

**Die Niere im Fokus von
Degeneration und Regeneration**

-

**Experimentelle Studie zu Prozessen an glomerulären
Endothelzellen und im renalen Interstitium**

von Julia Helmchen

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

**Die Niere im Fokus von
Degeneration und Regeneration**

-

**Experimentelle Studie zu Prozessen an glomerulären
Endothelzellen und im renalen Interstitium**

von Julia Helmchen

aus Augsburg

München 2023

**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie



Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Priv.-Doz. Dr. Elisabeth Kemter

Angefertigt am Institut für Physiologie der Universität Regensburg

Mentor: Univ.-Prof. Dr. Wolf Hayo Castrop

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

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

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Elisabeth G. Kemter

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Roswitha Dorsch

Tag der Promotion: 11. Februar 2023

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Die Niere – Anatomische und physiologische Grundlagen.....	2
2.2	Die glomeruläre Filtrationsbarriere	3
2.2.1	Aufbau und Funktion	3
2.2.2	Eigenschaften von glomerulären Endothelzellen.....	5
2.2.3	Endotheliale Glykokalyx.....	5
2.2.3.1	Struktur und funktionelle Bedeutung	5
2.2.3.2	Endothelial surface layer (ESL)	8
2.2.3.3	Wirkung von Hydrocortison auf die endotheliale Glykokalyx.....	9
2.3	Macula densa.....	10
2.3.1	Bestandteile und Funktion im juxtaglomerulären Apparat.....	10
2.3.2	Proteinsynthese und -sekretion	11
2.3.2.1	PAPP-A2.....	12
2.3.2.2	PAPP-A.....	13
2.3.2.3	CXCL14/BRAK	13
2.3.2.4	Semaphorin-3C.....	14
2.4	PDGFR- β -positive Zellen	15
2.5	Interstitielle Nierenfibrose.....	17
2.5.1	Ätiologie und Pathogenese.....	17
2.5.2	Krankheitsbild und Folgen für die Nierenfunktion	18
2.6	Multiphotonenmikroskopie.....	19
2.6.1	Eigenschaften der Fluoreszenz bei der Multiphotonenmikroskopie	20
2.6.2	Vorzüge der Multiphotonenmikroskopie	20
3	Fragestellung	22
4	Material	24
4.1	Geräte	24
4.2	Verbrauchsmaterial	25
4.3	Chemikalien, Pharmazeutika und Kits	26
4.4	Zellen und Biologika.....	27
4.5	Antikörper.....	28
4.5.1	Immunhistochemie.....	28
4.5.2	Immunzytochemie.....	28
4.5.3	Western Blots	28

4.6	Software.....	29
5	Methoden	30
5.1	Darstellung der glomerulären endothelialen Glykokalyx mit Hilfe der intravitalem Multiphotonenmikroskopie.....	30
5.1.1	Munich Wistar Froemter-Ratten	30
5.1.2	Haltungsbedingungen der Versuchstiere	30
5.1.3	Vorbereitung und Operation der Versuchstiere.....	30
5.1.4	Beschaffenheit und Vorbereitung von Wheat Germ Agglutinin - Fluorescein zur Visualisierung der glomerulären endothelialen Glykokalyx.....	32
5.1.5	Intravitale Multiphotonenmikroskopie	32
5.1.6	Einstellungen der Multiphotonenmikroskopie.....	33
5.1.7	Fokussierter Laserschaden im Nierengewebe.....	33
5.1.8	Vorbereitung und Applikation einer Infusion mit PAPP-A2, PAPP-A, CXCL14, Semaphorin-3C und Hydrocortison	33
5.1.9	Vorbereitung und Applikation einer Infusion mit 0,9%-iger Natriumchloridlösung .	34
5.2	<i>In vitro</i> -Versuche mit humanen renalen glomerulären endothelialen Primärzellen (HRGEC).....	35
5.2.1	Vorbereitung des Zellmediums	35
5.2.2	Kultivierung und Handling von HRGEC	35
5.2.3	Aufbau der Kurzzeitversuche.....	36
5.2.3.1	Visualisierung der endothelialen Glykokalyx mittels WGA	36
5.2.3.2	Einstellungen für die konfokale Mikroskopie.....	37
5.2.3.3	Vermessung der Dichte und Fläche der endothelialen Glykokalyx.....	38
5.3	<i>In-vitro</i> -Versuche mit PDGFR- β -positiven Zellen	38
5.3.1	Migrationsassay.....	38
5.3.1.1	PDGFR- β +/ <i>Cre</i> Mauslinie.....	38
5.3.1.2	Aufarbeitung von murinen Nieren für Fluorescence activated cell sorting von PDGFR- β -positiven Zellen	39
5.3.1.3	Kultivierung und Handling von PDGFR- β -positiven Zellen	39
5.3.1.4	Ablauf eines Migrationsassay.....	40
5.3.1.5	Vorbereitung und Verdünnung der Wirkstoffe.....	41
5.3.1.6	Auswertung der Migrationsversuche.....	42
5.3.2	Induktion fibrotischer Aktivität	42
5.3.2.1	Nachweis von extrazellulärer Matrix in interstitiellen Zellen	42
5.3.2.2	Verdünnung der profibrotischen Stimuli (IL-1 β , IL-17A, TNF- α , TGF- β 1, PDGF-BB)	42
5.3.2.3	Versuchsaufbau mit anschließender Proteinlysatherstellung	43
5.3.2.4	Quantifizierung der Proteinmenge mittels BCA Protein Assay	43

5.3.2.5	Proteinquantifizierung von Zelllysat mittels Western Blot	44
5.4	Histologische Methoden	49
5.4.1	Retrograde arterielle Perfusionsfixierung	50
5.4.2	Paraffineinbettung der Niere und Erstellung von Schnittpräparaten	50
5.4.3	Immunfluoreszenzfärbung	50
5.4.3.1	Immunhistochemie	51
5.4.3.2	Immunzytochemie	51
5.4.4	Konfokale Mikroskopie	52
5.5	Statistische Auswertung	52
6	Ergebnisse	53
6.1	<i>In vivo</i> - Modulation der endothelialen Glykokalyx durch parakrine Faktoren der Macula densa-Zellen	53
6.1.1	Einfluss von PAPP-A2 auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx	54
6.1.2	Einfluss von PAPP-A auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx	54
6.1.3	Einfluss von CXCL14/BRAK auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx	55
6.1.4	Einfluss von Semaphorin-3C auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx	56
6.1.5	Einfluss von NaCl auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx	57
6.1.6	Einfluss von Hydrocortison auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx nach einem Laserschaden im Epithel des proximalen Tubulus	58
6.1.7	Veränderungen am Bürstensaum des proximalen Tubulus	58
6.2	<i>In vitro</i> - Modulation der endothelialen Glykokalyx von HRGEC durch parakrine Faktoren der Macula densa-Zellen	60
6.3	Immunhistochemische Untersuchungen an der Macula densa und am Glomerulum	61
6.3.1	Nachweis von Proteinen in Macula densa-Zellen	61
6.3.2	PAPP-A als Bestandteil von Podozyten	64
6.4	Immunzytochemische Untersuchungen der physiologischen Glykokalyxstruktur glomerulärer Endothelzellen und deren Modulation durch parakrine Faktoren aus Macula densa-Zellen	65
6.4.1	Nachweis von Bestandteilen der endothelialen Glykokalyx	65
6.4.2	<i>In vitro</i> -Modulation der endothelialen Glykokalyx durch parakrine Faktoren aus Macula densa-Zellen	66
6.5	Untersuchung der Eigenschaften von PDGFR- β -positiven Zellen	68
6.5.1	Migrationskapazität nach Induktion durch chemotaktische Faktoren	68
6.5.1.1	Einfluss von PDGF-DD auf die Migrationskapazität von PDGFR- β -positiven Zellen	68
6.5.1.2	Einfluss von Urin auf die Migrationskapazität von PDGFR- β -positiven Zellen	69
6.5.1.3	Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Migrationskapazität von PDGFR- β -positiven Zellen	70

6.5.1.4	Einfluss von Albumin auf die Migrationskapazität von PDGFR- β -positiven Zellen	71
6.5.1.5	Einfluss von THP und Prostaglandin I ₂ auf die Migrationskapazität von PDGFR- β -positiven Zellen.....	72
6.5.1.6	Einfluss von Hyaluronsäure auf die Migrationskapazität von PDGFR- β -positiven Zellen	73
6.5.2	Nachweis von fibrotischen Proteinen in PDGFR- β -positiven Zellen.....	74
6.5.3	Induktion profibrotischer Aktivität von PDGFR- β -positiven Zellen	76
6.5.3.1	Wirkung von IL-1 β , IL-17A und TNF- α auf die Synthese extrazellulärer Matrix durch PDGFR- β -positive Zellen.....	76
6.5.3.2	Wirkung von TGF- β 1 auf die Synthese extrazellulärer Matrix durch PDGFR- β -positive Zellen.....	78
7	Diskussion	83
7.1	Bedeutung parakriner Faktoren der Macula densa-Zellen für die Integrität der glomerulären endothelialen Glykokalyx.....	83
7.1.1	Erhalt der Integrität der endothelialen Glykokalyx mittels Hydrocortison nach einem Laserschaden im proximalen Tubulusepithel	84
7.1.2	Intraoperative Veränderungen am Bürstensaum des proximalen Tubulus	85
7.1.3	Modulation von Bausteinen der glomerulären endothelialen Glykokalyx mittels parakriner Faktoren aus den Macula densa-Zellen	86
7.2	PDGFR- β -positive Zellen als Regulator im renalen Interstitium	87
7.2.1	Migrationskapazität von interstitiellen PDGFR- β -positiven Zellen	87
7.2.2	<i>In vitro</i> -Modulation des profibrotischen Potenzials von PDGFR- β -positiven Zellen durch Zytokine	90
8	Zusammenfassung	93
9	Summary	95
10	Literaturverzeichnis	97
11	Anhang	107
11.1	Abbildungsverzeichnis	107
11.2	Abkürzungsverzeichnis	109

1 Einleitung

Die Niere ist nur zu einem geringen Grad zur Regeneration fähig. Wie jedes andere Körpergewebe ist sie unter bestimmten Bedingungen degenerativen Prozessen unterworfen. Eine *restitutio ad integrum* nach Zell- oder Gewebeschädigungen ist in einem gewissen Maß möglich und zugrunde gegangene Zellen werden ersetzt. Allerdings ist die Regenerationskapazität der Niere vergleichsweise limitiert.

In der vorliegenden Arbeit sollen zwei wesentliche Strukturen der Niere in den Fokus von Degeneration und Regeneration gesetzt werden. Zunächst wird das Glomerulum und hier im Speziellen seine endotheliale Glykokalyx als wichtiger Modulator der glomerulären Filtration thematisiert. Da in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Castrop eine laserinduzierte Schädigung des proximalen Tubulus in einer Dichteabnahme der glomerulären endothelialen Glykokalyx und daraufhin in einer erhöhten Filtration von Proteinen resultierte, wurden anhand von *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten Faktoren aus *Macula densa* (MD)-Zellen hinsichtlich eines potenziellen modulierenden Einflusses auf die Integrität der endothelialen Glykokalyx untersucht. Dafür wurde die Hypothese geprüft, dass parakrine Faktoren aus MD-Zellen im Rahmen eines tubuloglomerulären Feedbacks eine Modulation der endothelialen Glykokalyx induzieren können und damit die glomeruläre Filtrationsbarriere so schädigen, dass eine erhöhte Filtration von Proteinen die Folge ist. Der Schwerpunkt lag dabei auf parakrinen Faktoren, die von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Peti-Peterdi (Kalifornien) aus MD-Zellen isoliert wurden (PAPP-A2, CXCL14, Semaphorin3C).

In einem zweiten Teilprojekt wurde die Rekrutierung von interstitiellen Zellen im Rahmen von Regenerationsprozessen betrachtet. Dazu wurde das renale Interstitium, insbesondere interstitielle PDGFR- β -positive Zellen, und ihr Anteil an immunologischen Vorgängen sowie an der Pathogenese der interstitiellen Nierenfibrose näher beleuchtet. Des Weiteren wurde die Migrationskapazität interstitieller Zellen nach Exposition mit regenerativen Faktoren untersucht. Es wurden folgende Hypothesen geprüft:

PDGFR- β -positive Zellen entwickeln durch inflammatorische Zytokine eine profibrotische Wirkung und tragen damit zur Pathogenese der interstitiellen Nierenfibrose bei. Zudem können sie durch chemotaktische Faktoren zu einer Gewebeschädigung migrieren und dort eine Regeneration begünstigen oder sogar initiieren.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Niere – Anatomische und physiologische Grundlagen

Im Organismus von Säugetieren übernimmt die Niere vielfältige Funktionen. Ausgehend von der Filtrierung des Blutes ist sie vor allem für die Harnbildung verantwortlich und scheidet darüber organische Stoffwechselendprodukte und exogene Schadstoffe aus. Daneben steuert sie den Säure-Basen-Haushalt, ist an der Hormonsynthese (z.B. Renin, Erythropoetin, Calcitriol) beteiligt und trägt zum Mineralstoffhaushalt bei. Weitere Aufgaben sind die Regulation des Volumens und der Osmolarität des Extrazellarraums (Salz-Wasser-Haushalt) sowie die Beteiligung am Stoffwechsel mit der Glukoneogenese und dem Abbau von Proteinen (König und Liebich 2012; Salomon et al. 2008).

