

# **Bedeutung der Mesangialzellen für die Struktur und Funktion des Glomerulums**

**Eine intravitale Studie anhand des Anti-Thy1.1  
Antikörpermodells**

von Vera Maria Barbara Ziegler

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Bedeutung der Mesangialzellen für die Struktur und  
Funktion des Glomerulums**

**Eine intravitale Studie anhand des Anti-Thy1.1 Antikörpermodells**

von Vera Maria Barbara Ziegler

aus Regensburg

München 2020

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Institut für Tierpathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. R. Wanke

Angefertigt am Institut für Physiologie der Universität Regensburg

Mentor: Univ.-Prof. Dr. H. Castrop

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-  
Maximilians-Universität München

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Niere – Anatomie und Physiologie.....	1
1.2	Mesangialzellen.....	1
1.2.1	Funktionen der Mesangialzellen .....	3
1.2.1.1	Kommunikation und Verankerung im Glomerulum.....	3
1.2.1.2	Synthese von Zytokinen .....	4
1.2.1.3	Synthese mesangialer Matrix.....	4
1.2.1.4	Fähigkeit zur Kontraktion .....	4
1.2.1.5	Phagozytose .....	5
1.2.2	Regulation der Proliferation der Mesangialzellen.....	5
1.3	Das Anti-Thy1.1 Antikörpermodell.....	6
1.3.1	Physiologische Relevanz des Thy-1 Antigens .....	7
1.3.2	Spezifität des Anti-Thy1.1 Antikörpers.....	7
1.3.3	Lyse der Mesangialzellen .....	9
1.3.4	Klinische Relevanz des Anti-Thy1.1 Antikörpermodells .....	10
1.4	Physiologische Ausscheidung von Protein .....	11
1.4.1	Pathophysiologie der Proteinurie .....	11
1.4.2	Glomeruläre Filtrationsbarriere .....	13
1.5	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) .....	15
1.5.1	Angiotensin II Rezeptoren der Mesangialzellen.....	15
1.5.2	Akute Effekte von Angiotensin II im Glomerulum.....	16
1.6	Multiphotonenmikroskopie .....	16
1.6.1	Prinzipien der Multiphotonenmikroskopie .....	16
1.6.2	Vorteile der Multiphotonenmikroskopie .....	17
2	Fragestellung.....	19
3	Material.....	21
3.1	Geräte.....	21
3.2	Verbrauchsmaterial.....	22
3.3	Antikörper .....	22
3.4	Chemikalien, Pharmazeutika und Kits.....	23
3.5	Software .....	23
4	Methoden.....	25
4.1	Versuchstiere.....	25
4.1.1	Munich Wistar Froemter Ratten .....	25
4.1.2	Haltung der Versuchstiere.....	25
4.2	Untersuchung der Nierenfunktion mit Hilfe der Multiphotonenmikroskopie.....	25
4.2.1	Applikation und Dosierung des Anti-Thy1.1 Antikörpers.....	25
4.2.2	Vorbereitung der Versuchstiere.....	26

4.2.3	Operation der Versuchstiere .....	26
4.2.4	Blutdruckmessung.....	26
4.2.5	Vorbereitung und Dosierung von AngII, NA und NaCl .....	27
4.2.6	Multiphotonenmikroskopie .....	27
4.2.6.1	Eigenschaften, Vorbereitung und Dosierung der Farbstoffe zur Visualisierung der Mesangialzellen und zur Ermittlung der funktionellen Parameter.....	27
4.2.7	Bestimmung funktioneller Parameter der Nierenfunktion.....	29
4.2.7.1	Glomerulärer Siebkoeffizient für Albumin .....	29
4.2.7.1.1	Messeinstellungen für die Bestimmung des Siebkoeffizienten von Albumin	30
4.2.7.1.2	Experimentelle Ermittlung des Siebkoeffizienten für Albumin.....	31
4.2.7.2	Glomerulärer Filtrationsrate des Einzelnephrons.....	33
4.2.7.3	Glomeruläre kapillare Flussgeschwindigkeit.....	34
4.2.7.4	Visualisierung der durch Angiotensin II bedingten Bewegung der Kapillaren im Glomerulum .....	36
4.2.8	Vermessung des Umfangs der Kapillaren und der Gesamtfläche im Glomerulum .	36
4.3	Histologische Methoden .....	37
4.3.1	Retrograde arterielle Perfusions-Fixierung .....	37
4.3.2	Einbetten der Niere in Paraffin und Anfertigen von Paraffinschnitten.....	38
4.3.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	38
4.3.4	Immunfluoreszenzfärbung .....	39
4.3.5	Lichtmikroskopie .....	40
4.3.6	Konfokale Mikroskopie.....	40
4.3.7	Transmissionselektronenmikroskopie .....	40
4.3.7.1	Einbettung und Vorbereitung der Proben .....	40
4.3.7.2	Analyse der Veränderungen der Podozyten nach dem Verlust der Mesangialzellen.....	41
4.3.7.3	Vermessung der Breite der Fenestrae .....	42
4.3.7.4	Dicke der glomerulären Basalmembran.....	43
4.4	Quantifizierung der Albuminausscheidung im Urin .....	43
4.4.1	Uringewinnung .....	43
4.4.2	Messung der Osmolarität.....	44
4.4.3	Proteinanalyse mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese ....	44
4.4.4	Albumin-ELISA .....	44
4.5	Serumgewinnung .....	45
4.6	Statistische Auswertung.....	45
5	Ergebnisse .....	47
5.1	Funktionelle Untersuchungen zum Einfluss von Mesangialzellen auf die glomeruläre Hämodynamik .....	47
5.1.1	Der Einfluss der Mesangialzellen auf den Siebkoeffizient von Albumin .....	47

5.1.2	Der Einfluss der Mesangialzellen auf die glomeruläre Filtrationsrate des Einzelneurons .....	49
5.1.3	Der Einfluss der Mesangialzellen auf die kapillare Flussgeschwindigkeit und den kapillaren Fluss im Glomerulum.....	50
5.1.4	Einfluss der Mesangialzellen auf die Oberfläche der Kapillaren sowie auf die Gesamtfläche der Kapillaren .....	53
5.1.5	Angiotensin II bedingte Bewegung der glomerulären Kapillaren .....	53
5.2	Histologische Untersuchungen der strukturellen Veränderung nach Anti-Thy1.1 bedingter Lyse der Mesangialzellen.....	56
5.2.1	Struktureller Vergleich mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	56
5.2.2	Verbreiterung der glomerulären Kapillaren nach Lyse der Mesangialzellen.....	57
5.2.3	Immunhistologischer Vergleich.....	58
5.2.3.1	Nachweis der Erhöhung der Albuminausscheidung nach Lyse der Mesangialzellen.....	58
5.2.3.2	Einfluss der mesangialen Lyse auf die endotheliale Glykokalyx .....	60
5.2.3.3	Immunhistologischer Nachweis der Spezifität des Anti-Thy1.1 Antikörpers.....	61
5.2.3.4	Verteilung des Anti-Thy1.1 Antikörpers im Glomerulum und dessen Einfluss auf Endothelzellen.....	62
5.2.3.5	Einfluss der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse von Mesangialzellen auf die Podozyten.....	63
5.2.4	Untersuchung der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse der Mesangialzellen mittels Transmissionselektronenmikroskop .....	65
5.2.4.1	Auswirkung der mesangialen Lyse auf die Basalmembran.....	68
5.2.4.2	Auswirkungen der mesangialen Lyse auf die Konformation der Podozyten .....	68
5.2.4.3	Auswirkungen der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse der Mesangialzellen auf das fenestrierte Endothel .....	70
5.2.4.4	Elektronenmikroskopische Untersuchung des proximalen und distalen Tubulus.....	71
5.3	Auswirkung der mesangialen Lyse auf die Zusammensetzung des Urins.....	73
5.3.1	Osmolarität.....	73
5.3.2	Quantifizierung der Albuminausscheidung mit Hilfe einer SDS-PAGE.....	74
5.3.3	Quantifizierung der Albuminausscheidung mit Hilfe des Albumin-ELISA .....	76
5.4	Auswirkung der mesangialen Lyse auf die Zusammensetzung des Serums .....	77
6	Diskussion.....	79
6.1	Spezifität des Anti-Thy1.1 Antikörpers.....	79
6.2	Akute Effekte von AngII und NA auf die Albuminfiltration .....	79
6.3	Auswirkungen der mesangialen Lyse auf den glomerulären Siebkoeffizient .....	80
6.3.1	Folgen der mesangialen Lyse für die glomeruläre Filtrationsbarriere .....	81
6.3.2	Auswirkungen der vermehrten Albuminfiltration auf das Tubulussystem .....	83
6.4	Akute Effekte von AngII und NA auf die snGFR.....	84
6.4.1	Steuerung der snGFR durch die Mesangialzellen.....	84
6.5	Akute Effekte auf von AngII und NA auf den glomerulären Blutfluss .....	85

6.5.1	Steuerung der kapillaren Flussgeschwindigkeit und des kapillaren Flusses durch die Mesangialzellen.....	86
6.6	Nachweis einer durch Mesangialzellen bedingten glomerulären Bewegung.....	86
7	Zusammenfassung.....	89
8	Summary .....	91
9	Literaturverzeichnis.....	93
10	Abbildungsverzeichnis.....	103
11	Danksagung .....	105

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ALT	Alanin Aminotransferase
AngII	Angiotensin II
AP1	Aktivatorprotein 1
$\alpha$ SMA	alpha smooth muscle actin
AST	Aspartat Aminotransferase
AT1/AT2	Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1 bzw. 2
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCL21	Chemokin Ligand 21
CD 55	complement decay acceleration factor
cm	Centimeter
Crry	complement receptor related gen Y protein
CDK4	cyclin dependent Kinase 4
Cy2	Carbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
d	Tag
ELISA	Enzyme linked Immunosorbant Assay
et. al	und andere
ET-1	Endothelin 1
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
GSC <sub>A</sub>	Glomerular sieving coefficient
h	Stunde

IL 1/6	Interleucin 1/6
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
i. v.	intravenös
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
kDa	Kilodalton
l	Liter
LSM	Laser scanning microscope
LY	Lucifer yellow
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mCRPs	membranständige Komplementregulatorische Proteine
MHz	Megahertz
min	Minute
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mW	Megawatt
MWF	Munich Wistar Froemter
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PDGFR $\beta$	Platelet derived growth factor receptor beta

pRb	Retinoblastom Protein
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Ras	Rat sarcoma
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SHG	Second Harmonic Generation
snGFR	Single nephron glomerular filtration rate
TGFβ	Transforming growth factor beta
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
V	Volt
Vol%	Volumenprozent
WGA	Wheat germ agglutinin
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
%	Prozent



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Niere – Anatomie und Physiologie

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ, das sich retroperitoneal im Abdomen befindet. Bei der Ratte befindet sich die rechte Niere vollständig im intrathorakalen Abschnitt der Bauchhöhle, während die linke Niere etwas weiter caudal liegt. Ebenso wie die menschliche Niere ist auch die Rattenniere in eine äußere Nierenrinde und ein inneres Nierenmark sowie ein Nierenbecken gegliedert (Achilles W. et al. 2005).

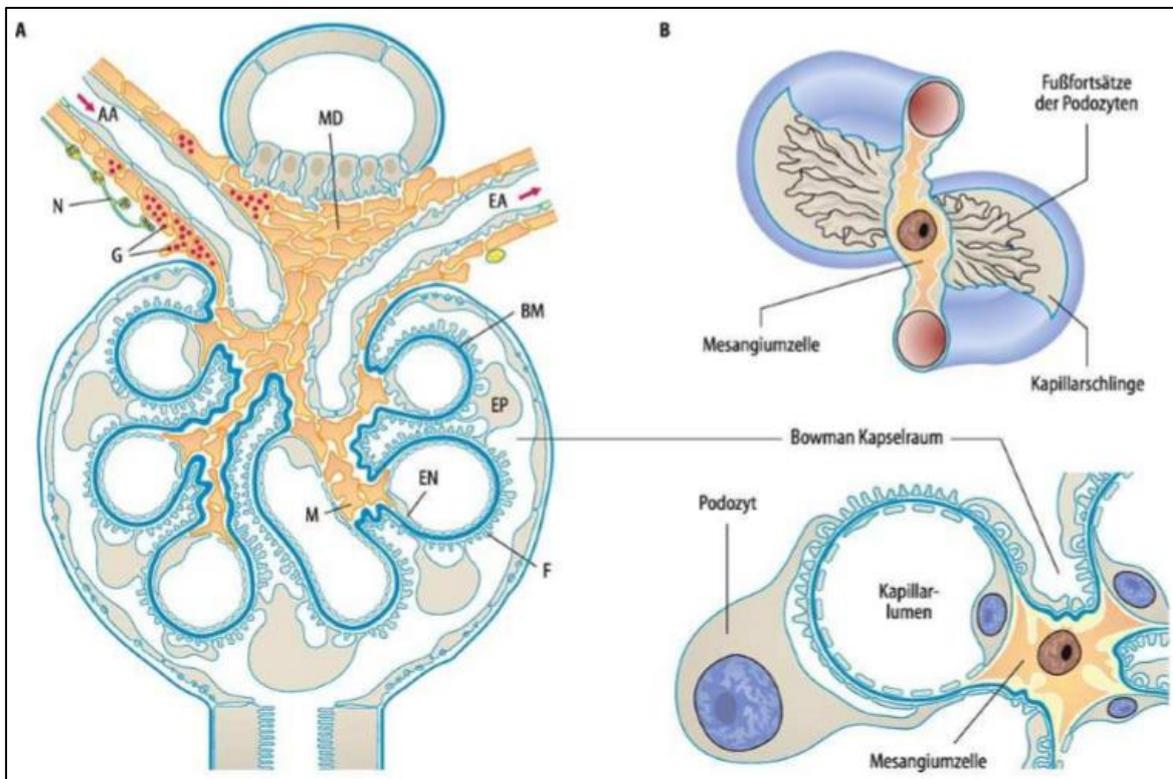
Zu den Hauptaufgaben der Niere gehören die Ausscheidung von harnpflichtigen Stoffwechselprodukten, wie beispielsweise Kreatinin, Harnsäure oder Harnstoff über den Urin sowie die Konservierung oder Rückresorption von Substanzen, die dem Körper erhalten bleiben sollen. Sie reguliert außerdem den Wasser- und Elektrolythaushalt und sorgt für ein Gleichgewicht des Säure-Base-Haushaltes. Darüber hinaus besitzt die Niere endokrine Funktionen, wie beispielsweise die Synthese der Hormone Calcitriol, Erythropoetin sowie Renin (Aurich et al. 2010).

Das Nephron ist die kleinste funktionelle Einheit der Niere. Es setzt sich aus dem sogenannten Glomerulum und einem anschließenden Tubulussystem zusammen. Das Glomerulum besteht aus einem Kapillarknäuel, welches zwischen afferenter und efferenter Arteriole liegt. Dieses Kapillarknäuel ist von der sogenannten *Bowman-Kapsel* und dem dazwischen gelegenen *Bowman-Raum* umgeben. Das Kapillarlumen ist vom *Bowman-Raum* durch eine dreischichtige Filtrationsbarriere mit unterschiedlichen größen- und ladungsselektiven Eigenschaften getrennt. Mit Hilfe dieser Filtrationsbarriere können Blutzellen, Plasmaproteine und andere Substanzen in Abhängigkeit von ihrer Größe und Ladung zurückgehalten werden. Das Plasma und die darin gelösten, frei filtrierbaren Stoffe gelangen über diese Barriere hindurch in den *Bowman-Raum* und bilden dort den Primärharn. Im anschließenden Tubulussystem wird durch abwechselnde Resorption und Sekretion der Sekundärharn gebildet. Der proximale Teil des Tubulus ist hauptverantwortlich für die Resorption niedermolekularer Stoffe wie Glukose und kleineren Proteinen. Der Sekundärharn wird mittels Sammelrohren ins Nierenbecken und über den Ureter in die Harnblase geleitet. Von dort aus wird er über die Harnröhre ausgeschieden (Klinke et al. 2005; Aurich et al. 2010).

## 1.2 Mesangialzellen

Die Mesangialzellen sind hoch spezialisierte Zellen im Glomerulum und für dessen Struktur und Funktion verantwortlich. Gemeinsam mit der von ihnen synthetisierten mesangialen Matrix bilden sie das sogenannte Mesangium. Bei der mesangialen Matrix handelt es sich um mesenchymales

Bindegewebe, das mit der Basalmembran in Kontakt steht. Die Mesangialzellen selbst sind spindelförmig und enthalten Myofibrillen, welche die kontraktile Eigenschaften dieser Zellen bedingen. In Abhängigkeit ihrer Lage lassen sie sich in extra- und intraglomeruläre Mesangialzellen einteilen (Liebich und Budras 2010).



**Abbildung 1: Aufbau des Glomerulums:** (Schmidt et al. 2011) A: Am Gefäßpol befindet sich die afferente Arteriole (AA), die von sympathischen Nervenfasern (N) versorgt wird sowie die efferente Arteriole (EA). Dazwischen liegt ein spezielles, distales Tubulus Segment, die sogenannte Macula Densa. Die Kapillarschlingen werden von den Endothelzellen (EN) im Glomerulum gebildet. Die Filtrationsbarriere weist einen dreischichtigen Aufbau auf: zusätzlich zu den Endothelzellen sind die glomerulären Basalmembran (BM) und die daran anschließenden Podozyten (EP) mit ihren Fußfortsätzen (F) für die Intaktheit dieser Barriere verantwortlich. Die Mesangialzellen (M) wurden orange dargestellt. Während sich die intraglomerulären Mesangialzellen im Glomerulum selbst befinden, liegen die extraglomerulären Mesangialzellen (MD) unterhalb der Macula Densa. B: Schematische Darstellung der Mesangialzellen im Glomerulum. Mesangialzellen sorgen für den strukturellen Zusammenhalt der glomerulären Kapillaren und bilden das glomeruläre Grundgerüst.

Die extraglomerulären Mesangialzellen werden auch als *Goormaghtigh-Zellen* oder *Lacis-Zellen* bezeichnet. Sie liegen im Bereich des Nierenpols und verbinden sich netzartig mit der *Macula Densa* und den intraglomerulären Mesangialzellen (Liebich und Budras 2010).

In der folgenden Studie wurde hauptsächlich auf die funktionellen und strukturellen Eigenschaften der Mesangialzellen im Glomerulum eingegangen.

### 1.2.1 Funktionen der Mesangialzellen

Die Mesangialzellen erfüllen unterschiedliche Funktionen im Glomerulum. Sie sind für die strukturelle Intaktheit des Glomerulums verantwortlich und besitzen außerdem die Fähigkeit zur Kontraktion, womit sie Einfluss auf die glomeruläre Filtration nehmen (Schlöndorff 1987, 1996).

#### 1.2.1.1 Kommunikation und Verankerung im Glomerulum

Mesangialzellen bilden gemeinsam mit der mesangialen Matrix das Grundgerüst im Glomerulum und stabilisieren die glomeruläre Basalmembran. Außerdem verankern sie die Kapillarschlingen im Glomerulum und sind für deren Ausbildung und Erhalt verantwortlich. Während der Glomerulogenese ist die Entwicklung der Mesangialzellen eng mit der Entwicklung der Endothelzellen verknüpft. Studien haben gezeigt, dass ein mangelnde *platelet-derived-growth-factor-beta* (PDGF $\beta$ ) Produktion der Endothelzellen, ebenso wie ein Defekt des *platelet-derived-growth-factor-receptor-beta* (PDGFR- $\beta$ ) der Mesangialzellen zu einer mangelnden Ausbildung der Mesangialzellen sowie zu einer verbreiterten Malformation der glomerulären Kapillaren führt (Schlöndorff 1996; Kurihara und Sakai 2017). Das Wachstumshormon PDGF $\beta$  ist nicht nur mitverantwortlich für die Proliferation der Mesangialzellen, sondern ist auch an der zellulären Kommunikation zwischen den Mesangialzellen und den Endothelzellen im Glomerulum beteiligt. Ebenso beeinflusst der Wachstumsfaktor Angiopoietin-1, der von den Mesangialzellen produziert wird, die Endothelzellen. Ein Verlust von Angiopoietin-1 führt zu einer verminderten Integrität der Filtrationsbarriere (Dimke et al. 2015).

Eine Kommunikation findet jedoch auch mit anderen Zellen des Glomerulums statt. Mesangialzellen kommunizieren beispielsweise über den *CD47-signal-inhibitory-regulatory-protein- $\alpha$*  (SIRP $\alpha$ ) Signalweg mit den Podozyten. Das transmembrane Glykoprotein SIRP $\alpha$  ist in der Schlitzmembran zwischen den Podozytenfußfortsätzen lokalisiert. CD47 ist ein Ligand für SIRP $\alpha$  und befindet sich in der Plasmamembran der Mesangialzellen. In der Studie von Kurihara et al. konnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg für pathologische Geschehen im Glomerulum von großer, funktioneller Bedeutung ist (Kurihara et al. 2010). Zusätzlich kommunizieren die Mesangialzellen auch über diverse Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise *Endothelin-1* (ET-1), *Chemokin Ligand 21* (CCL21), PDGF $\beta$  und *transforming-growth-factor-beta* (TGF $\beta$ ), mit den Podozyten (Dimke et al. 2015).

Zwischen den extra- und den intraglomerulären Mesangialzellen sind sogenannte *Gap junctions* ausgebildet, welche aus mehr als 20 verschiedenen Connexinen bestehen. Diese ermöglichen mit Hilfe von Calcium Signalen eine direkte Kommunikation zwischen den Mesangialzellen. Somit ist es den Mesangialzellen möglich, Informationen schnell zu übertragen und als funktionelles Synzytium zu agieren (Yao et al. 2002; Oite 2011).

### 1.2.1.2 Synthese von Zytokinen

In vitro konnte gezeigt werden, dass Mesangialzellen eine Vielzahl an Zytokinen produzieren, darunter unterschiedliche Entzündungs- und Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ , PDGF und *basic fibroblast growth factor* (bFGF). Diese Faktoren haben eine autokrine Wirkung auf die Mesangialzellen. Sie können jedoch ebenso von anderen Zellen, wie beispielsweise aktivierten Makrophagen, produziert werden und parakrin auf die Mesangialzellen wirken (Cove-Smith und Hendry 2008). In einer adulten, gesunden Niere ist die mesangiale Synthese von Zytokinen relativ gering. Bei Patienten mit Glomerulonephritis tritt jedoch eine verstärkte Synthese von Zytokinen und äquivalenten Rezeptoren der Mesangialzellen auf. Diese Ausschüttung triggert die Entzündung und führt zu einer Proliferation der Mesangialzellen sowie zu einer verstärkten Synthese mesangialer Matrix (Sterzel et al. 1993).

### 1.2.1.3 Synthese mesangialer Matrix

Die Synthese mesangialer Matrix gehört ebenfalls zu den Aufgaben der Mesangialzellen. Der Wachstumsfaktor TGF $\beta$  stimuliert die Bildung extrazellulärer Matrix. Andere Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise PDGF sowie Zytokine und hohe Blutglukosespiegel, führen über TGF $\beta$  ebenfalls zu einer verstärkten Synthese mesangialer Matrix. Physiologisch dient diese der mechanischen Verankerung der Zellen, unterstützt den glomerulären Spalt und beeinflusst die Proliferation der Mesangialzellen. Gerät die Synthese jedoch aus dem Gleichgewicht, entwickelt sich eine Glomerulosklerose (Thaiss und Stahl 2000; Cove-Smith und Hendry 2008).

### 1.2.1.4 Fähigkeit zur Kontraktion

Mesangialzellen besitzen ein Zytoskelett aus Aktin-, Myosin-, Tropomyosin- und alpha-Aktinfilamenten, welches sie zudem mit der Basalmembran verbindet. Diese Myofibrillen bilden die strukturelle Grundlage der Mesangialzellen und befähigen sie zur Kontraktion (Drenckhahn D. et al. 1990). In verschiedenen Studien konnte die Kontraktilität der Mesangialzellen bereits belegt werden. Die vasoaktiven Substanzen AngII, Arginin und Vasopressin führen, ebenso wie cAMP, zu einer mikroskopisch sichtbaren Kontraktion isolierter Mesangialzellen (Ausiello et al. 1980; Singhal et al. 1986; Schlöndorff 1987). In vivo haben die Mesangialzellen durch ihre Myofibrillen einen direkten Kontakt zur Basalmembran. Es wird angenommen, dass sie durch Kontraktion die Geometrie des Kapillarbetts und damit den kapillären Fluss sowie die glomeruläre Filtration verändern können (Schlöndorff 1987). Ihr funktioneller Einfluss auf die glomeruläre Filtration des Einzelneurons konnte bereits mit Hilfe von Mikropunktionsstudien gezeigt werden (Blantz et al. 1993).

### 1.2.1.5 Phagozytose

Die Fähigkeit zur Phagozytose stellt eine weitere Eigenschaft einiger Mesangialzellen dar. Die dabei entstehenden Vesikel enthalten Makromoleküle sowie Immunkomplexe (Cove-Smith und Hendry 2008; Liebich und Budras 2010). Somit können die Mesangialzellen sowohl Moleküle aus dem Kapillarlumen aufnehmen als auch den glomerulären Filter reinigen. Diese Phagozytose von Makromolekülen wird bei der Darstellung der Mesangialzellen mittels intravitaler Mikroskopie genutzt. Mesangialzellen nehmen den infundierten Farbstoff *Lucifer Yellow* (LY) auf und sind bereits nach wenigen Minuten als grün leuchtende Zellen intravital darstellbar (Schießl et al. 2016).

### 1.2.2 Regulation der Proliferation der Mesangialzellen

Die Proliferation der Mesangialzellen ist in einer gesunden, erwachsenen Niere sehr gering und lediglich für den kontinuierlichen Ersatz apoptotischer Zellen zuständig. Bei einer Glomerulopathie wie beispielsweise der Glomerulonephritis kann es hingegen zu einer Vermehrung der Mesangialzellen und zu einer verstärkten Synthese der mesangialen Matrix kommen. Eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise PDGF, TGF $\beta$  und IL1, stimulieren über unterschiedliche Signalkaskaden diese Proliferation der Mesangialzellen (Sterzel et al. 1993; Thaiss und Stahl 2000; Chin et al. 2001; Cove-Smith und Hendry 2008).

Der Wachstumsfaktor PDGF induziert die Proliferation der Mesangialzellen und führt zusätzlich über TNF $\alpha$  zu einer vermehrten Synthese mesangialer Matrix. Dabei bindet PDGF zunächst an den PDGF Rezeptor, einen Tyrosin-Kinase-Rezeptor in der Zellmembran der Mesangialzellen. Dies hat eine Aktivierung unterschiedlicher Effektoren, mitunter des G-Proteins rat sarcoma (Ras), zur Folge. Über eine Transduktionskaskade gelangt das Signal in den Zellkern. Dort werden unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise E2F und *Aktivatorprotein-1* (AP-1), aktiviert. Der Transkriptionsfaktor AP-1 führt wiederum zu einer Aktivierung zahlreicher Zielgene, wie etwa *Cyclin D1*. Dieses ist mit der *associated-cyclin-dependent-kinase* (CDK4) verknüpft. CDK4 reguliert den Übergang von Zellen aus der G0- in die G1-Phase und damit die Proliferation der Zellen. (Cove-Smith und Hendry 2008). In einer gesunden Niere wird CDK4 mit Hilfe des CDK4 Inhibitor p27<sup>kip1</sup> blockiert, der unter anderem von Mesangialzellen exprimiert wird. Sinkt die Konzentration von p27<sup>kip1</sup> ab, kommt es zunächst zu einer verstärkten Proliferation der Mesangialzellen und einer Überexpression der mesangialen Matrix. Ein solcher Effekt ist bei einer proliferativen Glomerulonephritis zu beobachten. Gleichzeitig ist p27<sup>kip1</sup> auch an der Regulation der Apoptose beteiligt. Das Ausbleiben oder eine zu geringe Konzentrationen des p27<sup>kip1</sup> bedingt eine Apoptose der Mesangialzellen (Marshall und Shankland 2006). Des Weiteren führen die Verbindung von *Cyclin D1* mit CDK4 über eine Phosphorylierung des *Retinoblastom Proteins* (pRb) zu einer

verstärkten Expression von Proteinen, die für den Zellzyklus in der Proliferation benötigt werden (Cove-Smith und Hendry 2008).

Zusätzlich zu den Wachstumsfaktoren besitzen auch Calcium Kanäle in der Zellmembran der Mesangialzellen einen erheblichen Einfluss auf deren Zellzyklus. Das Calcium bindende Protein *Calmodulin* reguliert den Zellzyklus und somit auch die Proliferation der Mesangialzellen (Cove-Smith und Hendry 2008).

### 1.3 Das Anti-Thy1.1 Antikörpermodell

Im Jahre 1986 beschrieben Bagchus et al. erstmals eine Lyse der Mesangialzellen nach intravenöser Applikation des monoklonalen Anti-Thy1.1 Antikörpers bei Wistar Ratten (Bagchus et al. 1986). Seither wurde dieses Modell in zahlreichen, unabhängigen Studien erfolgreich verwendet, um Mesangialzellen in situ zu depletieren (Yamamoto et al. 1991; Blantz et al. 1993; Mosley et al. 2000; Tuffin et al. 2005; Kato et al. 2013a).

Grundsätzlich kommt es durch die Applikation des Antikörpers bereits nach 15 Minuten zu einer Schädigung und anschließenden Lyse der Mesangialzellen. Je nach Literaturangaben sind 72–95 % (Yamamoto und Wilson 1987; Kurihara und Sakai 2017) der Mesangialzellen davon betroffen. Durch die Lyse der Mesangialzellen kommt es zur verminderten Stabilisierung der glomerulären Kapillaren und folglich zu deren Erweiterung. Diese Aufweitung nimmt innerhalb der ersten 72 Stunden zu, sodass der Effekt auch als „Balloon-like“ Glomerulum bezeichnet wird (Yamamoto und Wilson 1987; Kurihara und Sakai 2017). Gleichzeitig beginnt am dritten Tag die Proliferation der Mesangialzellen und lässt deren Zellzahl bis zum fünften Tag rasch ansteigen. Die proliferierenden Zellen besitzen, im Gegensatz zu den ausdifferenzierten Mesangialzellen, kein Thy-1 Antigen auf ihrer Zelloberfläche. Somit bleibt eine Lyse der Mesangialzellen bei einer abermaligen Antikörperinjektion innerhalb der ersten 5 Tage aus. Die ersten ausdifferenzierten Mesangialzellen treten nach 8 Tagen auf. Etwa einen Monat später sind die meisten Glomerula zu ihrem Ausgangszustand zurückgekehrt, wobei akkumulierte Kollagene in der mesangialen Matrix bestehen bleiben (Bagchus et al. 1990; Kurihara und Sakai 2017).

Bereits in den 90er Jahren wurde das Modell zur Untersuchung der funktionellen Eigenschaften von Mesangialzellen im Glomerulum verwendet. Damals konnte mit Hilfe von Mikropunktionsstudien der Einfluss von Mesangialzellen auf die Regulation der glomerulären Filtrationsrate gezeigt werden (Yamamoto et al. 1991; Blantz et al. 1993). Andere Studien wiesen außerdem eine Proteinurie nach der Lyse der Mesangialzellen nach und zeigten somit den Einfluss der Mesangialzellen auf die glomeruläre Filtrationsbarriere (Bagchus et al. 1986; Bagchus et al. 1990).

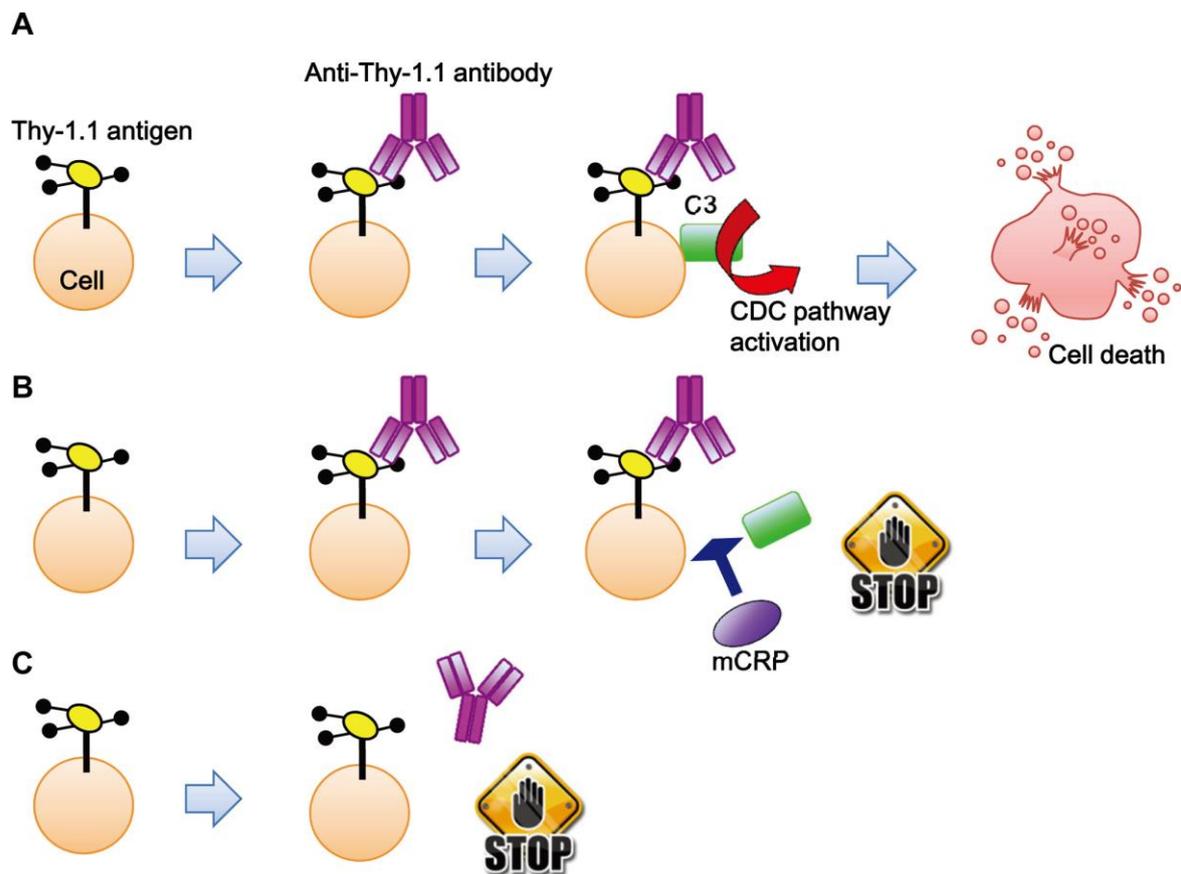
### 1.3.1 Physiologische Relevanz des Thy-1 Antigens

Das Thy-1 Antigen, auch bezeichnet als CD90, ist ein Glycosylphosphatidylinositol-verankertes Membranprotein, das von unterschiedlichen Zelltypen exprimiert wird. Im menschlichen Gewebe konnte es unter anderem in Thymozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Neuronen und T-Zellen nachgewiesen werden, wobei es bei Letzteren eine wichtige Rolle für deren Aktivierung spielt. Außerdem ist es an unterschiedlichen biologischen Prozessen, wie Adhäsion, Migration, Proliferation und Apoptose, beteiligt und daher ein Regulator der Zell-Zell sowie der Zell-Matrix Kommunikation (Rege und Hagood 2006). Im Wesentlichen besitzt das Antigen zwei unterschiedliche Allele, Thy1.1 und Thy1.2., wobei vor allem Ersteres im Gewebe von Ratten exprimiert wird. Das Antigen befindet sich sowohl bei Ratten als auch bei Menschen auf der Zelloberfläche der Mesangialzellen. Dadurch wird es zu einem spezifischen Marker für diese Zellen, jedoch wurde die genaue Funktion des Antigens in diesem Zusammenhang bisher noch nicht vollständig erforscht (Paul et al. 1984; Kurihara und Sakai 2017).

### 1.3.2 Spezifität des Anti-Thy1.1 Antikörpers

Das Thy1.1 Antigen kommt bei Ratten in unterschiedlichen Geweben und Organen vor. So konnte das Antigen in Organen wie der Leber, der Lunge und der Milz aber auch in nerven- und lymphatischen Geweben nachgewiesen werden. Am stärksten wird Thy1.1 jedoch in den mesangialen Zellen der Niere sowie in der Nebenniere exprimiert (Kato et al. 2013a).

Trotz dieser unspezifischen Verteilung des Antigens ist der Anti-Thy1.1 Antikörper in seiner Wirkung sehr spezifisch. Bereits nach wenige Minuten nach der Applikation kann der Antikörper in allen Mesangialzellen nachgewiesen werden. Vereinzelt bindet er jedoch auch an Lymphozyten im Thymus und medulläre Zellen der Nebenniere. Eine Bindung des Antikörpers führt jedoch nur bei den Mesangialzellen zu einer Aktivierung des Komplementsystems (Abbildung 2). Somit kann bei Mesangialzellen das Strukturprotein C3 bereits 30 Minuten nach der Applikation des Antikörpers nachgewiesen werden. Dies beweist eine komplementvermittelte Lyse der Mesangialzellen, wohingegen die anderen Zellen intakt bleiben (Kato et al. 2013a).



**Abbildung 2: Komplementbedingte Lyse der Mesangialzellen:** (Kato et al. 2013a) A: Die Bindung des Anti-Thy1.1 Antikörpers führt zu einer Aktivierung des Komplementsystems und folglich zur spezifischen Lyse der Zelle. Dies kommt nach Anti-Thy1.1 Applikation ausschließlich bei Mesangialzellen vor. B: Eine Bindung des Anti-Thy1.1 Antikörpers am Antigen findet statt, jedoch verhindern membranständige mCRPs die Aktivierung des Komplementsystems (z.B. Lymphozyten des Thymus und medulläre Zellen der Nebenniere). C: Die Zelle besitzt zwar ein Thy1.1 Antigen jedoch bindet der Anti-Thy1.1 Antikörper nicht daran und es erfolgt somit keine Lyse der Zelle (z.B. Stromazellen in Bronchiolen oder Stromazellen in den Gallengängen).

Der Grund dieser selektiven Lyse ist die organ- und zellspezifische Verteilung *membranständiger komplementregulatorischer Proteine* (mCRPs). Zu den mCRPs gehören unter anderem das Protein *complement-rezeptor-related-gen Y* (Crry) sowie der Oberflächenfaktor *complement-decay-accelerating-factor 55* (CD55). Sie führen zu einer Hemmung der C3 Konvertase und verhindern somit die Aktivierung des Komplementsystems sowie die komplementvermittelte Lyse (Fishelson et al. 2003; Kato et al. 2013b). Während die medullären Zellen der Nebenniere eine starke Expression von CD55 aufweisen, besitzen die Lymphozyten des Thymus eine deutliche Expression von Crry. Im Gegensatz dazu sind in der Niere kaum CRPs lokalisiert. Mesangialzellen besitzen lediglich eine sehr schwache Expression von Crry und exprimieren, im Gegensatz zu ihren benachbarten Podozyten, kein CD55. Daher führt die Bindung des Anti-Thy1.1 Antikörpers nur bei den Mesangialzellen zu einer komplementbedingten Lyse (Kato et al. 2013a; Kato et al. 2013b).

### 1.3.3 Lyse der Mesangialzellen

Durch die Applikation des spezifischen Anti-Thy1.1 Antikörpers erfolgt bei der Ratte eine Lyse der Mesangialzellen. Der genaue Ablauf dieser Lyse wird jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert (Rege und Hagood 2006).

Einige Autoren gehen von einer durch Anti-Thy1.1 induzierten Apoptose der Mesangialzellen aus. Sato et al. zeigten erstmals Hinweise auf einen durch Apoptose induzierten Zelltod. Dabei wiesen sie unter anderem die Dislokation des Phospholipids Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran nach. Ein Ereignis welches speziell während der Apoptose abläuft. Diese Dislokation führt zu einer Erkennung der Zellen durch Phagozyten sowie zur Aktivierung des Komplementsystems (Fadok et al. 1992; Sato et al. 1996). Zusätzlich deuten Doppelstrangbrüche sowie eine Kondensierung und Fragmentierung der DNA auf einen apoptotischen Zelltod hin (Morita et al. 1996; Sato et al. 1996).

Eine Elektronenmikroskopische Studie im Jahr 2000 zeigte allerdings, dass bei der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse der Mesangialzellen ebenso Hinweise auf nekrotische Prozesse bestehen. Zwar konnte auch hier eine Kondensierung der DNA etwa 30 Minuten nach Applikation des Antikörpers gezeigt werden, jedoch waren ebenso Merkmale einer Nekrose, wie der Verlust der Kernmembran, das Anschwellen des Zellkörpers und die Degeneration seiner Organellen, nachzuweisen. Die anschließende Lyse und der damit verbundene Austritt zellulärer Bestandteile in das Interstitium verursacht eine akute Entzündung und somit eine Aktivierung des Komplementsystems (Mosley et al. 2000).

Ungeachtet der Differenzierung zwischen Nekrose und Apoptose kommt es nach der Anti-Thy1.1 Applikation zur Aktivierung des Komplementsystems. Grundsätzlich können pathogene und infizierte Zellen über dieses System erkannt und eliminiert werden. Hierbei gibt es drei Wege zur Aktivierung des Komplementsystems: den klassischen Weg, den alternativen Weg und den Lektin Weg über die Registrierung von Mannoseresten auf Oberflächen (Alzheimer et al. 2005). Die Applikation des Antikörpers Anti-Thy1.1 führt zunächst zur Bildung des sogenannten C1 Komplexes. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex führt zu einer Aktivierung der C1/C1s Serinprotease und somit zur Induktion des klassischen Wegs. Hierbei spielt insbesondere das Strukturprotein C3 eine wichtige Rolle, dessen Ablagerung bereits 30 Minuten nach Anti-Thy1.1 Applikation in den Mesangialzellen sichtbar wird. Über eine Komplementkaskade kommt es schließlich zur komplementbedingten Zytotoxizität und zur Lyse der Mesangialzellen (Yamamoto T. und Wilson C. 1987; Kato et al. 2013a).

### 1.3.4 Klinische Relevanz des Anti-Thy1.1 Antikörpermodells

Mesangialzellen spielen insbesondere bei Glomerulopathien eine wichtige Rolle. Durch die spezifische und induzierbare Lyse der Mesangialzellen und deren anschließender Proliferation ist das Anti-Thy1.1 Antikörpermodell besonders für die Erforschung dieser Erkrankungen geeignet.

Grundsätzlich werden zwei unterschiedliche Formen der Glomerulopathien unterschieden. Zum einen die entzündliche Glomerulonephritis, welche sowohl primär als auch sekundär als Folge einer anderen Grunderkrankungen auftreten kann. Zum anderen die nicht entzündliche Glomerulosklerose, welche unter anderem bei Diabetes mellitus Patienten auftritt (Riede und Schaefer 2004).

Der Typ-2-Diabetes mellitus gehört inzwischen zu den häufigsten Einzelursachen für das Auftreten einer terminalen Niereninsuffizienz. Betroffene weisen oftmals eine sogenannte Mikroalbuminurie auf, welche mit einem erhöhten Risiko renaler und kardiovaskulärer Komplikationen einhergeht (Scherbaum und Ritz 2005; Wada et al. 2013). Im Rahmen einer solchen diabetischen Nephropathie kommt es – analog zum Anti-Thy1.1 Antikörpermodell – zur Lyse mesangialer Zellen. Der Verlust dieser Zellen führt zu einer Aufweitung der Kapillaren und zu einer Expansion der mesangialen Matrix (Saito et al. 1988). Eine solche Situation kann mit Hilfe des Anti-Thy1.1 Antikörpermodells künstlich bei einer Ratte induziert werden, um sowohl die Pathogenese als auch mögliche Therapieansätze genauer zu verstehen (Watanabe et al. 2011).

Die IgA-Nephritis ist die häufigste Form der primären Glomerulonephritis beim Menschen (Thaiss und Stahl 2000). Bereits vor 50 Jahren beschrieben Berger und Hinglais die histologischen Kriterien der IgA-Nephritis mit Hilfe von Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie (Berger und Hinglais 1968). Durch die Ablagerung von Immunglobulin A im Mesangium des Glomerulums kommt es – ebenso wie im Anti-Thy1.1 Antikörpermodell – zunächst zu einer Aktivierung des Komplementsystems und demzufolge zu einer Proliferation der Mesangialzellen und einer vermehrten Synthese mesangialer Matrix (Thaiss und Stahl 2000).

Auch in der Tiermedizin spielen entzündliche Glomerulopathien eine wichtige Rolle. Die membranoproliferative Glomerulonephritis ist durch eine Proliferation der Mesangialzellen und einer Zunahme an mesangialer Matrix gekennzeichnet. Man unterscheidet dabei zwei unterschiedliche Formen der Glomerulonephritis. Beim Hund ist die häufigste Form die Typ-1-Glomerulonephritis, welche über Immunkomplexe vermittelt wird. Sie tritt sowohl idiopathisch als auch sekundär, als Folge von Infektionen, entzündlichen Erkrankungen oder Endokrinopathien auf. Beim Berner Sennenhund ist ein autosomal rezessiver Erbgang verantwortlich für die Ablagerung von IgM Immunkomplexen und Komplementfaktoren, welche dann zu einer Typ-1-Glomerulonephritis führen. Die Typ-2-Glomerulonephritis ist bei Schaflämmern der finnischen

Landrasse beschrieben. Bei dieser Rasse führt ein autosomal rezessiver Erbgang zum Mangel des Komplementfaktors C3. Auf diese Weise kommt es zur verminderten Phagozytose von Immunkomplexen und somit zu deren Ablagerung im Glomerulum. Beide Formen der membranproliferativen Glomerulonephritis sind histologisch durch eine Proliferation der Mesangialzellen und eine Sklerosierung und Vermehrung der mesangialen Matrix gekennzeichnet (Baumgärtner 2007; Dahme und Hafner-Marx 2007; Suter et al. 2012).

Im Allgemeinen entwickelt sich als Folge eines mesangialen Zellverlustes und der Expansion von mesangialer Matrix häufig eine chronische Niereninsuffizienz. Geht eine chronische Niereninsuffizienz in ein terminales Nierenversagen über, so bleiben als lebensrettende Maßnahmen nur die Dialyse, beziehungsweise die Transplantation. Diese Maßnahmen werden jedoch fast ausschließlich in der Humanmedizin angewendet. In jedem Fall haben die betroffenen Patienten eine stark eingeschränkte Restlebenserwartung und hohen Leidensdruck.

Die intravitale Mikroskopie bietet die Möglichkeit, die funktionellen und hämodynamischen Eigenschaften von Mesangialzellen in vivo zu untersuchen. Somit kann ein besseres Verständnis über die Physiologie von Mesangialzellen entwickelt werden, welches entscheidend ist, um neue Therapieansätze für Betroffene zu entwickeln.

## **1.4 Physiologische Ausscheidung von Protein**

Trotz der glomerulären Filtrationsmechanismen gelangen auch bei einer gesunden Niere einige Gramm Albumin und kleinere Mengen niedermolekularer Proteine täglich in den Primärharn. Das filtrierte Protein gelangt zunächst in den proximalen Tubulus und bindet dort an *Megalin-Cubilin-Komplex-Rezeptoren* des Bürstensaums (Christensen und Birn 2001). Von dort wandert es an die Basis der Mikrovilli und wird über Endozytose ins Zellinnere resorbiert. Diese Endosomen verschmelzen anschließend mit Lysosomen und werden somit enzymatisch abgebaut. Auf diese Weise wird die Ausscheidung von Albumin im Endharn auf nur wenige Milligramm pro Tag reduziert (Gekle 2005; Klinke et al. 2005; Dickson et al. 2014).

### **1.4.1 Pathophysiologie der Proteinurie**

Grundsätzlich spricht man in der Humanmedizin bei einer Proteinausscheidung von mehr als 150 mg pro Tag von einer Proteinurie (Hofmann et al. 2001). Diese kann vielfältige Ursachen haben.

Bei einer sogenannten prärenalen Proteinurie liegt bereits im Plasma eine erhöhte Konzentration an niedermolekularen Proteinen vor. Somit kommt es zu einer verstärkten Filtration dieser Proteine und zur Überlastung des proximalen Tubulus. Eine weitere Form ist die sogenannte postrenale Proteinurie. Auch hier ist nicht eine Erkrankung der Niere ursächlich für die erhöhte

Proteinausscheidung, sondern Blutungen oder bakterielle Entzündungen unterschiedlicher Genese in den harnableitenden Wegen (Klinke et al. 2005).

Bei der renalen Proteinurie können sowohl Schäden im Glomerulum als auch im Tubulus vorliegen. Sie wird daher je nach Ursache in glomeruläre, gemischt glomerulär-tubuläre und tubuläre Proteinurie eingeteilt. Die glomeruläre Proteinurie ist durch eine Schädigung des glomerulären Filters gekennzeichnet. Dabei unterscheidet man die selektive Proteinurie, bei der durch eine veränderte Ladung des glomerulären Filters eine reine Albuminurie entsteht und die nicht selektive Proteinurie. Letztere ist durch eine Ausscheidung von Albumin sowie höhermolekularer Proteine, wie etwa IgG, gekennzeichnet. Dies deutet bereits auf strukturelle Schäden in der glomerulären Basalmembran hin und tritt häufig als Folge einer zunächst selektiven Proteinurie auf. Eine rein tubuläre Proteinurie tritt beispielsweise beim *Fanconi-Syndrom* sowie in Folge einer Blei-, Quecksilber- oder Cadmiumvergiftung auf. Durch Schäden an den Tubuluszellen können kleine, filtrierbare Proteine nicht mehr ausreichend rückresorbiert werden und es kommt zur vermehrten Ausscheidung von Albumin sowie  $\alpha_1$ - und  $\beta_2$ -Mikroglobulin. Liegen sowohl glomeruläre Schäden als auch Störungen des Interstitiums oder des Tubulussystems vor, spricht man von einer gemischten glomerulär-tubulären Proteinurie (Hofmann et al. 2001).

In der Humanmedizin wird die Albuminurie nochmals quantitativ unterschieden. Die sogenannte Mikroalbuminurie ist durch eine Albuminausscheidung von 20–299 mg pro Tag definiert. Diese geringgradige Erhöhung der ausgeschiedenen Albuminmenge zeigt bei den betroffenen Patienten ein erhöhtes Risiko für eine diabetische Nephropathie an und wird daher häufig als prognostischer Frühparameter bestimmt. Im Laufe der Erkrankung kann sich daraus eine Makroalbuminurie mit einer Albuminausscheidung von mehr als 300 mg pro Tag entwickeln (Dikow und Ritz 2003).

Eine vermehrte Filtration von Albumin ist jedoch nicht nur Folge eines Krankheitsgeschehens, sondern kann auch selbst zu entzündlichen, fibrotischen Umbauprozessen führen (Remuzzi 1995; Burton und Harris 1996; Remuzzi et al. 1997). In den Zellen des proximalen Tubulus kommt es physiologisch zur Endozytose und zum lysosomalen Abbau filtrierter Proteine. Eine vermehrte Filtration von Albumin führt jedoch zur Freisetzung von proinflammatorischen Proteinen und Wachstumsfaktoren, wie TNF $\alpha$  und TGF $\beta$  (Yard et al. 2001; Drumm et al. 2002). Zusätzlich kommt es zu einer Störung der kollagenen Homöostase. Als Folge dessen kann eine interstitielle Fibrose entstehen, die wiederum zu einer Niereninsuffizienz führt (Wohlfarth et al. 2003).

Auch ein Anti-Thy1.1 bedingter Verlust der Mesangialzellen führt zu einer Proteinurie. Dabei nimmt die Proteinausscheidung nach der Lyse innerhalb der ersten Woche zunächst deutlich zu. Anschließend reduziert sich die Proteinurie und kehrt nach zwei bis drei Wochen auf ein Normalniveau zurück. Eine solche Proteinurie wurde bereits von einigen Autoren beschrieben.

(Bagchus et al. 1986; Bagchus et al. 1990; Westerweel et al. 2012). Allerdings sind die Auswirkungen einer solchen Lyse auf die Integrität der Filtrationsbarriere und somit den glomerulären Siebkoeffizient bislang nicht verstanden.

Generell gilt die vermehrte Ausscheidung von Proteinen als Leitsymptom von Nierenerkrankungen unterschiedlicher Genese und gibt Hinweise auf einen Integritätsverlust der glomerulären Filtrationsbarriere. Dabei ist eine pathologisch erhöhte Proteinausscheidung im Urin nicht nur ein Symptom, sondern beschleunigt auch die Progression einer chronischen Niereninsuffizienz und verschlechtert damit die Langzeitprognose der betroffenen Patienten (Remuzzi und Bertani, 1998).

#### 1.4.2 Glomeruläre Filtrationsbarriere

Die glomeruläre Filtrationsbarriere setzt sich aus drei, eng miteinander verbundenen Komponenten, zusammen: dem fenestrierten Endothel, der glomerulären Basalmembran und den Podozyten (Jarad und Miner 2009).

Die erste Barriere bei der Ultrafiltration des Plasmas bilden die Endothelzellen. Speziell im Glomerulum bilden diese Zellen ein diskontinuierliches Endothel mit runden transzytoplasmatischen Aussparungen, den sogenannten Fenestrae aus. Sie haben physiologisch einen Durchmesser von 50–100 nm und machen etwa 20 % der endothelialen Oberfläche aus. Auf diese Weise werden Blutzellen sowie größere Plasmaproteine zurückgehalten. Von der Ausbildung dieser Fenestrationsen hängt unter anderem die glomeruläre Filtrationsrate ab (Haraldsson et al. 2008; Satchell, S., C. und Braet 2009; Menon et al. 2012). Zusätzlich befindet sich an der luminalen Seite des fenestrierten Endothels die Glykokalyx. Sie besteht aus negativ geladenen Glykoproteinen, Glykosaminoglykanen sowie membranassoziierten Proteoglykanen und sorgt somit für eine Ladungselektivität. Auf diese Weise können kleine, negativ geladene Moleküle, wie beispielsweise Albumin, mit einer Größe von 3,6 nm nur in einem geringen Ausmaß den Filter passieren. Eine Visualisierung der Glykokalyx ist jedoch noch immer schwierig, da sie durch die klassischen Methoden der Fixierung häufig dehydriert und damit zerstört wird (Haraldsson et al. 2008). In der Literatur sind daher unterschiedliche Angaben über die Dicke der Glykokalyx zu finden. Einige Autoren sprechen von einer physiologischen Dicke von etwa 250 nm andere von 500 nm und mehr (Vink und Duling 1996; Wiesinger et al. 2013). Generell kann diese Schicht der Filtrationsbarriere durch Erkrankungen unterschiedlicher Genese geschädigt werden. So führen beispielsweise Sepsis (Wiesinger et al. 2013), eine renale Ischämie (Ichikawa I. und Kon V. 1983) oder Diabetes mellitus-TypII (Siegmond-Schultze 2013) zu einem Integritätsverlust der Glykokalyx und folglich zu einer Proteinurie.

Die Basalmembran schließt an die Endothelzellen an und verbindet sie mit dem viszeralem Blatt der *Bowman-Kapsel*. Sie lässt sich grundsätzlich in drei Schichten einteilen: Die innerste Schicht ist dem Endothel zugewandt und wird als *Lamina rara interna* bezeichnet. An diese schließt eine elektronendichte Schicht, die sogenannte *Lamina densa*, an. Die äußerste Schicht wird als *Lamina rara externa* bezeichnet und ist der Epithelschicht zugewandt. Die Schichten bestehen aus Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Laminin, Kollagen IV, Nidogen sowie Proteoglycanen und werden hauptsächlich von den Endothelzellen synthetisiert. Zu einem kleinen Teil sind auch die Podozyten an der Synthese beteiligt, während die benachbarten Mesangialzellen die Basalmembran von ihren gefilterten Stoffen reinigen (Liebich und Budras 2010; Miner 2012).

Das viszerale Blatt der *Bowman-Kapsel* wird von Podozyten gebildet. Sie umgreifen mit ihren Fußfortsätzen die Außenseite der Kapillaren. Diese primären Fußfortsätze teilen sich weiter in sekundäre und tertiäre Fortsätze auf, wobei sie fingerartig miteinander verzahnt sind. Auf diese Weise entstehen Spalträume von etwa 25 nm, die von speziellen Zellverbindungen, den sogenannten Schlitzdiaphragmen, überbrückt werden. Auch die Oberfläche der Podozyten ist von einer negativ geladenen Glykokalyx überzogen, die gemeinsam mit dem Schlitzdiaphragma den letzten Teil der Filtrationsbarriere bildet. Bei einer Proteinurie kann häufig eine Verbreiterung der Fußfortsätze und damit ein Integritätsverlust des glomerulären Filters beobachtet werden (Liebich und Budras 2010; Menon et al. 2012).

Obwohl die Mesangialzellen nicht direkt an der Ausbildung der Filtrationsbarriere beteiligt sind, sorgen sie dennoch für eine Stabilisierung der Filtrationsbarriere (Haraldsson et al. 2008). Sie sind außerdem direkt oder indirekt über Mikrofibrillen mit der glomerulären Basalmembran verbunden und sorgen für die Reinigung des laminaren Filters. Außerdem können sie durch ihre kontraktile Eigenschaften Einfluss auf die Geometrie der gesamten Filtrationsbarriere nehmen (Sakai und Kriz 1987; Liebich und Budras 2010). Liegen Defekte in einer oder mehrerer Komponenten der Filtrationsbarriere vor, kommt es zu einer Proteinurie, die zu einem Nierenversagen bei betroffenen Patienten führen kann (Jarad und Miner 2009).

Chronische Nierenerkrankungen verlaufen häufig progredient, sodass es selbst nach Ausheilung der Grundursache bei betroffenen Patienten zu einer zunehmenden Verschlechterung der Nierenfunktion kommt. Die Ursachen hierfür sind vielfältig, häufig ist eine Aktivierung des *Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems* (RAAS) beteiligt. In der Klinik bietet daher eine Hemmung des RAAS eine wichtige Interventionsmöglichkeit zur Reduktion der Proteinurie bei betroffenen Patienten (Wenzel et al. 2003; Remuzzi et al. 2005).

## 1.5 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das RAAS ist physiologisch ein wichtiger Kreislauf, welcher den arteriellen Blutdruck sowie den Volumenhaushalt des Körpers reguliert.

Bei Absinken des renalen Arteriendrucks wird das proteolytische Hormon Renin aus den juxtaglomerulären Zellen der afferenten Arteriole freigesetzt. Dieses Hormon spaltet vom intrahepatisch synthetisierten *Angiotensinogen* das Peptid *Angiotensin I* ab. Durch weitere enzymatische Hydrolyse mittels *Angiotensin-Converting-Enzyme* (ACE) entsteht das eigentliche Effektorpeptid *Angiotensin II* (AngII) (Klinke et al. 2005). Zahlreiche Gefäße besitzen in ihrer glatten Muskulatur Rezeptoren für AngII. Dieses Peptid führt zu einer Vasokonstriktion der Gefäße und zu einer direkten Steigerung des Blutdrucks. Zusätzlich bewirkt AngII eine vermehrte Ausschüttung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Durch dieses Steroidhormon wird die Wasser- und Natriumresorption im distalen Tubulus gesteigert und somit das intravasale Volumen erhöht. Man spricht hier von langfristiger Blutdruckregulation (Aurich et al. 2010).

### 1.5.1 Angiotensin II Rezeptoren der Mesangialzellen

Grundsätzlich bindet das Effektorpeptid AngII an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Man unterscheidet hierbei die *Angiotensin II-Rezeptor-Subtyp 1* (AT1) und die *Angiotensin II-Rezeptor-Subtyp 2* (AT2) Rezeptoren. Nagetiere besitzen zusätzlich noch eine weitere Einteilung des AT1 Rezeptors in AT1a und AT1b Rezeptoren. Diese unterscheiden sich jedoch funktionell nicht voneinander (Castrop et al. 2010).

Eine Stimulation der AT1-Rezeptoren führt zu den typischen von AngII verursachten Effekten. Hierzu gehören die AngII bedingte Vasokonstriktion der Gefäße sowie die verstärkte Ausschüttung von Aldosteron. Außerdem unterdrückt eine Stimulation der AT1-Rezeptoren der juxtaglomerulären Zellen die Synthese und Ausschüttung von Renin und führt dadurch zu einem negativen Feedback auf das RAAS. Die AT2-Rezeptoren werden hingegen hauptsächlich während der fetalen Entwicklung exprimiert und verschwinden zum Großteil nach der Geburt. Die Effekte der verbleibenden AT2-Rezeptoren scheinen den klassischen AngII bedingten Effekten entgegenzuwirken (Sharma et al. 1998; Castrop et al. 2010).

Die Mesangialzellen besitzen hauptsächlich Rezeptoren vom Subtyp AT1a. Eine Bindung von AngII über die AT1a-Rezeptoren führt zu einer Aktivierung der *Phospholipase C* und folglich zur Veränderung des intrazellulären Calcium-Gehaltes der Mesangialzellen. (Ernsberger et al. 1992; Sharma et al. 1998; Ardaillou R. und Chansel D. 1993). Rezeptoren vom Subtyp AT2 sind im Glomerulum lediglich in den benachbarten Endothelzelle und Podozyten, nicht aber in den Mesangialzellen zu finden (Sharma et al. 1998).

### 1.5.2 Akute Effekte von Angiotensin II im Glomerulum

Bereits im Jahr 1940 konnten durch die Substitution von Renin der Einfluss des RAAS auf die Filtration von Proteinen gezeigt werden (Pickering und Prinzmetal 1940). Später konnte mit Hilfe von Mikropunktionsstudien eine AngII bedingte Erhöhung der Proteinfiltration bewiesen werden (Eisenbach und van Liew 1975; Blantz et al. 1993). AngII bewirkt jedoch nicht nur eine Erhöhung der Proteinfiltration, sondern hat über AT1-Rezeptoren auch einen direkten Einfluss auf die Mesangialzellen. Eine AngII bedingte Kontraktion der Zellen konnte in vitro mit Hilfe eines Silikonfilms dargestellt werden (Singhal et al. 1986). Die Ergebnisse aus Mikropunktionsstudien deuten darauf hin, dass Mesangialzellen für die AngII bedingte Reduktion der  $\text{snGFR}$  im Glomerulum verantwortlich sind (Blantz et al. 1993). Allerdings besitzen auch die glatten Muskelzellen der afferenten und efferenten Arteriole AT1-Rezeptoren (Sraer et al. 1989). Anhand isolierter Glomerula konnte eine AngII bedingte Kontraktion der Arteriolen gezeigt werden (Wilson 1986). Somit blieb bislang strittig, über welche Effekte AngII die glomeruläre Filtration moduliert.

Heute wird vor allem die Multiphotonenmikroskopie genutzt, um einen intravitalem Einblick in die Physiologie der Niere zu erhalten. Neben der Visualisierung struktureller Effekte kann diese Technik genutzt werden, um funktionelle Parameter der Niere zu messen. Dabei lassen sich beispielsweise der glomeruläre Siebkoeffizient für Albumin sowie die glomeruläre Filtrationsrate bestimmen (Tanner 2009; Schießl und Castrop 2013).

## 1.6 Multiphotonenmikroskopie

Bereits im Jahr 1931 beschrieb die Physikerin Maria Göppert-Mayer in ihrer Dissertation die theoretischen Grundlagen der 2-Photonenabsorption (Göppert-Mayer 1931). Heute ist die Multiphotonenmikroskopie besonders in der biomedizinischen Forschung von großer Bedeutung. Die am weitesten verbreitete Multiphotonenmikroskopie ist die 2-Photonenmikroskopie, welche auch in der intravitalem Mikroskopie ihre Anwendung findet.

Im Folgenden sollen zunächst die physikalischen Prinzipien der Multiphotonenmikroskopie und die sich daraus ergebenden Vorteile gegenüber einer konventionellen 1-Photonenmikroskopie erläutert werden.

### 1.6.1 Prinzipien der Multiphotonenmikroskopie

Grundsätzlich wird bei der Photonenmikroskopie ein Fluorophor mit Hilfe von Lichtenergie mit geeigneter Wellenlänge angeregt. Hierbei wird ein Elektron des Moleküls von dessen Grundzustand  $S_0$  auf ein höheres Energieniveau  $S_2$  angehoben. Von diesem strahlungsfreien  $S_2$  Zustand geht es im Anschluss unter Energieabgabe in den  $S_1$  Zustand über. Unter der Abgabe von Fluoreszenz fällt es schließlich auf seinen Grundzustand zurück. Es besteht also eine Differenz zwischen der Energie

des anregenden Photons und der Energie des abgegebenen Photons. Die zur Anregung verwendete Energie ist höher und somit auch kurzwelliger als die emittierte Fluoreszenzenergie. Diese Verschiebung der Wellenlängen wird *Stokes-Verschiebung* genannt und ist die Voraussetzung für die Fluoreszenzmikroskopie (Oheim et al. 2006).

Im Unterschied zur 1-Photonenmikroskopie wird bei der Multiphotonenmikroskopie ein Fluorophor nicht nur durch ein Photon, sondern durch zwei oder mehrere Photonen angeregt. Dabei teilt sich die Energie, die zuvor in einem Photon steckte, auf zwei beziehungsweise mehrere Photonen auf. Die Photonen der 2-Photonenmikroskopie besitzen daher eine doppelt so lange Wellenlänge. Um trotz halber Energie dennoch die zur Anregung benötigte Energie bereitzustellen, müssen beide Photonen gleichzeitig ankommen. Dies wird bei der Multiphotonenmikroskopie mit Hilfe eines non-linearen-Lasers und einer Pulsrate von etwa 100 MHz gewährleistet (Peter T. et al. 2000; Diaspro et al. 2006).

### 1.6.2 Vorteile der Multiphotonenmikroskopie

Die Multiphotonenmikroskopie besitzt im Vergleich zur 1-Photonenmikroskopie zahlreiche Vorteile: So ist die Wellenlänge der Lichtquelle im Vergleich zur 1-Photonenmikroskopie mindestens doppelt so groß. Dadurch wird eine tiefere Penetration des Gewebes und eine Verringerung der Streuung des Lichts erreicht. Dies ist besonders für die intravitale Mikroskopie entscheidend, da hier eine möglichst hohe Eindringtiefe die Voraussetzung für funktionelle Aufnahmen ist. Ein Weiterer Vorteil ist, dass ein Photon mit größerer Wellenlänge und niedrigerer Frequenz auch energieärmer ist und dadurch weniger Lichtschäden am narkotisierten Versuchstier verursacht. Zusätzlich wird das Ausbleichen der verwendeten Farbstoffe vermindert (Diaspro et al. 2006; Oheim et al. 2006). Die Multiphotonenmikroskopie ist zudem intrinsisch konfokal. Aufgrund der niedrigen Wahrscheinlichkeit, dass zwei Photonen gleichzeitig absorbiert werden und damit zu einer Anregung des Fluorophors führen, beschränkt sich die Erregung auf einen Femtoliter im Brennpunkt. Eine Lochblende, die ansonsten benötigt wird um ein scharfes Bild darzustellen, wird somit überflüssig (Diaspro et al. 2006).

Die Physiologie der Niere wurde bereits mit Hilfe intravitale Multiphotonenmikroskopie untersucht (Tanner 2009; Peti-Peterdi et al. 2016). Aufgrund der hohen Anschaffungskosten und der Komplexität der Methoden wird die intravitale Multiphotonenmikroskopie trotz ihrer immensen Vorteile noch immer selten praktiziert.



## 2 Fragestellung

Mesangialzellen besitzen eine zentrale Funktion im Glomerulum und sind außerdem bei der Entwicklung diverser Nierenerkrankungen beteiligt. Hierzu zählen unter anderem die diabetische Nephropathie, deren Prävalenz in den letzten Jahrzehnten zugenommen hat, sowie die IgA-Nephritis. Letztere zählt derzeit zur häufigsten Form der primären Glomerulonephritis und besitzt daher eine hohe klinische Relevanz.

In der vorliegenden Arbeit soll mit Hilfe der Multiphotonenmikroskopie erstmals die funktionelle Bedeutung der Mesangialzellen *in vivo* untersucht werden. Mesangialzellen besitzen Rezeptoren für Angiotensin II (AngII) und außerdem die Fähigkeit zur Kontraktion, welche bereits *in vitro* gezeigt werden konnte. Vor diesem Hintergrund soll folgende Hypothese überprüft werden:

*Mesangialzellen können durch ihren kontraktiven Phänotyp die Struktur im Glomerulum verändern und somit den glomerulären Blutfluss, sowie die Filtrationsrate des Einzelnephrons (snGFR) regulieren. Außerdem sind sie indirekt an der Aufrechterhaltung der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere beteiligt.*

Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte zunächst der funktionelle Einfluss von AngII auf die snGFR und den kapillaren Fluss im Glomerulum bestimmt werden. Im Anschluss sollten dieselben Messungen bei Anti-Thy1.1 behandelten Ratten durchgeführt werden. Falls die Mesangialzellen verantwortlich für die AngII bedingten Veränderungen sind, sollte eine AngII-Infusion nach Mesangiolyse einen veränderten oder keinen Einfluss auf die snGFR und den kapillaren Fluss haben. Um blutdruckbedingte Effekte zu erfassen, wurden analoge Versuche mit dem Vasokonstriktor Noradrenalin (NA) durchgeführt.

Des Weiteren sollte die Bedeutung der Mesangialzellen für die Integrität der Filtrationsbarriere ermittelt werden. Hierfür wurden zum einen die Auswirkungen einer mesangialen Lyse auf den glomerulären Siebkoeffizient für Albumin ( $GSC_A$ ) mit Hilfe der intravitalen Mikroskopie gemessen, und zum anderen wurden die sich ergebenden strukturelle Änderungen mit Hilfe immunhistologischer sowie elektronenmikroskopischer Aufnahmen analysiert.



### 3 Material

#### 3.1 Geräte

Produkt	
Chirurgische Instrumente	Fine Science Tools; Heidelberg
Computer	EliteDesk 800 G4 TWR, HP; Böblingen
Isofluran Verdampfer	Groppler Medizintechnik; Deggendorf
Kamera	AxioCam Mrm, Zeiss; Jena
Kühl- und Gefrierschränke	Hera Freeze, Thermo electron corporation; Langenselbold; Premium NoFrost, Liebherr; Biberach a.d. Riss
Laser	Chameleon Ultra-II Multiphoton-Laser; Coherent USA
Magnetrührer	MR80, Heidolph; Schwabach
Mehrkanalpipette	8-Kanäle, Sorenson, BioScience, Inc.; Murray USA
Microplate Reader	Tecan Sunrise; Schweiz
Mikroskop	Axio Observer Z1, Zeiss, Jena LSM 710, Zeiss; Jena
Mikrotom	Leica RM2265; Wetzlar
Narkosegas Absorber	Harvard Apparatus GmbH Holliston; Massachusetts USA
NDD Filter	ZEISS Reflektormodul 424931 AHF, Analysetechnik AG; Tübingen
OP Tischbeleuchtung	KL 1500 LCD, Schott; Mainz
Osmometer	Osmomat 030, Gonotec; Berlin
Perfusionspumpe	323, Watson Marlow; Wilmington USA
pH Meter	Digital pH-Meter, SevenCompact, Mettler; Gießen
Pipetten	Pipetman P2, P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson; Middleton USA
Pipettierhilfe Multipette E3	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy	ISB Integra Biosciences; Chur Schweiz
Ratten Operationstisch	08301, KE Med. Techn. Gerätebau; Pfaffing a.d. Attel
Schermaschine	Aeskulap, Braun; Melsungen
Schüttler	Rotamax, Heidolph; Schwabach
Silikonkautschuk Gießformen	Roth; Karlsruhe
Transmissionselektronenmikroskop	Zeiss 902; Jena
Ultramikrotom	Leica EM UC6; Wetzlar
Vortexgerät	USA REAX1, Heidolph; Schwabach
Waagen	Analysewaage H-20T, Mettler, Gießen; Wägetechnik Dürnberger; Obertraubling
Wärmeplatte	OTS40 Medite Medizintechnik; Burgdorf
Zentrifugen	Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg; NeoLab Migge GmbH; Heidelberg

### 3.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	
Centrifugal Devices 30 K	Pall Life Sciences; Ann Arbor, USA
Deckgläschen	Marienfeld; Lauda-Königshofen
Cups 2 ml, 5 ml	Eppendorf; Hamburg
Cups 1,5 ml	Roth; Dautphetal-Buchenau
Falcon Tube	Sarstedt 15ml, 50ml; Nümbrecht
Fettstift	Science Services; München
Handschuhe Nitril	Neolab; Heidelberg
Insulinspritzen	BD Medical, Le pont de Claix Cedex; Frankreich
Kanülen	Braun 22G, 20G; Melsungen
Microwell 96-Well Platte	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Sekundenkleber	UHU; Bühl/Baden
Serumröhrchen	Sarstedt; Nümbrecht
Objektträger	Thermo Scientific; Braunschweig
Wattestäbchen	DM; Karlsruhe

### 3.3 Antikörper

Zielantigene	
Thy1.1/CD90 (mouse)	Sino Biological; Chesterbrook, USA
Albumin (goat)	Abcam; Berlin
Podocin (rabbit)	IBL; Minneapolis, USA
Synaptopodin (goat)	Santa Cruze; Dallas, USA
$\alpha$ SMA (rabbit)	Abcam; Berlin
Cy2 (mouse, rabbit, goat)	Dianova; Hamburg
Cy5 (mouse, rabbit, goat)	Dianova; Hamburg

### 3.4 Chemikalien, Pharmazeutika und Kits

Produkt	
Albumin-ELISA	Immunology Consultants Laboratory, Inc.; Portland, OR, USA
Alexa Fluor 594 conjugate	Life Technologies GmbH; Darmstadt
Angiotensin II	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Augensalbe	Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer; Leverkusen
Coomassie Plus Assay Kit	Life Technologies; Carlsbad, USA
Dapi	Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA
DPX Mounting Medium	Sigma Alderich; Steinheim
Ethanol	Merck; Darmstadt
Fentanyl 0,1 mg/2 ml	Janssen; Neuss
Formaldehyd	Merck; Darmstadt
Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation; Glostrup, Dänemark
Heparin (5000 I.E./ml)	Roche; Mannheim
Hoechst 33342	Invitogen; Eugene, USA
Isofluran	Baxter; Höchststadt
Isopropanol	Merck; Darmstadt
Isotone NaCl-Lösung	Braun; Melsungen
Lucifer Yellow	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Mammalian Protein Extraction Kit	Life Technologies; Carlsbad USA
Mecain 10 mg/ml	PUREN Pharma GmbH; München
Methanol	Merck; Darmstadt
Midazolam 5 mg/ml	ROTEX-Medica; Trittau
Narcoren	Merial GmbH; Hallergmoos
Norepinephrin 1 mg/ml	Arterenol, SANOFI; Höchst
Paraffin	Leica; Wetzlar
Paraformaldehyd	Merck; Darmstadt
Protein Standard SDS Page	Life Technologies; Carlsbad, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma Alderich; Steinheim
Wheat germ agglutinin Fluoreszin Conjugate	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Xylol	Merck; Darmstadt

### 3.5 Software

Produkt	
Citavi 6	Swiss Academic Software GmbH; Wädenswil Schweiz
Fiji	ImageJ; Maryland, USA
Microsoft Office Professional Plus 2019	Microsoft Corporation; Redmond, USA
Prism 5	GraphPad; San Diego, USA
PowerLabs	AD Instruments; Oxford, UK
ZEN2011	Zeiss; Oberkochen



## 4 Methoden

Im Folgenden sollen die verwendeten Methoden sowie Versuchsprotokolle beschrieben und erklärt werden.

### 4.1 Versuchstiere

Die durchgeführten Tierversuche wurden durch die Regierung der Oberpfalz unter dem Aktenzeichen RUF 55.2.2-2532.2-964-12 (2019) genehmigt. Die Durchführung der Versuche erfolgte gemäß den Empfehlungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA).

#### 4.1.1 Munich Wistar Froemter Ratten

Um den funktionellen Einfluss der Mesangialzellen zu untersuchen wurden Munich Wistar Froemter (MWF) Ratten für die intravitale Multiphotonenmikroskopie verwendet. Aufgrund ihrer zahlreichen oberflächlich gelegenen Glomerula ist dieser Stamm für die Multiphotonenmikroskopie besonders geeignet (Hackbarth et al. 1983). Für die Versuche wurden Tiere beider Geschlechter, mit einem Gewicht von 130 g bis 210 g und einem Alter von 7 bis 11 Wochen verwendet.

Im Folgenden wird die Bezeichnung „MWF Ratte“ als Synonym für eine nicht behandelte Ratte verwendet, wohingegen die behandelten Tiere als „Anti-Thy1.1 Ratte“ bezeichnet werden.

#### 4.1.2 Haltung der Versuchstiere

Die Versuchstiere entstammen einer universitätsinternen Zuchtlinie und wurden bei einer Raumtemperatur (RT) von  $23 \pm 2$  °C, einer Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 5$  % sowie einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Futter und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

### 4.2 Untersuchung der Nierenfunktion mit Hilfe der Multiphotonenmikroskopie

Um den funktionellen Einfluss der Mesangialzellen im Glomerulum zu untersuchen, wurden die Versuchstiere sowie die verwendeten Farbstoffe entsprechend vorbereitet und die Messeinstellungen am Multiphotonenmikroskop konfiguriert.

#### 4.2.1 Applikation und Dosierung des Anti-Thy1.1 Antikörpers

Die Injektion des Anti-Thy1.1 Antikörpers erfolgte 24 h vor der geplanten intravitalem Mikroskopie. Hierfür wurde das Versuchstier mittels Isofluran narkotisiert und in Bauchlage auf einem beheizbaren Tisch positioniert. Um eine möglichst gute Perfusion der Schwanzvenen zu erreichen, wurde der Schwanz zusätzlich mit einer Rotlichtlampe angewärmt. Die Injektion des Anti-Thy1.1 Antikörpers (1 mg/kg) erfolgte mit Hilfe eines Venenverweilkatheters über die laterale

Schwanzvene. Den Kontrolltieren wurde das Lösungsmittel PBS (2 ml/kg) in derselben Vorgehensweise appliziert.

#### 4.2.2 Vorbereitung der Versuchstiere

Für die Untersuchung am Multiphotonenmikroskop wurden die Versuchstiere zunächst in einer Kammer mittels 5 Vol % Isofluran-Narkose eingeleitet. Im Anschluss wurde die Isofluran-Narkose auf 2,5 % verringert und über die Maske gegeben. Zusätzlich wurde das Tier mit einer Fentanyl-Dauertropfinfusion (5 µg/kg/h) anästhesiert. Die Narkosetiefe wurde in regelmäßigen Abständen anhand des Zwischenzehenreflexes überprüft. Zu Beginn der Narkose wurde beidseitig eine Augensalbe aufgetragen, um die Augen vor möglichen Defekten der Cornea zu schützen. Im Anschluss wurde das narkotisierte Versuchstier an der linken Flanke rasiert und jeweils 60 µl Lokalanästhetika (Mepivacain, 10 mg/ml) sowohl an der linken Flanke als auch ventral am Hals subkutan injiziert. Für den nachfolgenden chirurgischen Eingriff wurde die Ratte in Rückenlage auf einem beheizbaren Tisch befestigt und zusätzlich mit einer Rotlichtlampe bestrahlt. Um stets eine physiologische Körpertemperatur zwischen 36,0 und 40,0 °C (Wolfensohn und Lloyd 2003) zu gewährleisten, wurde die Temperatur mit Hilfe einer Rektalsonde kontinuierlich gemessen.

#### 4.2.3 Operation der Versuchstiere

Der arterielle sowie der venöse Zugang erfolgte ventral des Halses auf Höhe der Mandibeln und wurde bis auf Höhe des Brustbeins verlängert. Zunächst wurde die rechte *Arteria carotis* stumpf frei präpariert und möglichst cranial mit einem Faden ligiert sowie caudal mit einer Klemme versehen. Im Anschluss erfolgte die Eröffnung und Katheterisierung der *Arteria carotis* mit einem handgezogenen heparinisierten Polyethylenkatheter und die Befestigung des Katheters mittels zwei Fäden an der Arterie. Die Katheterisierung der rechten *Vena jugularis* erfolgte mit bis zu drei Kathetern analog. Während der arterielle Katheter der Messung des Blutdrucks und der Kontrolle der Herzfrequenz diente, konnten über den venösen Katheter die benötigten Farbstoffe sowie eine AngII, NA oder NaCl-Infusion appliziert werden.

Um die Niere für die intravitale Mikroskopie zugänglich zu machen, wurde die Ratte in Seitenlage gebracht und das Organ über einen ca. 1–2 cm großen Schnitt an der linken Flanke aus der Abdominalhöhle hervorgelegt. Die Niere wurde im Anschluss an einem selbstgefertigten Fenster befestigt, um die Bewegungsartefakte während der intravitalem Mikroskopie zu minimieren.

#### 4.2.4 Blutdruckmessung

Der arterielle Blutdruck wurde während den intravitalem Aufnahmen am Multiphotonenmikroskop direkt und kontinuierlich gemessen. Hierfür wurde der arterielle Katheter mit einem Druckmessfühler verbunden und die Werte mit Hilfe des Programms *Power Labs* aufgezeichnet. Die

im Folgenden aufgeführten Blutdruckwerte entsprechen jeweils dem mittleren arteriellen Blutdruck.

#### 4.2.5 Vorbereitung und Dosierung von AngII, NA und NaCl

Für eine adäquate, vergleichbare Erhöhung des Blutdrucks bei einer konstanten Infusionsmenge von 0,16 ml/kg/min wurden die Konzentration von AngII beziehungsweise NA entsprechend angepasst. Hierfür wurden AngII und NA auf Eis mit steriler NaCl-Lösung auf die gewünschte Endkonzentration (AngII: 0,5 µg/ml; NA: 1,0 µg/ml) verdünnt und anschließend in Aliquote bei -20 °C bis unmittelbar vor dem Gebrauch gelagert. Für die Infusion mit NaCl wurde eine sterile Lösung verwendet, welche in gleicher Menge dem Versuchstier infundiert wurde.

#### 4.2.6 Multiphotonenmikroskopie

Die Multiphotonenmikroskopie ermöglicht eine intravitale Darstellung von Organstrukturen, in diesem Falle der Niere, sowie die Messung funktioneller Parameter des Organs. Hierfür ist das Mikroskop mit einem beweglichen und beheizbaren Tisch ausgestattet, auf welchem das narkotisierte Tier in linker Seitenlage positioniert wurde. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe wurden von einem *Chameleon Ultra-II Multiphotonen Laser* mit einer Wellenlänge von 860 nm angeregt und die Emission über interne Detektoren ermittelt. Zur Vergrößerung wurde ein 40-faches Wasserobjektiv verwendet.

##### 4.2.6.1 Eigenschaften, Vorbereitung und Dosierung der Farbstoffe zur Visualisierung der Mesangialzellen und zur Ermittlung der funktionellen Parameter

Für die Visualisierung der Mesangialzellen und die Ermittlung ihres funktionellen Einflusses wurden geeignete Farbstoffe über den Venenkatheter des Versuchstieres appliziert:

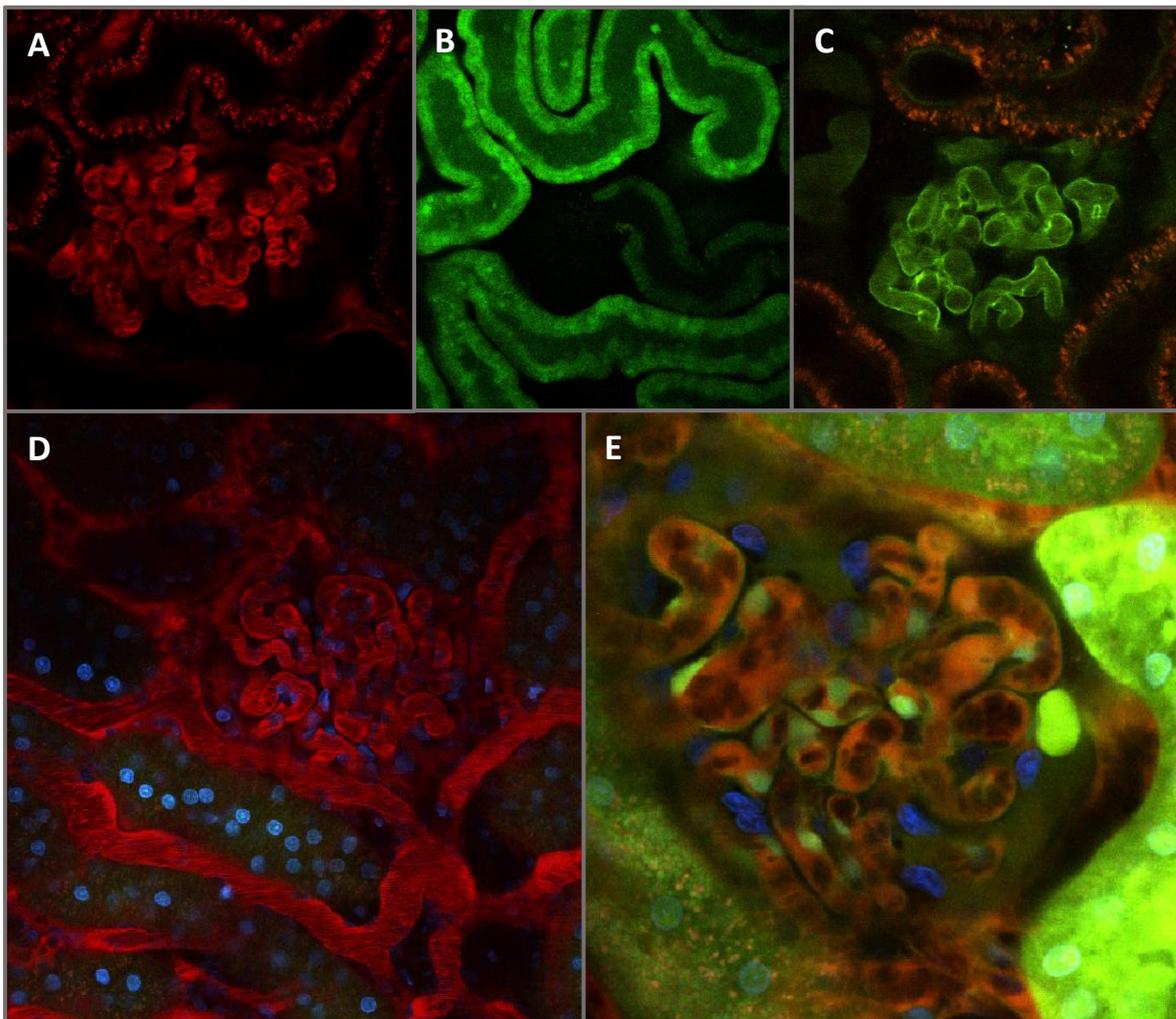
*Lucifer Yellow (LY)* ist ein niedermolekularer, frei filtrierbarer Farbstoff mit einer Emission von 536 nm. Für die Darstellung der Mesangialzellen wurde der Farbstoff in einer Konzentration von 12,5 mg/ml verwendet. Die Mesangialzellen nehmen durch ihre absorptiven Eigenschaften den Farbstoff auf und weisen nach einer 20-minütigen DTI (5 µl/min) eine intensiv grüne Färbung auf. Zur Bestimmung der snGFR wurde hingegen eine Konzentration von 5 mg/ml verwendet. Je nach benötigter Konzentration wurde der Farbstoff mit NaCl gelöst, anschließend aliquotiert und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

Die Zellkerne wurden mit dem interkalierenden Farbstoff Höchst 33342 (0,5 ml/kg) angefärbt. Dieser Farbstoff wird in gelöster (10 mg/ml) Form angeboten und wird bei 4 °C gelagert. Das Emissionsmaximum liegt bei 540 nm und wird blau dargestellt.