Das Nierenparenchym wird morphologisch in Rinde und Mark unterteilt. Die Rinde wiederum setzt sich aus einer äußeren *Pars convoluta* und einer inneren *Pars radiata* zusammen. Eine Unterteilung in *Zona externa* und *interna* ist auch im Nierenmark zu finden (König und Liebich 2012).

Die Funktionseinheit der Niere ist das Nephron. Es besteht aus einem Nierenkörperchen (= Malpighi-Körperchen) und dem distal anschließenden Tubulussystem. Gebildet wird das Nierenkörperchen aus der zweiblättrigen Bowman-Kapsel und einem Kapillarknäuel (= Glomerulum), das aus dem *Vas afferens* entspringt und in das *Vas efferens* mündet. Während das innere Blatt der Bowman-Kapsel als abgeflachte Deckzellen (= Podozyten) dem Kapillarknäuel anliegt, findet das äußere Blatt seine Fortsetzung im proximalen Tubulus. Somit ist das Glomerulum in die Bowman-Kapsel als blindsackähnliches Ende des proximalen Tubulus eingebettet und sichert eine Filtrierung in Richtung des Tubulussystems. Dieses besteht aus einem proximalen Teil, der Henle-Schleife und einem distalen Teil, an den sich das Sammelrohr anschließt, das den Harn über das Nierenbecken und den Harnleiter in Richtung Harnblase leitet. Nephron und Sammelrohre sorgen für die Harnbildung und -absonderung und haben als Gerüst ein Interstitium aus Bindegewebe, Gefäßen und Nerven (König und Liebich 2012).

Die Glomerula sind in der Nierenrinde lokalisiert, zu der auch der distale Tubulus in seinem Verlauf aus dem Nierenmark zurückkehrt und mit der Macula densa und dem juxtaglomerulären Apparat in Kontakt mit dem Kapillarknäuel tritt (Peti-Peterdi und Harris 2010). Sie sind Teil der glomerulären Filtrationsbarriere und bilden die erste selektive Instanz zur Bildung des Primärharns.

2.2 Die glomeruläre Filtrationsbarriere

2.2.1 Aufbau und Funktion

Eine weitere funktionelle Einheit der Niere ist neben dem Nephron die glomeruläre Filtrationsbarriere, die sich aus den fenestrierten Endothelzellen mit einer Glykokalyx, der Basalmembran und den Podozyten zusammensetzt (Menon et al. 2012). Die endotheliale Glykokalyx bildet die erste Barriere des glomerulären Filters und besteht zum Großteil aus Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen. Man geht davon aus, dass die Glykokalyx aus zwei wesentlichen Komponenten besteht: Einer stationären Schicht, die an den Endothelzellen direkt benachbart angeheftet ist, und einer dynamischen Schicht, die aus angelagerten Plasmaproteinen und Glykosaminoglykanen aufgebaut ist und in einem ständigen Gleichgewicht mit den Bestandteilen aus dem Blutplasma steht (Pries et al. 2000).

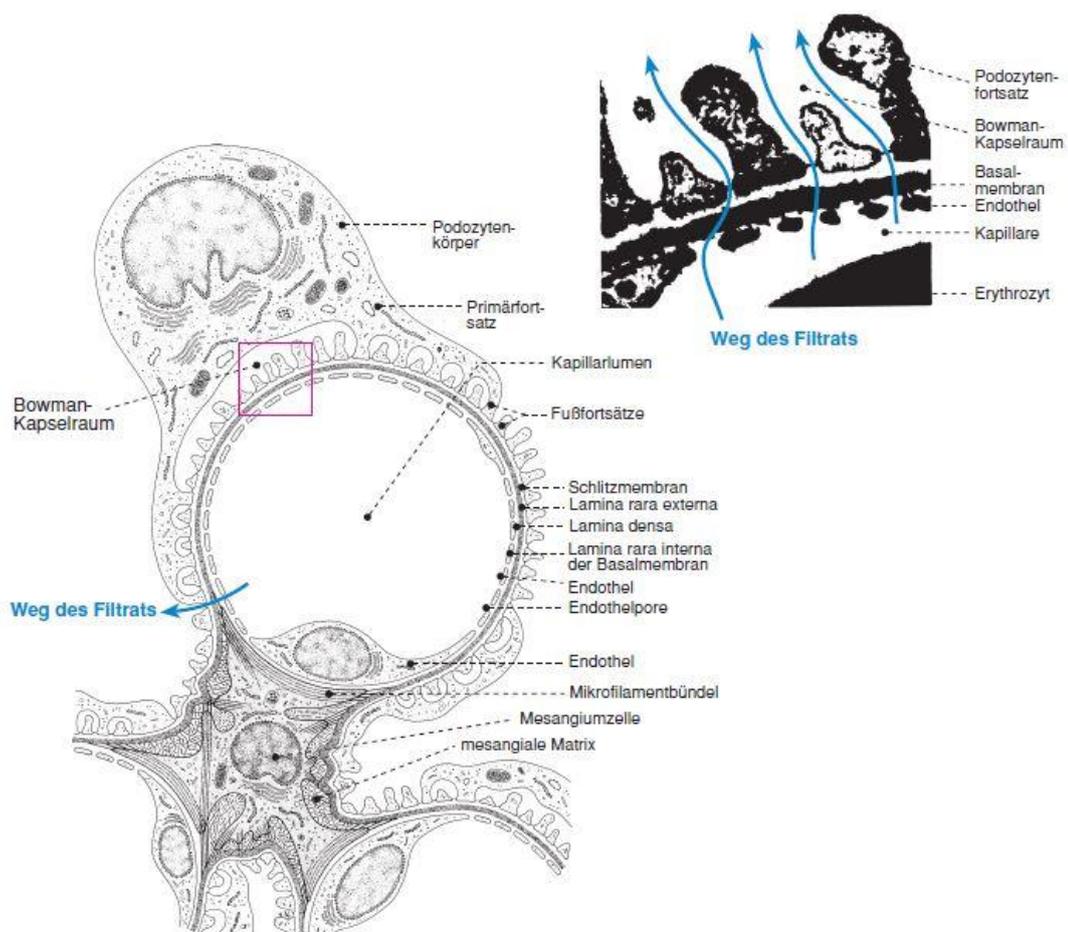


Abbildung 1: Querschnitt einer Glomeruluskapillare (Deetjen et al. 2004): Gezeigt werden die Komponenten der glomerulären Filtrationsbarriere, ihre benachbarten Strukturen und welchen Weg das Filtrat nimmt. Vom Lumen aus beginnend wird das Blut durch das fenestrierte Endothel, über die Basalmembran hinweg und durch die Schlitzmembran zwischen den Podozytenfortsätzen hindurch in den Bowman-Kapselraum filtriert. Die endotheliale Glykokalyx ist hier nicht dargestellt.

Die glomeruläre Basalmembran befindet sich zwischen den Endothelzellen und den Podozyten und wird von beiden Zelltypen synthetisiert (Singh et al. 2007). Sie ist strukturell vor allem aus Kollagen IV, Heparansulfat-Proteoglykanen und Laminin aufgebaut (Abrahamson 1987). Speziell das β 2-Laminin scheint entscheidend für die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere und für die Ultrastruktur der Podozyten zu sein (Menon et al. 2012). In ihrer Gesamtheit bildet sie die Grenze zwischen Blutgefäßsystem und Harnraum und ist somit wesentlicher Bestandteil der Blut-Harn-Schranke (Miner 2012).

Die Podozyten als drittes Element der glomerulären Filtrationsbarriere bilden den Übergang zum Harnraum und verfügen über eine charakteristische Struktur mit ihren Fußfortsätzen, die ineinandergreifen und sich damit zu Schlitzporen formieren, welche jeweils von einer porendurchzogenen Membran überspannt werden. Die Oberfläche der Podozyten ist von einer anionischen Glykokalyx bedeckt, die hauptsächlich aus Podocalyxin besteht. Diese trägt unter anderem zur stark negativen Ladung der glomerulären Filtrationsbarriere bei (Pavenstädt et al. 2003).

Die glomeruläre Filtrationsbarriere bildet als „Blut-Harn-Schranke“ eine hoch spezialisierte Einheit. Sie filtriert einerseits Wasser, kleine und mittelgroße gelöste Stoffe aus dem Blutplasma und ist andererseits für Makromoleküle unter physiologischen Bedingungen weitgehend impermeabel. Diese Größenselektivität, die bei Integritätseinbußen der Filtrationsbarriere aufgehoben ist und in einer Proteinurie beziehungsweise Albuminurie resultiert, wird durch die Schlitzporen der Podozyten bewerkstelligt (Menon et al. 2012). Dabei kann der Funktionsverlust an unterschiedlicher Stelle der Blut-Harn-Schranke eine erhöhte Filtration von Proteinen verursachen. So mündet eine enzymatische Degradierung der glomerulären endothelialen Glykokalyx ebenso in einer verstärkten Albuminurie (Singh et al. 2007).

Neben einer Filtration nach Größe werden Plasmabestandteile auch nach der Ladung selektiert. Welche Komponenten der Filtrationsbarriere dabei entscheidend sind, ist noch nicht abschließend geklärt (Jarad und Miner 2009). Diskutiert wird eine Beteiligung der Glykosaminoglykane der glomerulären endothelialen Glykokalyx, welche auch für eine Größenselektivität verantwortlich zu sein scheinen (Jeansson und Haraldsson 2006). Die Abwesenheit des Heparansulfat-Proteoglykans Agrin dagegen, das ein wesentliches Element der glomerulären Basalmembran darstellt und ihre negative Ladung maßgeblich bedingt, hatte bei Knockout-Mutation keinen Einfluss auf die Permeabilität der Filtrationsbarriere und verursachte nach erhöhter Albumin-Gabe keine Proteinurie bei den Knockout-Tieren (Harvey et al. 2007).

Letztendlich gelangt das Ultrafiltrat nach der glomerulären Filtrationsbarriere in den Spaltraum zwischen den beiden Blättern der Bowman-Kapsel und wird am Harnpol ins tubuläre System abgegeben (Salomon et al. 2008).

Da ihr Einfluss auf das Filtrationsgeschehen schon länger bekannt ist, werden im folgenden Abschnitt die glomerulären Endothelzellen mit ihrer Glykokalyx im Aufbau und ihrer Funktion näher beleuchtet.

2.2.2 Eigenschaften von glomerulären Endothelzellen

Glomeruläre Endothelzellen werden lumenwärts von einer Glykokalyx aus Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen, Glykolipiden, Sialomucinen, anderen Glykoproteinen und sezernierten sowie zirkulierenden Proteinen bedeckt (Ballermann et al. 2021). Diese überzieht nicht nur die Zelloberfläche der äußerst flachen Endothelzellen, sondern reicht auch in die *Fenestrae* zwischen den Zellen hinein. Die transzellulären Poren machen circa 30 % der Oberfläche von glomerulären Endothelzellen aus. Sie haben eine Ausdehnung von 60 bis 80 nm und können somit für großmolekulare Proteine wie Albumin oder Immunglobuline keine Barriere darstellen (Rostgaard und Qvortrup 2002; Obeidat et al. 2012; Ballermann et al. 2021). Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass die endotheliale Glykokalyx eine maßgebliche Rolle im Filtrationsgeschehen des Blutplasmas und damit in der Barrierefunktion der Blut-Harn-Schranke spielt. Aus diesem Grund ist es auch ersichtlich, dass eine auftretende Mikroalbuminurie als ein Marker für eine gestörte Funktion der endothelialen Glykokalyx gilt (Obeidat et al. 2012).

Da die endotheliale Glykokalyx aufgrund ihrer Lokalisation die erste Barriere für die Ultrafiltration des Blutes darstellt und ihr damit eine Rolle bei der Harnbildung zukommt, soll sie im folgenden Abschnitt gesondert betrachtet werden. Das Verständnis für ihre einzelnen Komponenten wird als Grundlage für die wissenschaftliche Diskussion dieser Arbeit gesetzt.

2.2.3 Endotheliale Glykokalyx

2.2.3.1 Struktur und funktionelle Bedeutung

Die glomeruläre endotheliale Glykokalyx besteht aus einer zellgebundenen Fraktion (hier als „endotheliale Glykokalyx“ bezeichnet), die in den Endothelzellen verankert ist und in die subendotheliale Basalmembran hineinragt, und einem dynamischen Anteil, dem *Endothelial surface layer (ESL)*, der sich aus angehefteten Plasmaproteinen und Glykosaminoglykanen zusammensetzt und in einem stetigen Gleichgewicht mit Glykokalyxbestandteilen aus dem Blutplasma

steht (Ballermann et al. 2021; Pries et al. 2000). Es wurde schon früh erkannt, dass sie in ihrer Gesamtheit eine negativ geladene Matrix bildet, die unter experimentellen Bedingungen anionische Teilchen abstößt und affin für kationische Moleküle ist. Sie lagert sich als breite Schicht entlang der Endothelzellen und bis in die Fenestrae hinein an, dringt allerdings nicht bis zur glomerulären Basalmembran vor (Avasthi und Koshy 1988). Rostgaard und Qvortrup identifizierten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sogenannte „*sieve plugs*“, die sich in den Spalträumen der *Fenestrae* zu einem dichten filamentösen Netzwerk formieren und ihre Fortsetzung in der endothelialen Glykokalyx in Richtung Lumen finden (Rostgaard und Qvortrup 2002).