Für die Visualisierung der Kapillaren bei der Messung der kapillaren Flussgeschwindigkeit sowie für die Messung des  $GSC_A$  wurde der an Albumin gebundene Farbstoff Alexa 594-BSA verwendet (6,5 mg/kg; Emission 617 nm). Der Farbstoff wurde zunächst in einer sterilen PBS-Lösung zu einer Konzentration von 5 mg/ml gelöst. Um die Lösung von nicht an Albumin gebundenen Farbstoff zu reinigen, wurde diese in 30 kDa Membranreagenzbehältnissen bei 14000 rpm zentrifugiert. Abschließend wurde die Lösung mit einer sterilen PBS-Lösung auf die Endkonzentration von 5 mg/ml aufgefüllt, in Aliquote aufgeteilt und bei -20 °C gelagert.

Um die Glykokalyx darzustellen, wurde *Wheat Germ Agglutinin Fluoreszin* (WGA) verwendet (0,3 ml/kg). Dieser Farbstoff liegt ebenso wie LY im grünen Bereich und besitzt ein Emissionsmaximum von 518 nm. Für die intravitale Anwendung am Mikroskop wurde der Farbstoff zunächst in einer NaCl-Verdünnung gelöst (10 mg/ml) und anschließend in Aliquote bei -20 °C gelagert.

Die Abbildung 3 zeigt die einzelnen, intravital verwendeten Farbstoffe:



**Abbildung 3: Visualisierung der glomerulären Strukturen:** A: Der an Albumin gebundene Farbstoff Alexa 594-BSA befindet sich in den Kapillaren und reichert sich im proximalen Tubulus an. B: LY reichert sich zunächst im proximalen Tubulus an. C: Der Farbstoff WGA-Fluoreszin führt zu einer grünen Färbung der endothelialen Glykokalyx im Glomerulum, (D) wohingegen der Farbstoff Hoechst 33342 die Zellkerne blau anfärbt. E: Darstellung der unterschiedlichen verwendeten Farbstoffe in einem Glomerulum. LY reichert sich nach etwa 20 Minuten in den Mesangialzellen an und färbt diese leuchtend grün (blau: Hoechst 33342; rot: Alexa 594-BSA).

#### 4.2.7 Bestimmung funktioneller Parameter der Nierenfunktion

Nach der Platzierung des Versuchstiers auf dem beheizbaren Tisch des Multiphotonenmikroskops erfolgte die Adaption des arteriellen Katheters an den Druckmessfühler, um eine kontinuierliche Überwachung des Blutdrucks zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die funktionellen Messungen, wie im Folgenden beschrieben, durchgeführt.

##### 4.2.7.1 Glomerulärer Siebkoeffizient für Albumin

Der glomeruläre Siebkoeffizient für Albumin ( $GSC_A$ ) zeigt die Intaktheit der Selektivität der glomerulären Filtrationsbarriere. Er wird über folgende Formel definiert (Deen 2004).

$$GSC\ Albumin = \frac{\text{Konzentration von Albumin im Harnraum}}{\text{Konzentration von Albumin in den Kapillaren}}$$

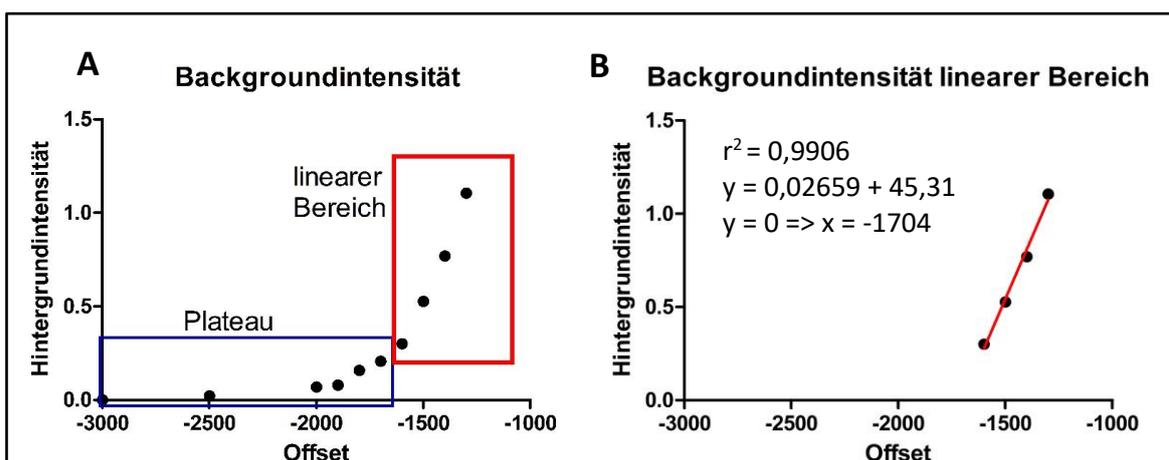
Der Farbstoff Alexa 594-BSA ist an Albumin gebunden. Mit Hilfe der Multiphotonenmikroskopie kann die Fluoreszenzintensität dieses Farbstoffs in den Kapillaren sowie im Harnraum ermittelt werden und somit der  $GSC_A$  im Glomerulum unter Berücksichtigung der Hintergrundfluoreszenz bestimmt werden.

#### 4.2.7.1.1 Messeinstellungen für die Bestimmung des Siebkoeffizienten von Albumin

Die Messgröße bei der Ermittlung des  $GSC_A$  ist die Fluoreszenzintensität von Alexa 594-BSA, welche im roten internen Kanal detektiert wurde. Für die Messaufnahmen wurde eine Zeitserie mit insgesamt sechs Bildern a 16-Bit über eine Minute aufgenommen. Die Anzahl der Pixel betrug  $512 \times 512$ .

Bei der experimentellen Ermittlung des  $GSC_A$  ist der Detektorschwellenwert, auch Offset genannt, maßgeblich für das sogenannte *Signal-Rausch-Verhältnis* verantwortlich. Je höher dieser Wert ist, desto höher ist das Hintergrundrauschen im Bild. Wird der Schwellenwert zu hoch angesetzt, so ist die gemessene Fluoreszenzintensität höher als die tatsächliche Intensität. Ist der Schwellenwert jedoch zu niedrig, so kann ein reales Signal nicht vom Detektor erkannt werden.

Die passende Einstellung für den Detektorschwellenwert wurde zunächst mit Hilfe des Mikroskops ermittelt. Hierfür wurde ein Versuchstier zur intravitalem Untersuchung vorbereitet und auf dem Mikroskop platziert. Auf die Applikation eines Farbstoffes wurde verzichtet. Die Hintergrundintensität im Glomerulum wurde bei einer Laserpower von 7 % (von 3200 mW) für die folgenden Offsets ermittelt: -1000, -1200, -1300, -1400, -1500, -1600, -1700, -1800, -1900, -2000, -2500 und -3000.



**Abbildung 4: Ermittlung des Detektorschwellenwertes für den  $GSC_A$ :** A: Die Hintergrundintensität wurde bei gleichbleibender Laserpower von 7 % und unterschiedlichen Offset Einstellungen gemessen und gegeneinander aufgetragen. Hierbei ergab sich ein linear ansteigender Bereich sowie eine Plateauphase. B: Um ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis zu gewährleisten wurde der x-Achsen Schnittpunkt der Regressionsgerade mit dem höchsten Bestimmtheitsmaß ( $r^2=0,9906$ ) verwendet.

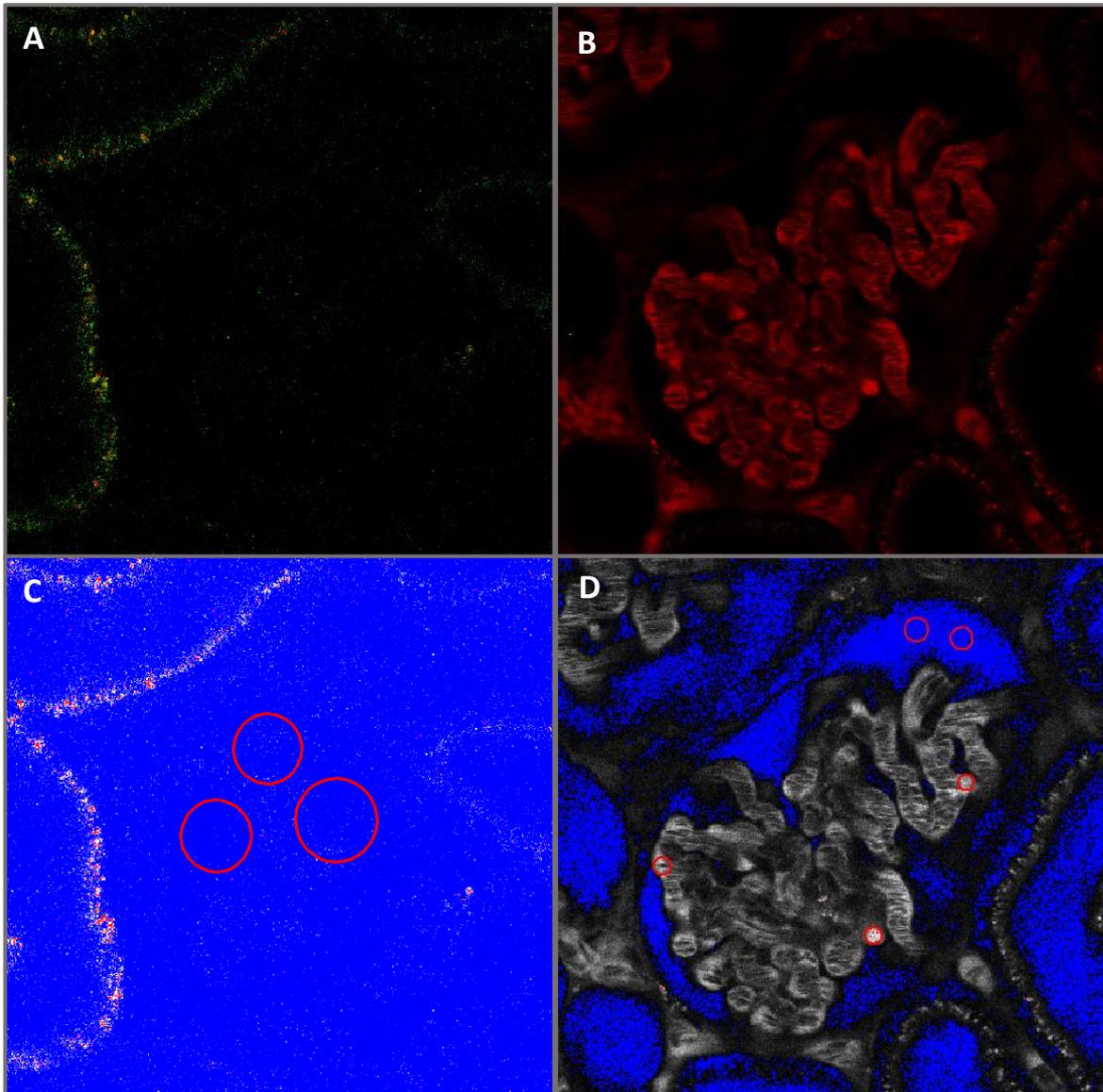
Anschließend wurde die gemessene Hintergrundintensität im Glomerulum gegen den jeweiligen Offset-Wert aufgetragen (Abbildung 4). Die daraus resultierende Kurve ließ sich in zwei Abschnitte gliedern. Eine Plateauphase, in welcher der Detektor keine ausreichende Sensitivität zur Detektion der Unterschiede besaß und einen linearen Bereich. Die optimale Offset-Einstellung liegt zu Beginn des linearen Bereichs und gewährleistet eine ausreichende Sensitivität, ohne das Rauschen fälschlicherweise zu erhöhen. Um diesen Offset-Wert zu ermitteln, wurden zunächst verschiedene auf diesem Datensatz basierende Regressionsgeraden erstellt. Anschließend wurde für jede Regressionsgerade das jeweilige Bestimmtheitsmaß kalkuliert. Das höchste Bestimmtheitsmaß ( $r^2=0,9906$ ) wurde für einen x-Achsenabschnitt bei -1704 ermittelt und auf einen Wert von -1700 gerundet.

#### 4.2.7.1.2 Experimentelle Ermittlung des Siebkoeffizienten für Albumin

Für die experimentelle Bestimmung des  $GSC_A$  wurden die in 4.2.7.1.1 beschriebenen Messeinstellungen verwendet. Nach der Platzierung des Versuchstiers auf dem beheizbaren Tisch des Mikroskops wurden zunächst vier bis sechs oberflächlich gelegene Glomerula unter der HXP-Fluoreszenzlampe ermittelt. Um die einzelnen Messungen vergleichbarer zu machen, wurden alle Aufnahmen in einer Tiefe von 30  $\mu\text{m}$  unterhalb der Nierenkapsel gemacht. Die Einstellung der exakten Aufnahmetiefe erfolgte mit Hilfe der sogenannten *Second Harmonic Generation* (SHG). Diese Frequenzverdopplung ist ein optischer Effekt, welcher entsteht, wenn ein Photon auf ein nicht lineares optisches Medium, in diesem Falle die Kollagenschicht der Nierenkapsel, trifft (Schürmann 2010). Bei der intravitalem Multiphotonenmikroskopie ist diese Frequenzverdopplung an der Nierenkapsel durch ein erhöhtes Rauschen im Bild zu erkennen.

Zunächst wurde die Hintergrundintensität der einzelnen Glomerula in einer Tiefe von 30  $\mu\text{m}$  bestimmt. Im Anschluss wurde der an Albumin gebundene Farbstoff Alexa 594-BSA über den venösen Zugang appliziert (1,3 ml/kg). Für die weiteren Aufnahmen musste eine Wartezeit von mindestens 10 Minuten nach Applikation eingehalten werden. Diese Zeit gewährleistet, dass die folgenden Messungen nicht durch frei filtrierbaren Farbstoff gestört werden. Nach dieser Wartezeit wurden einstellungsgleiche Messungen durchgeführt. Die Kapillaren sind durch die Gabe von Alexa 594-BSA leuchtend rot gefärbt, während sich der Harnraum beinahe schwarz darstellt. Um außerdem den Einfluss von AngII, NA und NaCl auf den  $GSC_A$  zu ermitteln, wurde anschließend eine entsprechende Infusion über den venösen Katheter appliziert (0,16 ml/kg/min). Nach einer Infusionsdauer von 15 Minuten wurden abermals einstellungsgleiche Messungen durchgeführt. Zusätzlich zu den funktionellen Messungen wurde ein Z-Stapel aufgenommen, welcher mindestens 20 Slices oberhalb der vermessenen Region beginnt und 20 Slices unterhalb dieser Region endet. Diese dreidimensionale Aufnahme des Glomerulums diente in der späteren Auswertung dazu einen

geeigneten Bereich im Harnraum zu finden. Kapillaren, welche sich nahe über oder unter dem vermessenen Harnraums befinden, beeinflussen dessen Fluoreszenzintensität und können in der späteren Auswertung zu einem fälschlich erhöhten  $GSC_A$  führen.



**Abbildung 5: Intravitale Bestimmung des  $GSC_A$ :** A: Intravitale Aufnahme der Hintergrundintensität. B: Nach der Applikation von Alexa 594-BSA wurden zunächst basale Aufnahmen angefertigt und außerdem einstellungsgleiche Aufnahmen nach der Infusion von AngII, NA oder NaCl gemacht C: Für die anschließende Auswertung wurden die Aufnahmen mittels Range Indikator dargestellt (A=C; B=D). Die Roten Kreise zeigen das Areal, das für die Messung der Hintergrundintensität bestimmt wurde. D: Darstellung des Glomerulums mittels Range Indikator. Die mittlere Intensität von Alexa 594-BSA wurde sowohl im Harnraum als auch in den Kapillaren anhand mehrerer Messpunkte bestimmt

Für die Auswertung der Fluoreszenzintensität wurden die angefertigten Aufnahmen zunächst mittels *Range Indikator* dargestellt (Abbildung 5). Diese Darstellung ermöglicht es auch bei einer sehr geringen Farbstoffintensität im Harnraum den optimalen Messbereich zu finden. Zur Auswertung wurden lediglich Glomerula verwendet, bei denen ein freier Harnraum zu erkennen war und zusätzlich, in unmittelbarer Nähe oberhalb oder unterhalb nahe der Messregion, die

Existenz von Kapillaren ausgeschlossen werden konnte. Zunächst wurde die Hintergrundintensität im jeweiligen Glomerulum der basalen Aufnahmen gemessen. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität von Alexa 594-BSA basal und nach Infusion von AngII, NA oder NaCl gemessen. Die Fluoreszenz der Kapillaren wurden in jeweils drei Messregionen bestimmt. Bei der Auswahl der jeweiligen Region wurde darauf geachtet, eine möglichst gleichmäßig starke Färbung über alle 6 Zeitpunkte zu erhalten. Durchströmende Erythrozyten können das Albumin in den Kapillaren verdrängen und somit die Intensität im Messbereich verringern. Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität im Harnraum wurden zwei Messregionen in einem geeigneten Bereich positioniert.

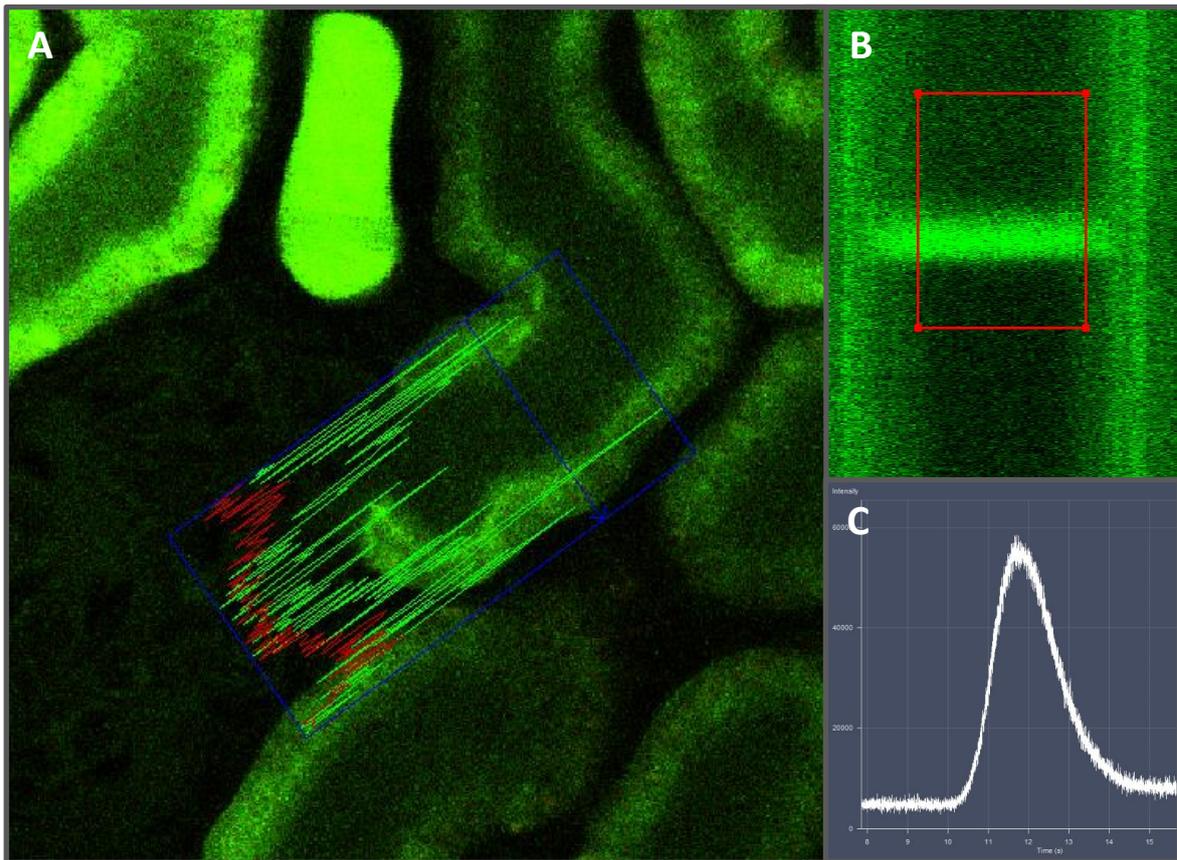
Auf Grundlage der erhobenen Daten konnte der  $GSC_A$  mit der nachfolgenden Formel berechnet werden:

$$GSC\ Albumin = \frac{\text{Konzentration von Albumin im Harnraum} - \text{Hintergrundintensität}}{\text{Konzentration von Albumin in den Kapillaren} - \text{Hintergrundintensität}}$$

#### 4.2.7.2 Glomerulärer Filtrationsrate des Einzelnephrons

Um die Filtrationsrate des Einzelnephrons (snGFR) mittels intravitaler Mikroskopie zu messen, wurde der frei filtrierbare Farbstoff Lucifer Yellow, LY (5 mg/ml), verwendet. Zunächst wurde mit Hilfe der HXP-Fluoreszenzlampe ein passendes Glomerulum mit gut sichtbarem proximalem Tubulus gesucht und ein *Line Scan* mit dem 2-Photonen-Laser aufgenommen. Im Anschluss wurde eine Messgerade senkrecht durch den Querschnitt des proximalen Tubulus gelegt (Abbildung 6).

Die Aufnahme erfolgte im bidirektionalen Scan, bei maximaler Scangeschwindigkeit und einer reduzierten Pixelzahl (125 x 125), um schnelle An- und Abfluten des Farbstoffes möglichst genau zu visualisieren. Nach Beginn der Aufnahme wurde ein Farbstoff-Bolus mit 20 µl Volumen über den venösen Katheter appliziert. Eine einstellungsgleiche Aufnahme wurde mit einem weiteren Bolus wiederholt. Sobald alle basalen Aufnahmen abgeschlossen waren, wurde eine Infusion mit AngII, NA oder NaCl über einen weiteren venösen Katheter appliziert. Nach einer Wartezeit von 15 Minuten wurde abermals die snGFR einstellungsgleich gemessen. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, die Messgerade wie zuvor bei den basalen Aufnahmen zu platzieren.



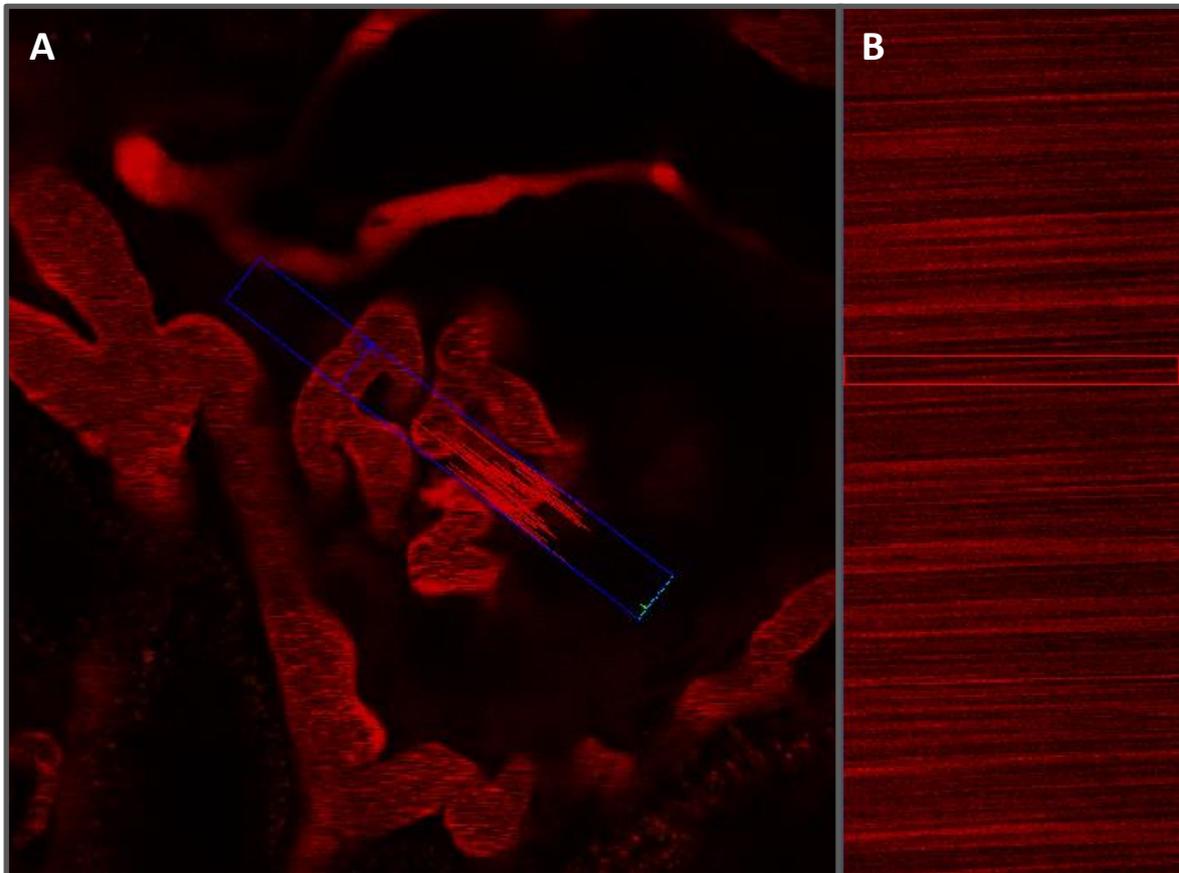
**Abbildung 6: Messung und Auswertung der snGFR:** A: Im *Line Scan Modus* wurde eine Messgerade senkrecht zur Flussrichtung durch den proximalen Tubulus gelegt. B: Im Messareal wurde die Applikation des Farbstoffbolus LY über einen zeitlichen Verlauf dargestellt. Mit Hilfe von *Mean Roi* wurde die Intensität des applizierten Farbstoffbolus gemessen. C: Die Intensitätsverlaufskurve zeigt das An- und Abfluten des applizierten Farbstoffes. In der abschließenden Auswertung wurde eine Steigungsgerade durch den Abfall dieser Kurve gelegt. Die gemessene Steigung entspricht in Abhängigkeit vom Tubulusdurchmesser der snGFR.

Für die Auswertung der snGFR wurde zunächst das Areal um die Messgerade im zeitlichen Verlauf dargestellt (Abbildung 6). Die Farbstoffintensität wurde anschließend mittels *Mean Roi* im zeitlichen Verlauf bestimmt. Wie in Abbildung 6 dargestellt, ergab sich hierbei, durch das An- und Abfluten des Farbstoffes, eine Intensitätsverlaufskurve. Eine Steigungsgerade wurde in den Abfall dieser Kurve gelegt. Die so gemessene Steigung wurde in Abhängigkeit des Durchmessers des jeweiligen proximalen Tubulus als Maß für die snGFR verwendet.

#### 4.2.7.3 Glomeruläre kapillare Flussgeschwindigkeit

Um die kapillare Flussgeschwindigkeit zu messen, wurden zunächst die Kapillaren mit Hilfe Alexa 594-BSA (1,3 ml/kg) dargestellt. Dieser Farbstoff ist an Albumin gebunden und färbt somit das Plasma rot, wobei die Erythrozyten im Blut ungefärbt bleiben. Mit Hilfe der HXP-Fluoreszenzlampe wurde zunächst ein Glomerulum gesucht. Im Anschluss wurde eine möglichst gerade verlaufende Kapillarschlinge mit dem 2-Photonen Laser gesucht und diese im *Line Scan Modus* aufgenommen. Um die Flussgeschwindigkeit zu messen wurde eine Messgerade möglichst parallel zur Flussrichtung in die Kapillare gelegt (Abbildung 7). Anschließend erfolgte für jede ausgewählte

Kapillare eine Zeitserie über 0,36 Sekunden und mit 500 Bildern. Nach Abschluss der basalen Aufnahmen wurde das Versuchstier mit AngII, NA oder NaCl infundiert. Die Aufnahmen wurden nach einer Wartezeit von 15 Minuten einstellungsgleich wiederholt, um den Einfluss der jeweiligen Infusion auf den kapillare Flussgeschwindigkeit zu ermitteln.



**Abbildung 7: Bestimmung der kapillaren Flussgeschwindigkeit sowie des kapillaren Flusses:** A: Eine Messgerade wurde im *Line Scan Modus* parallel zur kapillaren Flussrichtung gelegt. Damit wurde der Fluss im ausgewählten Areal bestimmt. B: Die Messung wurde im zeitlichen Verlauf dargestellt und die für die Strecke benötigte Zeit gemessen.

Bei der Auswertung der kapillaren Flussgeschwindigkeit wurde die im Messareal aufgenommene Zeitserie – wie in Abbildung 7 gezeigt – dargestellt. Hierbei wurden die vorbeifließenden Erythrozyten als dunkle Aussparungen dargestellt, während das umgebende Plasma von Alexa 594-BSA rot gefärbt war. Für die Berechnung der kapillaren Flussgeschwindigkeit wurde sowohl die Strecke als auch die dafür benötigte Zeit eines einzelnen Erythrozyten gemessen und mit folgender Formel berechnet:

$$\text{kapillare Flussgeschwindigkeit} = \frac{\text{Strecke in } \mu\text{m}}{\text{benötigte Zeit in ms}}$$

Zur Berechnung des kapillaren Flusses wurde diese Formel mit der Querschnittsfläche der Kapillare erweitert:

$$\text{kapillare Fluss} = \text{Flussgeschwindigkeit} * \pi r^2$$

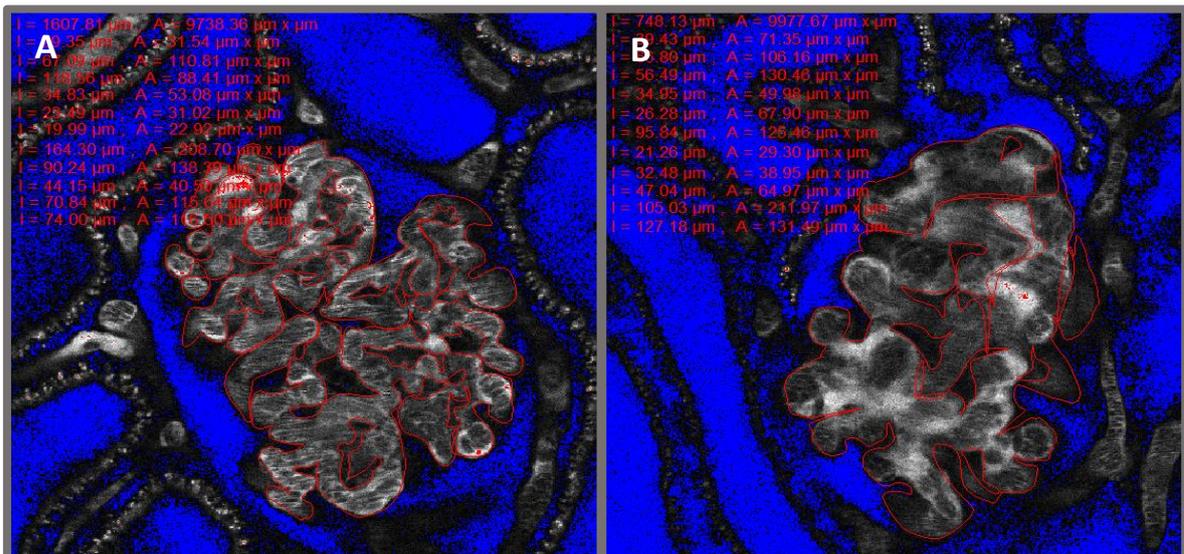
#### 4.2.7.4 Visualisierung der durch Angiotensin II bedingten Bewegung der Kapillaren im Glomerulum

Für die Darstellung der Kapillaren wurde der Farbstoff Alexa 594-BSA verwendet. Zunächst wurde ein Glomerulum mit der HXP-Fluoreszenzlampe identifiziert. Um eine Bewegung des Kapillarknäuels im Glomerulum darzustellen, wurde eine Zeitserie mit einer Scangeschwindigkeit von 1,94 Sekunden über 3 bis 5 Minuten aufgenommen. Etwa eine Minute nach Beginn der Aufnahme wurde AngII beziehungsweise NA über den venösen Katheter als DTI appliziert (0,25 ml/kg).

Zur Ermittlung einer möglichen Bewegung der Kapillaren im Glomerulum wurde ein fester Bezugspunkt außerhalb des Glomerulums für die einzelnen Kapillarschlingen gewählt und diese Strecke vermessen. Nach Applikation der jeweiligen DTI wurde die Entfernung der jeweiligen Kapillarschlinge zu ihrem Bezugspunkt erneut vermessen. In der anschließenden Auswertung wurde der Absolutwert der Differenz beider gemessenen Strecken gebildet und statistisch ausgewertet. Außerdem wurde die Querschnittsveränderung des gesamten Kapillarknäuels bezüglich der jeweiligen DTI miteinander verglichen.

#### 4.2.8 Vermessung des Umfangs der Kapillaren und der Gesamtfläche im Glomerulum

Um sowohl die Oberfläche der Kapillaren als auch die gesamte Querschnittsfläche der Kapillaren zu ermitteln, wurden die für den  $GSC_A$  angefertigten Aufnahmen verwendet. Hierbei wurde bei insgesamt 31 Glomerula (MWF n=16; Anti-Thy1.1 n=15) zunächst der Gesamtumfang der Kapillaren in einer zweidimensionalen Aufnahme vermessen (Abbildung 8). Dieser Gesamtumfang steht in direktem Zusammenhang zur dreidimensionalen Oberfläche des Kapillarknäuels und wurde daher in der späteren Auswertung als Maßstab für die Oberfläche der Kapillaren im Glomerulum verwendet. Die gesamte Querschnittsfläche der Kapillaren entsprach der vom Kapillarknäuel eingenommenen Fläche. Die sich ergebenden Werte wurden abschließend wie in 4.6 beschrieben statistisch ausgewertet.



**Abbildung 8: Vermessung der kapillaren Oberfläche sowie der gesamten Querschnittsfläche der Kapillaren im Glomerulum:** Der gemessene Umfang der Kapillaren ist in dieser Abbildung mit rot gekennzeichnet. Die gesamte Querschnittsfläche entspricht der von den Umrissen begrenzten Fläche im Glomerulum. A: MWF Ratte B: Anti-Thy1.1 Ratte

### 4.3 Histologische Methoden

Um die Auswirkungen des Verlustes der Mesangialzellen auch histologisch zu untersuchen, wurden die Nieren der Versuchstiere zunächst fixiert und anschließend gemäß unterschiedlichen Protokollen eingebettet und gefärbt. Um die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Histologie auszuschließen, wurden lediglich weibliche Ratten im Alter von 7–9 Wochen verwendet.

Um das Gewebe für histologische Methoden vorzubereiten, wurde es mit Hilfe von einer 3%igen Paraformaldehydlösung (gelöst in PBS; pH 7,35) fixiert. Das Fixiermittel lässt das perfundierte Gewebe aushärten und verhindert außerdem autokatalytische Prozesse.

#### 4.3.1 Retrograde arterielle Perfusions-Fixierung

Für die retrograde Perfusion wurde das Versuchstier zunächst euthanasiert (Narcoren 400 mg/kg) und anschließend in Rückenlage auf dem OP-Tisch fixiert. Nach der Eröffnung des Abdomens erfolgte die Präparation der Bauchaorta. Die *Aorta abdominalis* wurde über einen Schnitt eröffnet und mittels einer *Butterfly-Kanüle* katheterisiert. Diese wurde mit einer Klemme fixiert. Um das Abfließen der Perfusionslösung aus dem Versuchstier zu gewährleisten, wurde die *Vena abdominalis* ebenfalls eröffnet. Die Perfusion erfolgte bei einem konstanten Druck von 70 mmHg. Zunächst wurde das Versuchstier mit heparinisierter NaCl-Lösung (1 ml/g) perfundiert, um das Gewebe vor der Fixierung von Blutbestandteilen zu reinigen. Im Anschluss erfolgte die Perfusion mit einer 3%igen Paraformaldehydlösung (1 ml/g). Die perfundierten Nieren wurden entnommen und ihre Kapsel entfernt. Anschließend wurden die Nieren in ihrer Querachse halbiert und in eine Kassette gegeben. Für die weitere Einbettung wurden sie in 70%igem Methanol bei 8 °C gelagert.

#### 4.3.2 Einbetten der Niere in Paraffin und Anfertigen von Paraffinschnitten

Die perfundierte Niere wurde über eine aufsteigende Alkoholreihe sukzessive dehydriert und in flüssigem Paraffin (Schmelzpunkt: 56 °C) inkubiert.

Dauer	Temperatur	Lösung
1 x 30 min	RT	70%ig Methanol
2 x 30 min	RT	80%ig Methanol
2 x 30 min	RT	90%ig Methanol
2 x 30 min	RT	100%ig Methanol
2 x 30 min	RT	100%ig Isopropanol
1 x 30 min	45 °C	100%ig Isopropanol
1 x 30 min	60 °C	1:1 Isopropanol/Paraffin
2 x 24 h	60 °C	Paraffin

Im Anschluss wurden die Nieren routinemäßig in paraffingefüllte (60 °C) Silikon-Kautschuk-Einbettformen eingebettet. Sobald das Paraffin bei RT ausgehärtet war, konnten mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms 5 µm dicke Schnitte erstellt und in einem 41 °C warmen Wasserbad auf Objektträger gezogen werden. Für die Fixierung der Schnitte auf dem Objektträger wurden diese über Nacht bei RT getrocknet.

#### 4.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Diese Färbung wurde verwendet, um die strukturellen Veränderungen nach Applikation des Anti-Thy1.1 Antikörpers zu visualisieren. Vor der Färbung der Schnitte wurde das Paraffin mit Hilfe von Xylol und einer daran anschließenden absteigenden Alkoholreihe entfernt und die Schnitte rehydriert.

- 2 x 10 min in 100%igem Xylol
- 2 x 5 min in 100%igem Isopropanol
- 1 x 5 min in 96%igem Isopropanol
- 1 x 5 min in 80%igem Isopropanol
- 1 x 5 min in 70%igem Isopropanol
- 1 x 1 min in destilliertem Wasser

Im Anschluss wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Dabei wurden die Zellkerne zunächst für die Dauer von zwei Minuten mit Hämatoxylin gefärbt und die Schnitte anschließend mit einer 1:100 Mischung aus Salzsäure (25 %) und Isopropanol (70 %) differenziert. Um das Zytoplasma zu färben, wurden die Schnitte für die Dauer von 35 Sekunden in eine Eosin-Lösung

getaucht und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte fixiert.

- 1–2 x eintauchen in 70%igem Isopropanol
- 1–2 x eintauchen in 80%igem Isopropanol
- 1–2 x eintauchen in 96%igem Isopropanol
- 2 min in 100%igem Isopropanol
- 2 min in 100%igem Xylol

Abschließend wurden die Schnitte mit *DPX-Medium* eingebettet.

#### 4.3.4 Immunfluoreszenzfärbung

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung kann die Verteilung der zu untersuchenden Proteine im Gewebe sichtbar gemacht werden. Dabei nutzt man die Kombination zweier Antikörper. Der primäre Antikörper bindet spezifisch an das Epitop des zu untersuchenden Proteins. Ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter sekundärer Antikörper bindet wiederum an den Primärantikörper. Somit kann eine Färbung durch Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes sichtbar gemacht werden.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde zunächst das Paraffin, wie in 4.3.3 beschrieben, durch eine absteigende Alkoholreihe entfernt. Je nach Bindungseigenschaften der primären und sekundären Antikörper wurde das folgende Protokoll für die Fluoreszenzfärbung angepasst.

- 40-minütige Inkubation der Schnitte
  - in TRIS/EDTA beziehungsweise Citrat-Puffer bei 95 °C
  - oder in PBS bei RT
- 15 min bei 50 rpm in PBS Lösung waschen
- Schnitte mit Fettstift umranden
- 20 min blockieren mit einer der Blockierlösungen
  - Horse-Serum: 1 % BSA + 10 % HS in PBS
  - TritonX: 5 % BSA + 0,3 % TX in PBS
- Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer (Verdünnung des Primärantikörpers in der jeweiligen Blockierlösung)
- Am folgenden Tag: 3 x 5 min mit PBS waschen
- Sekundärantikörper mit der jeweiligen Blockierlösung verdünnen 1:400
- Inkubation des Sekundärantikörpers 1,5 h bei RT (unter Lichtausschluss)
- 15 min bei 50 rpm in PBS waschen
- Einbetten der Schnitte in Dako Fluorescence Mounting Medium

Protokollvarianten für die jeweiligen Antikörper:

- Anti-Albumin: Inkubation mit PBS bei RT; Blockierlösung Horse-Serum
- Anti- $\alpha$ SMA: Inkubation mit PBS bei RT; Blockierlösung TritonX
- Anti-Podocin: Inkubation mit PBS bei RT; Blockierlösung TritonX
- Anti-Synaptopodin: Inkubation mit TRIS/EDTA bei 95 °C; Blockierlösung Horse-Serum/TritonX
- Anti-Thy1.1: Inkubation mit PBS bei RT; Blockierlösung Horse-Serum/TritonX

#### 4.3.5 Lichtmikroskopie

Für die Darstellung der Schnitte nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde das LSM 710 lediglich als Durchlichtmikroskop verwendet. Hier ist – im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie – die richtige Einstellung der Beleuchtung entscheidend, um ein scharfes Bild zu erzeugen. Dabei wird das Mikroskop gekühlt und somit ein scharfes, vollständig ausgeleuchtetes Bild erzeugt.

#### 4.3.6 Konfokale Mikroskopie

Bei der konfokalen Mikroskopie befindet sich eine Lochblende vor dem Detektor. Diese führt zu einer Selektion des emittierten Lichts und damit zu einem höheren Kontrast und einer höheren Bildschärfe (Oheim et al. 2006). Die immunhistologisch angefärbten Schnitte wurden mit einem konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskop* dargestellt. Für die Anregung der Fluoreszenz wurde ein Argonlaser mit mehreren Wellenlängen verwendet (458 nm, 488 nm, 514 nm). Mit Hilfe dieses Lasers wurden die einzelnen Fluorophore zunächst auf einen höheren Energiezustand gebracht. Unter Fluoreszenzabgabe fallen die zuvor angeregten Fluorophore wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Das dabei emittierte Licht wurde von internen Detektoren registriert und konnte somit visualisiert werden.

#### 4.3.7 Transmissionselektronenmikroskopie

In den 1930er Jahren entwickelte der Physiker Ernst Ruska das erste Transmissionselektronenmikroskop. Bei dieser Mikroskopie werden die Elektronen zunächst beschleunigt und gebündelt und durchstrahlen anschließend das zu untersuchende Objekt. Somit kann eine direkte Abbildung des Objektes mit Hilfe von Elektronenstrahlen ermöglicht werden (van Gorkom et al. 2018). Für die vorliegenden Bilder wurde ein Transmissionselektronenmikroskop von Zeiss 902 verwendet.

##### 4.3.7.1 Einbettung und Vorbereitung der Proben

Bei der Transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung wurden jeweils 3 weibliche Tiere mit genau 9 Wochen verwendet. Für die Einbettung wurden die Nieren zunächst mit 3%iger

Paraformaldehydlösung perfusionsfixiert (siehe 4.3.1) und anschließend in 3%iger Glutardialdehydlösung (gelöst in 0,1 molarem Na-Cacodylatpuffer) für mindestens 24 h nachfixiert.

Die Osmierung der Proben fand mit 1%iger Osmiumsäure statt:

- 3 x 20 min in Na-Cacodylatpuffer waschen
- 1–2 h in 1%igem OsO<sub>4</sub> gelöst in Na-Cacodylatpuffer inkubieren
- 3 x 20 min in Na-Cacodylatpuffer waschen

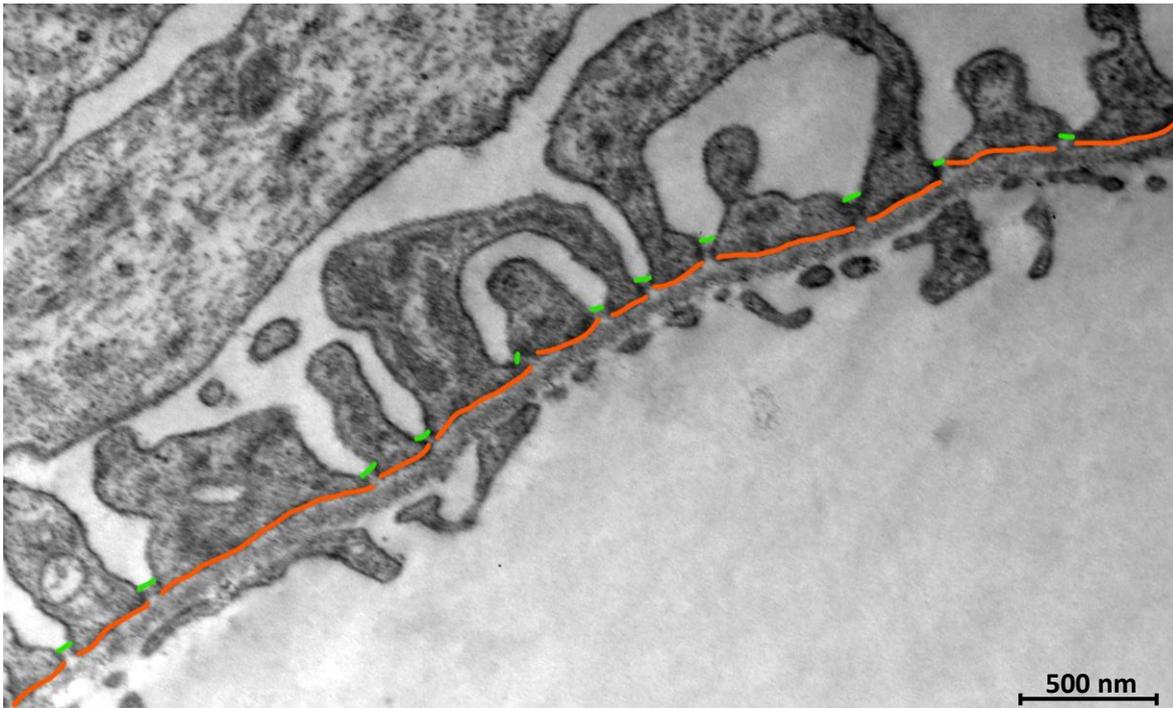
Im Anschluss wurden die Proben mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe und Aceton entwässert und in Epon inkubiert und eingebettet.

- 1x 15 min in 50%igem Ethanol
- 1x 15 min in 70%igem Ethanol
- 1x 15 min in 90%igem Ethanol
- 1x 15 min in 96%igem Ethanol
- 1x 20 min in 100%igem Ethanol
- 3 x 15 min in Aceton
- Über Nacht in 1:1 Aceton/Epon inkubieren
- 3 h in Epon bei 37 °C inkubieren
- Gewebe in Epon einbetten und für 24–48 h bei 60 °C aushärten lassen

Die ausgehärteten Blöcke wurden anschließend am Ultramikrotom (UC6 Leica EM) geschnitten und abschließend mit 1%igem Uranylacetat und Bleicitrat schnittkontrastiert. Für die weitere Analyse wurden von jeder der 6 Ratten je 3 Glomerula von einer verblindeten Person ausgewählt.

#### 4.3.7.2 Analyse der Veränderungen der Podozyten nach dem Verlust der Mesangialzellen

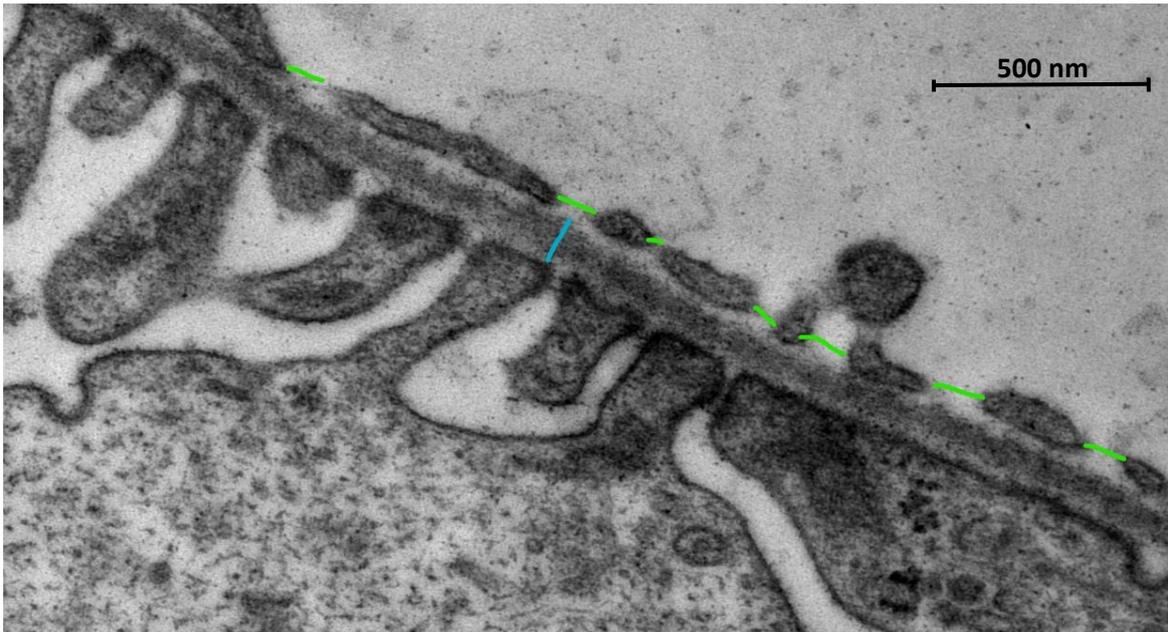
Um die Auswirkungen der mesangialen Lyse auf die Podozyten zu untersuchen, wurden diese eingehend vermessen (Abbildung 9). Hierbei wurden lediglich Bereiche ausgewertet, an welchen die Podozytenfußfortsätze senkrecht auf die Basalmembran treffen. Somit wurde die Auflagefläche der Podozytenfußfortsätze auf die glomeruläre Basalmembran vermessen. Zusätzlich wurde die Breite des Schlitzdiaphragmas sowie die Anzahl dieser Diaphragmen pro 1000 µm ermittelt.



**Abbildung 9: Vermessung der Podozytenfußfortsätze:** Um den Einfluss des Verlustes der Mesangialzellen auf die Podozyten zu ermitteln, wurde die Breite der Auflagefläche der Podozyten (orange) sowie die Anzahl und Breite der Schlitzdiaphragmen zwischen den Podozytenfußfortsätzen (grün) pro 1000  $\mu\text{m}$  vermessen.

#### 4.3.7.3 Vermessung der Breite der Fenestrae

Das fenestrierte Endothel bildet die erste Schicht der Blut-Harn-Schranke. Um zum einen den Einfluss des Anti-Thy1.1. Antikörpers auf die Endothelzellen und deren Fenestrae und zum anderen die Auswirkungen der mesangialen Lyse zu untersuchen, wurden sowohl die Breite als auch die Anzahl der Fenestrae vermessen. Wie in Abbildung 10 gezeigt, wurden hierfür die Messlinien innerhalb der transzytoplasmatischen Aussparungen platziert.



**Abbildung 10: Vermessung der Breite der Fenestrae sowie der Basalmembran:** Die Breite der endothelialen Poren wurde bei MWF Ratten sowie bei mit Anti-Thy1.1 behandelten Tieren vermessen (grün), um eventuelle Einflüsse des Verlustes der Mesangialzellen auf das fenestrierte Endothel zu untersuchen. Zusätzlich wurde die Breite der Basalmembran – hier blau dargestellt – vermessen.

#### 4.3.7.4 Dicke der glomerulären Basalmembran

Um den Einfluss der mesangialen Lyse auf die glomeruläre Basalmembran zu untersuchen wurde diese an unterschiedlichen Stellen in ihrer Breite vermessen (Abbildung 10). Für die Messung wurden lediglich Stellen ausgewählt, an denen die Podozytenfußfortsätze senkrecht auf die Basalmembran treffen. Eine tangential getroffene Basalmembran wurde somit von der Messung ausgeschlossen (Osawa et al. 1966). In der anschließenden Auswertung wurde die Breite der Basalmembran der unbehandelten MWF Ratten mit der Breite der Anti-Thy1.1 behandelten Ratten verglichen, um den Einfluss der mesangialen Lyse auf die Basalmembran zu evaluieren.

### 4.4 Quantifizierung der Albuminausscheidung im Urin

Um den Einfluss des Anti-Thy1.1 Antikörpers sowie den Einfluss von AngII, NA und NaCl auf die Ausscheidung von Albumin im Endharn zu untersuchen, wurde der Albumingehalt quantifiziert.

#### 4.4.1 Uringewinnung

Der basal gewonnene Urin wurde von der Ratte spontan abgegeben. Als nächstes wurde entweder der Antikörper über die Schwanzvene appliziert, oder im Falle eines unbehandelten Tieres, das Tier auf die intravitale Mikroskopie vorbereitet. Wenn eine Anti-Thy1.1 Injektion stattfand, wurde das Tier für 24 Stunden in den Käfig zurückgesetzt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde erneut spontaner Urin gesammelt. Zusätzlich wurde nach der Infusion von AngII, NA oder NaCl der Urin über Blasenpunktion gewonnen.

#### 4.4.2 Messung der Osmolarität

Um ausreichende Probenmenge für weitere Untersuchungen zu behalten, wurde der Urin zunächst im Verhältnis 1:10 mit Millipore verdünnt. Anschließend wurde die Osmolarität über die Gefrierpunktniedrigung mittels Osmometer bestimmt.

#### 4.4.3 Proteinanalyse mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese ist besser unter ihrer englischen Kurzform SDS-PAGE bekannt. Hierbei werden unterschiedliche Proteine im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Masse aufgetrennt.

Zunächst wurden die Urinproben mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung im Verhältnis 1:7,5 verdünnt. Da die Anti-Thy1.1 behandelten Ratten eine starke Albuminurie aufwiesen, mussten diese Proben bis zu 120-fach verdünnt werden, um in einem quantifizierbaren Bereich zu liegen. Im Anschluss wurde das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat zugegeben. Dieses lagert sich an die Proteine und verleiht ihnen eine negative Ladung, die proportional zur jeweiligen molekularen Masse ist. Zusätzlich führt das Reduktionsmittel Dithioerythritol zu einer vollständigen Denaturierung der Proteine und damit zu einer Linearisierung der zuvor gefalteten Proteine. Um die Proben zu beschweren, wurde außerdem Glycerol hinzugefügt. Zur Auftrennung wurden die Proben sowie ein Standard von Proteinen bekannter Größe und bekannter Konzentration auf ein 10%iges Polyacrylamidgel geladen und für eine Stunde eine elektrische Spannung von 100 V angelegt. Diese Spannung führt zur Migration der negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode. Kleine Proteine wandern dabei am schnellsten durch das Gel, wohingegen sich die größeren Proteine nur sehr langsam fortbewegen. Nach Ende der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteinbanden mit dem Farbstoff *Coomassie-Brilliant-Blau* angefärbt. Für die Auswertung wurde die Molekülmasse der Proteine aus dem Probenmaterial mit Hilfe des Standards ermittelt. Albumin besitzt eine bekannte Masse von 68,7 kDa (Pereira B. et al. 2017). Anhand zusätzlicher Standardkurven unterschiedlicher Konzentrationen konnte die jeweilige Albuminmenge schließlich quantifiziert werden.

#### 4.4.4 Albumin-ELISA

Die Quantifizierung der Albuminausscheidung erfolgte mit Hilfe eines *Antigen-ELISA*. Hierfür wurde zunächst eine Standardreihe (8 Verdünnungen von 0 ng/ml – 400 ng/ml) vorbereitet und die Proben mit der Verdünnungslösung verdünnt (1:2000 – 1:200000). Anschließend wurden Duplikate von je 100 µl der verdünnten Probe sowie 100 µl der Standardreihe auf eine mit dem primären Antikörper beschichtete Platte gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde der überschüssige

Antikörper durch Waschen von der Platte entfernt und ein zweiter primärer Antikörper für weitere 30 Minuten hinzugegeben. Auch dieser wurde anschließend mittels Waschpuffer ausgewaschen. Um das Ergebnis dieses *Sandwich-ELISA* sichtbar zu machen wurde ein sekundärer Antikörper hinzugegeben, welcher an den zweiten primären Antikörper bindet und eine enzymatische Farbreaktion verursacht. Diese Reaktion wurde nach einer 10-minütigen Inkubation mit einer weiteren Lösung gestoppt. Die Intensität der daraus resultierenden Färbung konnte anschließend mittels *Plate-Reader* detektiert werden. Die aus der Standardreihe entstehende Kalibrierungskurve ermöglichte es, diese Farbreaktion zu quantifizieren. Um die Ergebnisse außerdem vergleichbar zu machen, wurden die ermittelten Daten abschließend auf die Osmolarität des Urins bezogen.

#### **4.5 Serumgewinnung**

Um den Einfluss des Anti-Thy1.1 Antikörpers auf die Zusammensetzung des Serums zu untersuchen, wurde bei insgesamt 15 Ratten final Blut entnommen. Dies erfolgte über die Punktion des rechten Ventrikels mit Hilfe einer Kanüle. Das gewonnene Blut wurde bis zur Gerinnung für etwa 30 Minuten ruhig gelagert. Anschließend wurde die Probe abzentrifugiert (3500 rpm; 10 min) und das im Überstand verbleibende Serum in ein sauberes Vial überführt. Die Serumproben wurden für die Analyse in ein externes Labor eingeschickt (IDEXX).

#### **4.6 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung wurde *Graph Pad Prim 5* verwendet. Hierbei wurde für den Vergleich mehrerer, unabhängiger Ergebnisse der *ANOVA-Test* mit *post-hoc-Korrektur* nach Bonferroni angewendet. Zur Ermittlung von Unterschieden zwischen lediglich zwei Gruppen, wurde je nach Versuchsaufbau der gepaarte beziehungsweise der ungepaarte T-Test verwendet. In den Abbildungen ist die Irrtumswahrscheinlichkeit der Ergebnisse mit Sternen dargestellt. Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ) von weniger als 0,05 wurden als signifikant eingestuft und mit einem Stern gekennzeichnet. Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,01 wurden mit zwei Sternen und von weniger als 0,001 mit insgesamt drei Sternen dargestellt.

Von einer Verblindung wurde bei den intravitralen Aufnahmen abgesehen, da sich die behandelten Ratten durch das Aufweiten ihrer Kapillarschlingen augenscheinlich von den Kontrolltieren unterscheiden.



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Funktionelle Untersuchungen zum Einfluss von Mesangialzellen auf die glomeruläre Hämodynamik

Ziel dieser Studie war es mit Hilfe der intravitralen Multiphotonenmikroskopie den Einfluss der Mesangialzellen in Abhängigkeit von AngII im Glomerulum zu untersuchen. Hierfür wurde das Anti-Thy1.1 Antikörpermodell gewählt und die Auswirkungen der mesangialen Lyse auf die funktionellen Parameter gemessen. Um die spezifische Wirkung von AngII (0,08 mg/kg/min) an den Mesangialzellen von den blutdruckbedingten Effekten im Glomerulum zu unterscheiden, wurden außerdem Versuche mit dem Vasokonstriktor NA (0,16 mg/kg/min) durchgeführt. Dieses führte zu einer äquivalenten Erhöhung des Blutdrucks, ohne jedoch einen direkten Einfluss auf die Mesangialzellen zu haben. Zusätzlich wurden Versuche mit einer NaCl-Infusion durchgeführt, um den Einfluss einer Volumensubstitution von 0,16 ml/kg zu überprüfen. Die Ergebnisse der Volumensubstitution wurden graphisch jedoch nicht dargestellt.

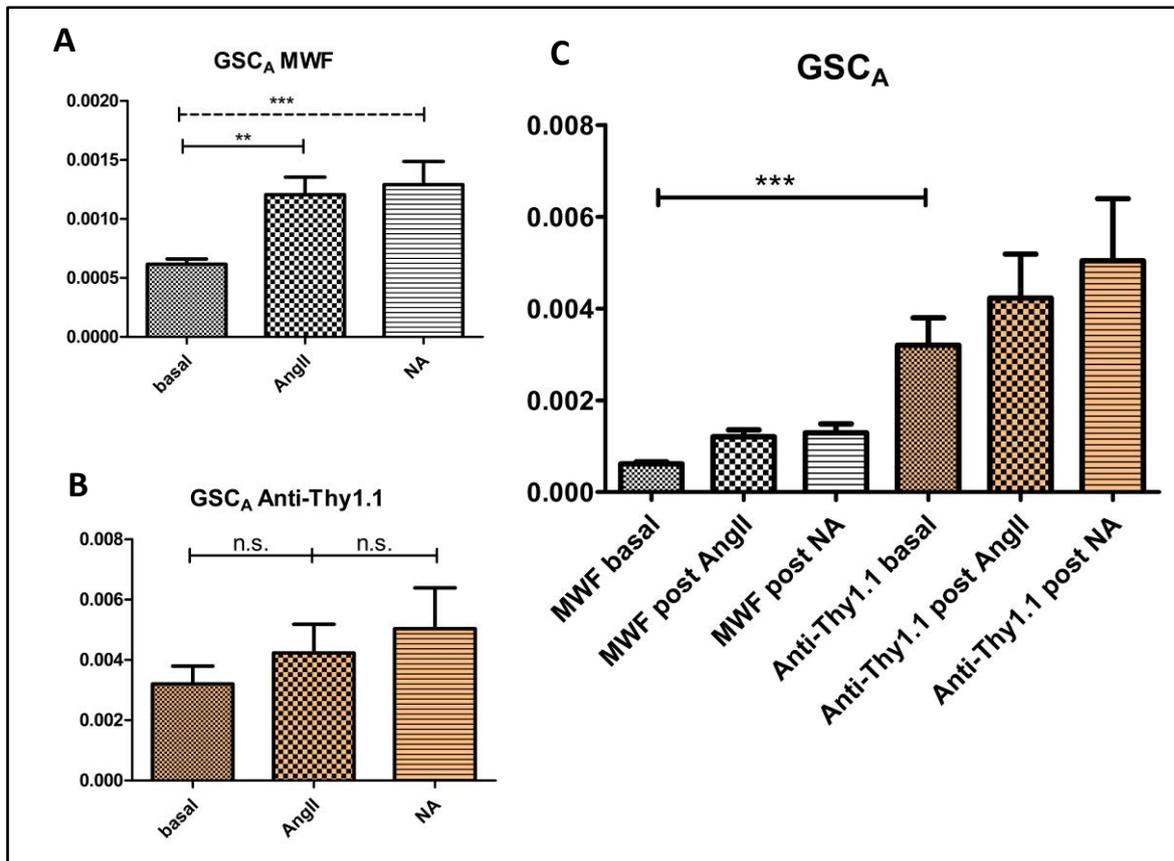
Im Folgenden werden die unbehandelten Ratten auch als „MWF Ratten“ bezeichnet, während die mit dem Anti-Thy1.1 Antikörper behandelten Versuchstiere mit „Anti-Thy1.1 Ratten“ abgekürzt werden. Zur besseren Orientierung werden die Ergebnisse der Anti-Thy1.1 Ratten in den Grafiken orange koloriert. Unter dem Begriff „basal“ werden die Messdaten vor der Applikation von AngII, NA oder NaCl zusammengefasst. Die jeweiligen Blutdruckangaben beziehen sich auf den mittleren direkt gemessenen Blutdruck (4.2.4).

#### 5.1.1 Der Einfluss der Mesangialzellen auf den Siebkoeffizient von Albumin

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine AngII bedingte Erhöhung des Blutdrucks (basal:  $98,8 \pm 1,6$  mmHg;  $n=20$ ; post AngII:  $127,5 \pm 3,5$  mmHg;  $n=8$ ) bei MWF Ratten zu einer Erhöhung des  $GSC_A$  führte (Abbildung 11). Der basale  $GSC_A$  lag bei einem Wert von  $0,00061 \pm 0,00004$  ( $n=76$  Glomerula von 20 Ratten) und stieg nach einer 20-minütigen AngII-Infusion auf einen Wert von  $0,00121 \pm 0,00015$  ( $n=29$  Glomerula von 8 Ratten) signifikant an ( $p<0,001$ ). Eine Infusion mit NA führte zu einem vergleichbaren Anstieg des Blutdrucks auf  $130,0 \pm 4,2$  mmHg ( $n=10$ ) und ebenfalls zu einer signifikanten ( $p<0,0005$ ) Erhöhung des  $GSC_A$  ( $0,00129 \pm 0,0002$ ;  $n=41$  Glomeruli von 10 Ratten). Eine alleinige Volumensubstitution führte zwar zu keiner Änderung des Blutdrucks ( $95,1 \pm 3,4$  mmHg;  $n=2$ ), jedoch zu einer Erniedrigung des  $GSC_A$  auf  $0,00035 \pm 0,00006$  ( $n=6$  Glomeruli von 2 Ratten;  $p<0,05$ ).

Bei den Anti-Thy1.1 behandelten Ratten war der basal in Narkose gemessene Blutdruck mit einem Mittelwert von  $101,5 \pm 1,9$  mmHg äquivalent zum basalen Blutdruck der unbehandelten Ratten ( $n=14$ ). Eine AngII- oder NA-Infusion führte auch bei den Anti-Thy1.1 Tieren zu einer adäquaten und

vergleichbaren Erhöhung des Blutdrucks (AngII:  $128,4 \pm 2,1$  mmHg;  $n=8$ ; NA:  $133,1 \pm 6,4$  mmHg;  $n=4$ ), während eine alleinige Substitution von NaCl auch hier keinen signifikanten Einfluss auf den Blutdruck hatte ( $104,0 \pm 5$  mmHg;  $n=2$ ). Trotz der äquivalenten Reaktion des Blutdrucks hatte eine Infusion von AngII, NA oder NaCl bei den Anti-Thy1.1 Ratten keinen signifikanten Einfluss auf den  $GSC_A$  (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Auswirkungen einer AngII- beziehungsweise NA-Infusion sowie der mesangialen Lyse auf den  $GSC_A$ :** A: Bei den unbehandelten MWF Ratten führte eine Infusion mit AngII oder NA zu einer Erhöhung des  $GSC_A$ . B: Diese Reaktion blieb bei den Anti-Thy1.1 behandelten Ratten aus. C: Allerdings führte die Anti-Thy1.1 bedingte Lyse der Mesangialzellen zu einer 5,2-fachen Erhöhung des  $GSC_A$ .

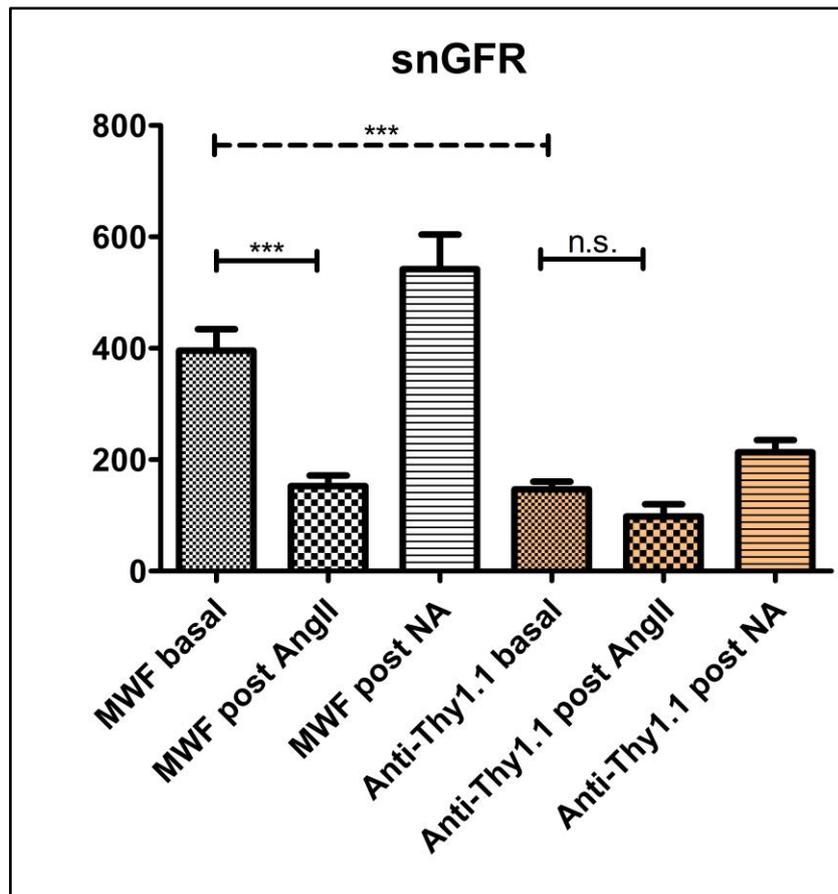
Generell führte die Lyse der Mesangialzellen zu einer signifikanten Erhöhung des  $GSC_A$  ( $p < 0,001$ ). Der basale  $GSC_A$  der behandelten Ratten war ( $0,00320 \pm 0,00059$ ;  $n=30$  Glomerula von 14 Ratten) um das 5,2-fache höher als der basale  $GSC_A$  der MWF Ratten ( $0,00061 \pm 0,00004$ ;  $n=76$  Glomerula von 20 Ratten). Eine Infusion mit AngII, NA oder NaCl führte jedoch zu keiner weiteren Erhöhung des  $GSC_A$  (AngII:  $0,00423 \pm 0,00096$ ;  $n=20$  Glomerula von 8 Ratten; NA:  $0,00504 \pm 0,00135$ ;  $n=10$  Glomerula von 4 Ratten; NaCl:  $0,00221 \pm 0,00071$ ;  $n=8$  Glomerula von 2 Ratten).

Die Ursache der Anti-Thy1.1 bedingten Erhöhung des  $GSC_A$  sowie deren Auswirkungen auf die Albuminausscheidung im Urin wurden in den Kapiteln 5.2.3, 5.2.3.5 und 5.3.2 weiter untersucht.

### 5.1.2 Der Einfluss der Mesangialzellen auf die glomeruläre Filtrationsrate des Einzelnephrons

Um den Einfluss der Mesangialzellen auf die snGFR zu untersuchen, wurde zunächst die basale Filtration der behandelten beziehungsweise der unbehandelten Tiere gemessen. Anschließend wurde diese Messung einstellungsgleich mit AngII, NA oder NaCl wiederholt. Die Auswertung in Abbildung 12 zeigt die gemessene Steigung der abflutenden Farbintensitätskurve in Abhängigkeit vom jeweiligen Tubulusdurchmesser. Dies ist in Kapitel 4.2.7.2 näher erläutert.

Der Blutdruck der unbehandelten Ratten lag basal bei  $100,1 \pm 1,7$  mmHg ( $n=15$ ) und war damit mit dem basalen Blutdruck der Anti-Thy1.1 Ratten vergleichbar ( $101,1 \pm 2,7$  mmHg;  $n=13$ ). Die gemessene snGFR lag bei den unbehandelten Ratten bei  $395,6 \pm 38,6$  ( $n=53$  Glomerula von 15 Ratten) und fiel nach einer AngII vermittelten Blutdruckerhöhung (AngII:  $128,8 \pm 5,0$  mmHg;  $n=8$ ) auf einen Wert von  $152,4 \pm 19,4$  ab ( $n=19$  Glomerula von 8 Ratten;  $p<0,001$ ). Eine äquivalente Erhöhung des Blutdrucks durch NA (NA  $131,8 \pm 4,6$  mmHg;  $n=7$ ) beziehungsweise eine Volumensubstitution in Form von NaCl ( $93,6 \pm 0,6$  mmHg;  $n=2$ ) führte jedoch zu keiner signifikanten Änderung der snGFR (NA:  $n=12$  Glomerula von 7 Ratten;  $p=n.s.$  NaCl:  $n=7$  Glomerula von 2 Ratten;  $p=n.s.$ ).



**Abbildung 12: Einfluss der Mesangialzellen auf die snGFR:** Bei den unbehandelten MWF Ratten kam es unter AngII Einfluss zu einer signifikanten Reduktion der snGFR. Die mit Anti-Thy1.1 behandelten Tiere hatten bereits eine geringere basale snGFR, die sich unter AngII-Infusion nicht signifikant veränderte.

Bei den mit Anti-Thy1.1 behandelten Ratten wurde ein basaler Filtrationswert von  $146,7 \pm 14,1$  ( $n=33$  Glomerula von 13 Ratten) gemessen. Die basale snGFR war somit signifikant geringer ( $p<0,001$ ) als bei den MWF Ratten. Eine entsprechende AngII-Infusion führte bei diesen Tieren zwar zu einem vergleichbaren Anstieg des Blutdrucks ( $125,5 \pm 6,3$  mmHg;  $n=7$ ), jedoch nicht zu einer signifikanten Veränderung der snGFR ( $n=15$  Glomerula von 7 Ratten;  $p=n.s.$ ). Eine Infusion mit NA führte zwar ebenfalls zu einer Erhöhung des Blutdrucks auf  $129,8 \pm 7,6$  mmHg ( $n=4$ ) jedoch veränderte sich die snGFR nicht ( $n=12$  Glomerula von 4 Ratten;  $p=n.s.$ ). Eine Volumensubstitution hatte weder einen Einfluss auf den Blutdruck ( $93,3 \pm 4,7$  mmHg;  $n=2$ ) noch auf die auf die snGFR ( $n=6$  Glomerula von 2 Ratten;  $p=n.s.$ ).

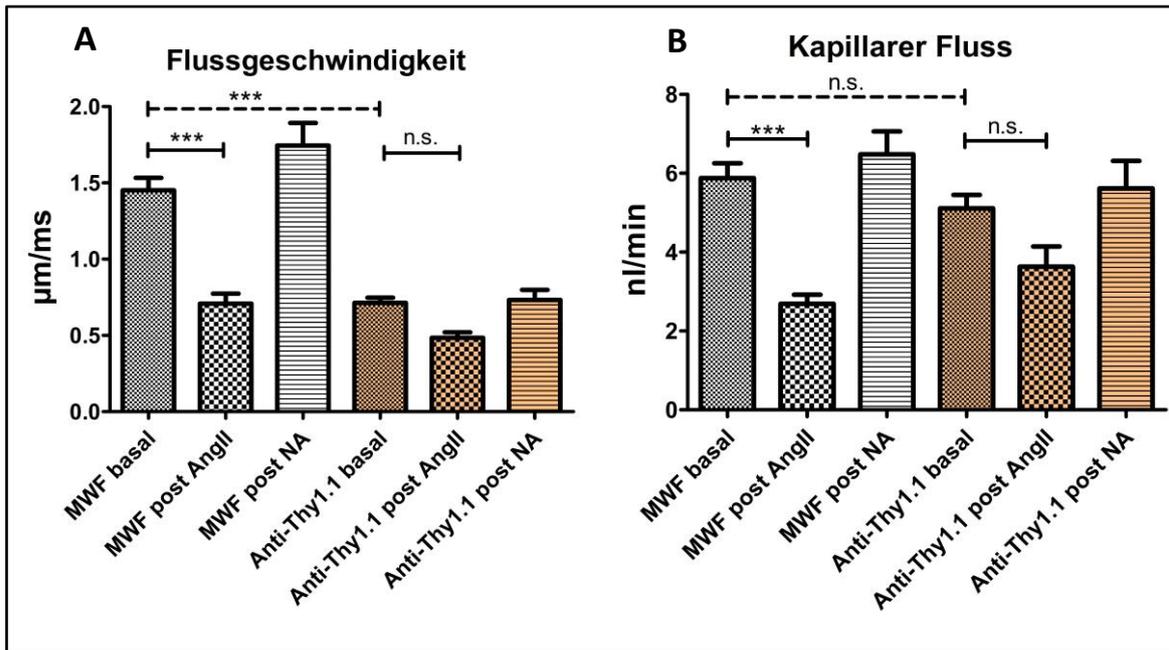
Diese Ergebnisse legen nahe, dass Mesangialzellen maßgeblich an der Regulation der snGFR durch AngII beteiligt sind.

### 5.1.3 Der Einfluss der Mesangialzellen auf die kapillare Flussgeschwindigkeit und den kapillaren Fluss im Glomerulum

Während die kapillare Flussgeschwindigkeit lediglich von der für eine Strecke benötigten Zeit abhängt, ist der kapillare Fluss (= Stromstärke) außerdem vom Durchmesser des jeweiligen Gefäßes

abhängig. Die gemessene basale Flussgeschwindigkeit der MWF Ratten lag mit  $1,45 \pm 0,08 \mu\text{m}/\text{ms}$  ( $n=80$  Kapillaren von 13 Ratten) signifikant ( $p<0,001$ ) über der basalen Geschwindigkeit der Anti-Thy1.1 Ratten ( $0,71 \pm 0,03 \mu\text{m}/\text{ms}$ ;  $n=78$  Kapillaren von 15 Ratten) (Abbildung 13). Der kapillare Fluss blieb jedoch von der Lyse der Mesangialzellen unbeeinflusst ( $p=n.s.$ ). Bei den MWF Ratten lag dieser basal bei  $5,86 \pm 0,38 \text{ nl}/\text{min}$  ( $n=80$  Kapillaren von 13 Ratten). Die langsamere Flussgeschwindigkeit der behandelten Ratten wurde durch die Anti-Thy1.1 bedingte Erweiterung der Kapillaren relativiert. Somit nahm der kapillare Fluss auch nach Lyse der Mesangialzellen nicht signifikant ab ( $5,11 \pm 0,34 \text{ nl}/\text{min}$ ;  $n=78$  Kapillaren von 15 Ratten). Auf den Einfluss des Antikörpers bezüglich der Breite der glomerulären Kapillaren wurde in 5.2.2 näher eingegangen.

Bei den unbehandelten MWF Ratten führte eine konstante Infusion von AngII auch bei der Messung der  $\text{snGFR}$  zu einer Erhöhung des Blutdrucks (basal:  $97,7 \pm 1,9 \text{ mmHg}$ ;  $n=13$ ; AngII:  $122,3 \pm 3,4 \text{ mmHg}$ ;  $n=6$ ) und außerdem zu einer signifikanten Reduktion der kapillaren Flussgeschwindigkeit von  $1,45 \pm 0,08 \mu\text{m}/\text{ms}$  ( $n=80$  Kapillaren von 13 Ratten) auf  $0,71 \pm 0,07 \mu\text{m}/\text{ms}$  ( $p<0,001$ ;  $n=27$  Kapillaren von 6 Ratten) und des kapillaren Flusses von  $5,86 \pm 0,38 \text{ nl}/\text{min}$  ( $n=80$  Kapillaren von 13 Ratten) auf  $2,69 \pm 0,23 \text{ nl}/\text{min}$  ( $p>0,001$ ;  $n=27$  Kapillaren von 6 Ratten). Bei einer entsprechenden Blutdrucksteigerung durch eine Infusion mit NA ( $123,0 \pm 2,6 \text{ mmHg}$ ;  $n=5$ ) konnte weder eine Änderung des kapillaren Flusses ( $p=n.s.$ ;  $n=28$  Kapillaren von 5 Ratten) noch der Flussgeschwindigkeit ( $p=n.s.$ ;  $n=28$  Kapillaren von 5 Ratten) nachgewiesen werden. Ebenso kam es bei der Infusion von physiologischer Kochsalzlösung weder zu einer Erhöhung des Blutdrucks ( $98,5 \pm 1,5 \text{ mmHg}$ ;  $n=2$ ) noch zu einer Änderung des kapillaren Flusses ( $p=n.s.$ ;  $n=14$  Kapillaren von 2 Ratten) oder der Flussgeschwindigkeit ( $p=n.s.$ ;  $n=14$  Kapillaren von 2 Ratten).



**Abbildung 13: Einfluss der Mesangialzellen auf die glomeruläre Durchblutung:** A: Zeigt die kapillare Flussgeschwindigkeit. Eine AngII-Infusion führte bei den MWF Ratten zu einer signifikanten Abnahme der Flussgeschwindigkeit, während diese Reaktion nach der Lyse der Mesangialzellen ausblieb. Generell führte jedoch die Lyse der Mesangialzellen zu einer deutlichen Reduktion der Flussgeschwindigkeit. B: Bei den unbehandelten MWF Ratten führte eine AngII-Infusion zu einer Reduktion des kapillaren Flusses. Diese Reduktion blieb bei den Anti-Thy1.1 behandelten Tiere aus. Allerdings wiesen unbehandelte und behandelte Ratten keine signifikanten Unterschiede des kapillaren Flusses auf.

Bei den mit Anti-Thy1.1 behandelten Ratten führte eine AngII-Infusion zwar zu einer Erhöhung des Blutdrucks von  $100,5 \pm 1,7$  mmHg ( $n=15$ ) auf  $122,5 \pm 5,3$  mmHg ( $n=8$ ), jedoch zu keiner signifikanten Änderung des kapillaren Flusses ( $p=n.s.$ ;  $n=21$  Kapillaren von 8 Ratten) oder der kapillaren Flussgeschwindigkeit ( $p=n.s.$ ;  $n=21$  Kapillaren von 8 Ratten). Ebenso ergab sich nach NA-Infusion zwar eine Blutdruckerhöhung auf  $131,1 \pm 4,7$  mmHg ( $n=5$ ), jedoch kein signifikanter Unterschied des kapillaren Flusses ( $p=n.s.$ ;  $n=29$  Kapillaren von 5 Ratten) oder der kapillaren Geschwindigkeit ( $p=n.s.$ ;  $n=29$  Kapillaren von 5 Ratten). Eine Infusion mit NaCl hatte weder Einfluss auf den Blutdruck ( $102,5 \pm 4,6$  mmHg;  $n=2$ ), noch führte sie zu Änderungen des kapillaren Flusses ( $p=n.s.$ ;  $n=6$  Kapillaren von 2 Ratten) oder der kapillaren Flussgeschwindigkeit ( $p=n.s.$ ;  $n=6$  Kapillaren von 2 Ratten).

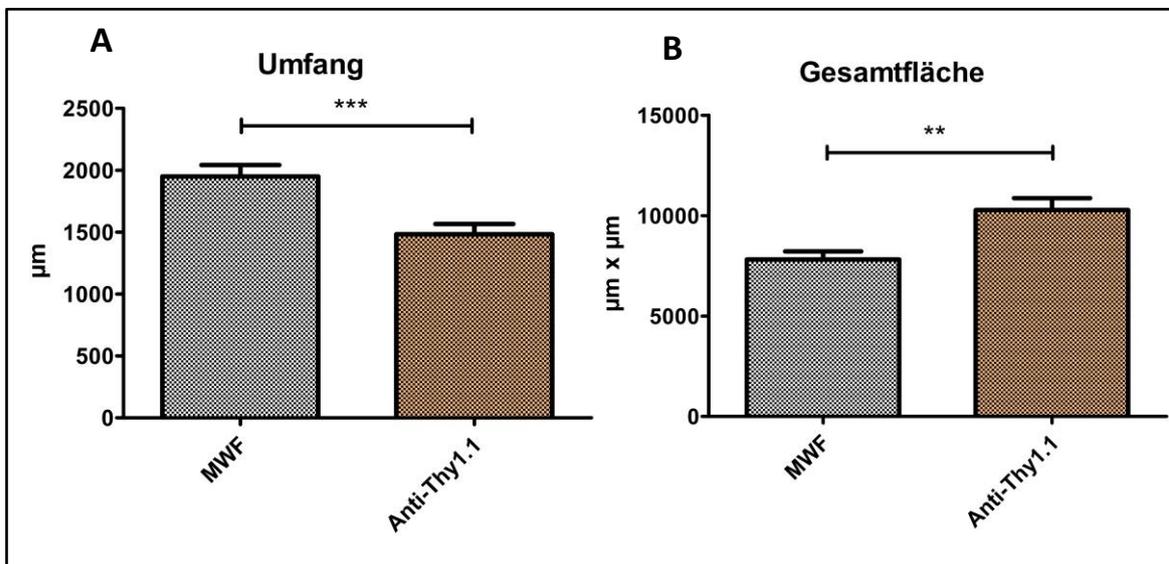
Diese Ergebnisse zeigen, dass Mesangialzellen einen wesentlichen Einfluss auf den kapillaren Fluss und die kapillare Flussgeschwindigkeit im Glomerulum besitzen. So führen ihre kontraktile Eigenschaften und ihre Rezeptoren für AngII zu einer durch AngII bedingten Reduktion des kapillaren Flusses und der kapillaren Flussgeschwindigkeit. Folglich bleibt der kapillare Fluss sowie die kapillare Flussgeschwindigkeit nach der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse der Mesangialzellen unbeeinflusst von AngII.

#### 5.1.4 Einfluss der Mesangialzellen auf die Oberfläche der Kapillaren sowie auf die Gesamtfläche der Kapillaren

Wie bereits in Kapitel 4.2.8 erörtert, wurde der Umfang der Kapillaren als Maßstab für deren Oberfläche verwendet. Der gemessene kapillare Umfang lag bei den unbehandelten Ratten bei  $1949 \pm 92,3 \mu\text{m}$  pro Glomerulum ( $n=16$ ), während bei den behandelten Tieren lediglich ein Umfang von  $1482 \pm 84,3 \mu\text{m}$  ( $n=15$ ) gemessen wurde. Die Lyse der Mesangialzellen führte also zu einem signifikant geringeren Gesamtumfang ( $p=0,0008$ ) und folglich einer geringeren Oberfläche des Kapillarknäuels (Abbildung 14).

Im Gegensatz dazu war die vom Kapillarknäuel eingenommene Gesamtfläche bei den Anti-Thy1.1 Ratten signifikant größer als bei den unbehandelten Tieren ( $p=0,0018$ ). Hier lag die durchschnittliche Gesamtoberfläche der behandelten Tiere bei  $10270 \pm 595,1 \mu\text{m}^2$  ( $n=15$ ) während sie bei den unbehandelten Ratten bei lediglich  $7811 \pm 409,8 \mu\text{m}^2$  ( $n=16$ ) lag (Abbildung 14).

Die Ergebnisse aus den Kapiteln 5.2.1, 5.2.2 und 5.1.4 zeigen, dass sich durch die Lyse der Mesangialzellen die gesamte Struktur des Glomerulums verändert. Durch ihren Verlust kommt es zum Konfluieren der Kapillaren und damit zu einer Verminderung der Oberfläche des jeweiligen Kapillarknäuels. Zugleich erhöht sich jedoch durch den *Ballooning-Effekt* die vom Kapillarknäuel eingenommene Gesamtfläche im *Bowman-Raum*.



**Abbildung 14: Einfluss der Mesangialzellen auf den Umfang sowie die Gesamtfläche der Kapillaren:** A: Der gemessene Umfang der Kapillaren verringerte sich nach der Lyse der Mesangialzellen signifikant. Dies lässt ein Konfluieren der Kapillaren nach dem Verlust der Mesangialzellen vermuten B: Die von den Kapillaren eingenommene Gesamtfläche im *Bowman-Raum* nahm nach Lyse der Mesangialzellen signifikant zu.