Die endotheliale Glykokalyx ist strukturell aus membrangebundenen Proteoglykanen und Sialomucinen aufgebaut, an die Hyaluronsäuremoleküle angeheftet sind, die über eine membranassoziierte Hyaluronsäuresynthase gebildet werden. Dieser Aufbau verleiht dem Ganzen den Charakter eines hydratisierten, gitternetzartigen Gels (Ballermann et al. 2021). In Verbindung mit der endothelialen Glykokalyx steht der ESL, der sich aus Glykoproteinen, kleinen Proteoglykanen und anderen Makromolekülen zusammensetzt, welche aus der Blutzirkulation stammen oder von Endothelzellen sezerniert wurden. Er sitzt der endothelialen Glykokalyx lumenwärts auf und ist in seinem Aufbau einer stetigen Dynamik unterworfen (Pries et al. 2000).

Ein entscheidendes Element für die Struktur und Funktion der endothelialen Glykokalyx sind die Glykosaminoglykane (GAG). Es handelt sich dabei um lange, unverzweigte Polymere aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten, die jeweils aus einem Aminozucker (N-Acetylglucosamin oder N-Acetylgalactosamin) und entweder einer Galactose oder einem Uronsäurezucker bestehen. Sie sind negativ geladen und wirken stark hygroskopisch, was ihre Viskoelastizität bedingt. Sie stoßen anionische Moleküle wie Albumin ab und fungieren oft als Korezeptoren für Wachstumsfaktoren und Zytokine. Als Bestandteil von Proteoglykanen ist immer ein Core-Protein mit einem Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat oder Heparansulfat GAG verknüpft, während letztere am häufigsten vertreten sind (Ballermann et al. 2021). Ebenso zahlreich kommt die Hyaluronsäure vor, die eine Sonderstellung bei der Synthese von GAG einnimmt, da sie nicht im Golgi-Apparat, sondern über die Hyaluronsäure-Synthase in der Zellmembran der Endothelzellen synthetisiert wird. Sie ist stark wasserbindend und interagiert mit anderen Komponenten der endothelialen Glykokalyx und dem ESL (Simpson et al. 2015; Queisser et al. 2021).

Als ebenso wichtige Struktur der endothelialen Glykokalyx gelten die Proteoglykane (PG), die sich durch äußerst lange, unverzweigte und sulfatierte GAG Seitenketten auszeichnen, die mindestens 60 % der molekularen Masse der PG ausmachen. Sie unterscheiden sich strukturell in ihren Core-Proteinen, die entweder mit der endothelialen Plasmamembran verknüpft oder von

derselben sezerniert werden, und in der Anzahl und dem Typ von GAG Seitenketten. Als wichtigste unter ihnen sind Syndecan 1-4, Glypican 1-6, Versican und Perlecan zu nennen (Ballermann et al. 2021). Ein Shedding von Syndecan gilt generell als anerkannter Biomarker für einen Integritätsverlust der endothelialen Glykokalyx. Jenes geht mit einer verringerten Glykokalyxdicke und verminderten Barrierefunktion mit Ödembildung und Albuminurie einher (Lepedda et al. 2021; Adembri et al. 2011). Die Abwesenheit von Syndecan-1 allein scheint die Funktion der Filtrationsbarriere nicht zu beeinflussen (Savery et al. 2013). Anhand von Experimenten an Zebrafischen kommen Experten auch bei einem Knock-down von Syndecan 3 und 4 zu demselben Schluss (Müller-Deile et al. 2016). Glypican ist über einen GPI Anker mit der Plasmamembran verknüpft und steht in Abhängigkeit mit der endothelialen NO Synthese (Mahmoud et al. 2021). Sowohl Versican als auch Aggrecan besitzen eine hohe Affinität zur Hyaluronsäure. In Zebrafischen ist Versican in glomerulären Endothelzellen und in Podozyten nachweisbar und scheint zur Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere beizutragen, da es nach einem Knock-down zu erhöhtem Verlust von Plasmaproteinen in der Niere kommt (Müller-Deile et al. 2016). Perlecan besitzt unter den PG ein vergleichsweise großes Core-Protein und trägt das Heparansulfat als GAG Seitenkette (Vischer et al. 1997). Forschungen deuten darauf hin, dass letztere für eine intakte glomeruläre Filtrationsbarriere nicht notwendig ist (Goldberg et al. 2009). Außerdem sind als Komponenten der endothelialen Glykokalyx die *SLRP (Small Leucine-Rich Proteoglycan)*-Familie mit dem Decorin, Biglycan und Lumican sowie das *ESM-1 (Endothelial Specific Molecule-1)* und das Serglycin zu nennen (Ballermann et al. 2021). Lumican ist zum *ESL* zu rechnen. Ebenso sind Albumin und Orosomuroid Bestandteile des *ESL* (Fridén et al. 2011). Welche Rolle dem Decorin, Biglycan und Lumican als Komponenten der glomerulären Filtrationsbarriere zukommt, ist noch nicht abschließend geklärt (Ballermann et al. 2021).

Endotheliale Sialomucine gehören zu den integralen Glykoproteinen der Plasmamembran von Endothelzellen und zeichnen sich durch ihre endständigen Sialinsäuren aus, die einen Beitrag zur negativen Ladung der endothelialen Glykokalyx leisten. Neuraminidase kann ein Entfernen von endothelialen Sialinsäuren herbeiführen und damit die Struktur der Glykokalyx so stark beeinflussen, dass die Gefäßpermeabilität für Wasser und Albumin beeinträchtigt ist (Ballermann et al. 2021; Betteridge et al. 2017; Avasthi und Koshy 1988). Ebenso ist anzunehmen, dass das podozytenspezifische Sialomucin Podocalyxin durch die Neuraminidase in Mitleidenschaft gezogen wird und damit Struktur und Filtrationsleistung der glomerulären Filtrationsbarriere nachteilig beeinflusst (Ballermann et al. 2021).

2.2.3.2 *Endothelial surface layer (ESL)*

Aufgrund seiner Dynamik im Austausch mit Glykokalyxbestandteilen aus der Blutzirkulation wird der ESL hier gesondert betrachtet. Während sein genauer Aufbau bislang nicht im Detail erforscht wurde, ist bekannt, dass Albumin, Orosomuroid, Lipoproteine, Lipasen, Komponenten des Komplementsystems sowie kleine Proteoglykane, die von Endothelzellen synthetisiert und sezerniert werden, zu seinen Bestandteilen gerechnet werden (Ballermann et al. 2021). Seine Ausdehnung in glomerulären Kapillaren wird in Summe mit der endothelialen Glykokalyx auf 250 nm geschätzt (Jeansson und Haraldsson 2006). Die Bausteine des ESL stammen zum einen durch Sekretion aus den Endothelzellen, zum anderen werden sie aus der Blutzirkulation herangetragen. Zudem stehen sie in einem dynamischen Gleichgewicht mit dem Blutplasma und liegen verdichtet in der Zone über der endothelialen Glykokalyx vor. Neben dem Lumican sind insbesondere Albumin und Orosomuroid als Elemente des ESL hervorzuheben. Albumin wird in der Leber produziert und ist das am häufigsten vorkommende, zirkulierende Protein im Organismus (Ballermann et al. 2021). Es ist negativ geladen und kann verschiedene Konformationen annehmen, da es neben einer herzförmigen Struktur auch eine zigarrenähnliche Gestalt haben kann (Leggio et al. 2008). Aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften bindet es im Organismus unter anderem Fettsäuren, Hormone und Vitamine und ist als Carrier von Medikamenten etabliert. In diesem Zusammenhang darf nicht außer Acht gelassen werden, dass Albumin ebenso Carrier von Mediatoren sein kann, die die Synthese und Integrität der endothelialen Glykokalyx modulieren können (Ballermann et al. 2021). Bei intakter glomerulärer Filtrationsbarriere ist eine Passage von Albumin zunächst nicht möglich. Seine Verteilung und Lokalisation im Bereich des glomerulären Filters ist dabei stark vom vorherrschenden Blutfluss in der Niere abhängig. Beim Abbinden der Nierenarterie und -vene dagegen kann das Albumin passieren und ist im Harnraum nachweisbar (Ryan und Karnovsky 1976). Trotz seiner geringen Affinität zur endothelialen Glykokalyx beziehungsweise zum ESL ist Albumin Bestandteil des ESL und trägt zu dessen Barrierefunktion bei. Dies lässt auch vermuten, dass gebundenes Albumin in ständigem Austausch mit der im Blut zirkulierenden Fraktion steht (Ballermann et al. 2021).

Orosomuroid ist ein sialyliertes und zirkulierendes Glykoprotein, das sowohl in der Leber als auch in den Endothelzellen synthetisiert wird (Ruiz 2021; Sörensson et al. 1999; Ballermann et al. 2021). Es kann die Clearance für Albumin reduzieren (Haraldsson et al. 1992) und trägt mit seiner Ladung zur negativen Wertigkeit der endothelialen Glykokalyx in Kombination mit dem *ESL* bei (Ballermann et al. 2021).

2.2.3.3 Wirkung von Hydrocortison auf die endotheliale Glykokalyx

Glukokortikoide finden einen weit verbreiteten Einsatz in der Medizin. Sie schützen vor einem Ischämie-/Reperfusionsschaden und können die Permeabilität von Makromolekülen sowie interstielle Ödeme reduzieren. Da die endotheliale Glykokalyx die Endothelzellen lumenwärts bedeckt und ihre Integrität direkt mit der Gefäßpermeabilität korreliert, haben sich die Arbeitsgruppe um Chappell et al. (2007) schon vor einigen Jahren mit der Frage beschäftigt, welchen Einfluss Hydrocortison auf die endotheliale Glykokalyx hat. Und so konnte an isolierten Meerschweinchenherzen gezeigt werden, dass das Hydrocortison einen deutlich protektiven Effekt auf die endotheliale Glykokalyx hat. Ohne Intervention sorgte eine Ischämie im betroffenen Bereich für eine Degradierung der endothelialen Glykokalyx und verstärkte den koronaren Perfusionsdruck, weswegen auch die Gefäßpermeabilität erhöht war. Die Schwere der Degradierung kam dabei einer enzymatischen Degradierung der endothelialen Glykokalyx gleich. All diese pathologischen Effekte konnten vorab durch die Applikation eines hoch dosierten Bolus an Hydrocortison (10 µg/ml) reduziert werden (Chappell et al. 2007). Auf der anderen Seite scheint Hydrocortison (dem körpereigenen Cortisol am ähnlichsten) bei dauerhafter Gabe beziehungsweise dauerhaft erhöhten Plasmaspiegeln (z.B. beim Hyperadrenokortizismus) eine Erhöhung des Blutdrucks und der Filtration von Proteinen durch die Nieren zu bewirken. Wurde die Gabe von Hydrocortison gestoppt, normalisierten sich die Parameter nach einem Monat wieder auf physiologische Werte (Schellenberg et al. 2008).

Die glomerulären Endothelzellen sind in direkter Nachbarschaft des juxtaglomerulären Apparats lokalisiert. Zum juxtaglomerulären Apparat gehört u.a. die *Macula densa*. Sie ist ein Zellverband der *Pars recta* des distalen Tubulus, der sowohl die Reninsekretion kontrolliert als auch die *single nephron glomerular filtration rate* (snGFR) über den präglomerulären Widerstand reguliert.

2.3 Macula densa

2.3.1 Bestandteile und Funktion im juxtaglomerulären Apparat

Die *Macula densa* (MD) ist ein Verband aus 20-25 hoch spezialisierten Epithelzellen, die in jedem Nephron als Teil der *Pars recta* des distalen Tubulus mit dem zugehörigen Glomerulum in Kontakt treten. Sie gelten bislang als die wichtigsten regulatorischen Zellen des Nephrons (Gyarmati et al. 2021a) und gehören zusammen mit den extraglomerulären Mesangiumzellen (Goormaghtigh-Zellen) und den juxtaglomerulären (Renin produzierenden) Zellen zum juxtaglomerulären Apparat (Deetjen et al. 2005).