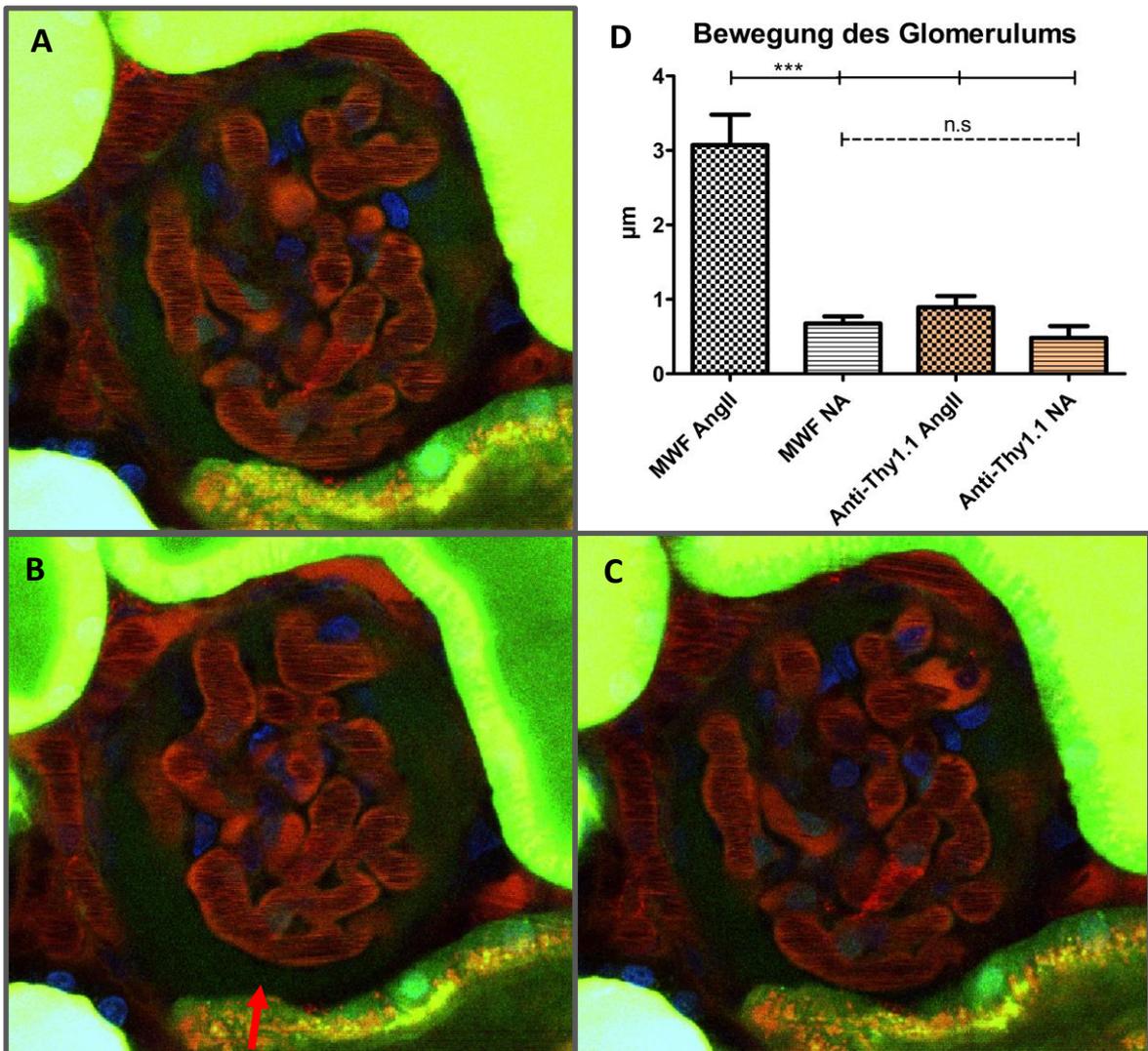
#### 5.1.5 Angiotensin II bedingte Bewegung der glomerulären Kapillaren

Eine Infusion mit AngII führte bei den unbehandelten Ratten zu einer augenscheinlich rotierenden Bewegung des Kapillarknäuels im Glomerulum. In Abbildung 15 sind einzelne Aufnahmen der AngII

bedingten, glomerulären Bewegung dargestellt. Diese sichtbare rotierende Bewegung blieb nach einer Infusion mit NA aus. In der anschließenden Auswertung wurde die Bewegung des Kapillarknäuels anhand äußerer, tubulärer Fixpunkte vermessen. Dabei ergaben sich bei allen Tieren minimale Bewegungen, die jedoch in der intravitalen Mikroskopie den atembedingten Eigenbewegungen der Ratte geschuldet sind. Während der gemessene Absolutwert der AngII bedingten Bewegung bei  $3,07 \pm 0,41 \mu\text{m}$  ( $n=14$  Glomerula von 7 Ratten) lag, war dieser während einer Infusion mit NA signifikant geringer ( $0,68 \pm 0,10 \mu\text{m}$ ;  $p<0,001$ ;  $n=16$  Glomerula von 7 Ratten).

Hinsichtlich der Effekte auf den Blutdruck ergaben sich jedoch keine Unterschiede zwischen AngII und NA. Bei den unbehandelten MWF Ratten lag der mittlere Blutdruck bei  $87,7 \pm 2,3 \text{ mmHg}$  ( $n=14$ ) und stieg nach einer AngII-Infusion auf  $126,2 \pm 5,8 \text{ mmHg}$  an ( $n=7$ ). Eine Infusion mit NA hatte einen vergleichbaren Effekt auf den Blutdruck ( $135,7 \pm 5,6 \text{ mmHg}$ ;  $n=7$ ). Auch die Behandlung mittels Anti-Thy1.1 Antikörper hatte keinen Einfluss auf den Blutdruck (basal:  $96,5 \pm 4,3 \text{ mmHg}$ ;  $n=6$ ) und eine Infusion mit AngII beziehungsweise NA führte zu einem vergleichbaren Anstieg des Blutdrucks (AngII:  $139,8 \pm 5,1 \text{ mmHg}$ ;  $n=4$ ; NA:  $143,5 \pm 1,9 \text{ mmHg}$ ;  $n=4$ ).

Bei den Anti-Thy1.1 behandelten Tieren war nach AngII-Infusion kaum eine Bewegung des Kapillarknäuels zu sehen. Die hierbei gemessene Bewegung war mit  $0,89 \pm 0,15 \mu\text{m}$  signifikant geringer als die AngII bedingte Bewegung der unbehandelten Ratten ( $p<0,001$ ;  $n=10$  Glomerula von 6 Ratten). Eine Infusion mit NA führte auch bei den behandelten Tieren zu keiner signifikanten Bewegung des Glomerulums ( $0,48 \pm 0,16 \mu\text{m}$ ;  $n=4$  Glomerula von 4 Ratten).



**Abbildung 15: AngII bedingte Bewegung des Glomerulums im Bowman-Raum:** A: Zeigt ein basales Glomerulum einer unbehandelten MWF Ratte vor der Infusion. B: Zeigt eine Bewegung des Kapillarknäuels im Glomerulum (Pfeil). Die zusätzlich abgebildeten Zellkerne im Tubulussystem zeigen dabei eine konstante Bildebene. Lediglich das Kapillarknäuel im Glomerulum scheint zu rotieren. C: Nach Beenden der AngII-Infusion kehrt das Kapillarknäuel in seinen Ausgangszustand zurück. D: Zeigt die Absolutwerte der Bewegung der einzelnen Kapillarschlingen, vermessen zu ihrem jeweiligen Bezugspunkt. Eine Infusion von AngII führte bei den unbehandelten Ratten zu einer Bewegung der Kapillarschlingen. Diese Bewegung reduzierte sich nach der Lyse der Mesangialzellen signifikant.

Um zusätzlich eine kontrahierende beziehungsweise relaxierende Bewegung des gesamten Kapillarknäuels zu überprüfen, wurde dessen Querschnittsveränderung vermessen. Dabei konnte jedoch kein Hinweis auf eine entsprechende Kontraktion gefunden werden. Die mittlere Querschnittsänderung der unbehandelten MWF Ratten unterschied sich nach AngII nicht signifikant ( $p=n.s.$ ) von der mittleren Querschnittsänderung der Vergleichsgruppen (Mittlere Querschnittsänderung: MWF: AngII:  $-0,78 \mu\text{m}$  NA:  $0,40 \mu\text{m}$ ; Anti-Thy1.1: AngII:  $1,12 \mu\text{m}$  NA:  $0,35 \mu\text{m}$ ). Durch das Auf- oder Abtauchen des Kapillarknäuels während der AngII bedingten rotierenden Bewegung veränderte sich zwar der jeweilige Querschnitt (Min:  $-9,44 \mu\text{m}$ ; Max:  $5,12 \mu\text{m}$ ;  $n=10$ ), jedoch konnte weder eine Kontraktion noch eine Relaxation der Kapillaren nachgewiesen werden. Die dabei gemessene Querschnittsveränderung kam größtenteils durch die Bewegung des

Kapillarknäuels zu Stande. Das Kapillarknäuel der Anti-Thy1.1 behandelten Tiere wies bei einer AngII-Infusion kaum eine Bewegung auf und die gemessenen Querschnittsveränderung waren relativ gering (Min: -1,05  $\mu\text{m}$ ; Max: 2,46  $\mu\text{m}$ ; n=6). Ebenso kam es auch nach eine Infusion mit NA bei behandelten sowie unbehandelten Ratten kaum zu einer Querschnittsänderung (MWF: NA: Min: -1,41  $\mu\text{m}$ ; Max: 3,15  $\mu\text{m}$ ; n=10; Anti-Thy1.1: NA: Min: 0,0  $\mu\text{m}$  Max: 0,7  $\mu\text{m}$ ; n=4).

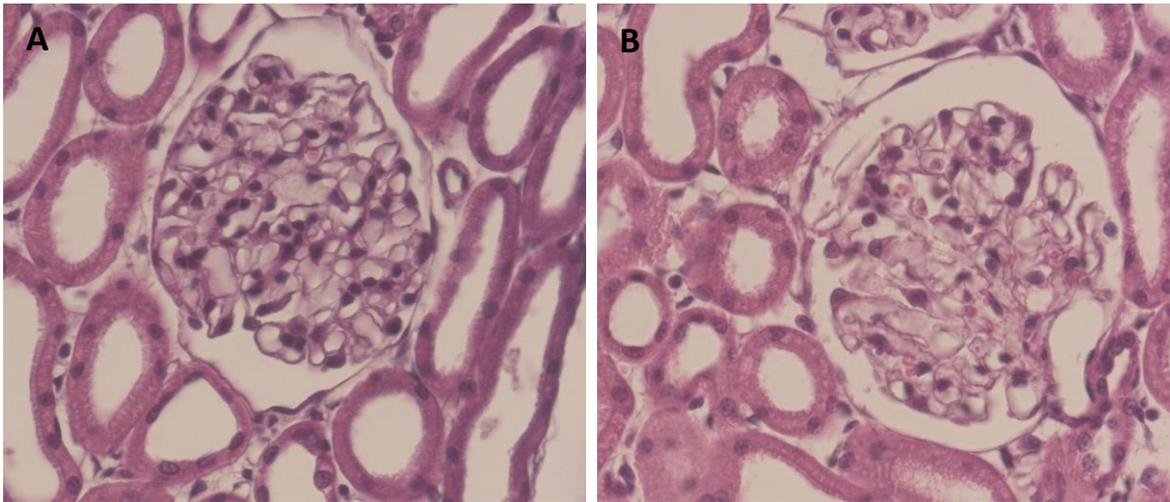
Mit Hilfe dieser intravitale Aufnahmen konnte erstmals eine AngII bedingte Bewegung des Glomerulums visualisiert werden. Das Ausbleiben dieser Bewegung nach Anti-Thy1.1 Applikation legt nahe, dass die Mesangialzellen durch ihre kontraktile Eigenschaften verantwortlich für die rotierende Bewegung sind.

## **5.2 Histologische Untersuchungen der strukturellen Veränderung nach Anti-Thy1.1 bedingter Lyse der Mesangialzellen**

Abgesehen von den funktionellen Veränderungen, verursacht die Lyse der Mesangialzellen auch strukturelle Veränderungen im Glomerulum. Diese Veränderungen wurden mittels intravitale Mikroskopie aber auch lichtmikroskopisch, immunhistologisch sowie elektronenmikroskopisch untersucht.

### **5.2.1 Struktureller Vergleich mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

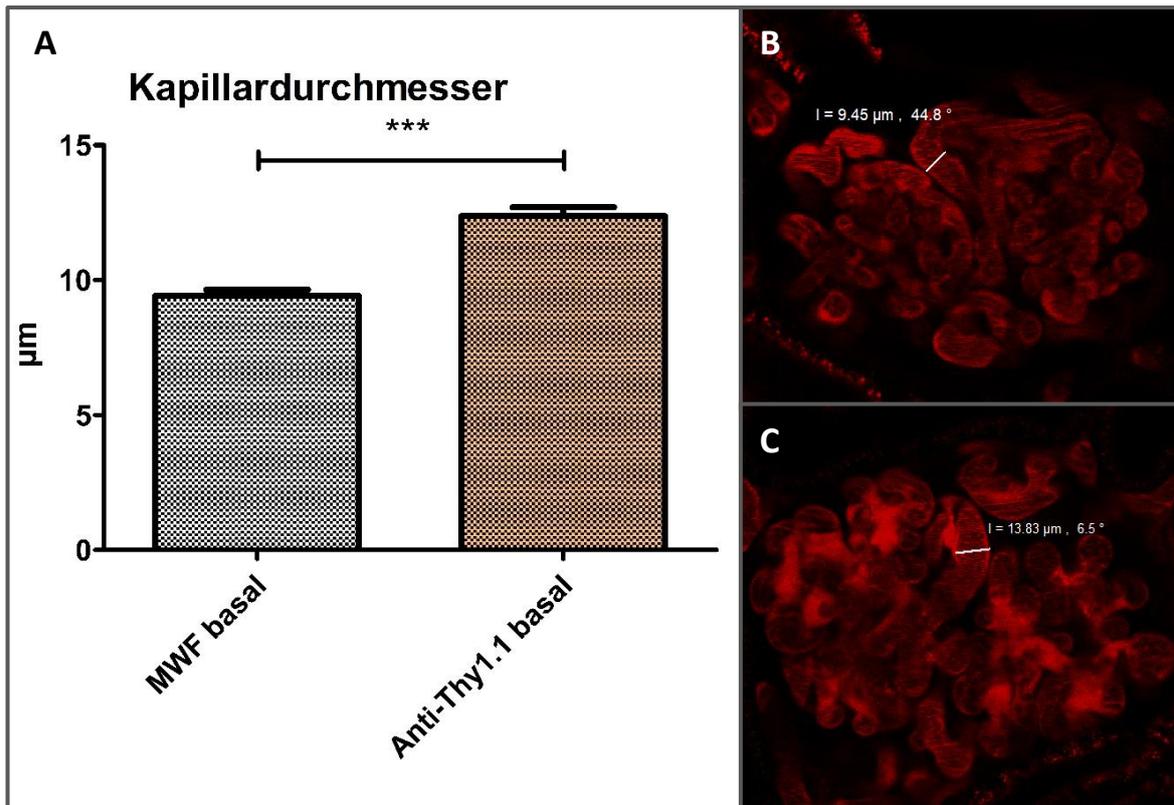
Um den Einfluss des applizierten Anti-Thy1.1 Antikörpers auf die Mesangialzellen und die glomeruläre Struktur zu untersuchen, wurden zunächst HE-gefärbte Schnittpräparate lichtmikroskopisch untersucht (Abbildung 16). Während die Glomerula der unbehandelten MWF Ratten homogen und gleichmäßig strukturiert waren, wiesen die Glomerula der Anti-Thy1.1 behandelten Ratten ein weniger dichtes Erscheinungsbild auf. Durch die Antikörper bedingte Lyse der Mesangialzellen waren die Glomerula der Anti-Thy1.1 behandelten Tiere zellärmer und die erweiterten glomerulären Kapillaren zeigten bereits einen beginnenden *Ballooning-Effekt*.



**Abbildung 16: Einfluss des Anti-Thy1.1 Antikörpers auf die Struktur im Glomerulum:** Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Schnitte: A: Die Glomerula der unbehandelten MWF Ratten wiesen eine dichte Struktur der Kapillarschlingen auf. B: In den Glomerula der Anti-Thy1.1 behandelten Ratten war bereits ein beginnender *Ballooning-Effekt* der Kapillaren nach dem Verlust der Mesangialzellen zu erkennen.

### 5.2.2 Verbreiterung der glomerulären Kapillaren nach Lyse der Mesangialzellen

Nicht nur anhand der histologischen Schnitte, sondern auch bei den intravitalen Aufnahmen konnte eine Verbreiterung der Kapillaren nachgewiesen werden (Abbildung 17). Während die MWF Ratten eine durchschnittliche Kapillarbweite von  $9,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$  besaßen ( $n=52$ ), konnte bei den Anti-Thy1.1 behandelten Ratten ein signifikant ( $p < 0,0001$ ) größerer Kapillardurchmesser von  $12,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$  ( $n=71$ ) nachgewiesen werden. Diese Verbreiterung der Kapillaren wird auch als *Ballooning-Effekt* bezeichnet und ist charakteristisch für die Anti-Thy1.1 bedingte Veränderung im Glomerulum (Kurihara und Sakai 2017).



**Abbildung 17: Auswirkungen der Anti-Thy1.1 bedingten mesangialen Lyse auf den Kapillardurchmesser:** A: Eine Lyse der Mesangialzellen führt zu einer signifikanten Verbreiterung der Kapillaren im Glomerulum. B: Zeigt eine intravitale Aufnahme bei einer unbehandelten Ratte. Die Kapillarbreite wurde an unterschiedlichen Stellen im Glomerulum ausgemessen. C: Die intravitale Aufnahme nach der Lyse der Mesangialzellen zeigt eine deutliche Verbreiterung der einzelnen Kapillarschlingen.

### 5.2.3 Immunhistologischer Vergleich

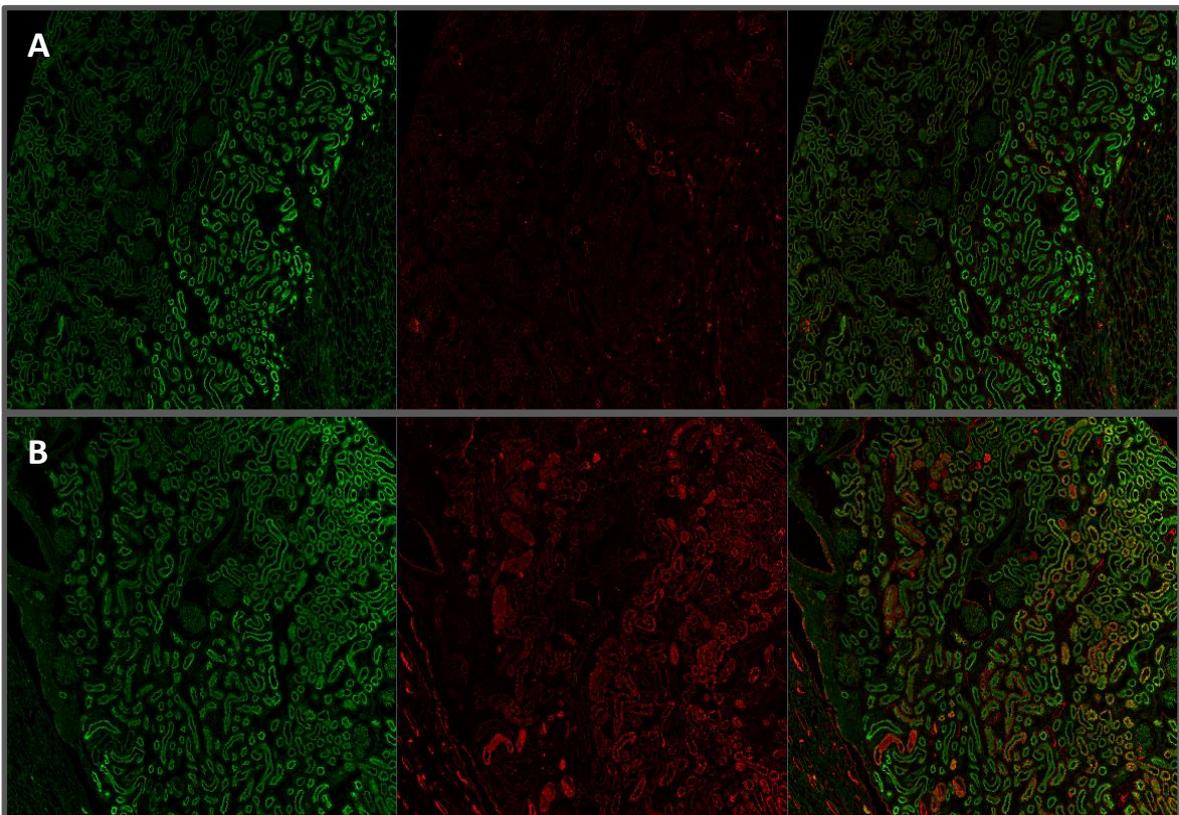
Um die Anti-Thy1.1 bedingten Veränderungen im Glomerulum zu evaluieren, wurden außerdem Paraffinschnitte von unbehandelten und behandelten Ratten immunhistologisch verglichen. Durch die funktionellen Messungen konnte nach der Lyse der Mesangialzellen eine Erhöhung des  $GSC_A$  nachgewiesen werden. In der folgenden immunhistologischen Färbung sollte daher zunächst die filtrierte Albuminmenge nachgewiesen werden. Anschließend wurden unterschiedliche Bestandteile der Filtrationsbarriere immunologisch angefärbt, um fragliche Defekte der Filtrationsbarriere zu ermitteln. Zusätzlich wurde die Spezifität des Anti-Thy1.1 Antikörpers in der Niere überprüft und mögliche Nebenwirkungen auf die glatten Muskelzellen der efferenten und afferenten Arteriole überprüft.

#### 5.2.3.1 Nachweis der Erhöhung der Albuminausscheidung nach Lyse der Mesangialzellen

Bei der intravitalem Ermittlung des Siebkoeffizienten für Albumin wurde ein signifikant erhöhter  $GSC_A$  bei den behandelten Ratten gemessen. Diese erhöhte Filtration und die genaue Verteilung von Albumin sollte mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht werden. Hierfür

wurde zunächst das an den primären Antikörper gebundene Albumin mit einem sekundären, an Indodicarbocyanin (Cy5: Absorption: 650 nm; Emission: 670 nm; Farbe: rot) gekoppelten Antikörper sichtbar gemacht. Dabei zeigt sich eine deutlich stärkere Albuminkonzentration bei den Anti-Thy1.1 behandelten Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Ratten (Abbildung 18, Abbildung 19).

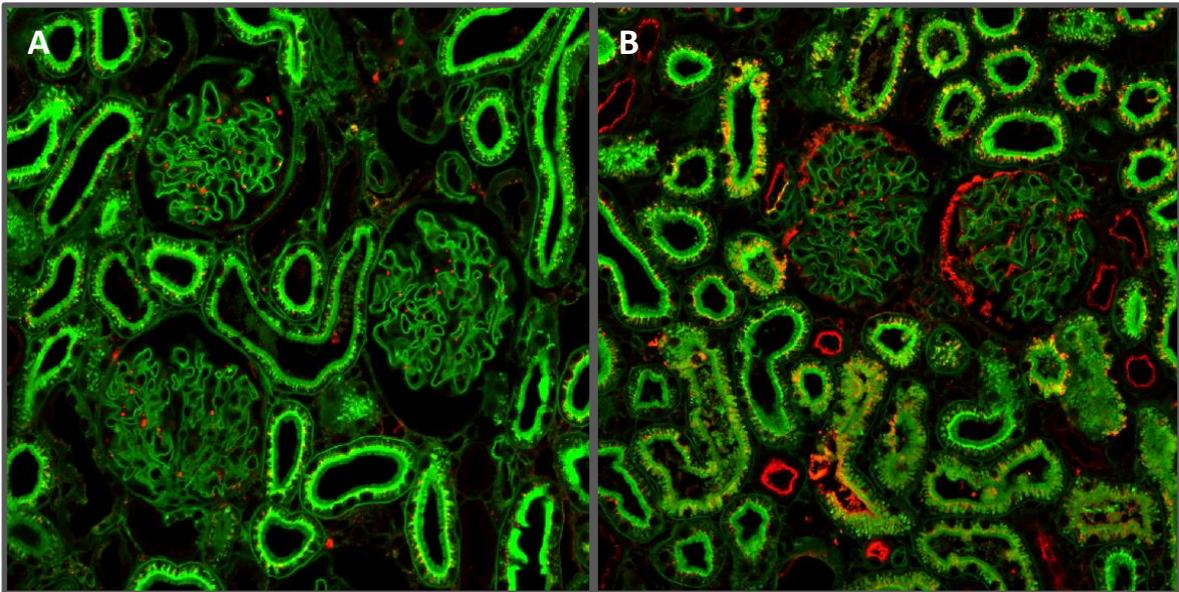
Die Abbildung 18 zeigt die generalisierte Verteilung von Albumin insbesondere im Bereich des proximalen Tubulus aber auch im distalen Tubulus sowie im Nierenmark. Dabei wird deutlich, dass die mit Anti-Thy1.1 behandelten Ratten eine höhere Filtration von Albumin aufweisen. Das vermehrte Auftreten von Albumin in den späteren Kompartimenten des Tubulussystems lässt vermuten, dass die Resorptionskapazität des proximalen Tubulus bei den Anti-Thy1.1 behandelten Ratten erschöpft ist und es somit zu einer verstärkten Albuminausscheidung kommt.



**Abbildung 18: Immunhistologischer Vergleich der Albuminausscheidung im Überblick:** Albumin wurde mittels Cy5 rot gefärbt. Die endotheliale Glykokalyx erscheint durch WGA-Fluoreszin grün. Ebenso ist die Autofluoreszenz des Tubulussystems grün dargestellt. A: Zeigt eine unbehandelte Ratte. Albumin ist hier nur sehr schwach im Tubulussystem zu finden. B: Bei der Anti-Thy1.1 behandelten Ratte ist Albumin nicht nur im proximalen Tubulus stark gefärbt, sondern auch in weiter distal gelegenen Kompartimenten des Tubulussystems.

Eine Ablagerung von Albumin im *Bowman-Raum* sowie im proximalen Tubulus lässt sich in Abbildung 19 im Detail erkennen. Während bei den unbehandelten Ratten lediglich vereinzelt Albumin nachgewiesen werden kann, besitzen die Anti-Thy1.1 behandelten Ratten eine deutlich höhere Albuminausscheidung. Im proximalen Tubulus wird das filtrierte Albumin von Tubuluszellen resorbiert und mit Hilfe ihrer intrazellulären Lysosomen abgebaut. Dort wird die hohe

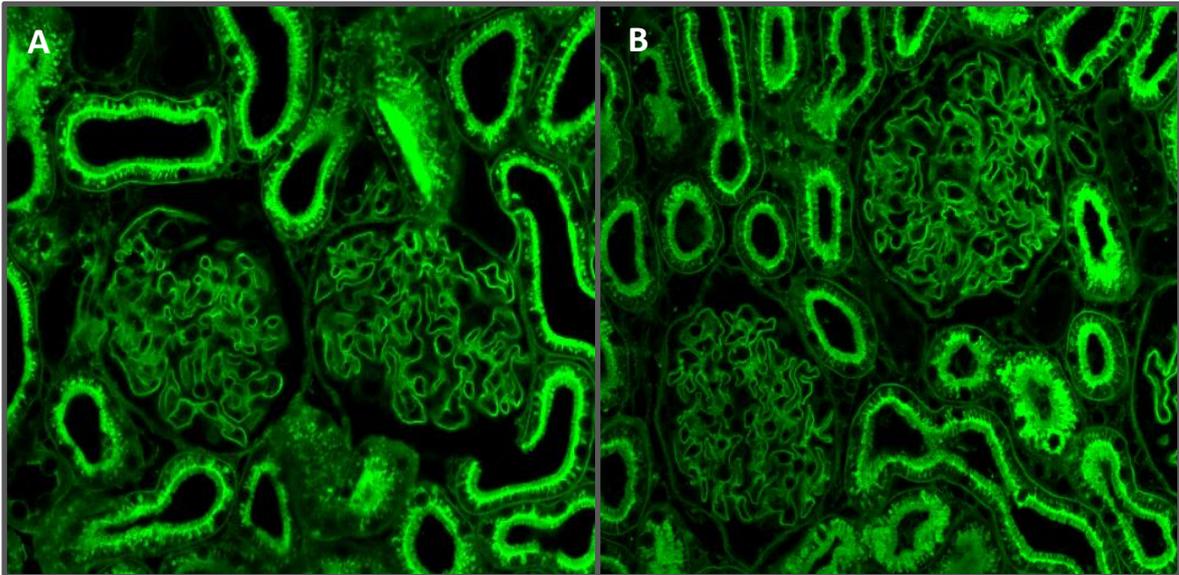
Albuminkonzentration der Anti-Thy1.1 behandelten Ratten durch die intrazelluläre Anreicherung sowie die Verklebung des Bürstensaums deutlich.



**Abbildung 19: Immunhistologischer Vergleich der Albuminausscheidung:** Albumin wurde mit Hilfe von Cy5 rot dargestellt, während die Glykokalyx mit WGA-Fluoreszin grün gefärbt wurde. Das Tubulussystem besitzt eine grün leuchtende Autofluoreszenz. A: Bei der unbehandelten MWF Ratte ist Albumin nur vereinzelt im Glomerulum und im proximalen Tubulus zu finden. WGA-Fluoreszin färbt die Glykokalyx im Glomerulum an. B: Die mit Anti-Thy1.1 behandelte Ratte weist eine deutlich stärkere Färbung von Albumin im *Bowman-Raum* des Glomerulums sowie im proximalen Tubulus auf. Die mit WGA-Fluoreszin angefärbte endotheliale Glykokalyx scheint jedoch unverändert vom Antikörper zu sein.

### 5.2.3.2 Einfluss der mesangialen Lyse auf die endotheliale Glykokalyx

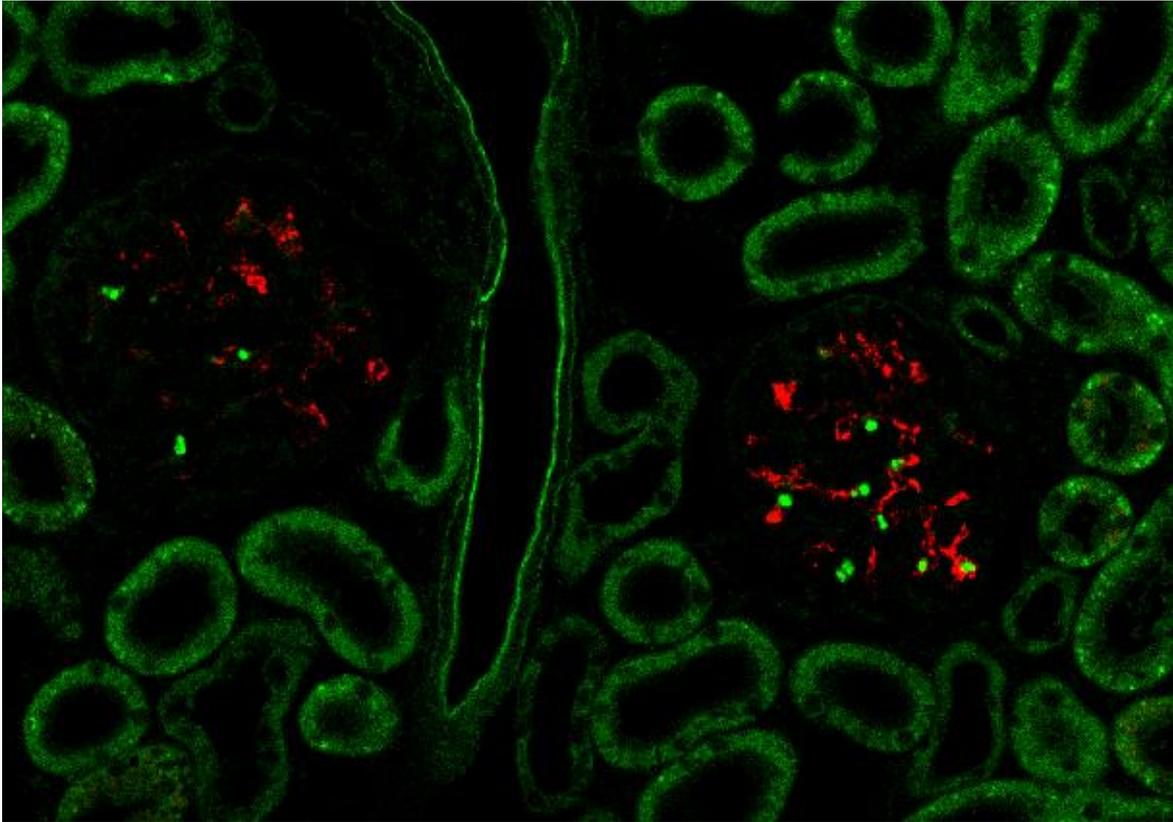
Die endotheliale Glykokalyx besitzt einen maßgeblichen Einfluss auf die glomeruläre Filtrationsbarriere. Um den Einfluss der Lyse der Mesangialzellen auf die Glykokalyx zu untersuchen wurden die Schnitte mit *Wheat germ agglutinin fluorescein* (WGA-Fluoreszin: Absorption: 497 nm Emission: 520 nm; Farbe: grün) angefärbt. Dabei bestanden – wie in Abbildung 19 und Abbildung 20 zu sehen – hinsichtlich der Ausbildung der Glykokalyx keine relevanten Unterschiede zwischen den behandelten und den unbehandelten Ratten. Der mit WGA-Fluoreszin angefärbte Teil der Glykokalyx scheint den immunhistologischen Färbungen zufolge unbeeinflusst von der mesangialen Lyse zu sein.



**Abbildung 20: Immunhistologische Darstellung der endothelialen Glykokalyx:** Die Glykokalyx wurde mit WGA-Fluoreszin grün gefärbt. Außerdem ist die Autofluoreszenz im Tubulussystem ebenfalls grün dargestellt. A: Unbehandelte Ratte B: Anti-Thy1.1 behandelte Ratte. Im direkten Vergleich ergaben sich nach Lyse der Mesangialzellen keine Unterschiede in der Ausprägung oder Dicke der mit WGA-Fluoreszin gefärbten endothelialen Glykokalyx.

### 5.2.3.3 Immunhistologischer Nachweis der Spezifität des Anti-Thy1.1 Antikörpers

Um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen, wurde auf Paraffinschnitte von Anti-Thy1.1 behandelten Ratten lediglich ein sekundärer, an Cy5 gekoppelter Antikörper aufgetragen. In Abbildung 21 ist die Verteilung des Anti-Thy1.1 Antikörpers anhand der roten Färbung des sekundären Antikörpers zu sehen. Im Glomerulum konnte eine spezifische Färbung nachweisen werden, welche der Verteilung der Mesangialzellen im Glomerulum entspricht, wohingegen weder im Tubulussystem noch im Endothel der Anti-Thy1.1 Antikörper nachgewiesen werden konnte. Dies zeigt, dass der Antikörper spezifisch an Mesangialzellen bindet, während benachbarte Zellen unbeeinflusst bleiben.



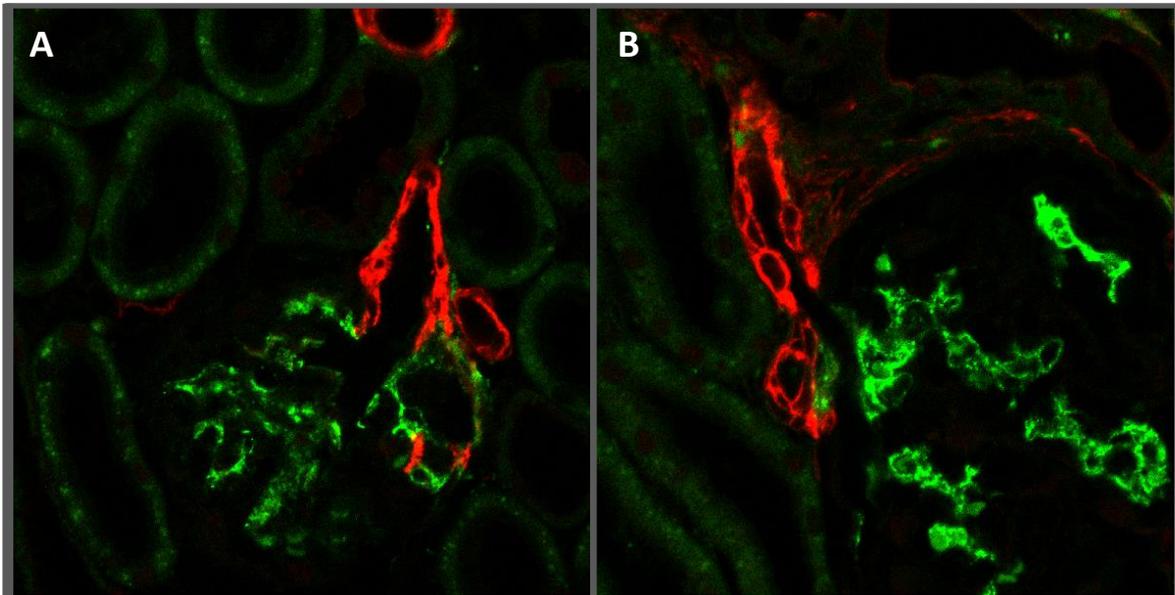
**Abbildung 21: Immunhistologischer Nachweis der Spezifität des Anti-Thy1.1 Antikörpers:** Der sekundäre, an Cy5 gekoppelte Antikörper färbt den intravital applizierten Antikörper Anti-Thy1.1 rot an. Dabei entspricht die Verteilung des Antikörpers im Glomerulum der Position der Mesangialzellen. Das Tubulussystem sowie das Gefäßsystem bleiben frei von dem Anti-Thy1.1 Antikörper.

#### 5.2.3.4 Verteilung des Anti-Thy1.1 Antikörpers im Glomerulum und dessen Einfluss auf Endothelzellen

Nach der Applikation des Anti-Thy1.1. Antikörpers blieb die AngII bedingte rotierende Bewegung des Glomerulums aus (5.1.4). Um eine Nebenwirkung des Anti-Thy1.1 Antikörpers auf die Gefäßmuskulatur der afferenten beziehungsweise der efferenten Arteriole zu überprüfen wurden diese mit Hilfe von *alpha smooth muscle actin* ( $\alpha$ SMA) immunhistologisch angefärbt. Der verwendete sekundäre Antikörper war abermals mit dem roten Farbstoff Cy5 gekoppelt. Zusätzlich wurden die Mesangialzellen sowohl bei den unbehandelten als auch bei den behandelten Ratten mit einem primären Anti-Thy1.1 Antikörper sowie einem sekundären, an Carbocyanin (Cy2: Absorption: 490 nm; Emission: 508 nm) gekoppelten Antikörper grün angefärbt.

Die Abbildung 22 zeigt das Resultat beider Färbungen. Die glomerulären Arteriolen der unbehandelten sowie der behandelten Ratten wiesen eine vergleichbare Färbung auf. Das belegt, dass der applizierte Anti-Thy1.1 Antikörper keine Auswirkungen auf benachbarte Endothelzellen hat. Die AngII bedingte Rotation des Glomerulums ist folglich ausschließlich den Mesangialzellen zuzuschreiben und blieb nach deren Lyse aus.

Das Verteilungsmuster der Mesangialzellen veränderte sich jedoch bei den behandelten Ratten deutlich (Abbildung 22, Abbildung 23). Während das mesangiale Thy1.1 Antigen bei den unbehandelten Ratten diffus und netzartig verteilt im Glomerulum vorzufinden war, konnte es bei den Anti-Thy1.1 behandelten Ratten lediglich in kondensierter Form nachgewiesen werden.



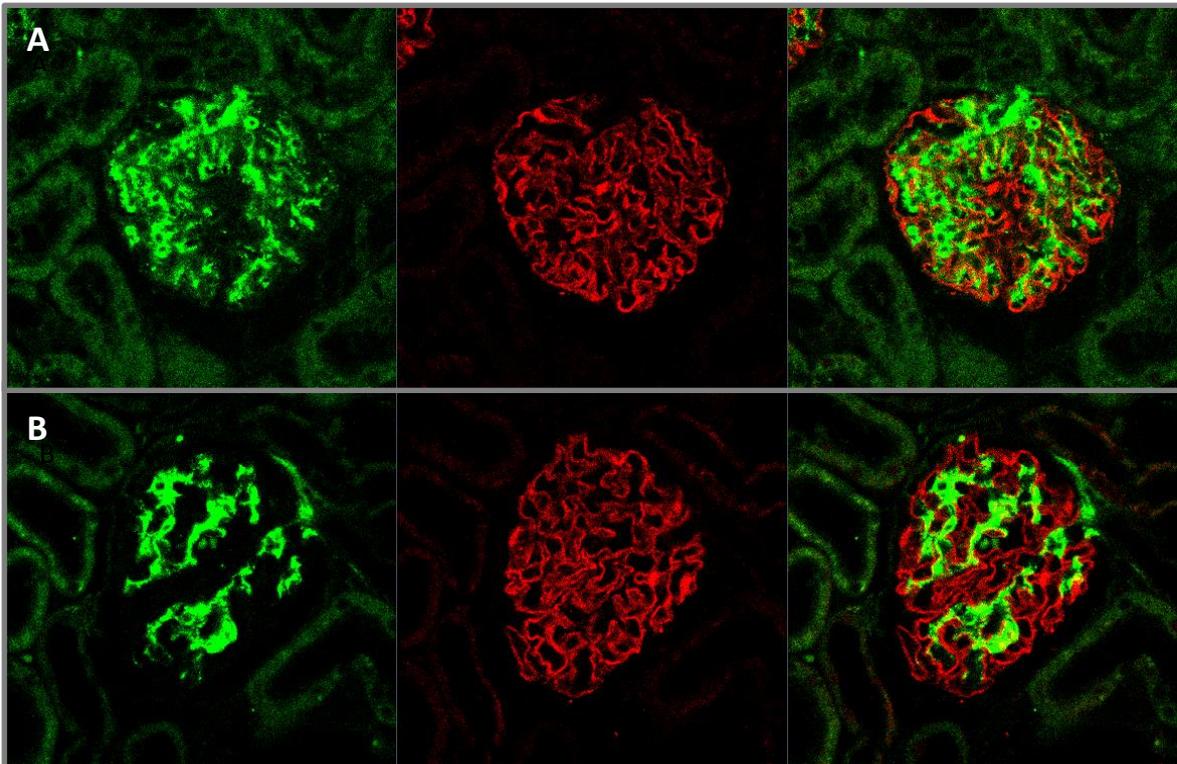
**Abbildung 22: Immunhistologische Darstellung der glatten Gefäßmuskulatur in afferenter/efferenter Arteriole:** Als Marker für die glatte Muskulatur der Arteriolen wurde ein Anti- $\alpha$ SMA Antikörper und ein sekundärer an Cy5 gekoppelter Antikörper verwendet (rot). Die Mesangialzellen wurden mit einem primären Anti-Thy1.1 Antikörper und einem sekundären Cy2 gekoppelten Antikörper grün gefärbt. Die Zellen des Tubulus weist durch ihre Eigenfluoreszenz ebenfalls eine leicht grüne Färbung auf. A: Bei der unbehandelte MWF Ratte wurde die glomeruläre Arteriole rot gefärbt. Die Verteilung der Mesangialzellen ist diffus und netzartig im Glomerulum zu finden. B: Bei der behandelten Ratte wurde die glomeruläre Arteriole ebenfalls rot gefärbt. Dabei ergab sich kein Unterschied zu den unbehandelten Ratten. Allerdings veränderte sich die Verteilung es Oberflächenantigens der Mesangialzellen nach deren Lyse. Die zuvor netzartige Verteilung erscheint nach der Anti-Thy1.1-Applikation vermehrt kondensiert.