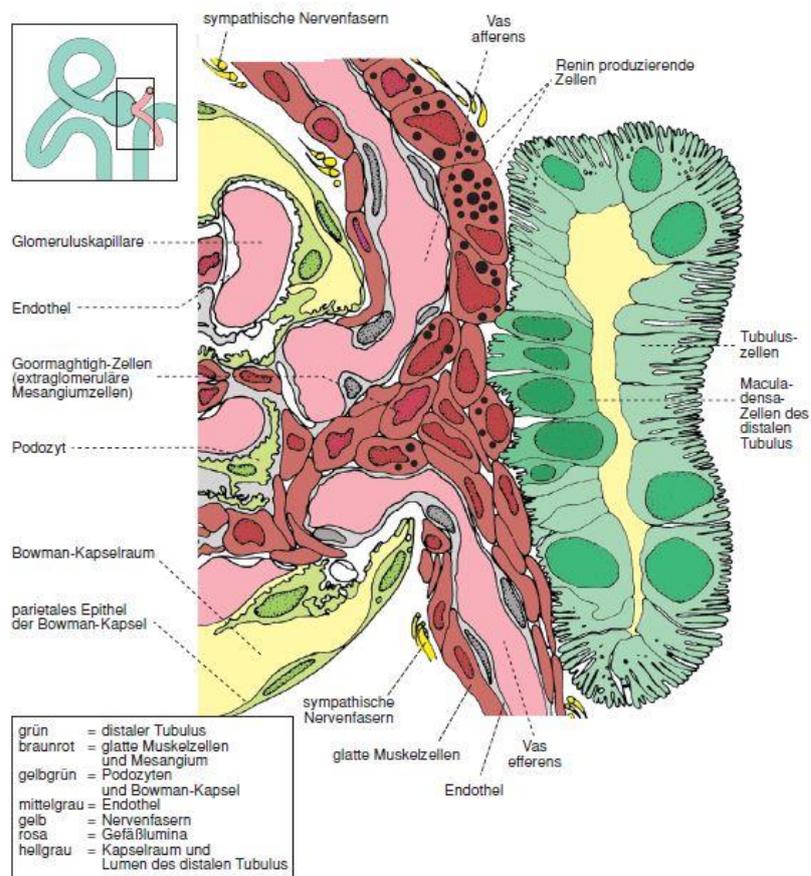


Abbildung 2: Juxtaglomerulärer Apparat (Deetjen et al. 2004): Der juxtaglomeruläre Apparat setzt sich aus der *Macula densa*, den juxtaglomerulären (Renin produzierenden) Zellen und den extraglomerulären Mesangiumzellen (= Goormaghtigh-Zellen) zusammen. Die *Macula densa*-Zellen gehören zum distalen Tubulus und treten mittig zwischen *Vas afferens* und *Vas efferens* über die übrigen Komponenten des juxtaglomerulären Apparats in Kontakt mit dem zugehörigen Glomerulum.

Aufgrund ihrer anatomisch schwierigen Zugänglichkeit war über die Morphologie und Dynamik der MD-Zellen lange wenig bekannt. Mithilfe eines Mausmodells und komplexer Bildtechnik ist es einer Arbeitsgruppe um Gyarmati et al. (2021) gelungen, mikroanatomische Aspekte der MD-Zellen näher zu beleuchten. Als herausragendes Merkmal gilt ein Netzwerk aus Zellfortsätzen (*Maculopodia*),

die sich in unterschiedlicher Länge bis zum extraglomerulären Mesangium und bis zur afferenten beziehungsweise efferenten Arteriole des Glomerulums erstrecken und somit Kontakt zum glomerulären Gefäßpol finden. Zeitrafferaufnahmen lassen dabei vermuten, dass die *Maculopodia* der MD-Zellen nicht statisch in ihrer Position bleiben, sondern vergleichsweise schnell ihre Ausdehnung erweitern können und über ein umfassendes vesikuläres Transportsystem verfügen (Gyarmati et al. 2021a). Daneben besitzen MD-Zellen mit ihren *Maculopodia* eine hohe Dichte an Organellen zur Proteinsynthese und sekretorischen Vesikeln (Shroff et al. 2020). Die Hauptaufgabe der MD-Zellen besteht vermutlich darin, als Chemorezeptoren im Rahmen des tubuloglomerulären Feedbacks sowohl die Cl^- -Konzentration als auch die Flussrate im Filtrat des distalen Tubulus zu messen. Dies geschieht über einen Natrium-Kalium-2-Chlorid-Cotransporter (NKCC2), der in der apikalen Zellmembran der MD-Zellen lokalisiert ist. Wird dabei eine zu hohe NaCl-Konzentration registriert, kommt es über bislang nicht vollständig aufgeklärte Mechanismen zu einer Vasokonstriktion der afferenten Arteriole und damit zum Abfall der glomerulären Filtrationsrate (Bell et al. 2003). In der Forschung werden zwei dafür verantwortliche Mediatoren diskutiert: Zum einen ist das Adenosin zu erwähnen, da eine Abnahme der GFR sowohl bei einem Knock-out als auch bei einer Blockade des Adenosin A_1 -Rezeptors ausbleibt (Ren et al. 2002; Sun et al. 2001). Nicht zu vergessen ist dabei, dass ebenso ein Adenosin A_2 -Rezeptor in der afferenten Arteriole vertreten ist, der mit einer Vasodilatation der afferenten Arteriole den gegenteiligen Effekt hat. Zum anderen wird ATP als Mediator angesehen, das über eine Aktivierung des P2X-Rezeptors in der afferenten Arteriole eine Vasokonstriktion herbeiführt (Bell et al. 2003). Möglich ist auch eine Beteiligung beider Mediatoren (Nishiyama und Navar 2002). Wird von der MD dagegen ein Abfall der Salzkonzentration registriert, kommt es zur Stimulation der Reninsekretion aus den juxtaglomerulären Zellen, was daraufhin das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) triggert (Deetjen et al. 2005).

2.3.2 Proteinsynthese und -sekretion

Die basalen Zellfortsätze („*Maculopodia*“) der MD-Zellen sind reich an Organellen zur Proteinsynthese und verfügen über sekretorische Vesikel, die eine hohe Produktionsrate für Proteine vermuten lassen. MD-Zellen weisen noch vor den Zwischenzellen der Sammelrohre, gefolgt von den Podozyten, das höchste Maß an Proteinsynthese auf. Von einer Arbeitsgruppe um Shroff et al. (2020) konnten Proteine wie zum Beispiel Cyclooxygenase 2 (COX2), mikrosomale Prostaglandin E_2 Synthase 1 (mPGES1) und Pappalysin 2 (Pappa2) isoliert werden. mTOR (*mechanistic Target of Rapamycin*) in den MD-Zellen gilt dabei als zentraler Modulator, um Synthese und Regulation von Proteinen beurteilen zu können (Shroff et al. 2020). Dabei handelt es sich um eine Serin/Threonin-Kinase, die stets als Komplex vorliegt (mTOR Komplex 1 und mTOR Komplex 2) und für die

Phosphorylierung und damit Aktivierung von Zielmolekülen verantwortlich ist (Yin et al. 2016). Das genetische Ansteuern dieser Kinase beziehungsweise die physiologische Aktivierung über ein salzarme Ernährung bewirkt einen signifikanten Anstieg der Proteinsynthese, was die Bedeutung von mTOR im Geschehen des Proteinmetabolismus von MD-Zellen unterstreicht (Shroff et al. 2020). Des Weiteren wurde der Wnt/ β -catenin-Signalweg als wichtige regulatorische Instanz in den MD-Zellen detektiert. Er spielt eine maßgebliche Rolle bei der Embryogenese, Karzinogenese und Gewebshomöostase im adulten Organismus (Gyarmati et al. 2021b; Clevers 2006). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass MD-Zellen unter den renokortikalen Zelltypen die höchste Wnt-Aktivität besitzen (Gyarmati et al. 2021b). Über gain-of-function- und loss-of-function-Mutation des Wnt-Gens im Mausmodell wurde gezeigt, dass Wnt einen Einfluss auf die Größe und Zellanzahl der Glomeruli sowie auf die glomeruläre Filtrationsrate hat. Die gain-of-function-Mutation des Wnt-Gens begünstigte die Proteinsynthese in MD Zellen und die Expression von Promoter-Faktoren für die Angiogenese wie CCN1 oder Sema3C. CCN1 konnte dabei auch im Urin nachgewiesen werden, wobei niedrige Konzentrationen mit einer chronischen Nierenerkrankung korrelierten. Dazu wurden außerdem RNA-Sequenzierungen von MD-spezifischen Genen durchgeführt. Betreffende Gene spielen eine Rolle bei der Angiogenese (z.B. Pappa2, VEGFA, CCN1, CXCL14), bei der Zellmigration und dem Gefäßpatterning (z.B. Sema3C, Slit2), als Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, FGF-9) sowie bei der Signaltransduktion und dem Umbau von extrazellulärer Matrix (z.B. Frem1, MMP14) (Gyarmati et al. 2021b). Dieser Nachweis verdeutlicht die regenerative Funktion der MD-Zellen und zeigt nochmals auf, welche Schlüsselrolle sie für die Integrität im renalen Cortex einnimmt.

Im Folgenden wird nur eine Auswahl des Proteinrepertoires der MD-Zellen behandelt, da diese in Versuchen Anwendung gefunden hat und somit von besonderer Relevanz für die wissenschaftliche Diskussion ist.

2.3.2.1 PAPP-A2

PAPP-A2 (*pregnancy-associated plasma protein-A2* bzw. Pappalysin A2) ist eine Metalloprotease, die IGFBP (*insulin-like growth factor binding protein*)-5 spezifisch spaltet (Overgaard et al. 2001). Ebenso kann es eine Spaltung von IGFBP-3 herbeiführen (Andrew et al. 2018). In beiden Fällen kommt es zur Freisetzung von IGF-I aus dem Tertiärkomplex, das daraufhin an IGF-I-Rezeptoren an Zelloberflächen binden und dort in seiner Interaktion wachstumsfördernde Aktivität zeigen kann (Overgaard et al. 2001). Aufgrund der proteolytischen Eigenschaften des PAPP-A2 scheint es die Bioverfügbarkeit von IGF-I signifikant zu erhöhen und damit modulieren zu können (Dauber et al. 2016). Basierend auf diesen Erkenntnissen ist eine Beteiligung von PAPP-A2 an genetischen

Erkrankungen, die mit Kleinwuchs einhergehen (z.B. das Laron-Syndrom), nachvollziehbar (Banaszak-Ziemska Magdalena und Niedziela 2017). Neben seiner Schlüsselrolle rund um die GH/IGF-Achse ist PAPP-A2 in den sekretorischen Vesikeln der MD-Zellen nachweisbar und lässt damit eine parakrine Funktion vermuten, die eine Zell-Zell-Kommunikation zu benachbarten Strukturen erlaubt (Gyarmati et al. 2021a). Ob PAPP-A2 am tubuloglomerulären Feedbackmechanismus beteiligt ist, ist bislang nicht geklärt und soll Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion dieser Arbeit sein.

2.3.2.2 PAPP-A

PAPP-A (Pappalysin 1) besitzt biochemisch eine 45%-ige Homologie zum PAPP-A2 und spaltet IGFBP-4 IGF-abhängig (Overgaard et al. 2001). Im Gegensatz zu PAPP-A2 benötigt PAPP-A für seine enzymatische Aktivität die Anwesenheit von IGF-I (Conover et al. 1993). Seine mRNA wird unter *in vitro*-Bedingungen von humanen Fibroblasten und Osteoblasten exprimiert und als Protein ins Zellkulturmedium sezerniert. Zudem ist es wie auch das PAPP-A2 im Blut von Schwangeren in besonders hoher Konzentration vorzufinden (Lawrence et al. 1999). Aufgrund dieser Korrelation gilt PAPP-A als routinemäßiger Biomarker für das Vorliegen eines Down-Syndroms beim ungeborenen Säugling. Auch in Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit oder mit einer Nierenerkrankung können die Plasmaspiegel von PAPP-A prognostische Werte annehmen. Dementsprechend korrelieren erhöhte Pappalysin 1-Konzentrationen mit einer eingeschränkten Nierenfunktion und dem Vorliegen einer Proteinurie. Nach einer Nierentransplantation kann ein Absinken der zuvor erhöhten Plasmaspiegel beobachtet werden und hilft somit bei der Beurteilung des Outcomes nach der Operation. Des Weiteren spielt PAPP-A eine Rolle bei der Wundheilung, dem Knochenaufbau oder auch der Atherosklerose. Es wird synthetisiert von diversen Zelltypen wie Fibroblasten, glatte Gefäßmuskelzellen, Osteoblasten, Granulosazellen der Ovarien, Trophoblastenzellen sowie in geringer Menge auch von Endothelzellen (Kalousová et al. 2012).

2.3.2.3 CXCL14/BRAK

CXCL14 gehört zur Klasse der Chemokine, die neben chemotaktischen Fähigkeiten, im Speziellen die Migration von Immunzellen, an inflammatorischen und neoplastischen Prozessen beteiligt sind. Es wird vermutet, dass sie zur Entwicklung und Homöostase des Immunsystems beitragen. Der Rezeptor für CXCL14 ist bis heute nicht identifiziert. Deshalb ist die Initiation seiner Signalkaskade bislang ungeklärt und Gegenstand aktueller beziehungsweise zukünftiger Forschung (Lu et al. 2016; Zlotnik und Yoshie 2000). Chemokine können im Allgemeinen eine Bindung mit

G Protein-gekoppelten Rezeptoren eingehen (Zlotnik et al. 2006). Erstmals entdeckt wurde das CXCL14 in Zellen der Niere und der weiblichen Brust, weshalb es auch als BRAK (*breast and kidney*) bezeichnet wird (Hromas et al. 1999). Seine Expression im Organismus ist weit verbreitet und auch in Epithelien nachweisbar (Frick et al. 2011). So ist CXCL14 auch in den epithelialen MD-Zellen zu finden (Shroff et al. 2020). Daneben wird es von einigen Immunzellen (z.B. Monozyten, B-Zellen), von Keratinozyten, Fibroblasten und endothelialen Zellen exprimiert. Seine Expression ist teilweise von äußeren Stimuli abhängig, was vor allem in der Immunologie von Bedeutung zu sein scheint. Als Zielzellen wurden bisher weitere Immunzellen, Endothelzellen und Mikroorganismen identifiziert (Shellenberger et al. 2004; Lu et al. 2016). Daran anschließend ist anzumerken, dass CXCL14 auch als Inhibitor von angiogenetischen Prozessen gilt (Shellenberger et al. 2004).