#### 5.2.3.5 Einfluss der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse von Mesangialzellen auf die Podozyten

Die Podozyten sind ein Teil der glomerulären Filtrationsbarriere und somit für deren Integrität und Funktionalität verantwortlich. Im Folgenden sollte der Einfluss des Anti-Thy1.1 Antikörpers auf die Podozyten immunhistologisch untersucht werden. Hierfür wurden Antikörper gegen Podocin beziehungsweise Synaptopodin verwendet. Beide sind spezifische Marker für Podozyten (Hong et al. 2016).

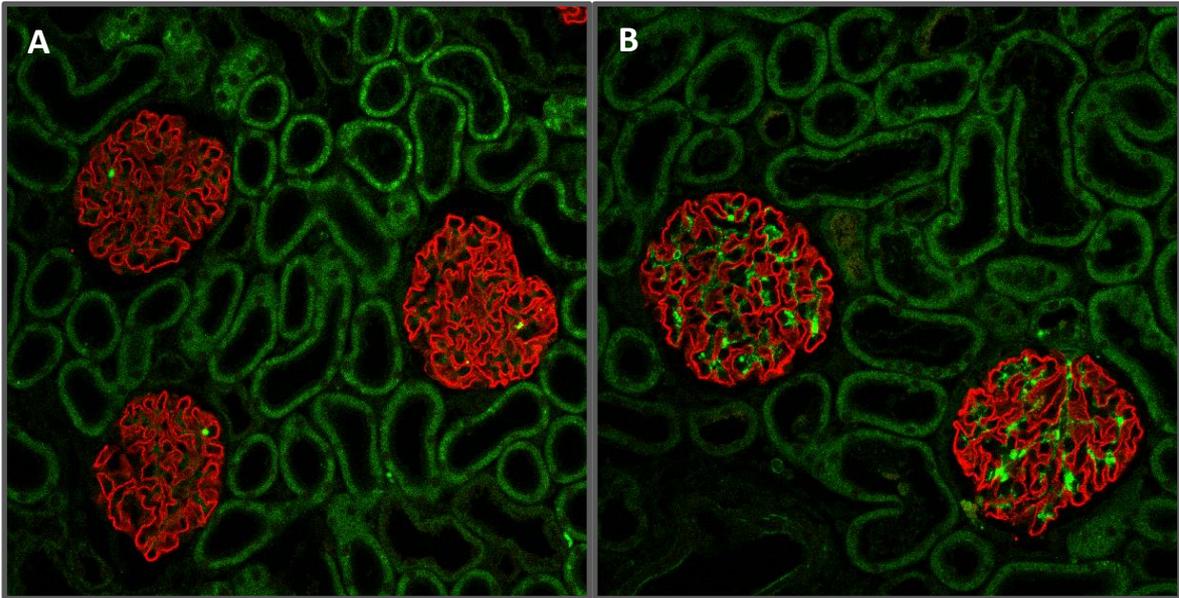
Abbildung 23 zeigt die immunhistologische Färbung der Podozyten mit einem primären Antikörper gegen Podocin und einem sekundären, Cy5 gekoppelten Antikörper (rot). Darüber hinaus wurden die Mesangialzellen mit einem primären Antikörper gegen Thy1.1 und einem sekundären, Cy2 gekoppelten Antikörper grün angefärbt. Die Mesangialzellen bilden bei den unbehandelten Tieren ein netzartiges Grundgerüst, das von den Podozyten gleichmäßig umgeben wird. Im Gegensatz dazu erschien das mesangiale Gerüst bei den Anti-Thy1.1 behandelten Ratten kondensiert und teilweise

lysiert zu sein. Die Dicke der Anti-Podocin gefärbten Schicht veränderte sich jedoch nach Lyse der Mesangialzellen nicht, lediglich dessen zuvor gleichmäßige Verteilung im Glomerulum.



**Abbildung 23: Immunhistologische Darstellung der Podozyten mit Hilfe eines Anti-Podocin Antikörpers:** Die Podozyten wurden mit einem primären Anti-Podocin Antikörper sowie einem sekundären, Cy5 gekoppelten Antikörper rot gefärbt. Die Mesangialzellen wurden mit einem primären Anti-Thy1.1 Antikörper und einem sekundären, Cy2 gekoppelten Antikörper leuchtend grün gefärbt. Die Autofluoreszenz der Tubuluszellen ist ebenfalls grün dargestellt. A: Bei der unbehandelten MWF Ratte ist das Thy1.1 Antigen netzartig im Glomerulum als Innengerüst zu den Podozyten lokalisiert. B: Die Anti-Thy1.1 behandelte Ratte besitzt ein verändertes und kondensiertes mesangiales Gerüst. Die Intensität und Dicke der Podocin gefärbten Schicht veränderte sich jedoch nicht. Allerdings erscheint die Verteilung des Anti-Podocin Antikörpers nach der Lyse der Mesangialzellen weniger homogen.

Ein ähnliches Bild ergab auch die immunhistologische Färbung mit einem primären Anti-Synaptopodin und einem sekundären, Cy5 gekoppelten Antikörper (Abbildung 24). Die mit Anti-Synaptopodin angefärbte Schicht ändert sich auch nach Anti-Thy1.1 Gabe nicht in ihrer Ausprägung. Allerdings sind die Glomerula nach der Lyse der Mesangialzellen lockerer strukturiert.



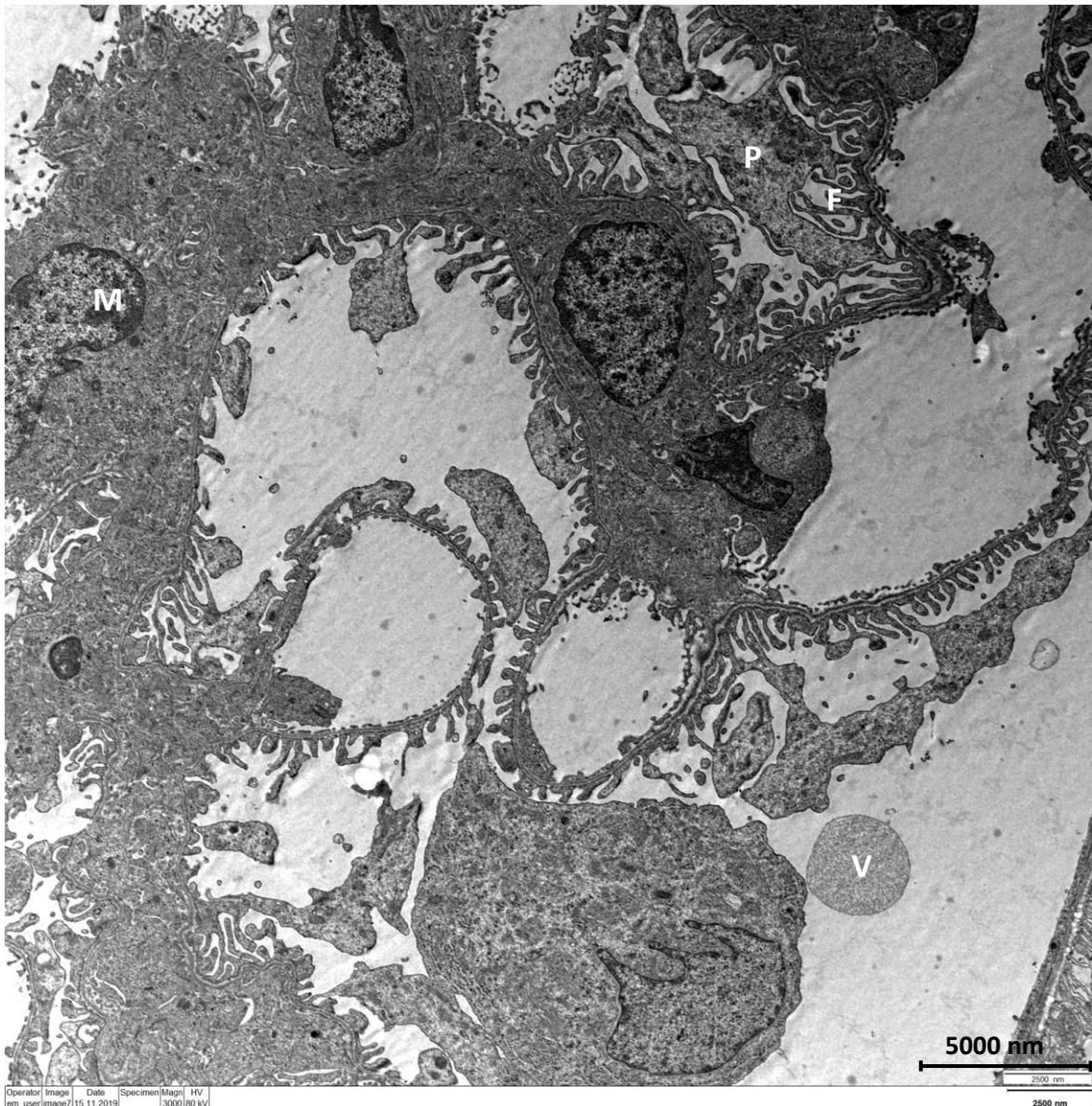
**Abbildung 24: Immunhistologische Darstellung der Podozyten mit Hilfe eines Anti-Synaptopodin Antikörpers:** Die Podozyten wurden mit dem primären Antikörper gegen Synaptopodin und einem sekundären Cy5 gekoppelten Antikörper rot gefärbt während die Mesangialzellen abermals mittels primärem Anti-Thy1.1 Antikörpers und einem sekundären Cy2 gekoppelten Antikörper grün dargestellt wurden. Die Tubuluszellen besitzen eine grün dargestellte Autofluoreszenz. Die Färbung von Synaptopodin bei der unbehandelten MWF Ratte (A) weist keine Unterschiede zur Anti-Thy1.1 behandelten Ratte (B) auf. Lediglich die Gesamtstruktur des Glomerulums erscheint nach der Lyse der Mesangialzellen lockerer.

Der Verlust des mesangialen Grundgerüsts könnte also indirekte Auswirkungen auf die Konformation der Podozyten zu haben. Eine solche Änderung könnte zu einem Integritätsverlust der glomerulären Filtrationsbarriere führen und damit zur Ursache für eine Proteinurie werden. Um den ultrastrukturellen Einfluss der mesangialen Lyse auf die Podozyten und deren Ausläufer zu untersuchen, wurden daher zusätzlich elektronenmikroskopische Bilder der Anti-Thy1.1 behandelten Ratten angefertigt.

#### 5.2.4 Untersuchung der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse der Mesangialzellen mittels Transmissionselektronenmikroskop

Mit Hilfe des Elektronenmikroskops konnten die ultrastrukturellen Veränderungen, die sich durch die Anti-Thy1.1 bedingte Lyse der Mesangialzellen ergaben, dargestellt werden. Abbildung 25 zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Teils des Glomerulums bei einer unbehandelten MWF Ratte. Hierbei wurde sichtbar, dass die Mesangialzellen die Kapillarschlingen stabilisieren und die Anordnung der zellulären Bestandteile im Glomerulum strukturieren. Die Podozyten lagen mit ihren Fußfortsätzen auf der vom Kapillarinneren abgewandten Seite der glomerulären Basalmembran. Während bei den unbehandelten Ratten die Podozytenfußfortsätze regelmäßig und gleichmäßig angeordnet sowie ineinander verzahnt waren, hatten die Podozytenfußfortsätze bei den Anti-Thy1.1 behandelten Ratten (Abbildung 26) eine scheinbar verbreiterte Auflagefläche sowie dünne spinnenbeinartige Fortsätze, welche einen Hinweis auf deren verminderte

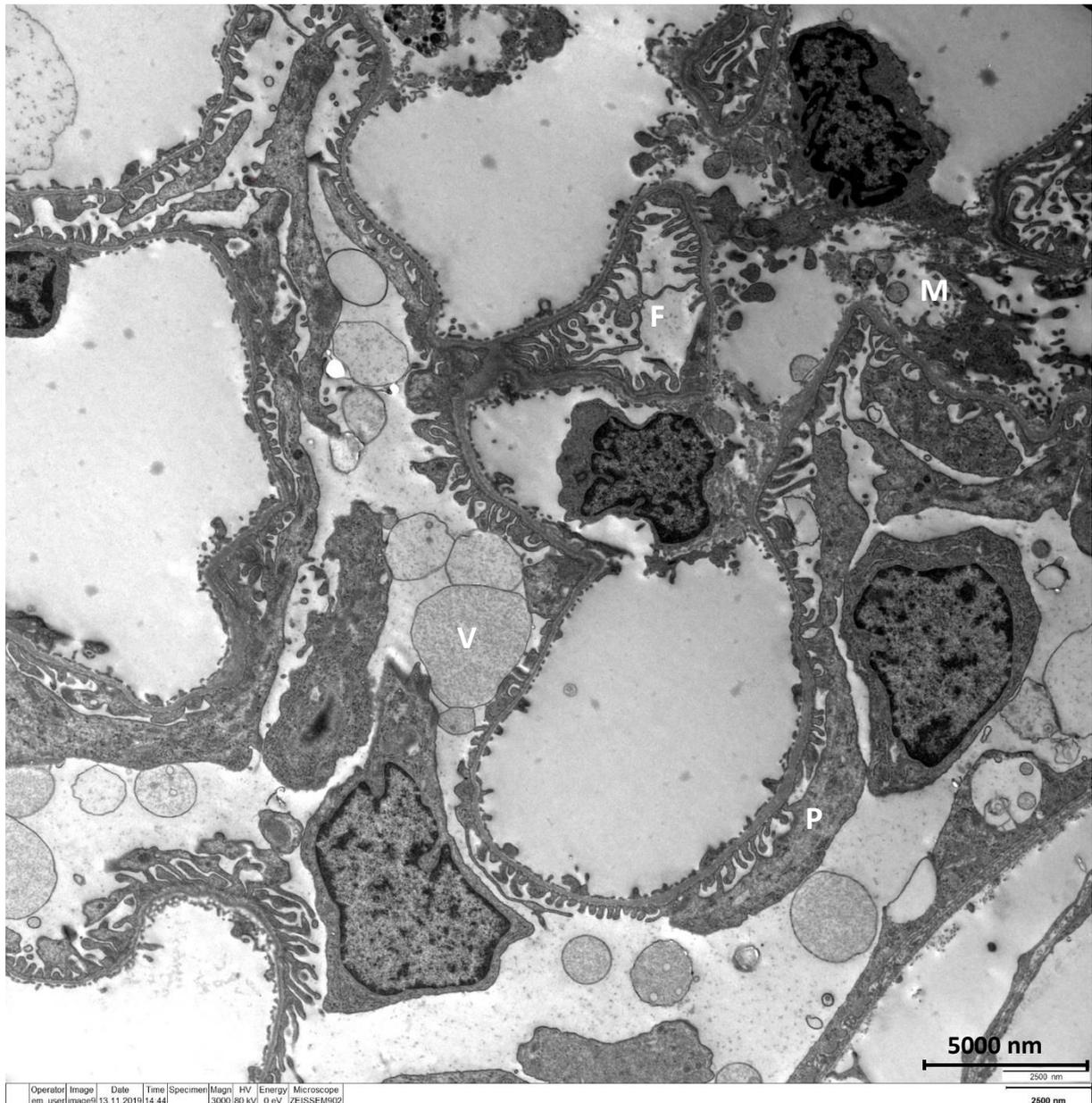
Funktionalität gaben. Die Ergebnisse der mesangialen Lyse auf die Podozyten wurde in 5.2.4.2 dargestellt.



**Abbildung 25: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des Glomerulums bei einer unbehandelten MWF Ratte:** Die Mesangialzellen (M) sind in dieser Aufnahme intakt und verankern die Kapillarschlingen im Glomerulum. An der äußeren Seite der Kapillarschlingen befinden sich die Podozyten (P). Diese sind mit ihren Fußfortsätzen (F) mitverantwortlich für die Intaktheit der glomerulären Filtrationsbarriere. Vereinzelt sind proteingefüllte vesikuläre Strukturen (V) im *Bowman-Raum* zu finden.

Die Abbildung 26 stellt das Glomerulum nach der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse der Mesangialzellen dar. Dabei wird deutlich, dass die Gesamtstruktur im Glomerulum durch den Verlust der Mesangialzellen stark verändert wurde. An Stelle der Mesangialzellen waren lediglich einzelne Zellfragmente beziehungsweise vereinzelt mesangiale Matrix zu sehen. Diese boten den Kapillarschlingen mangelnden Halt und führten folglich zu deren Verbreiterung. Die große Menge an umhülltem Protein, welche sich im *Bowman-Raum* befanden, lässt einen Defekt der

Filtrationsbarriere vermuten. Mit Hilfe der immunhistologischen Färbung konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei vor allem um Albumin handelte (Abbildung 19, Abbildung 18). Um den Einfluss der vermehrten glomerulären Albuminausscheidung auf das Tubulussystem zu untersuchen, wurden außerdem elektronenmikroskopische Aufnahmen des proximalen und distalen Tubulus gemacht (5.2.4.4).

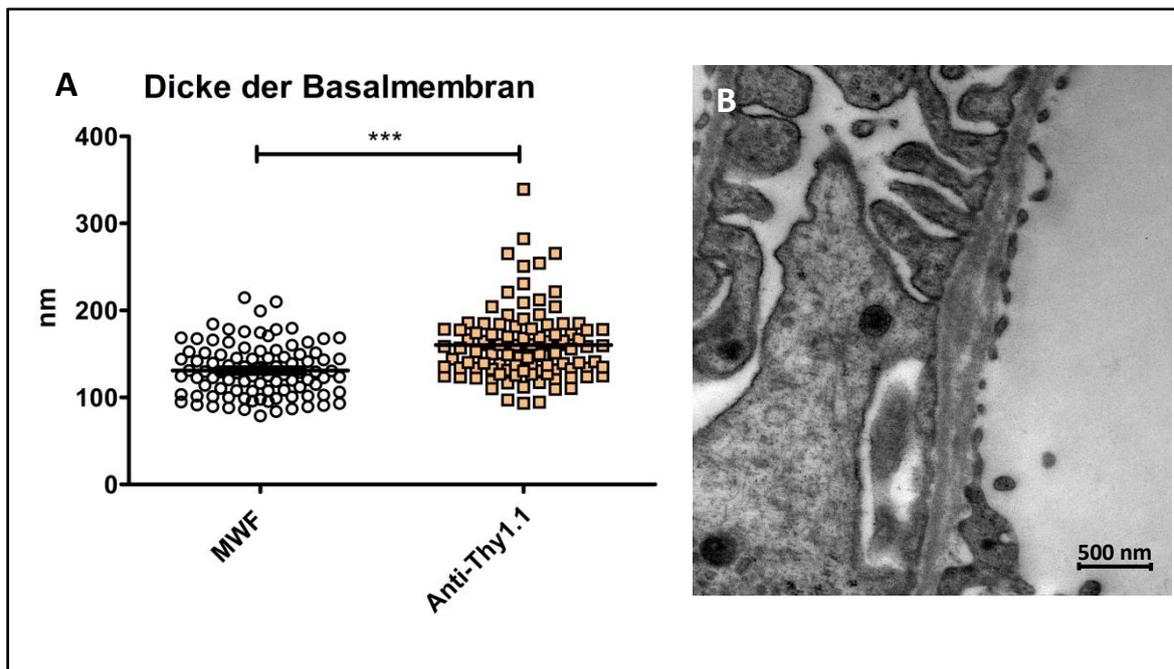


**Abbildung 26: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Glomerulums nach der Lyse der Mesangialzellen:** Anstelle von Mesangialzellen (M) sind lediglich verbleibende Bestandteile der mesangialen Matrix zu sehen. Das gesamte Glomerulum wirkt weniger kompakt und nach dem Verlust der Mesangialzellen lückenhaft. Die Zellkörper der Podozyten (P) bleiben auch nach der Lyse der Mesangialzellen intakt. Jedoch liegen diese oftmals ohne oder mit stark verbreiterten Fußfortsätzen großflächig auf der Basalmembran auf. Zusätzlich besitzen sie spinnenförmige dünne Fußfortsätze (F), die einen Defekt der Podozyten signalisieren. Im Bowman-Raum ist eine große Menge an vesikulären Strukturen (V) zu sehen. Diese zeigen den Verlust der Integrität der Filtrationsbarriere.

#### 5.2.4.1 Auswirkung der mesangialen Lyse auf die Basalmembran

Die Basalmembran bildet den Mittelteil der glomerulären Filtrationsbarriere. Defekte dieser Schicht führen unmittelbar zu einer Proteinurie. Durch eine Vermessung der Schichtdicke sollte der Einfluss der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse auf die Basalmembran untersucht werden.

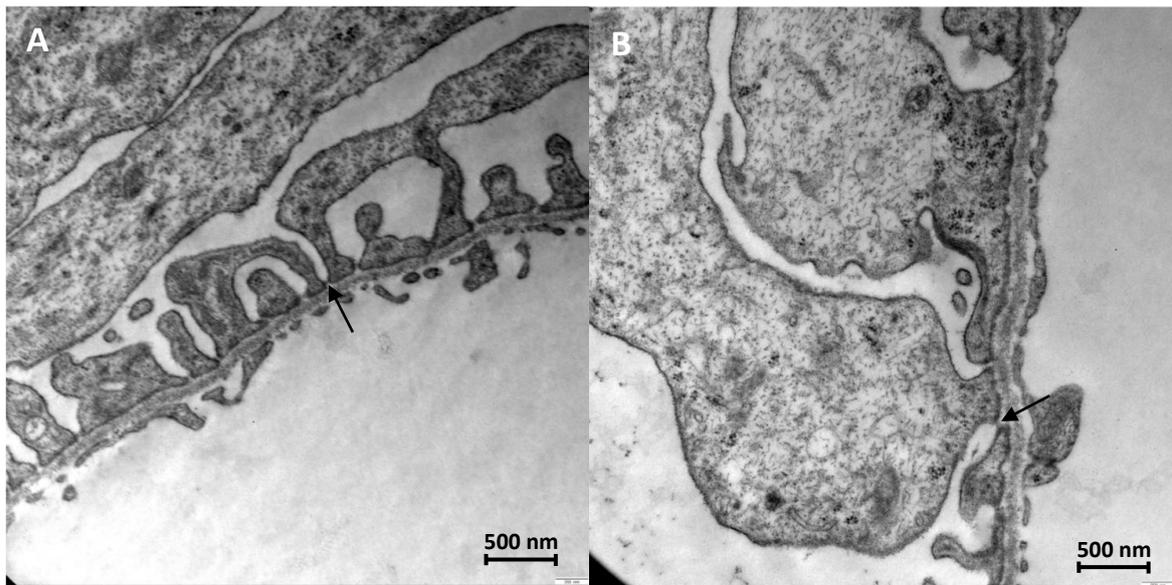
Dabei lag die Dicke der Basalmembran bei den unbehandelten Tieren bei  $(130,8 \pm 3,1 \text{ nm}; n=96)$ , während sie bei den behandelten Ratten signifikant ( $p<0,0001$ ) zunahm ( $170,6 \pm 5,7 \text{ nm}; n=54$ ). Zusätzlich kam es nach der Lyse der Mesangialzellen regelmäßig zur Aufspaltung der Basalmembran.



**Abbildung 27: Veränderung der Basalmembran nach Verlust der Mesangialzellen:** A: Während die unbehandelten Ratten eine Basalmembran mit einer durchschnittlichen Breite von 130 nm aufwiesen, kam es nach der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse der Mesangialzellen zu einer signifikanten Verbreiterung. B: Zusätzlich kam es nach der Applikation des Anti-Thy1.1 Antikörpers regelmäßig zu einer Aufspaltung der Basalmembran.

#### 5.2.4.2 Auswirkungen der mesangialen Lyse auf die Konformation der Podozyten

Die Abbildung 28 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen einer unbehandelten und einer behandelten Ratte bei 20000-facher Vergrößerung. Während die Fortsätze der Podozyten bei den unbehandelten Tieren regelmäßig und gleichmäßig auf der Basalmembran lagen, waren die Fortsätze nach der Lyse der Mesangialzellen verbreitert und lagen zum Teil großflächig auf der Basalmembran auf. Die Schlitzmembran, welche in den sogenannten Filtrationsschlitzen zwischen den einzelnen Podozytenfußfortsätzen liegt, konnte unabhängig von der Lyse der Mesangialzellen nachgewiesen werden.



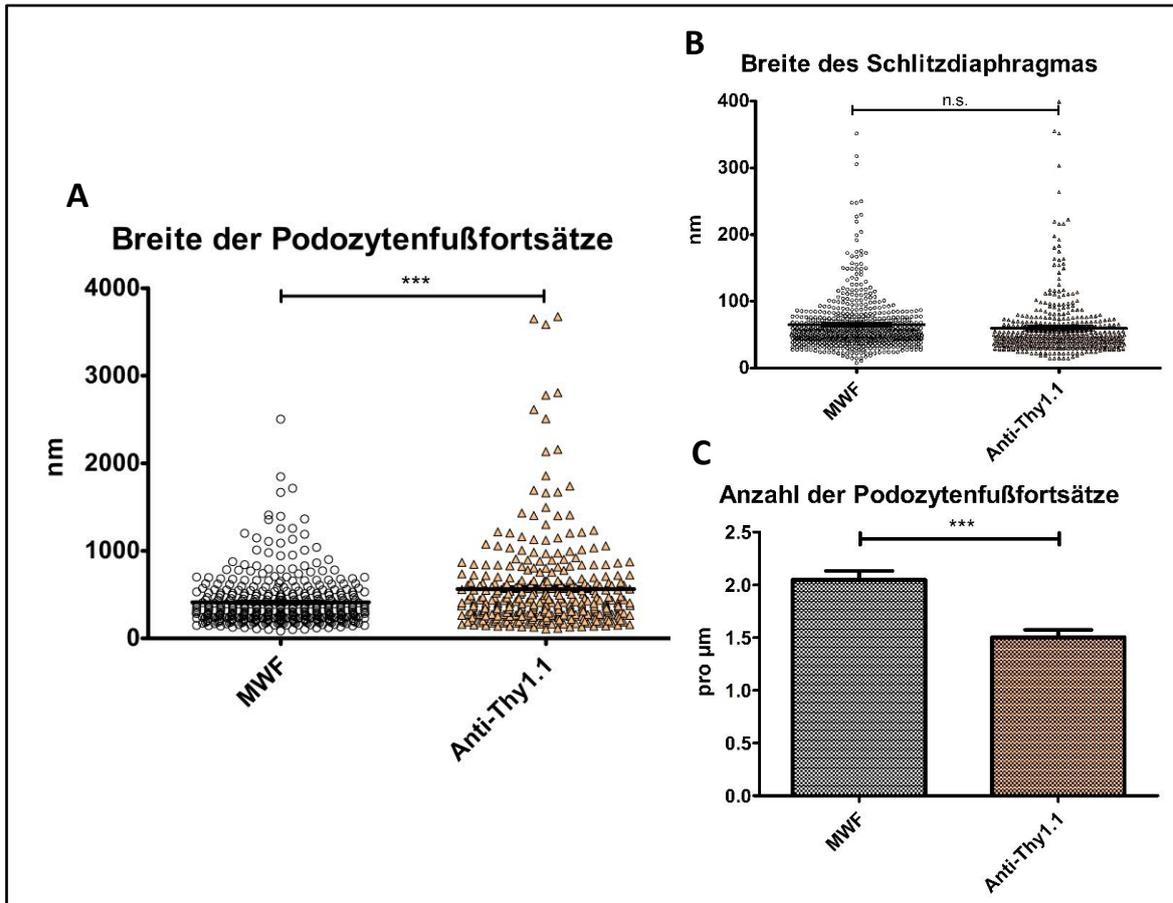
**Abbildung 28: Auswirkungen der mesangialen Lyse auf die Konformation der Podozyten:** A: Bei der unbehandelten Ratte war eine regelmäßige und gleichmäßige Verteilung der Podozytenfußfortsätze sichtbar. Darüber hinaus konnte die Schlitzmembran zwischen den Podozytenfußfortsätzen dargestellt werden (Pfeil). B: Die Anti-Thy1.1 behandelten Ratten wiesen hingegen eine verbreiterte Auflageflächen der Podozytenfußfortsätze auf. Eine Schlitzmembran war aber auch bei diesen regelmäßig zu erkennen (Pfeil).

Anhand der elektronenmikroskopischen Bilder wurden die Podozytenfußfortsätze, sowie die dazwischen liegende Schlitzdiaphragma vermessen und ausgewertet (Abbildung 29). Dabei wurde zunächst die Breite der Podozytenfußfortsätze vermessen. Diese lag bei den unbehandelten Tieren bei  $411,4 \pm 14,6$  nm ( $n=392$ ) und nahm nach der Lyse der Mesangialzellen mit  $562,7 \pm 28,2$  nm ( $n=329$ ) signifikant zu ( $p < 0,0001$ ).

Als Schlitzdiaphragma wird der Spalt zwischen zwei Podozytenfußfortsätzen bezeichnet. Seine Breite ist unabhängig von der Lyse der Mesangialzellen. Bei den unbehandelten MWF Ratten liegt dieser Spalt bei  $65,0 \pm 1,9$  nm ( $n=679$ ). Auch nach Anti-Thy1.1 Applikation bleibt diese Breite mit  $59,4 \pm 2,5$  nm ( $n=482$ ) annähernd unverändert ( $p=0,07$ ; n.s.).

Zuletzt wurde die Anzahl der Podozytenfußfortsätze pro  $\mu\text{m}$  vermessen. Dabei ergab sich eine signifikante ( $p < 0,0001$ ) Verminderung der Fußfortsätze. Während bei den unbehandelten Ratten durchschnittlich  $2,05 \pm 0,08$  Fußfortsätze pro  $\mu\text{m}$  vorkamen ( $n=25$ ), hatten die behandelten Tiere lediglich  $1,50 \pm 0,07$  ( $n=24$ ) Fußfortsätze pro  $\mu\text{m}$ .

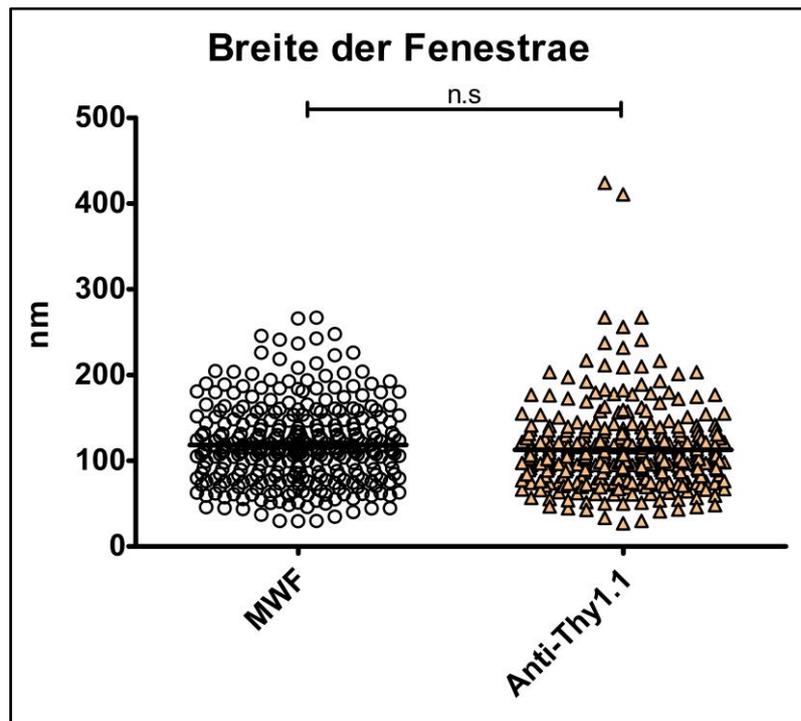
Generell werden die Podozyten durch die Anti-Thy1.1 bedingte Lyse der Mesangialzellen sekundär geschädigt. Dies lässt sich mikroskopisch anhand fehlender Verzahnung der Fußfortsätze sowie dünner spinnenbeinartiger Ausläufer erkennen. Die einzelnen Fußfortsätze verbreitern sich zur Basalmembran, wodurch die Gesamtzahl der Fortsätze abnimmt. Diese Veränderungen bedingen eine Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere und führen somit unter anderem zu einer Proteinurie der Anti-Thy1.1 Ratten.



**Abbildung 29: Auswertung der durch mesangiale Lyse bedingten Veränderung der Podozytenfußfortsätze:** A: Die Podozytenfußfortsätze verbreitern sich nach der Lyse der Mesangialzellen signifikant. B: Das Schlitzdiaphragma bleibt von den Auswirkungen des Anti-Thy1.1 Antikörpers unbeeinflusst. C: Insgesamt nimmt jedoch die Anzahl der Podozytenfußfortsätze pro  $\mu\text{m}$  nach Lyse der Mesangialzellen signifikant ab.

#### 5.2.4.3 Auswirkungen der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse der Mesangialzellen auf das fenestrierte Endothel

Um den Einfluss der mesangialen Lyse auf die transzytoplasmatischen Aussparungen der Endothelzellen zu beurteilen, wurden diese anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen vermessen. Dabei ergab sich in der Breite der Fenestrae kein signifikanter Unterschied ( $p=0,1428$ ) zwischen den unbehandelten ( $118,4 \pm 2,663 \text{ nm}$ ;  $n=309$ ) und den behandelten Ratten ( $112,8 \pm 2,716 \text{ nm}$ ;  $n=314$ ). Die Lyse der Mesangialzellen scheint demnach keinen Einfluss auf die Ausbildung der Fenestrae im Endothel zu haben.

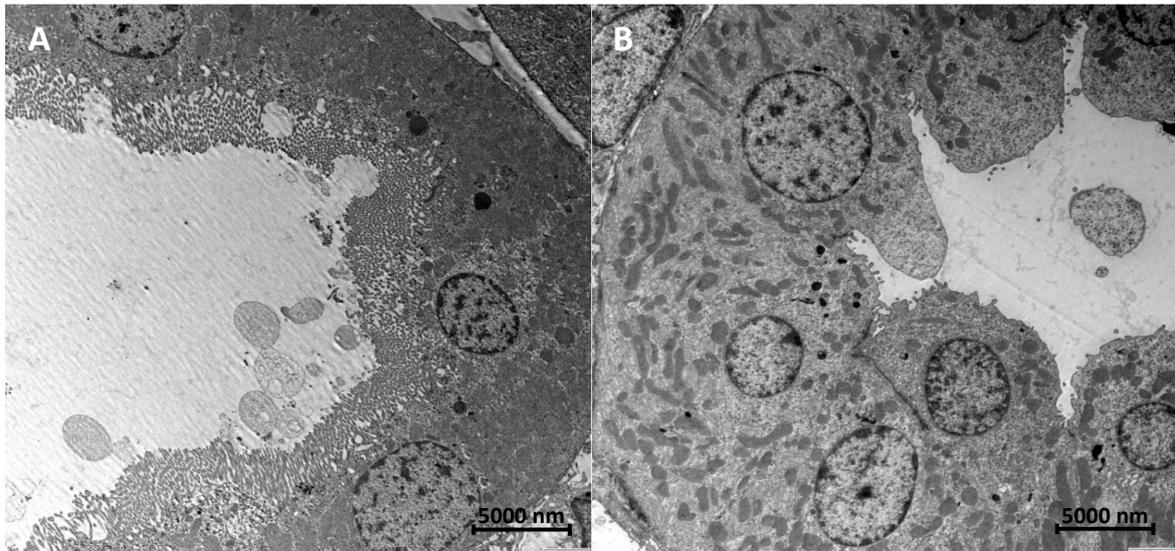


**Abbildung 30: Auswirkung der mesangialen Lyse auf die transzytoplasmatischen Ausparungen der Endothelzellen im Glomerulum:** Die Breite der Fenestrae bleibt vom Anti-Thy1.1 Antikörper unbeeinflusst. Auch nach der Applikation des Antikörpers verändert sie sich nicht signifikant.

#### 5.2.4.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung des proximalen und distalen Tubulus

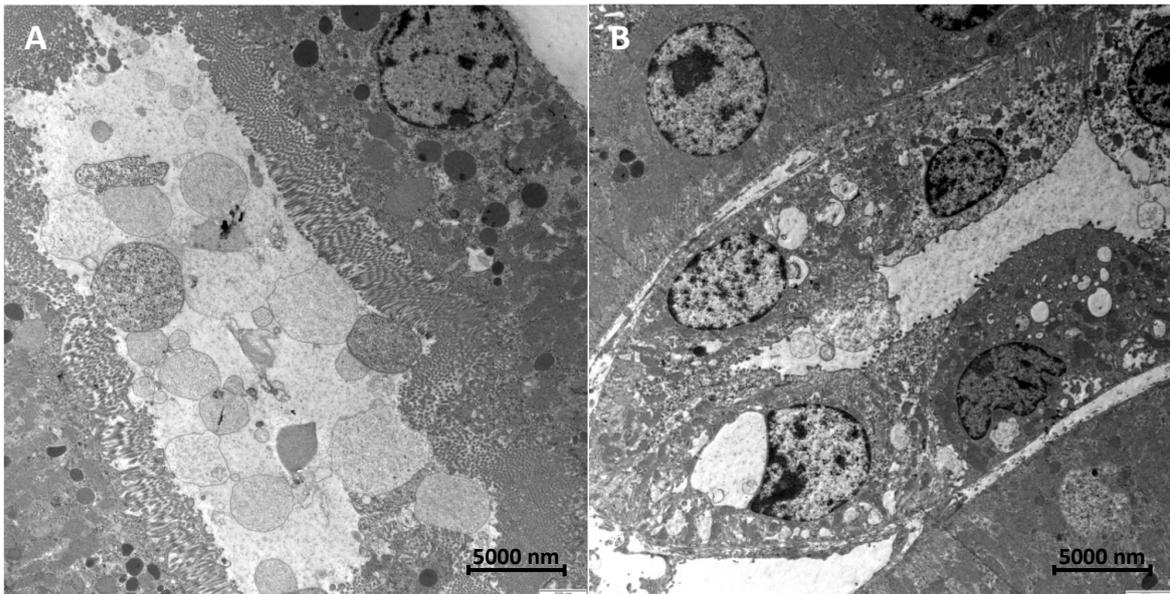
Insbesondere nach der Lyse der Mesangialzellen konnte mit Hilfe immunhistologischer Färbung eine deutliche Anreicherung von Albumin im Tubulussystem nachgewiesen werden (Abbildung 18). Um die strukturellen Effekte der Albuminausscheidung sowie die Endozytose im proximalen Tubulus zu untersuchen, wurden zusätzlich elektronenmikroskopische Aufnahmen des Tubulussystems angefertigt.

In Abbildung 31 sind der proximale sowie der distale Tubulus einer unbehandelten, 7 Wochen alten und weiblichen MWF Ratte dargestellt. Im Inneren des Tubulussystems waren vereinzelte vesikuläre Strukturen zu finden. Der Bürstensaum des proximalen Tubulus sowie dessen zelluläre Bestandteile schienen morphologisch intakt zu sein. Der distale Tubulus ist durch einen abgeflachten Bürstensaum gekennzeichnet. Hier waren die Hauptzellen sowie die teilweise ins Lumen des Tubulus hineinragenden Schaltzellen zu erkennen. Alle Tubuluszellen wiesen eine große Menge an Mitochondrien auf, welche einen Hinweis auf die hohe Resorptions- und Sekretionsaktivität geben.



**Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Tubulussystems einer unbehandelten Ratte:** A: Im proximalen Tubulus sind vereinzelt vesikuläre Strukturen zu sehen. Das Lumen wird von einem regelmäßigen Bürstensaum umgeben. B: Der distale Tubulus ist anhand seines abgeflachten Bürstensaums zu erkennen und besteht aus Haupt- und Schaltzellen.

Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 32 den proximalen und distalen Tubulus einer ebenfalls 7 Wochen alten, weiblichen Ratte nach Lyse der Mesangialzellen. Das Lumen des proximalen Tubulus ist mit einer Vielzahl an umhülltem und freiem Protein gefüllt. Der Bürstensaum erscheint durch die hohe Menge an tubulären Proteinen verklebt. In den Zellen des proximalen Tubulus ist eine Vakuolisierung und eine vermehrte Ausbildung von Lysosomen erkennbar, welche durch die vermehrte Albuminfiltration und der daraus resultierenden massiven Endozytose verursacht wurde. Da die Kapazität des proximalen Tubulus für die Rückresorption der Proteine nicht ausreicht, gelangen diese bis in das Lumen des distalen Tubulus. Auch im distalen Kompartiment stellt sich eine veränderte Struktur der Tubuluszellen dar.



**Abbildung 32: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Tubulussystems einer Anti-Thy1.1 behandelten Ratte:** A: Der proximale Tubulus ist hochgradig mit Protein gefüllt. Das Innere der Tubuluszellen weist eine vermehrte Ausbildung von Lysosomen auf. B: Im Lumen des distalen Tubulus befindet sich ebenfalls ein erhöhter Anteil freier Proteine. Die Zellen des distalen Tubulus zeigen außerdem eine veränderte blasig erscheinende Struktur.

### 5.3 Auswirkung der mesangialen Lyse auf die Zusammensetzung des Urins

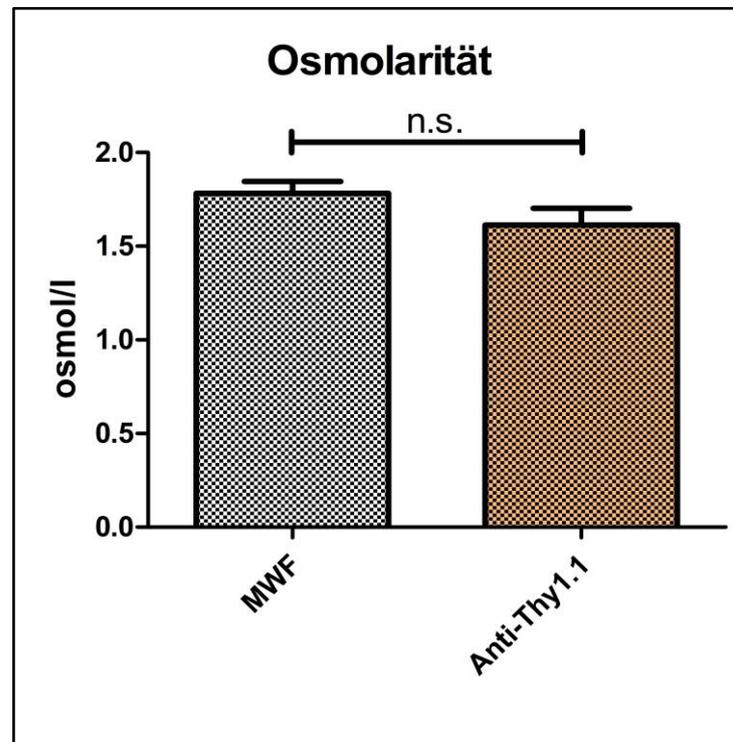
Bei der Ermittlung des funktionellen Einflusses der Mesangialzellen konnte mit Hilfe der intravitalen Mikroskopie gezeigt werden, dass die Mesangialzellen mitverantwortlich für die Intaktheit der glomerulären Filtrationsbarriere sind. Ebenso konnte immunhistologisch sowie elektronenmikroskopisch bei den Anti-Thy1.1 behandelten Ratten eine starke Anreicherung von Albumin im Tubulussystem nachgewiesen werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern die Lyse der Mesangialzellen einen Einfluss auf die Osmolarität des Urins und seine Zusammensetzung hat. Weiter sollte die Albuminausscheidung mit einem Albumin-ELISA sowie einer SDS-Page quantifiziert werden.

#### 5.3.1 Osmolarität

Zunächst wurde die Osmolarität des gesammelten Urins bestimmt und die Ergebnisse in Abbildung 33 dargestellt. Der Urin der MWF Ratten hatte basal eine Osmolarität von  $1,78 \pm 0,06$  osmol/l (n=59). Nach der Applikation des Anti-Thy1.1 Antikörpers lag die Osmolarität bei  $1,61 \pm 0,09$  osmol/l (n=30). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Lyse der Mesangialzellen keinen Einfluss auf die Osmolarität des Urins hat (p=n.s.)

Im Gegensatz dazu führte die Applikation der jeweiligen 20-minütigen Dauertropfinfusion zu einer signifikanten ( $p < 0,001$ ) Reduktion der Osmolarität (AngII:  $0,64 \pm 0,04$  osmol/l, n=36; NA:  $0,58 \pm 0,05$  osmol/l, n=14; NaCl:  $0,91 \pm 0,16$  osmol/l, n=5). Um die mittels Albumin-ELISA beziehungsweise

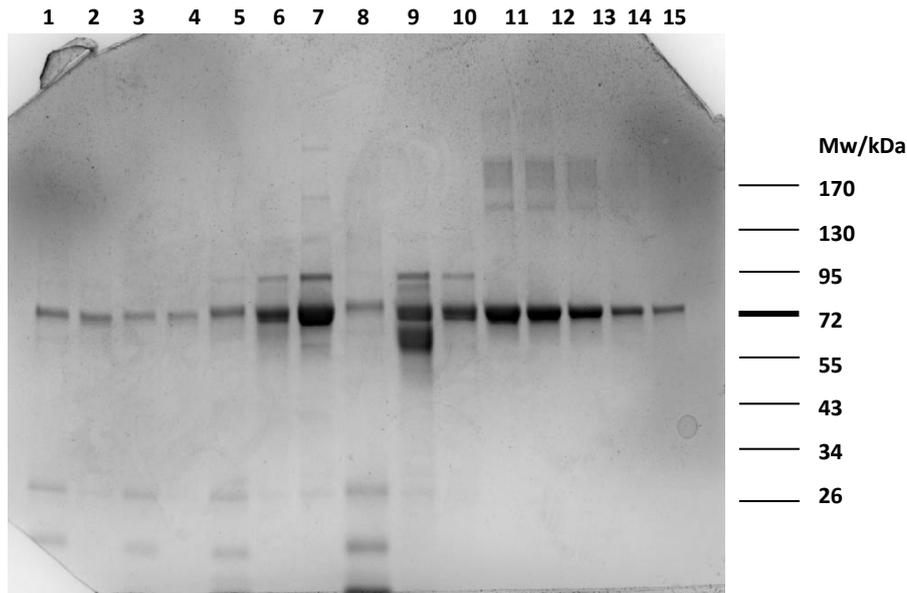
mittels SDS-Page gemessene Albuminausscheidung exakt zu quantifizieren, wurde die Osmolarität jeder einzelnen Probe bestimmt.



**Abbildung 33: Auswirkung der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse auf die Osmolarität des Urins:** Die Osmolarität des Spontanurins der unbehandelten MWF Ratten wurde mit dem Urin der behandelten Tiere 24 Stunden nach Applikation des Anti-Thy1.1 Antikörpers verglichen. Die Lyse der Mesangialzellen besaß dabei keinen signifikanten Einfluss auf die Osmolarität des Urins.

### 5.3.2 Quantifizierung der Albuminausscheidung mit Hilfe einer SDS-PAGE

Insgesamt verursachte die Anti-Thy1.1 bedingte Lyse der Mesangialzellen eine signifikant höhere Albuminausscheidung welche mittels SDS-PAGE gemessen und quantifiziert werden konnte ( $p < 0,001$ ). Die Abbildung 34 zeigt beispielhaft eine SDS-PAGE, auf der die Urinproben der AngII behandelten Ratten aufgetragen wurden. Die Proben der Anti-Thy1.1 behandelten Ratten wurden in diesem Blot 16-fach stärker verdünnt als die Proben der unbehandelten Ratten. Mit Hilfe der zur Quantifizierung aufgetragenen Standards konnte im Anschluss die jeweilige ausgeschiedene Albuminmenge bestimmt werden.

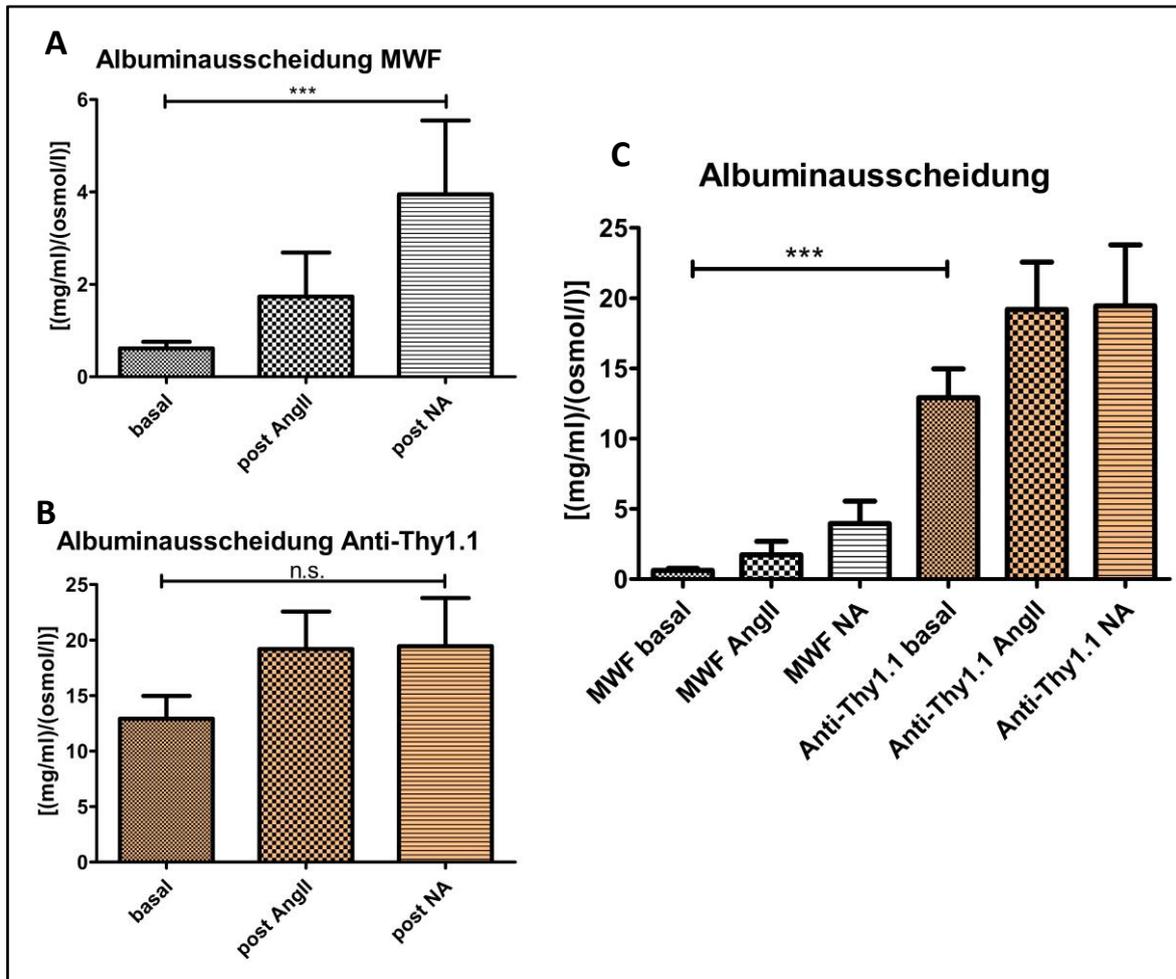


**Abbildung 34: Proteindifferenzierung sowie Quantifizierung von Albumin anhand eines Coomassie-Blau gefärbten SDS-PAGE Gels:** Die Albuminbande liegt bei etwa 72 kDa 1: MWF Ratte basal, 2: MWF Ratte nach AngII zeigt eine etwas stärkere Färbung der Albuminbande 3: MWF Ratte basal, 4: MWF Ratte nach AngII, 5: unbehandelte Ratte basal, 6: nach Anti-Thy1.1 Behandlung ist die Albuminbande trotz 16-fach stärkerer Verdünnung deutlich zu sehen, 7: Anti-Thy1.1 Ratte nach AngII-Infusion 16-fach stärker verdünnt 8: unbehandelte Ratte basal, 9: nach Anti-Thy1.1 Behandlung 16-fach stärker verdünnt, 10: Anti-Thy1.1 Ratte nach AngII-Infusion 16-fach stärker verdünnt. 11–15 Standardreihe: (11: 2 µg; 12: 1,5 µg; 13: 1,0 µg; 14: 0,5 µg; 15: 0,25 µg)

Wie in Abbildung 35 dargestellt, ergab die Auswertung eine 21-fache Erhöhung der Albuminkonzentration nach Lyse der Mesangialzellen (MWF:  $0,61 \pm 0,03$  mg/ml;  $n=30$ ; Anti-Thy1.1:  $12,9 \pm 0,55$  mg/ml;  $n=14$ ;  $p>0,001$ ).

Vergleicht man lediglich die unbehandelten MWF Ratten untereinander, so führt auch eine Infusion mit NA zu einem signifikanten Anstieg der Albuminausscheidung von basal  $0,61 \pm 0,03$  mg/ml ( $n=30$ ) auf einen Wert von  $3,95 \pm 0,40$  mg/ml ( $n=5$ ;  $p<0,001$ ). Eine Infusion mit AngII sowie Substitution von Volumen in Form einer NaCl-Infusion haben jedoch keinen Einfluss auf die Albuminkonzentration ( $1,7 \pm 0,16$  mg/ml;  $n=6$ ;  $p=n.s.$ ).

Die Anti-Thy1.1 behandelten Ratten hatten zwar eine deutlich höhere Albuminausscheidung, jedoch verursachten weder eine Infusion mit NA noch mit AngII eine signifikante Veränderung der Albuminurie (AngII:  $19,2 \pm 1,50$  mg/ml;  $n=5$ ; NA:  $19,4 \pm 1,94$  mg/ml;  $n=5$ ;  $p=n.s.$ ).



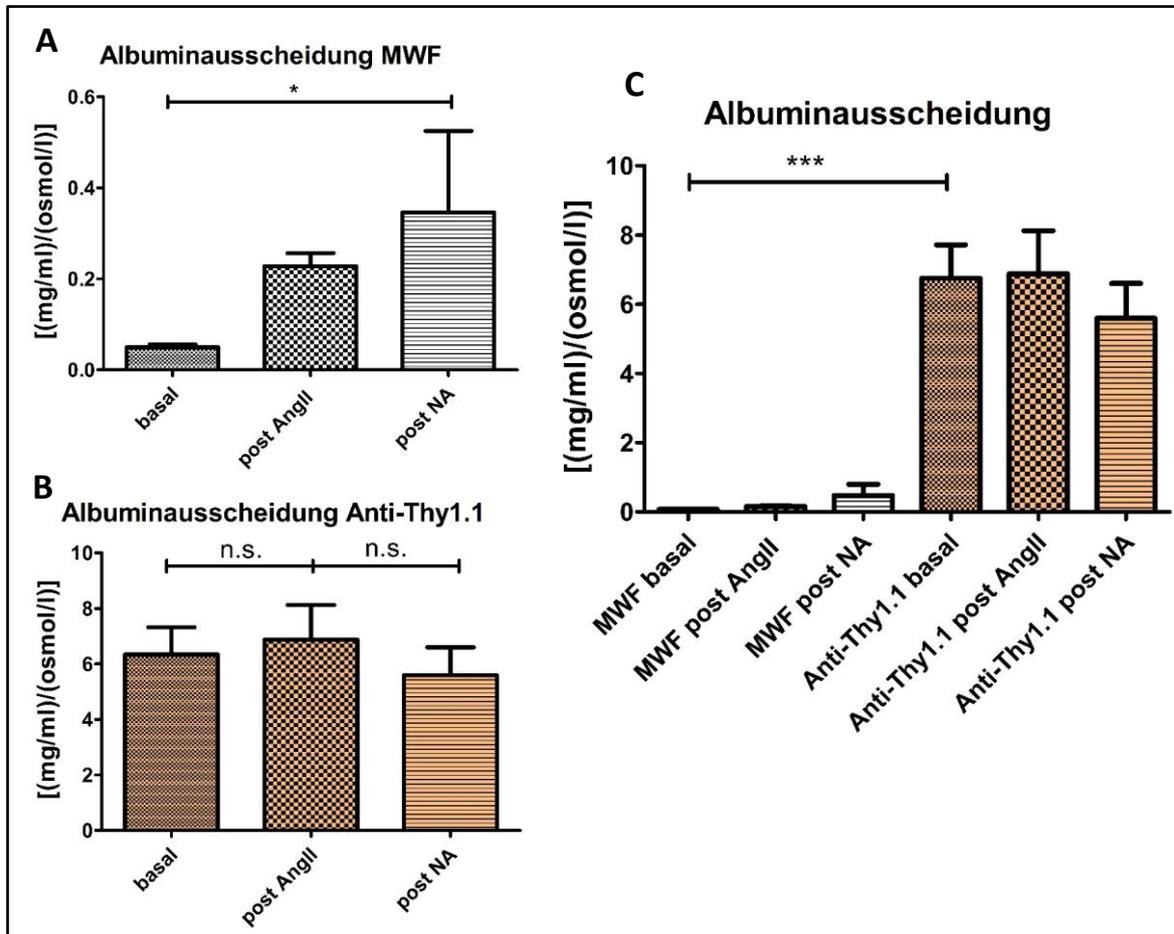
**Abbildung 35: Bestimmung der Auswirkung der mesangialen Lyse auf die Albuminkonzentration mittels SDS-PAGE:** A: Bei den unbehandelten MWF Ratten verursachte eine NA-Infusion eine signifikante Erhöhung der Albuminausscheidung, B: während bei den behandelten Ratten weder eine Infusion mit AngII noch mit NA zu einer Änderung der Albuminausscheidung führte. C: Grundsätzlich wurde mittels SDS-PAGE nach der Lyse der Mesangialzellen ein signifikanter 21-facher Anstieg der Albuminkonzentration gemessen.

### 5.3.3 Quantifizierung der Albuminausscheidung mit Hilfe des Albumin-ELISA

Mit Hilfe des Albumin-ELISA konnte die signifikant erhöhte Ausscheidung von Albumin im Urin nach Anti-Thy1.1 Applikation ebenfalls bestätigt werden ( $p < 0,001$ ), (Abbildung 36). Die unbehandelten MWF Ratten hatten basal eine Albuminausscheidung von  $0,069 \pm 0,002$  mg/ml ( $n=31$ ). Exakt 24 Stunden nach der Anti-Thy1.1 Behandlung stieg diese Konzentration auf das fast 100-fache im Urin an ( $6,75 \pm 0,52$  mg/ml;  $n=13$ ).

Bei den unbehandelten MWF Tieren führte eine NA-Infusion zu einer signifikanten Erhöhung der Albuminausscheidung im Urin ( $0,47 \pm 0,08$  mg/ml;  $n=6$ ;  $p < 0,05$ ). Durch eine Infusion mit AngII kam es zwar ebenso zu einer Erhöhung des  $GSC_A$ , jedoch nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Albuminausscheidung im Urin ( $0,16 \pm 0,03$  mg/ml;  $n=6$ ). Auch eine alleinige Substitution von Volumen führte zu keiner signifikanten Veränderung der Albuminkonzentration im Urin ( $0,13 \pm 0,01$  mg/ml).

Nach der Lyse der Mesangialzellen verursachte weder eine Infusion mit AngII, noch mit NA oder NaCl eine signifikante Veränderung der Albuminausscheidung (AngII:  $6,88 \pm 0,51$  mg/ml, n=6; NA:  $5,59 \pm 0,45$  mg/ml, n=5; NaCl:  $4,03 \pm 0,06$  mg/ml, n=2).



**Abbildung 36: Bestimmung der Auswirkung der Anti-Thy1.1 Applikation auf die Albuminausscheidung im Urin mit Hilfe eines Albumin-ELISA:** A: Bei den unbehandelten MWF Ratten führte eine Infusion mit NA zu einer Erhöhung der Albuminkonzentration im Urin. B: Im Gegensatz dazu hatten bei den behandelten Anti-Thy1.1 Ratten weder eine Infusion mit NA noch mit AngII einen Einfluss auf die Albuminausscheidung. C: Die mittels Albumin-ELISA gemessene Ausscheidung stieg nach Lyse der Mesangialzellen um das fast 100-fache an.

#### 5.4 Auswirkung der mesangialen Lyse auf die Zusammensetzung des Serums

Um zum einen die Auswirkungen des mesangialen Zellverlustes auf die Funktionalität der Organe zu überprüfen und zum anderen eine prärenal bedingte Proteinurie auszuschließen, wurden die Serumproben von einem externen Labor analysiert.

Dabei ergaben sich lediglich bei der Quantifizierung von Albumin und Gesamtprotein signifikante Unterschiede nach der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse der Mesangialzellen. Die Lyse führte zu einer signifikanten Reduktion von Albumin, womit eine prärenal bedingte Proteinurie ausgeschlossen werden konnte.

Als funktionelle Parameter für die Leber wurden wie die Aspartat-Aminotransferase (AST), die Alanin-Aminotransferase (ALT), die alkalische Phosphatase sowie das Gesamt-Bilirubin untersucht. Die einzelnen Werte veränderten sich nach der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse der Mesangialzellen nicht ( $p=n.s.$ ). Außerdem wurden die Funktionsparameter der Niere, Kreatinin und Harnstoff sowie die Konzentration der Elektrolyte Natrium und Kalium im Serum gemessen. Auch hier ergaben sich 24 Stunden nach Anti-Thy1.1 Applikation keine signifikante Änderung ( $p=n.s.$ ). Die Konzentrationen der Serumbestandteile sind in der folgenden Tabelle zu finden:

Serumbestandteile	MWF	Anti-Thy1.1	Signifikanz
AST	147,1 ± 34,1 (n=8)	167,3 ± 24,9 (n=6)	n.s. $p=0,66$
ALT	54,4 ± 4,2 (n=8)	52,7 ± 9,4 (n=6)	n.s. $p=0,86$
Alk. Phosphatase	387,4 ± 48,0 (n=8)	321,5 ± 49,0 (n=6)	n.s. $p=0,36$
Ges. Bilirubin	0,15 ± 0,02 (n=6)	0,12 ± 0,02 (n=6)	n.s. $p=0,26$
Albumin	2,65 ± 0,05 (n=8)	2,2 ± 0,06 (n=6)	$p<0,0001$
Gesamtprotein	5,5 ± 0,03 (n=8)	4,9 ± 0,1 (n=6)	$p=0,0002$
Kreatinin	0,23 ± 0,02 (n=8)	0,23 ± 0,02 (n=6)	n.s. $p=0,89$
Harnstoff	29,3 ± 1,0 (n=8)	33,0 ± 2,1 (n=6)	n.s. $p=0,11$
Kreatinkinase	490,6 ± 94,3 (n=7)	742,0 ± 69,7 (n=6)	n.s. $p=0,06$
Natrium	142,8 ± 0,4 (n=8)	141,8 ± 2,4 (n=6)	n.s. $p=0,67$
Kalium	4,9 ± 0,3 (n=6)	4,4 ± 0,1 (n=6)	n.s. $p=0,15$

## 6 Diskussion

### 6.1 Spezifität des Anti-Thy1.1 Antikörpers

Anhand von immunhistologischen Färbungen konnte die in der Literatur beschriebene Spezifität des Anti-Thy1.1 Antikörpers bestätigt werden (Kato et al. 2013a). Der intravital applizierte Anti-Thy1.1 Antikörper wurde lediglich in den Glomerula nachgewiesen und bewirkte eine Lyse der Mesangialzellen. Durch weitere immunhistologische Färbungen der Podozyten sowie der glomerulären Glykokalyx konnten zusätzliche Auswirkung des Antikörpers auf diese Strukturen ausgeschlossen werden. Die glomeruläre Gesamtstruktur verändert sich jedoch nach der Lyse der Mesangialzellen stark, sodass die in der Literatur beschriebene Aufweitung der Kapillarschlingen und ein daraus resultierender *Balloon-like-Effekt* des Glomerulums histologisch zu beobachten war (Kurihara und Sakai 2017).

### 6.2 Akute Effekte von AngII und NA auf die Albuminfiltration

Mit Hilfe der intravitalem Multiphotonenmikroskopie sollten zunächst die Effekte von AngII beziehungsweise von NA auf den glomerulären Siebkoeffizienten überprüft werden. Der basal ermittelte  $GSC_A$  der in dieser Studie verwendeten MWF Ratten lag bei einem Wert von 0,00061. Diese gemessene Menge an basal filtriertem Albumin entspricht der klassischen Vorstellung, dass in einer gesunden Niere lediglich eine geringe Menge Albumin in den proximalen Tubulus gelangt (Haraldsson et al. 2008). Der gemessene Wert stimmt ebenso mit Ergebnissen aus ehemaligen Mikropunktionsstudien überein ( $GSC_A=0,00063$ ) (Tojo und Endou 1992). Eine Infusion mit AngII führte zu einer Erhöhung des mittleren Blutdrucks und zu einem signifikanten Anstieg des  $GSC_A$  auf einen Wert von 0,00121. Der Einfluss von AngII auf den  $GSC_A$  im Glomerulum wurde bereits in früheren intravitalem Studien nachgewiesen. Dabei fanden sich Hinweise, dass die Erhöhung des  $GSC_A$  über die Wirkung von AngII an AT1-Rezeptoren vermittelt wird (Schießl und Castrop 2013). Auch eine NA-Infusion führte zu einer Erhöhung des Blutdrucks und somit zu einem signifikanten Anstieg des  $GSC_A$  (0,00129). Klinisch wird von einer Korrelation der Höhe des Blutdrucks mit dem Schweregrad der Albuminurie gesprochen (Parving et al. 1974).

Zusätzlich zum  $GSC_A$  wurde die Albuminausscheidung im Endharn mittels SDS-Page sowie mittels Albumin-ELISA quantifiziert. Dabei ergab sich eine basal Albuminausscheidung von 0,069 mg/ml mit dem Albumin-ELISA. Ausgehend von der Annahme, dass die täglich ausgeschiedene Urinmenge bei 55 ml/kg liegt (Fox et al. 2002), hatten die durchschnittlich 159 g schweren unbehandelten MWF Ratten eine tägliche Albuminausscheidung von 0,6 mg. Eine 20-minütige NA-Infusion führte nicht nur zu einer Erhöhung des  $GSC_A$ , sondern ebenfalls zu einer vermehrten Ausscheidung von Albumin im Urin (4,1 mg/d). Im Gegensatz dazu kam es nach einer Infusion mit AngII nicht zu einem

messbaren Anstieg der Albuminkonzentration im Urin (1,4 mg/d). Ein möglicher Grund hierfür ist eine gesteigerte Endozytose von Albumin im proximalen Tubulus. AngII führt über AT2 Rezeptoren im proximalen Tubulus zu einer vermehrten Aktivierung der Proteinkinase B in der Plasmamembran und somit zu einer gesteigerten Rückresorption von Albumin (Caruso-Neves et al. 2005). Aus diesem Grund konnte bei den intravitale Versuchen zwar ein gesteigerter  $GSC_A$  gemessen werden, jedoch stieg die Albuminausscheidung im Endharn durch die erhöhte Resorption von Albumin im proximalen Tubulus nicht signifikant an.

### **6.3 Auswirkungen der mesangialen Lyse auf den glomerulären Siebkoeffizient**

Um den Einfluss der Mesangialzellen auf die funktionelle Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere zu untersuchen, wurde der  $GSC_A$  mit Hilfe der intravitale Mikroskopie bei Anti-Thy1.1 behandelten Ratten bestimmt. Die Lyse der Mesangialzellen führte basal zu einer 5,2-fachen Erhöhung des  $GSC_A$  (0,00320). Eine entsprechende Infusion mit AngII beziehungsweise NA führte zu keiner weiteren signifikanten Veränderung des  $GSC_A$ . Ein möglicher Grund hierfür könnten die starken strukturellen Veränderungen im Glomerulum sein. Die Mesangialzellen bilden in einem intakten Glomerulum das Grundgerüst und sorgen außerdem für eine zelluläre Kommunikation (Abboud 2012). Eine fehlende Kommunikation könnte somit zum Ausbleiben der Reaktion auf AngII beziehungsweise NA führen. Außerdem besitzen Mesangialzellen sowie Podozyten zahlreiche AT1-Rezeptoren (Sharma et al. 1998). Nach der Lyse der Mesangialzellen vermindert sich deren Anzahl im Glomerulum und damit auch ihr Einfluss auf den  $GSC_A$ .

Zusätzlich zu der deutlichen Erhöhung des  $GSC_A$  wiesen die mit Anti-Thy1.1 behandelten Ratten eine massiv erhöhte Albuminausscheidung im Urin auf. Abermals ausgehend von der Annahme, dass die ausgeschiedene Urinmenge einer Ratte bei 55 ml/kg liegt (Fox et al. 2002), lässt sich die Albuminausscheidung bei den durchschnittlich 158 g schweren Anti-Thy1.1 Ratten auf 58,7 mg pro Tag schätzen. Damit liegt die Albuminausscheidung sogar um ein 100-faches über der Ausscheidung der unbehandelten Tiere. Dieser Anstieg entspricht einer Albuminurie (Dikow und Ritz 2003) und kann unterschiedliche Ursachen haben.

Um den Einfluss des Anti-Thy1.1 Antikörpers auf die Albuminkonzentration im Blut zu überprüfen, wurden Serumproben behandelter und nicht behandelter Tiere entnommen. Die Verminderung der Albuminkonzentration im Serum zeigt einen starken, renal bedingten Albuminverlust und schließt gleichzeitig eine prärenale Ursache der Albuminurie aus. Im Folgenden sollen mögliche Gründe für die renale Albuminurie erörtert werden.

### 6.3.1 Folgen der mesangialen Lyse für die glomeruläre Filtrationsbarriere

Die Mesangialzellen sind zwar nicht direkt an der Filtrationsbarriere beteiligt, jedoch bilden sie das Grundgerüst eines jeden Glomerulums und sorgen somit für dessen Integrität. Ein Verlust dieser Zellen verursacht eine Proteinurie (Bagchus et al. 1986). Mit Hilfe der intravitalem Multiphotonenmikroskopie wurde eine deutliche Erhöhung des  $GSC_A$  nach der Lyse der Mesangialzellen gezeigt. Allerdings konnten immunhistologisch keine Veränderungen der glomerulären Filtrationsbarriere nachgewiesen werden. Um die Auswirkungen der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse auf die Ultrastruktur im Glomerulum genauer zu untersuchen und somit die Ursache des erhöhten  $GSC_A$  zu ermitteln, wurden zusätzlich elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Dabei wurden auch bei diesen Aufnahmen die Lyse der Mesangialzellen sowie die Auflösung der mesangialen Matrix deutlich. Hinsichtlich der Auswirkungen auf die Integrität der Filtrationsbarriere wurden die einzelnen Bestandteile untersucht.

Das diskontinuierliche Endothel bildet gemeinsam mit der daran anliegenden Glykokalyx den ersten Bestandteil der glomerulären Filtrationsbarriere. Mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die Auswirkungen der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse auf die Breite der Fenestrae genauer untersucht. Dabei ergaben sich 24 Stunden nach Applikation des Antikörpers keine Änderungen ihrer Breite oder Konstitution. Auch andere elektronenmikroskopischen Studien bestätigen dieses Ergebnis. Allerdings konnte 5 Tage nach der Applikation des Antikörpers eine starke Zunahme der Fenestrae mit einem Diaphragma dargestellt werden (Ichimura et al. 2008). Die ausbleibende Veränderung 24 Stunden nach Applikation des Antikörpers lässt jedoch vermuten, dass die Integrität der Endothelzellen nicht von der Lyse der Mesangialzellen beeinflusst wurde und somit auch keinen Einfluss auf den erhöhten  $GSC_A$  besitzt.

Die endotheliale Glykokalyx wurde intravital sowie immunhistologisch dargestellt. Dabei wurden 24 Stunden nach der Anti-Thy1.1 Applikation keine Veränderungen ihrer Breite oder Ausprägung festgestellt. Anhand der angefertigten elektronenmikroskopischen Bilder konnte die Glykokalyx jedoch nicht beurteilt werden, da die für diese Studie verwendete Fixierung des Gewebes zu einem Verlust dieser sehr sensiblen Schicht führte. Obwohl die endotheliale Glykokalyx 24 Stunden nach der Lyse der Mesangialzellen noch intakt ist, könnte sich das während der Proliferationsphase des Anti-Thy1.1 Antikörpermodells ändern. Bagchus et al. stellten in ihrer Studie im Jahr 1986 eine zunehmende Proteinurie nach der Lyse der Mesangialzellen fest. Etwa 24 Stunden nach der Lyse der Mesangialzellen lag die Proteinurie bei 36 mg/Tag und ist somit mit der hier gemessenen basalen Albuminausscheidung von 58,7 mg/Tag vergleichbar. Nach 4 Tagen erhöhte sich die Proteinurie auf einen maximalen Wert von 320 mg/Tag (Bagchus et al. 1986). In dieser Phase findet die maximale Proliferation der Mesangialzellen sowie die vermehrte Synthese von

proinflammatorischen Zytokinen, wie beispielsweise TNF $\alpha$  (Sterzel et al. 1993), statt. TNF $\alpha$  verursacht eine Schädigung der endothelialen Glykokalyx und könnte daher die Ursache des beinahe 10-fache Anstiegs der Proteinausscheidung darstellen (Henry und Duling 2000). Allerdings konnte diese Theorie bisher durch keine Studie belegt werden.

Die angrenzende Basalmembran bildet die mittlere Schicht der glomerulären Filtrationsbarriere. Bei der Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen ergab sich eine signifikante Verbreiterung der Basalmembran nach der Lyse der Mesangialzellen. Die Mesangialzellen sind in einem intakten Glomerulum mit der Basalmembran direkt über Zellfortsätze sowie indirekt über Microfibrillen verbunden und sorgen somit für deren Stabilität (Sakai und Kriz 1987; Takami et al. 1990). Fissel und Miner (2018) entwickelten eine neue Hypothese, welche die Basalmembran als komprimierbaren Ultrafilter beschreibt. Dabei wirken in einem gesunden Glomerulum die Fußfortsätze, welche sich an der anderen Seite der Basalmembran befinden, dem hydrostatischen Druck in den Kapillaren entgegen. Erweitert man diese Theorie auf die Mesangialzellen, so kann ihre Lyse ebenso zu einem Verlust der stabilisierenden Kraft auf die Basalmembran führen. Diese Verminderung der Kompressionskraft auf die Basalmembran führt zu einer Erweiterung der fibrinösen Netzwerkes und somit zu einer vermehrten Durchlässigkeit für Albumin (Fissell und Miner 2018).

Der äußere Anteil der Filtrationsbarriere wird durch die verzweigten Fußfortsätze der anliegenden Podozyten gebildet. Diese stehen zwar nicht direkt mit den Mesangialzellen in Verbindung, jedoch kommunizieren sie indirekt über Zytokine. Eine Schädigung der Mesangialzellen führt somit zu einer Verbreiterung der Podozytenfußfortsätze (Schlöndorff und Banas 2009). Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte diese Verbreiterung der Podozytenfußfortsätze auch nach der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse der Mesangialzellen nachgewiesen werden. Die Hypothese von Fissel und Miner besagt diesbezüglich, dass in einem gesunden Glomerulum Anziehungs- und Kontraktionskräfte zwischen den Podozytenfußfortsätzen wirken. Dies macht die Fortsätze der Podozyten zu Stützpfeilern gegen den hydrostatischen Filtrationsdruck in den Kapillaren. Eine Verbreiterung der Podozyten führt also zunächst zu einer Verringerung des Gegendrucks und folglich zu einer verminderten Kompression der Basalmembran (Fissell und Miner 2018). Andere Autoren verweisen in diesem Zusammenhang auf das engmaschige Ineinandergreifen der Fußfortsätze als wichtiger Bestandteil der Filtrationsbarriere. Die entstehenden Schlitzmembranen verhindern dabei in einem intakten Glomerulum die Filtration von Plasmaproteinen (Reiser und Altintas 2016). Eine Verbreiterung der Fußfortsätze führt somit in jedem Fall zu einer erhöhten Filtration von Plasmaproteinen und folglich zu einer Proteinurie (Schlöndorff und Banas 2009).

Die Resultate ergeben, dass eine Lyse der Mesangialzellen im Glomerulum zu einer Verbreiterung der Basalmembran sowie der Podozytenfußfortsätze. Beides bedingt eine Proteinurie welche zunächst als erhöhter  $GSC_A$  intravital gemessen werden konnte.

### 6.3.2 Auswirkungen der vermehrten Albuminfiltration auf das Tubulussystem

Während mit Hilfe der intravitalen Mikroskopie lediglich eine 5,2-fache Erhöhung der Albuminfiltration nach Lyse der Mesangialzellen gemessen werden konnte, stieg die Albuminausscheidung im Urin um das beinahe 100-fache an. Ursächlich für diese Diskrepanz ist vermutlich eine Überlastung des Tubulus und der dort stattfindenden Resorptionsprozesse. Physiologisch werden etwa 97 % des filtrierte Albumins vom Tubulussystem resorbiert (Tojo und Kinugasa 2012). Dabei soll vor allem der Albumin-Gehalt im Serum möglichst konstant gehalten werden (Wagner et al. 2016). Die Resorptionskapazität des Tubulus über das gewöhnliche Maß hinaus ist jedoch stark limitiert (Tenten et al. 2013). So kann bereits eine kurzfristige Minderversorgung der Niere während der Orthostase zu einem reversiblen Anstieg der Albuminausscheidung führen (Robinson et al. 1963).

Eine Infusion mit AngII beziehungsweise NA führte bei den Anti-Thy1.1 behandelten Tieren zu keiner weiteren Erhöhung der Albuminausscheidung im Urin. Ein möglicher Grund ist die bereits erörterte ausbleibende Veränderung des  $GSC_A$ , welche folglich auch im Urin zu finden ist. Hinzu kommt außerdem die basale Überlastung des tubulären Systems. Eine Infusion mit AngII kann zu keiner weiteren Erhöhung der Resorptionskapazität im proximalen Tubulus führen; ein entsprechender Unterschied zwischen AngII und NA bleibt somit aus (Caruso-Neves et al. 2005).

Immunhistologisch konnte bei den Anti-Thy1.1 behandelten Tieren eine deutliche Albuminanreicherung im gesamten Tubulussystem nachgewiesen und elektronenmikroskopisch bestätigt werden. Das Lumen des proximalen Tubulus war massiv mit umhülltem Protein gefüllt, während im distalen Tubulus vor allem freies Protein zu finden war. Über die *Megalin-Cubilin-Komplex-Rezeptoren* des Bürstensaums wird Albumin in die Tubuluszellen aufgenommen und in Lysosomen enzymatisch abgebaut (Tojo und Kinugasa 2012). Mit Hilfe der ultrastrukturellen Aufnahmen konnte eine vermehrte Ausbildung und Vergrößerung der Lysosomen in den Tubuluszellen gezeigt werden. Die Albuminurie der Anti-Thy1.1 behandelten Tiere wurde somit sekundär durch eine Überlastung des Tubulussystems und einer fehlenden tubulären Rückresorption verstärkt. Grundsätzlich kann eine erhöhte Albuminfiltration auch zu strukturellen Veränderungen und entzündlichen Schäden bei den Tubuluszellen führen (Wohlfarth et al. 2003).

## 6.4 Akute Effekte von AngII und NA auf die snGFR

Mesangialzellen leisten nicht nur einen wichtigen Beitrag zur Integrität der Filtrationsbarriere, sondern können darüber hinaus durch ihre kontraktile Eigenschaften die snGFR im Glomerulum regulieren (Schlöndorff 1987; Blantz et al. 1993). In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals mittels intravitaler Multiphotonenmikroskopie der Einfluss der Mesangialzellen auf die snGFR gezeigt werden. Im Gegensatz zu ehemaligen Mikropunktionsstudien sind die funktionellen Messungen mittels Multiphotonenmikroskopie weniger invasiv und ermöglichen außerdem eine visuelle Darstellung der glomerulären Filtration.

Mesangialzellen besitzen AT1-Rezeptoren und zeigen *in vitro* eine AngII bedingte Kontraktion (Singhal et al. 1986). Blantz et al. (1993) wiesen mit Hilfe von Mikropunktionsstudien bereits eine AngII bedingte Erniedrigung der snGFR nach. Diese Reduktion der snGFR unter dem Einfluss von AngII konnte in dieser Studie mit Hilfe der intravitalen Multiphotonenmikroskopie bestätigt werden. Um auszuschließen, dass es sich bei der veränderten snGFR lediglich um blutdruckbedingte Effekte handelte, wurde in einem weiteren Versuch eine Infusion mit NA appliziert. Mesangialzellen besitzen keine Rezeptoren für NA, sodass die Wirkung von NA lediglich auf die  $\alpha$ -Rezeptoren in den Arteriolen und die Erhöhung des Blutdrucks beschränkt bleibt (Alzheimer et al. 2005). Im Glomerulum selbst bewirkt NA eine Kontraktion der afferenten und efferenten Arteriole (Wilson 1986). Die Menge an NA wurde entsprechend verdünnt, sodass durch dieselbe Infusionsmenge eine äquivalente Blutdruckerhöhung beim Versuchstier erreicht werden konnte. Eine solche NA-Infusion hatte keinen signifikanten Einfluss auf die snGFR, wodurch blutdruckbedingte Effekte ausgeschlossen werden konnten.

### 6.4.1 Steuerung der snGFR durch die Mesangialzellen

Abgesehen von den Mesangialzellen besitzen jedoch auch Endothelzellen der afferenten und efferenten Arteriole Rezeptoren für AngII (Wilson 1986; Sraer et al. 1989). Um den tatsächlichen Einfluss der Mesangialzellen auf die snGFR zu klären, wurde das Anti-Thy1.1 Antikörpermodell verwendet und genau 24 Stunden nach der Applikation des Antikörpers snGFR den behandelten Ratten ermittelt. Eine Anti-Thy1.1 bedingte Reduktion der basalen snGFR wurde bereits von Yamamoto et al. (1991) mittels Mikropunktionsstudien nachgewiesen, konnte jedoch in einer anderen Studie nicht bestätigt werden (Blantz et al. 1993). Aufgrund dieser Kontroversität sollten die Versuche mittels intravitaler Mikroskopie wiederholt werden. Zu den Vorteilen der intravitalen Mikroskopie gegenüber den früheren Mikropunktionsstudien gehört unter anderem, dass diese weit weniger invasiv ist und die Tiere bis zur Messung nur etwa eine halbe Stunde in Narkose verbleiben. In dieser Studie konnte nach Lyse der Mesangialzellen eine signifikante Reduktion der snGFR um 62,9 % gemessen werden. Diese Verminderung kann durch die bestehenden

strukturellen Veränderungen erklärt werden. Durch die Lyse der Mesangialzellen kommt es zur Aufweitung und – funktionell offenbar entscheidend – zum Konfluieren glomerulärer Kapillaren. Somit reduziert sich die Gesamtoberfläche der Kapillaren, selbst wenn sich die von ihnen eingenommene Fläche nach Lyse der Mesangialzellen vergrößert. Eine verminderte Oberfläche des Kapillarknäuels führt letztendlich zu einer geringeren  $\text{snGFR}$ .

Bei den Anti-Thy1.1 behandelten Ratten kam es außerdem nicht zu einer AngII vermittelten Reduktion der  $\text{snGFR}$ . Zu letzterem Ergebnis kamen auch Blantz et al. (1993) mit Hilfe von Mikropunktionsstudien. Um abermals den Einfluss der Blutdruckerhöhung zu klären, wurden die Versuche mit einer NA-Infusion wiederholt. Dabei ergaben sich jedoch keine signifikanten Änderungen der basal bereits erniedrigten  $\text{snGFR}$ .

Generell zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass das Grundgerüst der Mesangialzellen wichtig für eine adäquate  $\text{snGFR}$  ist und beweisen außerdem, dass Mesangialzellen fähig sind, die  $\text{snGFR}$  durch ihre kontraktile Eigenschaften zu modulieren.

Die hier beobachtete Reduktion der  $\text{snGFR}$  könnte ebenso zur Erhöhung des glomerulären Siebkoeffizienten beitragen. Lund et al. (2003) zeigten in ihrer Studie, dass sich die Filtration von Albumin mit zunehmender  $\text{snGFR}$  vermindert. Ihrer Hypothese zufolge erhöht sich bei einer geringeren Filtrationsrate der Anteil der Diffusion und trägt somit zu einem verstärkten Transport von Albumin über die Filtrationsbarriere bei (Lund et al. 2003). Diese Diffusion könnte die bereits erläuterten Ursachen unterstützen und somit zu der AngII bedingte Erhöhung der  $\text{GSC}_A$  bei unbehandelten Ratten sowie zu der Erhöhung des  $\text{GSC}_A$  bei Anti-Thy1.1 behandelten Ratten beitragen.

## 6.5 Akute Effekte auf von AngII und NA auf den glomerulären Blutfluss

Es ist bekannt, dass eine Infusion mit AngII zu einer dosisabhängigen Reduktion der kapillaren Flussgeschwindigkeit führt. Obwohl die Menge an infundiertem AngII in dieser Studie lediglich bei  $0,08 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  lag, nahm die kapillare Flussgeschwindigkeit um 51 % ab. Zimmerhackl et al. (1985) verwendeten deutlich höhere AngII Konzentrationen ( $0,4 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) und beobachtete eine Reduktion der Flussgeschwindigkeit um 42 %.

Als basale kapillare Flussgeschwindigkeiten sind in der Literatur Werte zwischen  $781 \mu\text{m}/\text{sec}$  und  $815 \mu\text{m}/\text{sec}$  zu finden (Zimmerhackl et al. 1985; Steinhausen et al. 1981). Diese Angaben liegen jedoch unter der hier gemessenen kapillaren Flussgeschwindigkeit von  $1450 \mu\text{l}/\text{sec}$ . Ein möglicher Grund für diese Diskrepanz könnte die damals verwendete und invasive *kidney-spoon-Technik* sein. Für diese Studie wurde die Niere lediglich aus dem Abdomen hervorgelegt und es fand keine

weitere Fixierung statt. Der in dieser Studie gemessene Kapillardurchmesser von 9,4  $\mu\text{m}$  war vergleichbar mit dem gemessenen Durchmesser aus anderen Studien (8,4  $\mu\text{m}$  bzw. 9,0  $\mu\text{m}$ ).

Der kapillare Fluss ergibt sich jedoch aus dem Produkt aus Flussgeschwindigkeit und Fläche. Aufgrund der höheren kapillaren Flussgeschwindigkeit liegt auch der kapillare Fluss mit einem Wert von 5,86 nl/min über den in der Literatur angegebenen Werten (3,2 nl/min bzw. 2,61 nl/min) (Steinhausen et al. 1981; Zimmerhackl et al. 1985).