2.3.2.4 Semaphorin-3C

Semaphorin-3C (Sema3C) gehört zu einer Reihe von Klasse 3-Semaphorinen und zählt zu den sekretorischen Proteinen. Es spielt unter *in vitro*-Bedingungen eine maßgebliche Rolle bei angiogenetischen Prozessen, indem es die Funktion von Endothelzellen reguliert und notwendig für kardiovaskuläres Patterning zu sein scheint. Im Speziellen initiiert es die Proliferation von Endothelzellen und reduziert Zellapoptose, die bei künstlich herbeigeführtem Nährstoffentzug eintritt. Zudem ist es in der Lage, die Anheftung von Endothelzellen an extrazelluläre Matrix wie Fibronectin oder Kollagen zu verstärken. Seine Wirkung scheint dabei der von VEGF-A (*vascular endothelial growth factor-A*) sehr ähnlich und von einer Phosphorylierung des β_1 -Integrins abhängig zu sein. Daneben verstärkt Sema3C die Migration von glomerulären Endothelzellen der Maus und stimuliert die Bildung von Gefäßnetzwerken. Aus diesem Grund wird vermutet, dass es *in vitro* ausschlaggebend an der Proliferation, Adhäsion und Migration von glomerulären Endothelzellen sowie der Formation des Glomerulums beteiligt ist. Voraussetzung ist dabei, dass eine Stimulation durch die Phosphorylierung von β_1 -Integrin und einer Sekretion von VEGF₁₂₀ (Variante des VEGF-A der Maus) erfolgt. Gleichzeitig wird mRNA für Sema3C und seine Rezeptorkomponenten Plexin A1, A2 und D1 von glomerulären Endothelzellen exprimiert. Dies lässt eine autokrine Funktion vermuten, da es auch im Überstand von kultivierten Endothelzellen zu finden ist (Banu et al. 2006). Für einen Einfluss auf die Integrität von glomerulären Endothelzellen spricht die Tatsache, dass Sema3C auch in MD-Zellen exprimiert wird und damit den Endothelzellen anatomisch benachbart ist (Gyarmati et al. 2021b). Bekannt ist zudem, dass Sema3C an neoplastischen Prozessen beteiligt ist. Während es *in ovo* eine Neovaskularisation von Glioblastomzellen inhibiert, trägt es bei malignen Magentumoren zu deren Progression bei (Valiulyté et al. 2019; Miyato et al. 2012). Zudem zeigt es inhibitorische Effekte auf die pathologische Neoangiogenese bei der Frühgeborenen-Retinopathie.

Dabei kommt es während der Entwicklung des Fetus zunächst zur Degeneration der retinalen Mikrogefäße. In einer zweiten Phase werden diese aufgrund einer gestörten Neoangiogenese durch ein stark ausgedehntes und verzweigtes Gefäßbett ersetzt, welches beim Neugeborenen eine Sehbehinderung zur Folge hat. Eine lokale Verabreichung von Sema3C wirkt *in vitro* auf unreife Mikrogefäße apoptotisch und sorgt *in vivo* für einer verringerte Ausdehnung und Verzweigung des Gefäßbetts (Yang et al. 2015).

2.4 PDGFR- β -positive Zellen

Das folgende Kapitel widmet sich renalen interstitiellen Zellen, die den *platelet-derived growth factor receptor β* (PDGFR- β) exprimieren. In der Literatur ist beschrieben, dass jene Zellen die Fähigkeit zur Migration und aktiven Regenerationsleistung besitzen. Außerdem wird ihnen eine profibrotische Komponente zugeschrieben. Damit rücken PDGFR- β -positive Zellen in den Fokus von renaler Degeneration und Regeneration und sollen in die wissenschaftliche Diskussion einbezogen werden.

Zelltypen und Vorkommen

Der PDGFR- β (*platelet-derived growth factor receptor- β*) ist eine Rezeptortyrosinkinase, die ubiquitär im Organismus vorkommt und als Transmembranprotein das PDGF-BB und -DD extrazellulär als Ligand bindet. Des Weiteren gehören zur PDGF-Familie die Homodimere PDGF-AA, PDGF-CC sowie das Heterodimer PDGF-AB. Je ein PDGF-Molekül kann eine PDGFR- β -Molekül binden und damit eine Dimerisierung des Rezeptors bewirken (Kazlauskas 2017). Als bislang bekannte Trägerzellen des PDGFR- β gelten unter anderem mesenchymale Zellen, Myofibroblasten, Fibroblasten, intestinale glatte Muskelzellen, renokortikale Erythropoetin-produzierende Zellen, Perizyten und Astrozyten (Buhl et al. 2020; Nair et al. 2014; Gerl et al. 2016; Schiessl et al. 2018; Kazlauskas 2017).

Funktionsweise des PDGFR- β

Bei dem PDGF-Rezeptor handelt es sich um ein Tyrosinkinase, die durch Bindung von PDGF direkt aktiviert wird. Das intrazelluläre Tyrosin des aktivierten PDGFR- β phosphoryliert daraufhin Substrate und initiiert zelluläre Signalkaskaden. Im Gegensatz zum PDGFR- α kann der PDGFR- β nicht indirekt aktiviert werden und damit nicht über die Dauer der Ligandenbindung hinweg aktiv sein (Feed-forward-Schleife). In ruhenden Zellen beträgt die Halbwertszeit bis zu zwei Stunden, während die aktive Form nur 5 bis 30 Minuten intakt bleibt. PDGFR- β -positive Zellen spielen eine wichtige

Rolle bei der Migration und Proliferation von Perizyten und haben damit großen Anteil an der Funktion und Bildung von Gefäßen (Kazlauskas 2017).

Die Rolle von PDGFR- β -positiven Zellen in der Niere

In der Niere sind PDGFR- β -positive Zellen im Interstitium lokalisiert und unter anderem für die Produktion von Erythropoetin verantwortlich, während lediglich 50 % dieser Zellen Träger des Rezeptors sind (Gerl et al. 2016). Außerdem scheinen PDGFR- β -positive mesenchymale Zellen, die sich zu Myofibroblasten differenzieren, an der Pathogenese der interstitiellen Nierenfibrose beteiligt zu sein. Anhand eines transgenen Mausmodells, das speziell eine Aktivierung des PDGFR- β von mesenchymalen Zellen induziert, kann im weiteren Verlauf eine progressive mesangioproliferative Glomerulonephritis, eine mesangiale Sklerose und eine interstitielle Fibrose beobachtet werden. Zudem zeigt sich eine fortschreitende Anämie aufgrund der Zerstörung von EPO-produzierenden Fibroblasten. Sekundär kommt es daraufhin zu einer Zerstörung des tubulären Epithels, welche das irreversible Fortschreiten einer hypertensiven und obstruktiven Nephropathie zur Folge hatte (Buhl et al. 2020). Diese wiederum kann in eine tubulointerstitielle Nierenfibrose münden, welche im nächsten Kapitel thematisiert wird.

Des Weiteren besitzen PDGFR- β -positive interstitielle Zellen die Fähigkeit, zu einem Gewebeschaden zu migrieren und dort eine Regeneration zu initiieren. Nach einem künstlichen Laserschaden im tubulären Epithel senden benachbarte PDGFR- β -positive Zellen ein Calciumsignal aus und wandern zum Ort des Defekts (Schiessl et al. 2018). Diese Beobachtung deckt sich auch im Grundgedanken mit der Theorie, dass epitheliale Zellen des proximalen Tubulus im Falle eines Gewebeschadens proliferieren, sich dedifferenzieren und stammzellähnliches Verhalten zeigen. Sogenannte *scattered tubular cells* (STC), die vorübergehend Stammzellmarker exprimieren können, initiieren eine Reparatur und damit – zumindest teilweise – eine Regeneration des Nierengewebes. Dies entkräftet die lange vorherrschende Vermutung, dass eine eigene Stammzellpopulation vorliegt, die für die Regeneration verantwortlich ist (Kramann et al. 2015; Kusaba et al. 2014). An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass Perizyten infolge eines Nierenschadens beginnen, zu proliferieren. Über die Aktivierung ihres PDGFR- β machen sie eine Differenzierung zu Myofibroblasten durch und bewirken daraufhin über die Bildung von vor allem Kollagen Typ I eine Vernarbung von Nierengewebe. Neben der Aktivierung des Rezeptors wird auch die Expression von PDGF in den Tubuli, den Endothelien und den Makrophagen erhöht (Chen et al. 2011). Allerdings ist bislang nicht geklärt, auf welche Signale genau jene PDGFR- β -positive Zellen reagieren und regenerative Prozesse einleiten. Diskutiert werden Zytokine wie IL-1 β (Interleukin-1 β), IL-17A und TNF- α

(Tumornekrosefaktor- α), die nach Registrierung des Nierenschadens von Immunzellen ausgeschüttet werden. Diese können unter anderem die Proliferation von PDGFR- β -positiven Zellen begünstigen (Nair et al. 2014). Ebenso wird postuliert, dass auch TGF- β (*transforming growth factor- β*) am fibrotischen Geschehen beteiligt ist. Bei Störung der Signalwirkung von TGF- β ist die profibrotische Genexpression vermindert. Zudem fallen das Absinken der Erythropoetinsynthese und die daraus resultierende Anämie, welche mit renalen fibrotischen Prozessen einhergeht, weniger stark aus (Fuchs et al. 2021).

Daran anschließend folgt nun eine deskriptive und ätiologische Darstellung des Krankheitsbildes der interstitiellen Fibrose, da ihre Pathogenese vor dem Hintergrund einer Beteiligung von PDGFR- β -positiven Zellen betrachtet werden sollte.

2.5 Interstitielle Nierenfibrose

2.5.1 Ätiologie und Pathogenese

Die tubulointerstitielle Nierenfibrose ist eine chronisch-progressive Erkrankung, die mit einer Fibrosierung des Nierenparenchyms einhergeht. Sie ist gekennzeichnet durch die vermehrte Ablagerung von extrazellulärer Matrix (v.a. Kollagene, Fibronectin) im Nierenparenchym zwischen der tubulären Basalmembran und den peritubulären Kapillaren. Es handelt sich um einen irreversiblen Zustand, der in eine chronische Nierenerkrankung (*chronic kidney disease*, CKD) und schließlich in ein Nierenversagen mündet (Humphreys 2018; Eddy 1996). Bei einem milden Gewebeschaden kann das fibrotische Material resorbiert werden. Bei einem ausgedehnteren dagegen verläuft die Fibrosierung unkontrolliert. Dabei kommt erschwerend hinzu, dass eine zunehmende Fibrosierung die Gewebereparatur beeinträchtigt. Aus diesem Grund bleibt vernarbtes Parenchym zurück, das in einem Funktionsverlust der Gesamtniere resultiert (Humphreys 2018). Für die vermehrte Bildung von extrazellulärer Matrix sind vor allem Myofibroblasten verantwortlich. Sie bilden die aktivierte Form von ruhenden Fibroblasten und sind in einer gesunden Niere nahezu nicht existent (Kramann et al. 2013). Diese Transformation zu aktiven Fibroblasten ist infolge verschiedener Szenarien denkbar: Zum einen wird sie als Reaktion auf auto- oder parakrine Produktion von Wachstumsfaktoren (TGF- β 1, CTGF, FGF, PDGF) diskutiert. Zum anderen kann sie als Folge von direktem Zell-Zell-Kontakt (über Leukozyten und Makrophagen getriggert) eintreten. Als dritter Auslöser ist eine Interaktion zwischen extrazellulärer Matrix und Integrinen zu erwähnen. Und zu guter Letzt resultiert die Transformation möglicherweise aus der Wirkung von umgebenden Reizen wie Hypoxie, Hyperglykämie, Proteine des Komplementsystems, *advanced glycation endproducts* (AGE) sowie oxidativer Stress (Qi et al. 2006). Daran anschließend sind aus dem Knochenmark stammende Zellen zu nennen, die

sich in der Niere zu diversen Zelltypen differenzieren. Neben den Myofibroblasten gelten folglich auch Endo- und Epithelzellen als Ursprung einer potenziellen Kollagensynthese in der Niere (Li et al. 2007). Hier sei zu erwähnen, dass Myofibroblasten auch von Perizyten abstammen und damit zu einer interstitiellen Fibrose der Niere beitragen können (Wang et al. 2017). Des Weiteren werden Fibrozyten, die aus dem Knochenmark ins Nierenparenchym einwandern können, als Ursprung von renalen Myofibroblasten diskutiert und damit indirekt für die Synthese von Kollagen I verantwortlich gemacht (Sun et al. 2016; Nikolic-Paterson et al. 2014).

Zu den Risikofaktoren einer interstitiellen Nierenfibrose zählen ein angeborener Mangel an Nephronen sowie ein Nephronverlust aufgrund steigenden Alters oder wegen akuter beziehungsweise chronischer Nierenschäden, die toxin- oder krankheitsbedingt (z.B. Übergewicht, Typ-II-Diabetes) eintreten. Die diabetische Nephropathie gilt als der Hauptgrund für eine sogenannte *end-stage kidney disease*, die letztendlich solange eine Dialysepflicht mit einschließt, bis im besten Fall ein passendes Organ als Ersatz transplantiert werden kann (Romagnani et al. 2017). Die zweithäufigste Todesursache durch eine chronische Nierenerkrankung ist die hypertensive Nephropathie. Neben den bereits genannten Faktoren scheinen insbesondere die begleitenden Prozesse einer systemischen Hypertension das Krankheitsbild mit zu prägen. Darunter fallen zum Beispiel die Aktivierung des Renin-Angiotension-Aldosteron-Systems oder vasoaktive Substanzen (Sun 2019).

Auch wenn eine chronische Nierenerkrankung derzeit nicht heilbar, aber bis zu einem gewissen Grad therapierbar ist, ist sie der größte Risikofaktor für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung (Humphreys 2018). Dies unterstreicht die Komplexität eines chronischen Nierenleidens und im Speziellen einer interstitiellen Nierenfibrose und ihrer Folgen für den Organismus. Zudem ist an dieser Stelle nachvollziehbar, dass zahlreiche Aspekte erst im Detail erforscht werden müssen, um die Pathogenese und Folgen verstehen zu können sowie mögliche Therapieoptionen evaluieren zu können.

2.5.2 Krankheitsbild und Folgen für die Nierenfunktion

Die interstitielle Nierenfibrose zeichnet sich im Allgemeinen durch einen unterschiedlich stark ausgedehnten Gewebeschaden, Entzündungsherde, Migration und Aktivierung von Myofibroblasten sowie Ablagerung und Umbau von extrazellulärer Matrix aus (Humphreys 2018). Neben einer erhöhten Albuminurie gehören Anämien, metabolische Azidosen, sekundärer Hyperparathyreoidismus sowie kardiovaskuläre Komplikationen zum Erscheinungsbild einer chronischen Nierenerkrankung (Ortiz 2020; Romagnani et al. 2017). Eine nachlassende Nierenfunktion ist zudem gekennzeichnet durch Ödembildung, Hypertension, Wachstumsstörungen bei Kindern

sowie veränderter Qualität und Menge des Endharns. Auch im Blut sind Abweichungen wie erhöhte Serumlevel von Kreatinin, Cystatin C und Blut-Harnstoff-Stickstoff zu beobachten. Die Kidney Disease Improving Global Outcomes Initiative definiert das Vorliegen einer CKD, wenn beim Patienten Anomalien der renalen Struktur oder Funktion länger als drei Monate bestehen. Zu diesen Anomalien gehört auch eine zu niedrige glomeruläre Filtrationsrate, die als ein Maß für die Filtrationsleistung der Niere gilt. Liegt diese fortwährend unter 15 ml/min, ist das Risiko für die Entwicklung einer *end stage kidney disease* (ESKD) deutlich erhöht. Ebenso dient die Schwere einer Proteinurie beziehungsweise einer Albuminurie als Marker für die Nierenfunktion, im Speziellen für die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere. Therapeutisch ist es nach heutigem Wissensstand vor allem wichtig, den Blutdruck auf einem physiologischen Level zu halten und das RAAS so weit wie nötig zu hemmen (Romagnani et al. 2017). Trotz allem ist die interstitielle Nierenfibrose eine Erkrankung, die stetig fortschreitet und deren Verlauf bislang nur geringfügig hinausgezögert werden kann. Endpunkt der Progression ist die ESKD, die nicht mehr ohne eine regelmäßige Dialyse auskommt und letal verläuft, sofern keine Nierentransplantation erfolgt. Dieser Ausgang verdeutlicht die Brisanz für die Entwicklung von alternativen Therapieansätzen, die ihren Ursprung im Verständnis der Pathogenese von chronischen Nierenleiden haben.

Erstes Anzeichen einer nachlassenden Nierenfunktion ist das Auftreten einer verstärkten Proteinurie, die aus einer erhöhten Filtration von Proteinen resultiert. Da die glomeruläre Filtrationsbarriere stets einer Dynamik unterworfen ist, soll im nächsten Abschnitt eine Methode erläutert werden, die besonders für die Darstellung und live-Beobachtung von dynamischen Prozessen geeignet ist. Mit der Multiphotonenmikroskopie wird eine Untersuchung physio- und pathologischer Vorgänge am lebenden Tier möglich.

2.6 Multiphotonenmikroskopie

Die Multiphotonenmikroskopie ist ein Abkömmling der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie. Bereits 1931 wurde das Prinzip der Multiphotonenanregung von Maria Göppert-Mayer in ihrer Dissertation beschrieben (So et al. 2000). Darauf aufbauend entwickelte sich den folgenden Jahrzehnten die Multiphotonenmikroskopie, die auch noch heutzutage ihre Anwendung in der biomedizinischen Forschung findet. Am häufigsten wird die Zweiphotonenmikroskopie eingesetzt, da sie für die intravitale Mikroskopie besonders geeignet ist.

2.6.1 Eigenschaften der Fluoreszenz bei der Multiphotonenmikroskopie

Bei der Photonenmikroskopie werden fluoreszierende Moleküle, sogenannte Fluorophore, einem Photonenstrahl ausgesetzt. Während bei der konventionellen Einphotonenmikroskopie ein einzelnes Photon auf ein Elektron trifft, davon absorbiert wird und es – sofern die Energie dafür ausreicht – in einen höheren Energiezustand versetzt, erfolgt dies bei der Multiphotonenmikroskopie durch zwei oder mehrere Photonen, die nahezu gleichzeitig auf dasselbe Elektron treffen. Da dieser höhere Energiezustand instabil ist, neigt das Elektron dazu, unter Abgabe eines energieärmeren Photons wieder in seinen Grundzustand zurückzukehren, was als Fluoreszenz sichtbar wird. Die geringere Energie des ausgesendeten Photons resultiert aus der sogenannten Stokes-Verschiebung. Sie beschreibt das Phänomen, dass zwischen den Wellenlängen für die Anregung eines Elektrons und die daraus resultierende Emission eines Photons immer eine gewisse Differenz besteht. Dies liegt daran, dass die Energiezustände eines Elektrons nicht nur ein Niveau besitzen, sondern sich durch Zwischenenergiezustände, sogenannte Vibrationszustände, auszeichnen. Während ein Elektron bei Anregung in den höchsten Vibrationszustand seines „angeregten Energieniveaus“ versetzt wird, erfolgt aufgrund der Instabilität direkt eine geringe Energieabgabe, sodass das Elektron in einen niedrigeren Vibrationszustand des „angeregten Energieniveaus“ fällt. Dieser Energieabfall wird allerdings noch nicht als Strahlung sichtbar. Im Anschluss daran erfolgt die eigentliche Fluoreszenz unter Abgabe eines Photons, während das zuvor angeregte Elektron dazu tendiert, in den höchsten Vibrationszustand seines „Energiegrundzustandes“ versetzt zu werden. Damit wird die Energie des ausstrahlenden Photons nochmals gesenkt (Lakowicz 2010). Das erklärt, weshalb bei der Photonenmikroskopie für eine gewünschte Wellenlänge eine stets höhere Energie zur Anregung benötigt wird. Bei der Multiphotonenmikroskopie dagegen teilt sich die Anregungsenergie auf zwei oder mehr Photonen auf, da sich die Einzelenergien durch das nahezu gleichzeitige Ankommen am Elektron addieren. Dies ermöglicht die Wahl von deutlich geringeren Einzelphotonenenergien, die mithilfe eines nicht-linearen, gepulsten Laserstrahls erzeugt werden (So et al. 2000).

2.6.2 Vorzüge der Multiphotonenmikroskopie

Die Multiphotonenmikroskopie ermöglicht den Einsatz einer geringeren Anregungsenergie im Vergleich zur konventionellen LSM. Das bedeutet, dass der Gewebe- beziehungsweise Zellschaden durch die Energieeinwirkung deutlich schwächer ausfällt und die Multiphotonenmikroskopie damit zu einer wenig invasiven, bildgebenden Methode macht. Gleichzeitig ermöglicht eine geringere Energie und damit höhere Wellenlänge der Einzelphotonen eine höhere Eindringtiefe (So et al. 2000). Während die Eindringtiefe bei der Einphotonenmikroskopie mit unter 100 μm

vergleichsweise begrenzt ist, können bei der Multiphotonenmikroskopie je nach Gewebe und Bedingungen eine Tiefe von bis zu 1000 μm erreicht werden (Helmchen und Denk 2005; Theer et al. 2003). Zunächst korreliert die Eindringtiefe immer auch mit einer Lichtstreuung nach Absorption durch die Probe. Je tiefer die Anregung im Gewebe erfolgt, desto höher ist die Streuung des Lichts und desto geringer wird die Bildauflösung. Da die Streuung aber gleichzeitig umso geringer ausfällt, je geringer die Wellenlänge der Anregungsenergie war, ist dieser Effekt weitgehend vernachlässigbar. Schließlich finden bei der Multiphotonenmikroskopie meist Anregungsenergien im energiearmen Infrarotbereich ihre Anwendung (Helmchen und Denk 2005). Nachdem der Streueffekt beim Einsatz von längeren Wellenlängen viel geringer als bei energiereicher Strahlung ist, findet die Anregung bei der Zweiphotonenmikroskopie konfokal mit einem Volumen im Femtoliterbereich statt. Aus diesem Grund erübrigt sich bei der Multiphotonenmikroskopie die Verwendung einer Lochblende, um das Bild scharf zu stellen (Diaspro et al. 2006).

Diese Eigenschaften machen die Multiphotonenmikroskopie zu einer besonders geeigneten Methode für die intravitale Mikroskopie. Auch wenn es sich bei den Intravitalversuchen für die vorliegende wissenschaftliche Arbeit stets um finale und keine Belastungsversuche handelte, war eine Abbildung der physiologischen Integrität des Nierengewebes zu jeder Zeit im Fokus der Versuche.

3 Fragestellung

Die Kapazität der Niere zur Regeneration ist vergleichsweise gering. Eine *restitutio ad integrum* nach degenerativen Prozessen ist in einem gewissen Maß möglich und zugrunde gegangene Zellen werden ersetzt. Um eine nachlassende Nierenfunktion aufhalten sowie renoprotektive Vorgänge und Maßnahmen fördern zu können, ist ein detailliertes Verständnis regenerativer Prozesse unabdingbar. In den nachfolgenden Ausführungen sollen zwei anatomische Strukturen der Niere in den Fokus von Degeneration und Regeneration genommen werden.

Zunächst wurde in dieser Arbeit das Glomerulum und hier im Speziellen seine endotheliale Glykokalyx als wichtiger Modulator der glomerulären Filtration untersucht. Da die glomeruläre Filtrationsbarriere Ausgangspunkt einer pathologischen Proteinurie und damit nachlassenden Nierenfunktion ist, wurde ein Konzept etabliert, mit dem eine potenzielle Modulation der endothelialen Glykokalyx am lebenden Tier beobachtet werden konnte. Ausgehend von Vorbefunden, bei denen eine experimentell induzierte Tubulusschädigung eine Veränderung der Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere mit erhöhter Filtration von Proteinen auslöste, sollte mittels Multiphotonenmikroskopie die glomeruläre endotheliale Glykokalyx im Tiermodell detailliert untersucht werden. Das Augenmerk lag dabei auf parakrinen Faktoren, die bereits als Bestandteile von benachbarten MD-Zellen identifiziert und mittels Immunhistologie nachgewiesen werden konnten. Es sollte daher im Tiermodell und mittels *in vitro*-Experimenten die Hypothese geprüft werden, dass parakrine Faktoren der MD-Zellen die Integrität der endothelialen Glykokalyx und damit der glomerulären Filtrationsbarriere beeinflussen. Damit sollte also geklärt werden, ob die MD als Signalvermittler zwischen laserinduziertem Epithelschaden und endothelialer Glykokalyx fungiert. Im Speziellen sollte dann geprüft werden, ob einzelne Komponenten der endothelialen Glykokalyx gezielt durch die parakrinen Faktoren moduliert werden können.

Als weiterer möglicher Ausgangspunkt degenerativer Prozesse in der Niere wurde das renale Interstitium, insbesondere interstitielle PDGFR- β -positive Zellen und ihr Anteil an immunologischen Vorgängen sowie der Pathogenese der interstitiellen Fibrose, analysiert. Dafür wurden PDGFR- β -positive Zellen inflammatorischen Zytokinen ausgesetzt, deren profibrotisches Potenzial in der Literatur bereits unter Beweis gestellt wurde. Mit Zytokinen als Mediatoren von immunologischen sowie entzündlichen Prozessen sollte *in vitro* geprüft werden, welche Elemente zur Entwicklung einer Nierenfibrose beitragen können. Anhand einer anschließenden Proteinquantifizierung des Zelllysats mittels Western Blots wurde die Fähigkeit zur Synthese extrazellulärer Matrix quantifiziert.