Eine Infusion mit NA führt ebenso wie AngII zu einer Vasokonstriktion der afferenten und efferenten Arteriole (Wilson 1986). In dieser Studie konnte jedoch nach Lyse der Mesangialzellen kein Einfluss auf die kapillare Flussgeschwindigkeit sowie den kapillaren Fluss nachgewiesen werden. Dies führt wiederum zu der Hypothese, dass die Mesangialzellen, welche unter anderem AT1-Rezeptoren besitzen, verantwortlich für die AngII bedingte Änderung der glomerulären Durchblutung sind.

#### 6.5.1 Steuerung der kapillaren Flussgeschwindigkeit und des kapillaren Flusses durch die Mesangialzellen

Grundsätzlich führte die Lyse der Mesangialzellen zu einer Reduktion der Flussgeschwindigkeit im Glomerulum. Durch die gleichzeitige Erweiterung der Kapillaren blieb jedoch der kapillare Fluss auch nach Lyse der Mesangialzellen konstant. Eine entsprechende Infusion mit AngII beziehungsweise NA führte nach der Lyse der Mesangialzellen weder zu einer Änderung des kapillaren Flusses noch zu einer Erhöhung der kapillaren Flussgeschwindigkeit.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des Anti-Thy1.1 Antikörpermodells die anfängliche Hypothese bestätigt werden: Mesangialzellen können die kapillare Flussgeschwindigkeit sowie den kapillaren Fluss im Glomerulum regulieren.

#### 6.6 Nachweis einer durch Mesangialzellen bedingten glomerulären Bewegung

Mit Hilfe von in vitro Studien konnte bereits vor 40 Jahren der kontraktile Phänotyp der Mesangialzellen gezeigt werden (Ausiello et al. 1980; Singhal et al. 1986). Schlöndorff geht in seiner Theorie davon aus, dass Mesangialzellen durch ihre Kontraktion nicht nur den glomerulären Fluss, sondern die ganze Konstitution im Glomerulum verändern können (Schlöndorff 1987). Jedoch konnte eine solche Veränderung bislang nicht intravital gezeigt werden.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals mit Hilfe der intravitalen Multiphotonenmikroskopie gezeigt werden, dass Mesangialzellen eine Bewegung des gesamten Glomerulums verursachen können. Unter dem Einfluss von AngII konnte eine rotierende Bewegung des gesamten Kapillarknäuels im Glomerulum beobachtet werden. Diese Bewegung setzte mit der

AngII bedingten Blutdruckerhöhung ein und verharrte anschließend bei gleichbleibender Erhöhung des Blutdrucks. Nach beenden der AngII-Infusion rotierte das Glomerulum an seinen ursprünglichen Ausgangspunkt zurück. Dies lässt eine Kontraktion im Glomerulum als Ursache für die Bewegung vermuten. Allerdings besitzen auch die Endothelzellen der afferenten und efferenten Arteriole Rezeptoren für AngII (Sraer et al. 1989). Um die Theorie zu überprüfen, dass die Mesangialzellen verantwortlich für diese beobachtete Bewegung sind, wurde das Anti-Thy1.1 Antikörpermodell verwendet. Der Antikörper führt lediglich bei Mesangialzellen zu deren Lyse (Kurihara und Sakai 2017). Auch die hier angefertigten immunhistologischen Aufnahmen zeigten keinen Einfluss des Anti-Thy1.1 Antikörpers auf die Endothelzellen. Bei den funktionellen Messungen blieb die rotierende Bewegung des Kapillarknäuels nach der Lyse der Mesangialzellen aus. Ein Anstieg des Blutdrucks durch eine NA-Infusion führte weder bei unbehandelten noch bei behandelten Ratten zu einer Bewegung des Kapillarknäuels. Somit konnten rein blutdruckbedingte Effekte als Ursache für die Bewegung ausgeschlossen werden.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Mesangialzellen durch ihre kontraktilen Eigenschaften die Konstitution im Glomerulum verändern und dadurch die beobachtete rotierende Bewegung des Kapillarknäuels verursachen.



## 7 Zusammenfassung

Mesangialzellen sind spezialisierte Zellen und für die Verankerung und Kommunikation der einzelnen zellulären Strukturen im Glomerulum verantwortlich. Sie besitzen Rezeptoren für AngII sowie einen kontraktilen Phänotyp, der bereits *in vitro* nachgewiesen werden konnte. Die genaue Relevanz der Mesangialzellen für die glomeruläre Filtrationsbarriere sowie für die Ultrafiltration *in vivo* blieb bislang unklar.

In der vorliegenden Arbeit sollte folgende Hypothese überprüft werden: Mesangialzellen haben durch ihre kontraktilen Eigenschaften einen erheblichen Einfluss auf die Hämodynamik im Glomerulum und sind durch ihre strukturellen Eigenschaften für die Integrität der Filtrationsbarriere mitverantwortlich.

Zur Prüfung der Hypothese wurde das Anti-Thy1.1 Antikörpermodell verwendet und die Ratten mit Hilfe der intravitralen Multiphotonenmikroskopie untersucht. Der applizierte Anti-Thy1.1 Antikörper führte zu einer Lyse der Mesangialzellen im Glomerulum. Mittels Immunhistochemie konnte die spezifische Bindung des Antikörpers an Mesangialzellen nachgewiesen werden. Die mit Anti-Thy1.1 behandelten Tiere sowie unbehandelte Vergleichstiere wurden mit Hilfe der intravitralen Multiphotonenmikroskopie hinsichtlich des  $GSC_A$ , der  $snGFR$  und der kapillaren Flussgeschwindigkeit untersucht. Dabei wurden die funktionellen Daten beider Gruppen zunächst basal und anschließend unter dem Einfluss einer AngII-Infusion untersucht. Um die rezeptorvermittelte Wirkung von AngII an den Mesangialzellen von den blutdruckbedingten Effekten im Glomerulum zu unterscheiden, wurden die gleichen Studien zudem mit dem Vasokonstriktor NA durchgeführt. Diese Infusion führte zu einer vergleichbaren Erhöhung des Blutdrucks, ohne jedoch eine direkte, rezeptorvermittelte Wirkung auf die Mesangialzellen zu haben.

Unter dem Einfluss von AngII kam es bei den unbehandelten Tieren zu einer signifikanten Reduktion des kapillaren Flusses sowie der kapillaren Flussgeschwindigkeit, während die Infusion von NA beziehungsweise NaCl zu keiner signifikanten Veränderung führte. Bei den mit Anti-Thy1.1 behandelten Tieren kam es nach dem Verlust der Mesangialzellen zu einem *Ballooning-Effekt* und somit zu einer Verbreiterung der Kapillaren bei einer geringeren Gesamtoberfläche. Die gemessene kapillare Flussgeschwindigkeit war somit geringer als bei den unbehandelten Tieren, jedoch blieb der kapillare Fluss annähernd gleich. Eine Infusion mit AngII führte jedoch weder zu einer Veränderung der kapillaren Flussgeschwindigkeit noch zu einer Veränderung des kapillaren Flusses. Dies zeigt zum einen die strukturelle Funktion der Mesangialzellen und zum anderen ihre Fähigkeit, die kapillare Durchblutung des Glomerulums zu regulieren.

Die  $snGFR$  steht in direkter Abhängigkeit zur kapillaren Durchblutung. Daher kam es auch hier bei den unbehandelten Tieren zu einer signifikanten Reduktion nach der AngII-Infusion. Die  $snGFR$  war bei den mit Anti-Thy1.1 behandelten Tiere insgesamt niedriger und veränderte sich nach der AngII-Infusion nicht.

Strukturell bilden die Mesangialzellen und das mit ihnen verbundene Mesangium das Grundgerüst eines jeden Glomerulums. Durch die Lyse dieser Zellen veränderte sich nicht nur die glomeruläre Struktur, sondern auch die Integrität der Filtrationsbarriere. Die mit Anti-Thy1.1 behandelten Tiere wiesen intravital einen deutlich erhöhten  $GSC_A$  auf. Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass durch den Verlust der Mesangialzellen auch die Podozyten in ihrer Funktionalität beeinträchtigt wurden. Zusätzlich konnte eine Verbreiterung der glomerulären Basalmembran nachgewiesen werde. Die daraus resultierende erhöhte Albuminfiltration führte zu einer Überlastung des proximalen Tubulus und zu einer massiv erhöhten Albuminausscheidung im Urin.

Die Fähigkeit der Mesangialzellen zur Kontraktion lässt auch eine sichtbare Bewegung im Glomerulum vermuten. Eine solche rotierende Bewegung der Kapillarschlingen im *Bowman-Raum* konnte in dieser Arbeit erstmals nach AngII Applikation bei den unbehandelten Ratten beobachtet werden. Dieses Bewegungsphänomen blieb jedoch bei den Anti-Thy1.1 behandelten Ratten aus. Daraus lässt sich weiter folgern, dass die Mesangialzellen auch *in vivo* die Fähigkeit zur Kontraktion besitzen und somit eine Bewegung der Kapillarschlingen verursachen.

Insgesamt belegen die Ergebnisse dieser Arbeit den funktionellen und strukturellen Einfluss der Mesangialzellen im Glomerulum. So regulieren sie durch ihre Kontraktilität die kapillare Geschwindigkeit, den kapillaren Fluss sowie die  $snGFR$  im Glomerulum. Außerdem sind sie wesentlich an der Aufrechterhaltung der Integrität der Filtrationsbarriere beteiligt.

## 8 Summary

The intra-glomerular mesangial cells fill the space between the glomerular capillaries and may support the structural integrity of the glomerulus. Data from cultured mesangial cells suggest a contractile cell phenotype. However, the in vivo relevance of mesangial cells for the function of the glomerular filtration barrier and the regulation of glomerular filtration remains unclear.

Here we hypothesized that contractile mesangial cells actively regulate glomerular hemodynamics and that mesangial cells support the integrity of the glomerular filtration barrier. To test this hypothesis, we assessed the function of mesangial cells in the live animal by intravital multiphoton microscopy. The mesangial cells were depleted in Munich Wistar Froemter rats using the anti-Thy1.1 antibody model. Immune staining of kidneys for anti-Thy1.1 showed an exclusive binding of the administered anti-Thy1.1 antibody to mesangial cells. The anti-Thy1.1-treated rats and the control rats were evaluated by intravital multiphoton microscopy concerning the  $GSC_A$ , the snGFR and the capillary plasma flow. Functional data were assessed at baseline and after the infusion of AngII.

The capillary flow and the capillary flow velocity decreased during the infusion of AngII in the control rats. The anti-Thy1.1-treated animals showed a *ballooning-effect* after the lysis of the mesangial cells and, consequently, an enlargement of the capillaries with a smaller surface area. However, the measured capillary velocity was lower compared to the control group, but the capillary flow remained unchanged. In anti-Thy1.1-treated rats, an infusion of AngII did not influence the capillary velocity and the capillary flow. These data suggest that mesangial cells actively regulate the blood flow in the glomerulus.

The snGFR depends on the capillary blood flow. Accordingly, a significant reduction of the snGFR was observed in the control group after an infusion of AngII. This alteration was absent in anti-Thy1.1-treated rats. The snGFR was lower in this group and an infusion of AngII did not result in an alteration of the snGFR.

Mesangial cells maintain the structural architecture of the glomerulus. A lysis of mesangial cells apparently changed the glomerular structural integrity, and, consequently the function of the glomerular filtration barrier. The anti-Thy1.1-treated rats had a highly increased  $GSC_A$  compared to the control animals, as determined by the intravital microscopy. Furthermore, electron microscopy demonstrated a loss of podocyte structure in anti-Thy1.1-treated rats. Additionally, loss of mesangial cells was accompanied by an enlargement of the glomerular basement membrane could be determined. The increased filtration of albumin led to an enhanced proximal tubular albumin uptake and to albuminuria.

Mesangial cells are contractile cells. The contractile phenotype of mesangial cells became apparent by a rotating movement of the capillary loops within the Bowman's space after an infusion of AngII in the control group. This phenomenon was absent in anti-Thy1.1-treated rats.

Our data provide new insights into the functional and structural role of the mesangial cells in the glomerulus. Mesangial cells have a contractile phenotype and, therefore, contribute to the regulation of the sngFR, to the capillary velocity and the capillary flow in vivo. Furthermore, mesangial cells are crucially involved in the maintenance of the integrity of the glomerular filtration barrier.

## 9 Literaturverzeichnis

- Abboud, H. (2012): Mesangial cell biology. In: *Experimental cell research*, S. 979–985. DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.02025.
- Achilles W.; Cerny, H.; Geyer, H.; Gille, U.; Krautwald-Junghans, M.; Salomon, F. et al. (2005): Anatomie für die Tiermedizin. Stuttgart: Enke.
- Alzheimer, C.; Benndorf, K.; Berger, E.; Bingmann, D.; Bosy-Westphal, A.; Cooper, T.; Deetjen, P. et al. (2005): Physiologie. 4., vollst. überarb. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer.
- Ardailou R.; Chansel D. (1993): Glomerular effects of angiotensin II: a reappraisal based on studies with non-peptide receptor antagonists. In: *Journal of Hypertension* 11 (3), S. 43–47.
- Aurich, C.; Breer H.; Breves, G.; Bruckmaier R.; Bubna-Littitz, H.; Deeg, C. et al. (2010): Physiologie der Haustiere. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Enke.
- Ausiello, D.; Kreisberg, J.; Roy, C.; Karnovsky, M. (1980): Contraction of cultured rat glomerular cells of apparent mesangial origin after stimulation with angiotensin II and arginine vasopressin. In: *The Journal of clinical investigation* 65 (3), S. 754–760. DOI: 10.1172/JCI109723.
- Bagchus, W.; Hoedemaeker, P.; Rozing, J.; Bakker, W. (1986): Acute glomerulonephritis after intravenous injection of monoclonal anti-thymocyte antibodies in the rat. In: *Immunology Letters* 12 (2-3), S. 109–113. DOI: 10.1016/0165-2478(86)90091-x.
- Bagchus, W.; Jeunink, M.; Elema, J. (1990): The Mesangium in Anti-Thy-1 Nephritis. Influx of Macrophages, Mesangial Cell Hypercellularity, and Macromolecular Accumulation. In: *American Journal of Pathology* (137), S. 215–223.
- Baumgärtner, W. (2007): Pathohistologie für die Tiermedizin. Stuttgart: Enke.
- Berger, J.; Hinglais, N. (1968): Intercapillary deposits of IgA-IgC. In: *Journal of Urology Nephrology (Paris)* (74), S. 694–695.
- Blantz, R.; Gabbai, F.; Tucker, B.; Yamamoto, T.; Wilson, C. (1993): Role of mesangial cell in glomerular response to volume and angiotensin II. In: *The American journal of physiology* 264 (1 Pt 2), F158-65. DOI: 10.1152/ajprenal.1993.264.1.F158.
- Burton, C.; Harris, K. (1996): The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure. In: *American Journal of Kidney Diseases* 27 (6), S. 765–775. DOI: 10.1016/s0272-6386(96)90512-0.
- Caruso-Neves, C.; Kwon, S. H.; Guggino, W. (2005): Albumin endocytosis in proximal tubule cells is modulated by angiotensin II through an AT2 receptor-mediated protein kinase B activation. In:

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (48), S. 17513–17518. DOI: 10.1073/pnas.0507255102.

Castrop, H.; Höcherl, K.; Kurtz, A.; Schweda, F.; Todorov, V.; Wagner, C. (2010): Physiology of kidney renin. In: *Physiological reviews* 90 (2), S. 607–673. DOI: 10.1152/physrev.00011.2009.

Chin, B.; Mohsenin, A.; Li, S.; Choi, A.; Choi, M. (2001): Stimulation of pro-alpha(1)(I) collagen by TGF-beta(1) in mesangial cells: role of the p38 MAPK pathway. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 280 (3), F495-504. DOI: 10.1152/ajprenal.2001.280.3.F495.

Christensen, E.; Birn, H. (2001): Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 280 (4), F562-73. DOI: 10.1152/ajprenal.2001.280.4.F562.

Cove-Smith, A.; Hendry, B. (2008): The regulation of mesangial cell proliferation. In: *Nephron. Experimental nephrology* 108 (4), e74-9. DOI: 10.1159/000127359.

Dahme, E.; Hafner-Marx, A. (2007): Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. 5 Tabellen. 6., völlig neu bearb. Aufl. Stuttgart: Enke.

Deen, W. (2004): What determines glomerular capillary permeability? In: *The Journal of clinical investigation* 114 (10), S. 1412–1414. DOI: 10.1172/JCI200423577.

Diaspro, A.; Bianchini, P.; Vicidomini, G.; Faretta, M.; Ramoino, P.; Usai, C. (2006): Multi-photon excitation microscopy. In: *Biomedical engineering online* 5, S. 36. DOI: 10.1186/1475-925X-5-36.

Dickson, L.; Wagner, M.; Sandoval, R.; Molitoris, B. (2014): The proximal tubule and albuminuria: really! In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 25 (3), S. 443–453. DOI: 10.1681/ASN.2013090950.

Dikow, R.; Ritz, E. (2003): Frühwarnsystem für den nierenkranken Diabetiker. Nicht nur neue Testsysteme und nephroprotektive Arzneimittel sprechen für eine regelmäßige Untersuchung des Urins. In: *Deutsches Ärzteblatt* 100 (17).

Dimke, H.; Maezawa, Y.; Quaggin, S. (2015): Crosstalk in glomerular injury and repair. In: *Current opinion in nephrology and hypertension* 24 (3), S. 231–238. DOI: 10.1097/MNH.000000000000117.

Drenckhahn D.; Schnittler H.; Nobiling R.; Kriz W. (1990): Ultrastructural organization of contractile proteins in rat glomerular mesangial cells. In: *American Journal of Pathology* 137 (6), S. 1343–1351.

Drumm, K.; Bauer, B.; Freudinger, R.; Gekle, M. (2002): Albumin induces NF-kappaB expression in human proximal tubule-derived cells (IHKE-1). In: *Cellular physiology and biochemistry* :

*international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 12 (4), S. 187–196. DOI: 10.1159/000066278.

Eisenbach, G. M.; van Liew, J. B. (1975): Effect of angiotensin on glomerular filtration of albumin. In: *Contributions to nephrology* 1, S. 28–36. DOI: 10.1159/000398226.

Ernsberger, P.; Zhou, J.; Damon, T. H.; Douglas, J. G. (1992): Angiotensin II receptor subtypes in cultured rat renal mesangial cells. In: *The American journal of physiology* 263 (3 Pt 2), F411-6. DOI: 10.1152/ajprenal.1992.263.3.F411.

Fadok, V.; Voelker, D.; Campbell, P.; Cohen, J.; Bratton, D.; Henson, P. (1992): Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. In: *Journal of Immunology* 148 (7), S. 2207–2216.

Fishelson, Z.; Donin, N.; Zell, S.; Schultz, S.; Kirschfink, M. (2003): Obstacles to cancer immunotherapy: Expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. In: *Molecular Immunology* 40 (2-4), S. 109–123. DOI: 10.1016/s0161-5890(03)00112-3.

Fissell, William H.; Miner, Jeffrey H. (2018): What Is the Glomerular Ultrafiltration Barrier? In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 29 (9), S. 2262–2264. DOI: 10.1681/ASN.2018050490.

Fox, J.; Anderson, L.; Loew, F.; Quimby, F. (2002): *Laboratory Animal Medicine*. 2. Aufl. s.l.: Elsevier professional (American College of Laboratory Animal Medicine).

Gekle, M. (2005): Renal tubule albumin transport. In: *Annual review of physiology* 67, S. 573–594. DOI: 10.1146/annurev.physiol.67.031103.154845.

Göppert-Mayer, M. (1931): Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. In: *Ann. Phys.* 401 (3), S. 273–294. DOI: 10.1002/andp.19314010303.

Hackbarth, H.; Büttner, D.; Jarck, D.; Pothmann, M.; Messow, C.; Gärtner, K. (1983): Distribution of glomeruli in the renal cortex of Munich Wistar Frömter (MWF) rats. In: *Renal physiology* 6 (2), S. 63–71. DOI: 10.1159/000172882.

Haraldsson, B.; Nyström, J.; Deen, W. M. (2008): Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. In: *Physiological reviews* 88 (2), S. 451–487. DOI: 10.1152/physrev.00055.2006.

Henry, C.; Duling, B. (2000): TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 279 (6), H2815-23. DOI: 10.1152/ajpheart.2000.279.6.H2815.

- Hofmann, W.; Edel, H.; Guder, W.; Ivandic, M.; Scherberich, J. (2001): Harnuntersuchungen zur differenzierten Diagnostik einer Proteinurie. In: *Deutsches Ärzteblatt* 98 (12).
- Hong, J.; Park, J.; Lee, H.; Jeong, J.; Hyeon Y.; Yun Kim, H. et al. (2016): Myosin heavy chain is stabilized by BCL-2 interacting cell death suppressor (BIS) in skeletal muscle. In: *Experimental & Molecular Medicine* 48, e225. DOI: 10.1038/emm.2016.2.
- Ichikawa I.; Kon V. (1983): Glomerular mesangium as an effector locus for the tubuloglomerular feedback system and renal sympathetic innervation. In: *Federation Proceedings* 42 (14), S. 3075–3079.
- Ichimura, K.; Stan, R.; Kurihara, H.; Sakai, T. (2008): Glomerular endothelial cells form diaphragms during development and pathologic conditions. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 19 (8), S. 1463–1471. DOI: 10.1681/ASN.2007101138.
- Jarad, G.; Miner, J. H. (2009): Update on the glomerular filtration barrier. In: *Current opinion in nephrology and hypertension* 18 (3), S. 226–232. DOI: 10.1097/mnh.0b013e3283296044.
- Kato, C.; Kato, A.; Adachi, K.; Fujii, E.; Isobe, K.; Matsushita, T. et al. (2013a): Anti-Thy-1 Antibody-mediated Complement-dependent Cytotoxicity is Regulated by the Distribution of Antigen, Antibody and Membrane Complement Regulatory Proteins in Rats. In: *Journal of toxicologic pathology* 26 (1), S. 41–49. DOI: 10.1293/tox.26.41.
- Kato, C.; Kato, A.; Adachi, K.; Fujii, E.; Isobe, K.; Watanabe, T. et al. (2013b): Expression of Membrane Complement Regulatory Proteins Crry and CD55 in Normal Rats. In: *Journal of toxicologic pathology* 26 (2), S. 223–226. DOI: 10.1293/tox.26.223.
- Klinke, R.; Pape, H-C; Silbernagel, S. (2005): Physiologie. 5. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Kurihara, H.; Harita, Y.; Ichimura, K.; Hattori, S.; Sakai, T. (2010): SIRP- $\alpha$ -CD47 system functions as an intercellular signal in the renal glomerulus. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 299 (3), F517-27. DOI: 10.1152/ajprenal.00571.2009.
- Kurihara, H.; Sakai, T. (2017): Cell biology of mesangial cells: the third cell that maintains the glomerular capillary. In: *Anatomical science international* 92 (2), S. 173–186. DOI: 10.1007/s12565-016-0334-1.
- Liebich, H. G.; Budras, K. D. (2010): Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis ; mit 4 Tabellen und 21 Übersichten zu differenzialdiagnostischen Merkmalen ; + Histologie online: die Bilddatenbank mit dem Plus. 5. Aufl. Stuttgart: Schattauer.

- Lund, Ulla; Rippe, Anna; Venturoli, Daniele; Tenstad, Olav; Grubb, Anders; Rippe, Bengt (2003): Glomerular filtration rate dependence of sieving of albumin and some neutral proteins in rat kidneys. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 284 (6), F1226-34. DOI: 10.1152/ajprenal.00316.2002.
- Marshall, C.; Shankland, S. (2006): Cell cycle and glomerular disease: a minireview. In: *Nephron. Experimental nephrology* 102 (2), e39-48. DOI: 10.1159/000088400.
- Menon, M. C.; Chuang, P. Y.; He, C. J. (2012): The glomerular filtration barrier: components and crosstalk. In: *International journal of nephrology* 2012, S. 749010. DOI: 10.1155/2012/749010.
- Miner, J. (2012): The glomerular basement membrane. In: *Experimental cell research* 318 (9), S. 973–978. DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.02.031.
- Morita, H.; Isobe, K.; Cai, Z.; Miyazaki, T.; Matsumoto, Y.; Shinzato, T. et al. (1996): Thy-1 antigen mediates apoptosis of rat glomerular cells in vitro and in vivo. In: *Nephron* 73 (2), S. 293–298. DOI: 10.1159/000189054.
- Mosley, K.; Collar, J.; Cattell, V. (2000): Mesangial cell necrosis in Thy 1 glomerulonephritis. an ultrastructural study. In: *Virchows Archiv* (6), S. 567–573.
- Oheim, M.; Michael, D.; Geisbauer, M.; Madsen, D.; Chow, R. H. (2006): Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. In: *Advanced drug delivery reviews* 58 (7), S. 788–808. DOI: 10.1016/j.addr.2006.07.005.
- Oite, T. (2011): Exploring the mechanisms of renoprotection against progressive glomerulosclerosis. In: *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 87 (3), S. 81–90. DOI: 10.2183/pjab.87.81.
- Osawa, G.; Kimmelstiel, P.; Seiling, V. (1966): Thickness of glomerular basement membranes. In: *American journal of clinical pathology* 45 (1), S. 7–20. DOI: 10.1093/ajcp/45.1.7.
- Parving, H.-H.; Mogensen, C.E.; Jensen, H.Æ; Evrin, P.-E (1974): Increased urinary Albumin-Excretion rate in benign essential hypertension. In: *The Lancet* 303 (7868), S. 1190–1192. DOI: 10.1016/S0140-6736(74)91002-2.
- Paul, L.; Rennke, H.; Milford, E.; Carpenter, C. (1984): Thy-1.1 in glomeruli of rat kidneys. In: *Kidney International* 25 (5), S. 771–777. DOI: 10.1038/ki.1984.89.
- Pereira B.; Cavalcante S.; Lima-Leite, A.; Henrique Fernandes, A.; Rabelo Buzalaf, M.; Magalhães Padilha, P. (2017): Metalloproteomic and differential expression in plasma in a rat model of type 1 diabetes. In: *International journal of biological macromolecules* 104 (Pt A), S. 414–422. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.032.

- Peter T.; Chen Y.; Barry R.; Keith M. (2000): Two-photon excitation fluorescence microscopy. In: *Annual review of biomedical engineering* (2), S. 399–429.
- Peti-Peterdi, J.; Kidokoro, K.; Riquier-Brison, A. (2016): Intravital imaging in the kidney. In: *Current opinion in nephrology and hypertension* 25 (3), S. 168–173. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000219.
- Pickering, G. W.; Prinzmetal, M. (1940): The effect of renin on urine formation. In: *The Journal of physiology* 98 (3), S. 314–335. DOI: 10.1113/jphysiol.1940.sp003852.
- Rege, T.; Hagood, J. (2006): Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (8), S. 1045–1054. DOI: 10.1096/fj.05-5460rev.
- Reiser, Jochen; Altintas, Mehmet M. (2016): Podocytes. In: *F1000Research* 5. DOI: 10.12688/f1000research.7255.1.
- Remuzzi, G. (1995): Abnormal protein traffic through the glomerular barrier induces proximal tubular cell dysfunction and causes renal injury. In: *Current opinion in nephrology and hypertension* 4 (4), S. 339–342. DOI: 10.1097/00041552-199507000-00009.
- Remuzzi, G.; Perico, N.; Macia, M.; Ruggenenti, P. (2005): The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. In: *Kidney international. Supplement* (99), S57-65. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.09911.x.
- Remuzzi, G.; Ruggenenti, P.; Benigni, A. (1997): Understanding the nature of renal disease progression. In: *Kidney International* 51 (1), S. 2–15. DOI: 10.1038/ki.1997.2.
- Riede, U.; Schaefer, H. E. (2004): Allgemeine und spezielle Pathologie. 168 Tabellen. 5., komplett überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Robinson, R.; Lecocq, F. R.; PHILLIPPI, P. J.; GLENN, W. G. (1963): Fixed and reproducible orthostatic proteinuria III. Effect of induced renal hemodynamic alterations upon urinary protein excretion. In: *The Journal of clinical investigation* 42 (1), S. 100–110.
- Saito, Y.; Kida, H.; Takeda, S.; Yoshimura, M.; Yokoyama, H.; Koshino, Y.; Hattori, N. (1988): Mesangiolysis in diabetic glomeruli: its role in the formation of nodular lesions. In: *Kidney International* 34 (3), S. 389–396. DOI: 10.1038/ki.1988.193.
- Sakai, T.; Kriz, W. (1987): The structural relationship between mesangial cells and basement membrane of the renal glomerulus. In: *Anatomy and embryology* 176 (3), S. 373–386. DOI: 10.1007/bf00310191.

- Satchell, S., C.; Braet, F. (2009): Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 296 (5), 947-56. DOI: 10.1152/ajprenal.90601.2008.
- Sato, T.; van Dixhoorn, M.; Schroeijers, W.; Huizinga, T.; Reutelingsperger, C.; van Es, L.; Daha, M. (1996): Apoptosis of cultured rat glomerular mesangial cells induced by IgG2a monoclonal anti-Thy-1 antibodies. In: *Kidney International* 49 (2), S. 403–412. DOI: 10.1038/ki.1996.59.
- Scherbaum, W.; Ritz, E. (2005): Prävention und Therapie der diabetischen Nephropathie. In: *Deutsches Ärzteblatt* 102 (3).
- Schießl, I.; Castrop, H. (2013): Angiotensin II AT2 receptor activation attenuates AT1 receptor-induced increases in the glomerular filtration of albumin: a multiphoton microscopy study. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 305 (8), F1189-200. DOI: 10.1152/ajprenal.00377.2013.
- Schießl, I.; Hammer, A.; Kattler, V.; Gess, B.; Theilig, F.; Witzgall, R.; Castrop, H. (2016): Intravital Imaging Reveals Angiotensin II-Induced Transcytosis of Albumin by Podocytes. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 27 (3), S. 731–744. DOI: 10.1681/ASN.2014111125.
- Schlöndorff, D. (1987): The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. In: *FASEB Journal* (1), S. 272–281.
- Schlöndorff, D. (1996): Roles of the mesangium in glomerular function. In: *Kidney International* 49 (6), S. 1583–1585. DOI: 10.1038/ki.1996.229.
- Schlöndorff, Detlef; Banas, Bernhard (2009): The mesangial cell revisited: no cell is an island. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 20 (6), S. 1179–1187. DOI: 10.1681/ASN.2008050549.
- Schmidt, R. F.; Lang, F.; Heckmann, M. (2011): Physiologie des Menschen. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Schürmann, S. (2010): Second Harmonic Generation Mikroskopie in biomedizinischen Anwendungen. Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg. Online verfügbar unter [http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/10796/1/Dissertation\\_Schuermann.pdf](http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/10796/1/Dissertation_Schuermann.pdf).
- Sharma, M.; Sharma, R.; Greene, A. S.; McCarthy, E. T.; Savin, V. J. (1998): Documentation of angiotensin II receptors in glomerular epithelial cells. In: *The American journal of physiology* 274 (3 Pt 2), F623-7. DOI: 10.1152/ajprenal.1998.274.3.f623.
- Siegmund-Schultze, N. (2013): Die Nephroprotektion ist essenziell. In: *Deutsches Ärzteblatt* 110 (16).

- Singhal, P.; Scharschmidt, L.; Gibbons, N.; Hays, R. (1986): Contraction and relaxation of cultured mesangial cells on a silicone rubber surface. In: *Kidney International* 30 (6), S. 862–873. DOI: 10.1038/ki.1986.266.
- Sraer, J.; Kanfer, A.; Rondeau, E.; Lacave, R. (1989): Role of the renin-angiotensin system in the regulation of glomerular filtration. In: *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 14 (4), S. 21–25.
- Steinhausen, M.; Zimmerhackl, B.; Thederan, H.; Dussel, R.; Parekh, N.; Esslinger, H. et al. (1981): Intraglomerular microcirculation: measurements of single glomerular loop flow in rats. In: *Kidney International* 20 (2), S. 230–239. DOI: 10.1038/ki.1981.125.
- Sterzel, R.; Schulze-Lohoff E.; Marx M. (1993): Cytokines and mesangial cells. In: *Kidney International* (39), S. 26–31.
- Suter, P.; Kohn, B.; Schwarz, G. (2012): *Praktikum der Hundeklinik*. 11., überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart: Enke.
- Takami, H.; Naramoto, A.; Nakazawa, K.; Shigematsu, H.; Ohno, S. (1990): Ultrastructure of glomerular mesangial matrix by quick-freeze and deep-etch methods. In: *Kidney International* 38 (6), S. 1211–1215. DOI: 10.1038/ki.1990.336.
- Tanner, G. (2009): Glomerular sieving coefficient of serum albumin in the rat: a two-photon microscopy study. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 296 (6), F1258-65. DOI: 10.1152/ajprenal.90638.2008.
- Tenten, V.; Menzel, S.; Kunter, U.; Sicking, E.-M.; van Roeyen, C. R. C.; Sanden, S. K. et al. (2013): Albumin is recycled from the primary urine by tubular transcytosis. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 24 (12), S. 1966–1980. DOI: 10.1681/ASN.2013010018.
- Thaiss, F.; Stahl, R. (2000): IgA-Nephropathie. Klinik, Pathogenese und Therapie der häufigsten Glomerulonephritis. In: *Deutsches Ärzteblatt* 97 (41).
- Tojo, A.; Endou, H. (1992): Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. In: *The American journal of physiology* 263 (4 Pt 2), F601-6. DOI: 10.1152/ajprenal.1992.263.4.F601.
- Tojo, A.; Kinugasa, S. (2012): Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. In: *International journal of nephrology* 2012, S. 481520. DOI: 10.1155/2012/481520.
- Tuffin, G.; Waelti, E.; Huwyler, J.; Hammer, C.; Marti, H. (2005): Immunoliposome targeting to mesangial cells: a promising strategy for specific drug delivery to the kidney. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 16 (11), S. 3295–3305. DOI: 10.1681/ASN.2005050485.

- van Gorkom, J.; van Delft, D.; van Helvoort, T. (2018): The Early Electron Microscopes: Incubation. In: *Advances in Imaging and Electron Physics* 208, S. 43–128. DOI: 10.1016/bs.aiep.2018.08.002.
- Vink, H.; Duling, B. (1996): Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. In: *Circulation research* 79 (3), S. 581–589. DOI: 10.1161/01.res.79.3.581.
- Wada, T.; Shimizu, M.; Yokoyama, H.; Iwata, Y.; Sakai, Y.; Kaneko, S.; Furuichi, K. (2013): Nodular lesions and mesangiolysis in diabetic nephropathy. In: *Clinical and experimental nephrology* 17 (1), S. 3–9. DOI: 10.1007/s10157-012-0711-6.
- Wagner, M. C.; Campos-Bilderback, S. B.; Chowdhury, M.; Flores, B.; Lai, X.; Myslinski, J. et al. (2016): Proximal Tubules Have the Capacity to Regulate Uptake of Albumin. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 27 (2), S. 482–494. DOI: 10.1681/ASN.2014111107.
- Watanabe, M.; Nakashima, H.; Miyake, K.; Sato, T.; Saito, T. (2011): Aggravation of diabetic nephropathy in OLETF rats by Thy-1.1 nephritis. In: *Clinical and experimental nephrology* 15 (1), S. 25–29. DOI: 10.1007/s10157-010-0349-1.
- Wenzel, U.; Dominiak, P.; Neumayer, H.; Wolf, G. (2003): Hemmung der Progression von chronischen Nierenerkrankungen. In: *Deutsches Ärzteblatt* 100 (31-32).
- Westerweel, P.; Joles, J.; den Ouden, K.; Goldschmeding, R.; Rookmaaker, M.; Verhaar, M. (2012): ACE Inhibition in Anti-Thy1 Glomerulonephritis Limits Proteinuria but Does Not Improve Renal Function and Structural Remodeling. In: *Nephron extra* 2 (1), S. 9–16. DOI: 10.1159/000335750.
- Wiesinger, A.; Peters, W.; Chappell, D.; Kentrup, D.; Reuter, S.; Pavenstädt, H. et al. (2013): Nanomechanics of the endothelial glycocalyx in experimental sepsis. In: *PloS one* 8 (11), e80905. DOI: 10.1371/journal.pone.0080905.
- Wilson, S. (1986): The effects of angiotensin II and norepinephrine on afferent arterioles in the rat. In: *Kidney International* 30 (6), S. 895–905. DOI: 10.1038/ki.1986.270.
- Wohlfarth, V.; Drumm, K.; Mildenerger, S.; Freudinger, R.; Gekle, M. (2003): Protein uptake disturbs collagen homeostasis in proximal tubule-derived cells. In: *Kidney international. Supplement* (84), S103-9. DOI: 10.1046/j.1523-1755.63.s84.13.x.
- Wolfensohn, S.; Lloyd, M. (2003): *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Yamamoto, T.; Mundy, C.; Wilson, C.; Blantz, R. (1991): Effect of mesangial cell lysis and proliferation on glomerular hemodynamics in the rat. In: *Kidney International* 40 (4), S. 705–713. DOI: 10.1038/ki.1991.264.

Yamamoto, T.; Wilson, C. (1987): Quantitative and qualitative studies of antibody-induced mesangial cell damage in the rat. In: *Kidney International* 32 (4), S. 514–525. DOI: 10.1038/ki.1987.240.

Yamamoto T.; Wilson C. (1987): Complement dependence of antibody-induced mesangial cell injury in the rat. In: *Journal of Immunology* 138 (11), S. 3758–3765.

Yao, J.; Morioka, T.; Li, B.; Oite, T. (2002): Coordination of mesangial cell contraction by gap junction--mediated intercellular Ca(2+) wave. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 13 (8), S. 2018–2026. DOI: 10.1097/01.ASN.0000023436.71816.56.

Yard, B.; Chorianopoulos, E.; Herr, D.; van der Woude, F. (2001): Regulation of endothelin-1 and transforming growth factor-beta1 production in cultured proximal tubular cells by albumin and heparan sulphate glycosaminoglycans. In: *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 16 (9), S. 1769–1775. DOI: 10.1093/ndt/16.9.1769.

Zimmerhackl, B.; Niranjana, P.; Kücherer, H.; Steinhausen, M. (1985): Influence of systemically applied angiotensin II on the microcirculation of glomerular capillaries in the rat. In: *Kidney International* (27), S. 17–24.

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Glomerulums:	2
Abbildung 2: Komplementbedingte Lyse der Mesangialzellen:	8
Abbildung 3: Visualisierung der glomerulären Strukturen:	29
Abbildung 4: Ermittlung des Detektorschwellenwertes für den GSC <sub>A</sub> :	30
Abbildung 5: Intravitale Bestimmung des GSC <sub>A</sub> :	32
Abbildung 6: Messung und Auswertung der snGFR:	34
Abbildung 7: Bestimmung der kapillaren Flussgeschwindigkeit sowie des kapillaren Flusses:	35
Abbildung 8: Vermessung der kapillaren Oberfläche sowie der gesamten Querschnittsfläche der Kapillaren im Glomerulum:	37
Abbildung 9: Vermessung der Podozytenfußfortsätze:	42
Abbildung 10: Vermessung der Breite der Fenestrae sowie der Basalmembran:	43
Abbildung 11: Auswirkungen einer AngII- beziehungsweise NA-Infusion sowie der mesangialen Lyse auf den GSC <sub>A</sub> :	48
Abbildung 12: Einfluss der Mesangialzellen auf die snGFR:	50
Abbildung 13: Einfluss der Mesangialzellen auf die glomeruläre Durchblutung:	52
Abbildung 14: Einfluss der Mesangialzellen auf den Umfang sowie die Gesamtfläche der Kapillaren:	53
Abbildung 15: AngII bedingte Bewegung des Glomerulums im <i>Bowman-Raum</i> :	55
Abbildung 16: Einfluss des Anti-Thy1.1 Antikörpers auf die Struktur im Glomerulum:	57
Abbildung 17: Auswirkungen der Anti-Thy1.1 bedingten mesangialen Lyse auf den Kapillardurchmesser:	58
Abbildung 18: Immunhistologischer Vergleich der Albuminausscheidung im Überblick:	59
Abbildung 19: Immunhistologischer Vergleich der Albuminausscheidung:	60
Abbildung 20: Immunhistologische Darstellung der endothelialen Glykokalyx:	61
Abbildung 21: Immunhistologischer Nachweis der Spezifität des Anti-Thy1.1 Antikörpers:	62
Abbildung 22: Immunhistologische Darstellung der glatten Gefäßmuskulatur in afferenter/efferenter Arteriole:	63
Abbildung 23: Immunhistologische Darstellung der Podozyten mit Hilfe eines Anti-Podocin Antikörpers:	64
Abbildung 24: Immunhistologische Darstellung der Podozyten mit Hilfe eines Anti-Synaptopodin Antikörpers:	65
Abbildung 25: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des Glomerulums bei einer unbehandelten MWF Ratte:	66
Abbildung 26: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Glomerulums nach der Lyse der Mesangialzellen:	67
Abbildung 27: Veränderung der Basalmembran nach Verlust der Mesangialzellen:	68
Abbildung 28: Auswirkungen der mesangialen Lyse auf die Konformation der Podozyten:	69
Abbildung 29: Auswertung der durch mesangiale Lyse bedingten Veränderung der Podozytenfußfortsätze:	70
Abbildung 30: Auswirkung der mesangialen Lyse auf die transzytoplasmatischen Aussparungen der Endothelzellen im Glomerulum:	71

Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Tubulussystems einer unbehandelten Ratte:	72
Abbildung 32: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Tubulussystems einer Anti-Thy1.1. behandelten Ratte:	73
Abbildung 33: Auswirkung der Anti-Thy1.1 bedingten Lyse auf die Osmolarität des Urins:	74
Abbildung 34: Proteindifferenzierung sowie Quantifizierung von Albumin anhand eines Coomassie-Blau gefärbten SDS-PAGE Gels:	75
Abbildung 35: Bestimmung der Auswirkung der mesangialen Lyse auf die Albuminkonzentration mittels SDS-PAGE:	76
Abbildung 36: Bestimmung der Auswirkung der Anti-Thy1.1 Applikation auf die Albuminausscheidung im Urin mit Hilfe eines Albumin-ELISA:	77

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich während meiner Promotionszeit in persönlicher und professioneller Hinsicht gefördert haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hayo Castrop für die Bereitstellung dieses spannenden Themas und die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung. Ich danke ihm herzlich für sein Vertrauen in meine selbständige Arbeit und seine konstruktive Kritik, die mich stets ermutigte meine Arbeit weiter auszubauen.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wanke für die Übernahme meiner Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanken. Mit seiner konstruktiven Kritik hat er mir sehr bei der Fertigstellung meiner Arbeit geholfen.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Ralph Witzgall und seiner technischen Assistentin Frau Helga Othmen für die umfassende Unterstützung am Elektronenmikroskop.

Bei Herrn Uwe de Fries möchte ich mich für seine technische Unterstützung im Umgang mit dem LSM 710 bedanken.

Herrn Bernhard Gess danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung der Gelelektrophorese.

Besonders möchte ich mich bei Frau Katharina Fremter für ihre Hilfe bei den immunhistologischen Färbungen, ihrer Einarbeitung in die labortechnischen Methoden sowie ihre Unterstützung im Tierstall bedanken. Außerdem danke ich Frau Katherina Fremter und meiner Kollegin Julia Helmchen für die freundschaftliche Zusammenarbeit und gemeinsame lustige Stunden im Büro.

Vielen herzlichen Dank auch an die anderen Mitarbeiter des Instituts für Physiologie, mit denen ich in den letzten zwei Jahren zusammenarbeiten durfte und die mir zu jederzeit hilfsbereit zur Seite standen.

Meiner lieben Familie möchte ich für die Unterstützung in allen Lebenslagen danken, ohne die mein Studium und die darauffolgende Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein größter Dank gilt meinem Freund Felix. Danke, dass du immer für mich da bist, mich beruhigst und aufmunterst, wenn es mal schwierig ist und dich gemeinsam mit mir über meine Erfolge freust.