In diesem Zusammenhang wurde zudem die Migrationskapazität interstitieller PDGFR- β -positiver Zellen untersucht. Nach Etablierung eines Migrationsassay sollte die Hypothese geprüft werden, dass jene Zellen durch chemotaktische Faktoren zu einer tubulären Schädigung wandern und dort eine Regeneration begünstigen oder sogar initiieren können. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass interstitielle Zellen nicht nur an einem Ort ihrer Funktion nachkommen können, sondern stets dorthin migrieren können, wo sie benötigt werden.

4 Material

4.1 Geräte

Produkt	Hersteller
Chemidoc Imaging System	Bio Rad Laboratories GmbH; Feldkirchen
Chirurgische Instrumente	Fine Science Tools; Heidelberg
CO ₂ -Inkubator Model BD	Binder; Tuttlingen
CO ₂ Module S + TempModule S	Carl Zeiss Microscopy GmbH; Göttingen
Computer	Elite Desk 800 G4 TWR; HP; Böblingen
Criterion Vertical Electrophoresis Cell	Bio Rad Laboratories GmbH; Feldkirchen
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer mit Colibri 7, AxioCam 506 mono, AxioCam 503 mono, AxioCam 305 color, Apoptome 3	Carl Zeiss Microscopy GmbH; Göttingen
Gasinkubator	Ibidi; Gräfelfing; Life Imaging Services GmbH; Schweiz
Heizeinheit	Ibidi; Gräfelfing; Life Imaging Services GmbH; Schweiz
Heizeinheit XL S	Carl Zeiss Microscopy GmbH; Göttingen
Infrarotwärmelampe	Sanitas; Hans Dinslage GmbH; Uttenweiler
Isofluran Verdampfer	Groppler Medizintechnik; Deggendorf
Kamera am LSM 710	AxioCam Mrm, Zeiss; Jena
Kühl- und Gefrierschränke	Hera Freeze, Thermo electron corporation; Langenselbold; Premium NoFrost, Liebherr; Biberach a.d. Riss
Magnetrührer	MR80, Heidolph; Schwabach
Mikroskop	Axio Observer Z1, Zeiss; Jena; LSM710, Zeiss; Jena
Mikrotom	Leica RM2265; Wetzlar
NanoDrop 1000 Spektrophotometer	Peqlab – Biotechnologie GmbH; Erlangen
Narkosegasabsorber	Harvard Apparatus GmbH Holliston; Massachusetts, USA
NDD Filter	Zeiss Reflektormodul 424931 AHF, Analysetechnik AG; Tübingen
OP-Tischbeleuchtung	KL 1500 LCD, Schott; Mainz
Perfusionspumpe	323, Watson Marlow; Wilmington, USA
pH-Meter	Digital pH-Meter, Seven Compact, Mettler; Gießen
Pipetten	Pipetman P2, P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson; Middleton, USA
Pipettierhilfe Pipetboy	ISB Integra Biosciences; Chur Schweiz
PowerLab	PowerLab 8/35, AD Instruments; Spechbach
PowerPac HC Power Supply	Bio Rad Laboratories GmbH; Feldkirchen
Ratten Operationstisch	08301, KE Med. Techn. Gerätebau; Pfaffing a.d. Attel
Schermaschine	Aeskulap, Braun; Melsungen
Schüttler	Rotamax, Heidolph; Schwabach
Stereomikroskop	Helmut Hund GmbH; Wetzlar
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank der Klasse II, Modell Claire pure B-2-190	Berner International GmbH; Elmshorn

Silikonkautschuk Gießformen	Roth; Karlsruhe
Thermomixer compact	Eppendorf AG; Hamburg
Vortexgerät	USA REAX1, Heidolph; Schwabach
Waagen	Analysewaage H-20T; Mettler, Gießen; Wägetechnik Dürnberger; Obertraubling
Wärmeplatte	OTS40 Medite Medizintechnik; Burgdorf
Wasserbad Typ 1086	Gesellschaft für Labortechnik (GFL) mbH; Burgwedel
Zentrifugen	Zentrifuge 5415R, Eppendorf; Hamburg; Neo-Lab Migge GmbH; Heidelberg; Zentrifuge 5804 R, Eppendorf; Hamburg
Zweiphotonenlaser	Chameleon Ultra-II Multiphoton-Laser; Coherent USA

4.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Centrifugal Devices 1K, 30K	Pall Life Sciences; Ann Arbor, USA
Deckgläschen	Marienfeld; Lauda-Königshofen
Chirurgisches Nahtmaterial, Seide, nicht resorbierbar, 7-0	Resorba; Nürnberg
Cups	Sarstedt 1,5 ml, 2 ml; Hamburg
Einbettkassetten	Thermo Fisher Scientific; Schwerte
Falcon Tube	Sarstedt 15 ml, 50 ml; Nümbrecht
Fettstift	Sciences Services; München
Latex Einmalhandschuhe	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Insulinspritzen	BD Medical, Le pont de Claix Cedex; Frankreich
Kanülen	Braun 22G, 20G; Melsungen
Magnetührstäbchen	VWR International GmbH; Darmstadt
Nitrocellulosemembran	Bio Rad Laboratories GmbH; Feldkirchen
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tips	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht
Pipettensitzen MultiFlex Round Tips 1-200µl	Sorenson, BioScience, Inc.; Utah, USA
µ-Plate 24 Well Black	Ibidi; Gräfelfing
Rundboden Polystyrolröhrchen	Thermo Fisher Scientific; Schwerte
Sekundenkleber	UHU; Bühl/Baden
µ-Slide Chemotaxis	Ibidi; Gräfelfing
µ-Slide VI 0,4	Ibidi; Gräfelfing
Spritzen 1 ml	B. Braun SE; Melsungen
Spritzen 3 ml, 5 ml	Henke – Sass, Wolf GmbH; Tuttlingen
Objektträger	Thermo Fisher Scientific; Schwerte
Objektträger-Inkubationskammern	Mechanische Werkstatt der Universität Regensburg
Transparente Geschenkfolie	Müller Handels GmbH & Co. KG; Ulm
Wattestäbchen	Dm; Karlsruhe
Western Blot-Zubehör	Bio Rad Laboratories GmbH; Feldkirchen
Whatman Filterpapier	GE Healthcare Life Sciences; Solingen

4 Material

Zellkulturschalen	Corning; Arizona, USA
Zellschaber	Sarstedt, Inc., North Carolina, USA
Zellsiebe	Corning 40 µm, 100 µm; Arizona, USA

4.3 Chemikalien, Pharmazeutika und Kits

Produkt	Hersteller
AdvanBlock-Chemi Blockierlösung	Advansta; Kalifornien, USA
Amphotericin B	Merck; Darmstadt
Augensalbe	Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer; Leverkusen
Bovine Albuminfraktion (7,5 %-Lösung)	Thermo Fisher Scientific; Schwerte
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich; Steinheim
Kollagenase Typ 2	Worthington Biochemical; New Jersey, USA
4-20 % Criterion TGX Stain-Free Protein Gel	Bio Rad Laboratories GmbH; Feldkirchen
DAPI	Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA
DPX Mounting Medium	Sigma Aldrich; Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle's Medium, hoher Glucoseanteil	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
EGF	Sigma Aldrich; Steinheim
Endothelzellmedium Kit	Innoprot; Derio, Spanien
Ethanol	Merck; Darmstadt
Fentanyl 0,1 mg/2 ml	Janssen; Neuss
Fötales Kälberserum	Merck; Darmstadt
Formaldehyd	Merck; Darmstadt
Reduzierender Probenpuffer	Thermo Fisher Scientific; Illinois USA
Glycin	Sigma Aldrich; Steinheim
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Merck; Darmstadt
Heparin (5000 I.E./ml)	Roche; Mannheim
Hyaluronsäure Natriumsalz	Sigma Aldrich; Steinheim
Hydrocortison Injektionslösung	Pfizer; New York, USA
Immersionöl	Zeiss; Oberkochen
Isofluran	Baxter; Höchststadt
Isopropanol	Merck; Darmstadt
Lämmli-Puffer	Bio Rad Laboratories GmbH; Feldkirchen
NaCl-Lösung 0,9 %	Braun; Melsungen
Natives Mausalbumin	Abcam; Berlin
Mecain 10 mg/ml	PUREN Pharma GmbH; München
Mepivacainhydrochlorid 20 mg/ml (Mepidor)	WDT eG; Garbsen
Methanol	Merck; Darmstadt
Midazolam 5 mg/ml	ROTEX-Medica; Tritttau
Narcoren	Merial GmbH; Hallbergmoos
PageRuler Prestained Ladder 10 bis 180kDa	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Paraffin	Leica; Wetzlar
Paraformaldehyd	Merck; Darmstadt
Penicillin-Streptomycin	Merck; Darmstadt
Percoll	Sigma Aldrich; Steinheim
Pferdeserum	Merck; Darmstadt
Pierce BCA Protein assay Kit	Thermo Fisher Scientific; Schwerte

Precision Plus Protein Dual Color Standards, 10 bis 250kDa	Bio-Rad Laboratories GmbH; Feldkirchen
Pronase E	Merck; Darmstadt
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma Aldrich; Steinheim
RIPA-Puffer	Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich; Schnelldorf
Trapidil	Merck; Darmstadt
TRIS-Base	Sigma-Aldrich; Steinheim
TRIS-HCl	Sigma-Aldrich; Steinheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich; Steinheim
Trypsin-EDTA 0,5 %	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Tween 20	Bio-Rad Laboratories GmbH Feldkirchen
Western Bright Sirius Chemiluminescence Substrat	Advansta; Kalifornien, USA
Wheat germ agglutinin Fluorescein Conjugate	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Xylol	Merck; Darmstadt

4.4 Zellen und Biologika

Produkt	Hersteller
Humane renale glomeruläre Endothelzellen (HRGEC), 500000 Zellen/ml (P10665)	Innoprot; Derio, Spanien
Murines FGF-9 (RP8637)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific; Schwerte
Prostaglandin I ₂ (sc-201231)	Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA
Rekombinantes humanes CXCL14/BRAK (866-CX-025)	R&D Systems, BioTechne; Wiesbaden
Rekombinantes humanes PAPP-A (2487-ZNF-020)	R&D Systems, BioTechne; Wiesbaden
Rekombinantes humanes PAPP-A2 (1668-ZN-020)	R&D Systems, BioTechne; Wiesbaden
Rekombinantes humanes PDGF-DD (1159-SB-025/CF)	R&D Systems, BioTechne; Wiesbaden
Rekombinantes humanes Semaphorin-3C (5570-S3-050)	R&D Systems, BioTechne; Wiesbaden
Rekombinantes murines IL-1 β (575104)	BioLegend; Kalifornien, USA
Rekombinantes murines IL-17A (576004)	BioLegend; Kalifornien, USA
Rekombinantes murines PDGF-BB (558806)	BioLegend; Kalifornien, USA
Rekombinantes murines TGF- β 1 (7666-MB-005)	R&D Systems, BioTechne; Wiesbaden
Rekombinantes humanes TNF- α (cyt-223)	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH; Eching
Rekombinantes Uromodulin, THP (ASB-OPCD07832)	Biozol; Eching

4.5 Antikörper

4.5.1 Immunhistochemie

Produkt	Hersteller
PAPP-A2 (aus Ziege) (AF1668-SP)	R&D Systems, BioTechne; Wiesbaden
PAPP-A (aus Kaninchen) (NBP1-90087)	Novus Biologicals, BioTechne; Wiesbaden
COX2 (aus Maus) (85-8200)	Thermo Fisher Scientific; Schwerte
CXCL14/BRAK (aus Kaninchen) (ab137541)	Abcam; Berlin
Semaphorin-3C (aus Kaninchen) (ab214309)	Abcam; Berlin
Synaptopodin (aus Ziege) (sc-21537)	Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA
Cy2 (gegen Maus, Kaninchen bzw. Ziege) (715-225-150; 111-225-144; 705-225-147)	Dianova; Hamburg
Cy5 (gegen Maus, Kaninchen bzw. Ziege) (715-175-151; 111-175-144; 705-175-147)	Dianova; Hamburg

4.5.2 Immunzytochemie

Produkt	Hersteller
Biglycan (aus Kaninchen) (NBP1-84971)	Novus Biologicals; BioTechne; Wiesbaden
Hyaluronsäure (aus Kaninchen) (MBS2003855)	MyBioSource; San Diego, USA
Syndecan 1 (aus Maus) (ab181789)	Abcam; Berlin
Versican (aus Maus) (NBP2-22408)	Novus Biologicals; BioTechne; Wiesbaden
Kollagen I (aus Kaninchen) (ab21286)	Abcam; Berlin
Kollagen III (aus Ziege) (SBA-1330-01)	Biozol; Eching
Decorin (aus Ziege) (AF1060)	R&D Systems; BioTechne; Wiesbaden
Fibronectin (aus Kaninchen) (F3648)	Sigma-Aldrich; Steinheim
GFP (aus Huhn) (ab13970)	Abcam; Berlin
Cy2 (gegen Ziege) (705-225-147)	Dianova; Hamburg
Cy5 (gegen Maus, Kaninchen bzw. Ziege) (715-175-151; 111-175-144; 705-175-147)	Dianova; Hamburg
DAPI (28718-90-3)	Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA
TRITC (gegen Kaninchen bzw. Ziege) (111-025-003; SBA-6160-03)	Dianova; Hamburg

4.5.3 Western Blots

Produkt	Hersteller
Decorin (aus Kaninchen) (ab175404)	Abcam; Berlin
Fibronectin (aus Kaninchen) (ab2413)	Abcam; Berlin
Kollagen I (aus Kaninchen) (ab34710)	Abcam; Berlin
Pierce goat, anti-rabbit IgG, peroxidase conjugated (31460)	Thermo Fisher Scientific; Illinois, USA

4.6 Software

Programm	Hersteller
AxioVision 4	Zeiss; Oberkochen
Citavi 6	Swiss Academic Software GmbH; Wädenswil Schweiz
ImageJ	National Institutes of Health; Maryland, USA
Image Lab Touch Software	Bio Rad Laboratories GmbH; Feldkirchen
Microsoft Office Professional Plus 2019	Microsoft Corporation; Redmond, USA
Prism 5	GraphPad; San Diego, USA
Powerlabs	AD Instruments; Oxford, UK
ZEN2011	Zeiss; Oberkochen
ND 1000 V3.8.1 BCA Protein	Thermo Fisher Scientific; Schwerte

5 Methoden

Im folgenden Kapitel werden die angewendeten Methoden und ihre zugehörigen Versuchsprotokolle im Detail dargestellt und erläutert.

5.1 Darstellung der glomerulären endothelialen Glykokalyx mit Hilfe der intravitralen Multiphotonenmikroskopie

Die hier beschriebenen Tierversuche erfolgten nach Genehmigung durch die Regierung der Oberpfalz unter dem Aktenzeichen RUF 55.2.2 – 2532.2 – 917 – 10. Sie wurden gemäß den Empfehlungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) durchgeführt.

5.1.1 Munich Wistar Froemter-Ratten

Für die intravitale Multiphotonenmikroskopie der glomerulären endothelialen Glykokalyx wurden Munich Wistar Froemter (MWF)-Ratten eingesetzt. Sie zeichnen sich durch besonders viele oberflächlich gelegene Glomeruli aus und sind deshalb sehr für die Multiphotonenmikroskopie der Niere geeignet (Hackbarth et al. 1983). Es wurden sowohl weibliche als auch männliche Tiere mit einem Gewicht von 170 g bis 280 g und einem Alter von 8 bis 12 Wochen in den Versuchen eingesetzt. Die Stichprobenzahl lag bei jeder Versuchsreihe bei $n = 6$ und bestand je zur Hälfte aus weiblichen und männlichen Tieren. Zur Randomisierung des Versuchsaufbaus befanden sich in jedem Käfig vier Tiere, die vorab von 1 bis 4 nummeriert wurden. Im Anschluss wurde gewürfelt und das Tier mit der jeweiligen Zahl im Versuch eingesetzt.

5.1.2 Haltungsbedingungen der Versuchstiere

Die MWF Ratten wurden in einer universitätseigenen Zucht bei 23 ± 2 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5 % und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten, während sie Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung hatten.

5.1.3 Vorbereitung und Operation der Versuchstiere

Zu Beginn wurden die MWF Ratten mit 5 Vol. % Isoflurangas in der Narkosekammer betäubt. Während daran anschließend die Isoflurankonzentration auf 2,5 Vol. % abgesenkt und die Inhalationsnarkose über eine selbst gefertigte Narkosemaske verabreicht wurde, wurde das Tier

auf einem beheizbaren Operationstisch abgelegt. Zudem erhielt das Tier über eine Infrarotwärmelampe eine zusätzliche Wärmezufuhr. Zum Schutz der Kornea vor Defekten durch Austrocknung wurde auf beiden Augen Augensalbe aufgetragen. Für die Lokalanästhesie wurde das Tier auf die rechte Körperseite gedreht, die linke, kaudale Flanke frei rasiert und dort ein subkutanes Depot mit Mepivacainhydrochlorid (100 µl, 10 mg/ml) appliziert. Im Anschluss erfolgte das Verlagern des Tieres auf den Rücken und es wurde auch ventral am Hals ein Mepivacainhydrochlorid-Depot (60 µl; 10 mg/ml) gesetzt. Nach einer einminütigen Wartezeit, bis zum Wirkungseintritt des Lokalanästhetikums, wurde in der Medianen auf Höhe der *Mandibulae* beginnend ein Längsschnitt am Hals gesetzt und bis zum Brustbein fortgeführt. Nun wurde die linke *Vena jugularis* stumpf frei präpariert und möglichst kranial mittels eines Fadens abgebunden. Daraufhin wurde sie mit einem kleinen Schnitt eröffnet und mittels eines handgezogenen Polyethylenkatheters kanüliert, welcher kranial und kaudal des Zugangs mittels eines Fadens fixiert wurde. Über diesen Zugang erfolgte zur zusätzlichen Anästhesie die Applikation einer Fentanyl-Dauertropfinfusion (5 µg/kg/h). Zudem wurden über einen weiteren Katheter der Fluoreszenzfarbstoff beziehungsweise die Infusionen mit Wirkstoff verabreicht. Im Anschluss wurde die linke *Arteria carotis* stumpf frei präpariert, kranial wiederum mit einem Faden abgebunden und an der kaudalsten Stelle mit einer Miniaturklemme abgeklemmt. Nach Eröffnung wurde die Arterie mit einem handgezogenen, heparinisierten Polyethylenkatheter kanüliert, der ebenso kranial und kaudal der Katheterisierung mit Hilfe eines Fadens befestigt wurde. Über diesen arteriellen Zugang erfolgte mittels Druckmessfühler die Messung des Blutdrucks und der Herzfrequenz während der Operation und des Versuchs. Die Narkosetiefe wurde durch das Fehlen des Zwischenzehenreflexes sowie die Kontrolle der Herzfrequenz und des mittleren arteriellen Blutdrucks überwacht. Zuletzt wurde das Tier auf die rechte Seite gelagert und die linke Niere nach Eröffnung der Bauchhöhle durch einen circa 1,5 cm-langen Schnitt hervorgezogen. Mittels eines Einzelhefts wurde der Flankenschnitt verkleinert und verhinderte ein selbstständiges Zurückverlagern der linken Niere. Im Anschluss wurde ein selbstgefertigtes Fenster mit Hilfe von Sekundenkleber auf die Niere aufgebracht, um atmungsbedingte Bewegungsartefakte während der mikroskopischen Aufnahmen zu verringern. Während der gesamten Operation und auch während der Mikroskopie wurde die Körpertemperatur mittels Rektalsonde überwacht. Am Ende des Versuchs erfolgte die Euthanasie des Tieres über einen intravenösen Bolus mit Pentobarbital-Natrium (400 mg/kg KGW).

5.1.4 Beschaffenheit und Vorbereitung von Wheat Germ Agglutinin - Fluorescein zur Visualisierung der glomerulären endothelialen Glykokalyx

Beim *Wheat Germ Agglutinin* (WGA)-Fluorescein handelt es sich um ein Lektin des Weizenkeims (*Triticum vulgare*), das an den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (lt. Hersteller: Ex: 494 nm; Em: 518 nm) gekoppelt ist. Es bindet im Organismus N-Acetylglucosamine und Sialinsäuren. Da beide Komponenten zu den Bestandteilen der glomerulären endothelialen Glykokalyx zählen, ist das WGA-Fluorescein besonders für seine Visualisierung geeignet (Kataoka et al. 2016).

Für die Applikation wurde das Wheat Germ Agglutinin (WGA)-Fluorescein als lyophilisiertes Pulver zunächst in steriler 0,9%-iger Kochsalzlösung entsprechend den Anweisungen des Herstellers gelöst (10 mg/ml). Um eine homogene Farbstofflösung ohne extrem kleine Partikel zu erhalten, wurde nach dem ersten Schritt die Lösung in einem Zentrifugenkonzentrator zentrifugiert (4 °C; 16100 g; fünf Minuten). Anschließend wurde die Lösung aliquotiert und bis unmittelbar kurz vor dem Gebrauch bei -20 °C eingefroren.

5.1.5 Intravitale Multiphotonenmikroskopie

Zu Beginn des Versuchs wurde die Ratte zunächst auf einem beheizbaren Mikroskopiertisch abgelegt und der Arterienkatheter mit einem Druckmessfühler zur Kontrolle des Blutdrucks und der Herzfrequenz verbunden. Der Mikroskopiertisch war mit einer runden Aussparung mit einem Durchmesser von circa 3 cm versehen, welche mittels eines runden Deckgläschen verschlossen wurde. Um den optischen Abstand zum Objektiv zu verringern, wurde auf dem Deckgläschen ein Tropfen Wasser aufgebracht, auf den anschließend das Fenster mit der Rattenniere so abgelegt wurde, dass das Tier mit der linken Körperseite auf dem Mikroskopiertisch zu liegen kam. Über einen Perfusor wurde die Aufrechterhaltung der Fentanyl-Dauertropfinfusion gewährleistet. Ebenso die Inhalationsnarkose mit 2,5 Vol. % Isofluran wurde am Mikroskop fortgeführt. Die Blutdruckmessdaten wurden zu Beginn, während und am Ende des Versuchs dokumentiert.

Im Anschluss wurde zunächst ein Glomerulum so fokussiert, dass die Kapillarschlingen in möglichst großer Ausdehnung dargestellt wurden. Daraufhin wurde das gelöste WGA-Fluorescein in einer Dosisierung von 0,3 µl/g KGW der Ratte über den Venenkatheter verabreicht. Die Markierung der glomerulären endothelialen Glykokalyx erfolgte unmittelbar nach Applikation. Bei jedem Versuch wurde zunächst eine basale Aufnahme und dann in 10- beziehungsweise 30-minütigen Abständen eine weitere Aufnahme angefertigt. Zu jedem Zeitpunkt wurden die Aufnahmen des Glomerulums in fünf Ebenen (mit einem Abstand von je 1 µm) dargestellt.

5.1.6 Einstellungen der Multiphotonenmikroskopie

Innerhalb eines Versuchs wurden stets zu jedem Zeitpunkt dieselbe Einstellung am LSM gewählt, welche direkt am PC über das *Zen black* angesteuert wurde. Bei einer Laserpower von 10 % und einer Wellenlänge von 800 nm wurde das fokussierte Glomerulum durch den Zweiphotonenlaser angeregt (NDD R3: 650; NDD R4: 600). Über eine Dauer von 7,75 s wurde jeweils ein Bereich in 40-facher Vergrößerung gescannt und auf dem PC wiedergegeben. Wie bereits erwähnt erfolgte die Darstellung des jeweiligen Glomerulums stets in fünf Ebenen. Dafür wurden mithilfe eines Z-Stapels die Koordinaten für die erste und letzte der fünf Ebenen festgelegt.

5.1.7 Fokussierter Laserschaden im Nierengewebe

Mit Hilfe der Crop-Funktion des *Zen black* ist es möglich, die Projektion des Laserstrahls bis auf einen Punkt im Bildbereich zu fokussieren. Um einen maximalen Effekt zu erhalten, wurde die Laserpower stets auf 100 % eingestellt und damit für vier Sekunden der gewünschte Bereich bestrahlt. Dies fand zum einen in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Prof. Castrop seine Anwendung, als festgestellt wurde, dass ein Laserschaden im Epithel des proximalen Tubulus eine Dichteabnahme der endothelialen Glykokalyx und damit eine erhöhte Filtration von Proteinen zur Folge hatte. Zum anderen wurde die Funktion in einer eigenen Versuchsreihe eingesetzt, bei der der Einfluss von Hydrocortison auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx nach einem Laserschaden im proximalen Tubulusepithel untersucht wurde. Eine Erläuterung des Versuchsaufbaus folgt im nächsten Abschnitt.

5.1.8 Vorbereitung und Applikation einer Infusion mit PAPP-A2, PAPP-A, CXCL14, Semaphorin-3C und Hydrocortison

Um den Effekt parakriner Faktoren auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx zu untersuchen, wurden diese in Form von Infusionen für die intravenöse Verabreichung bereitgestellt. Die jeweiligen Infusionen wurden stets einen Tag vor Versuchsstart unter sterilen Bedingungen vorbereitet. Dafür wurde der zu verdünnende Wirkstoff auf Eis unter den Abzug einer Sicherheitswerkbank verbracht, dort mit steriler 0,9%-iger Kochsalzlösung verdünnt, gevortext und die fertige Lösung in eine 1 ml-Spritze aufgezogen. Eine Zugabe von isotoner Natriumchloridlösung diente dazu, die Applikation über den Katheter zu erleichtern, da die reine Gabe des Wirkstoffs aufgrund der geringen Volumina nicht möglich gewesen wäre. Bis unmittelbar kurz vor dem Gebrauch wurden die Infusionsspritzen bei -20 °C gelagert.

Die Wirkstoffe wurden mit den folgenden Volumina an NaCl-Lösung vermischt:

Wirkstoff	Volumen der Stocklösung	Endvolumen der Infusion	Molarität der Infusion
PAPP-A	19 µl	419 µl	136 nM
PAPP-A2	30 µl	430 µl	244 nM
CXCL14	8 µl	408 µl	1280 nM
Semaphorin-3C	20 µl	420 µl	110 nM

Nach dem Anfertigen der basalen Aufnahme als Kontrollintensität der endothelialen Glykokalyx wurde die jeweilige Infusion an den Venenkatheter angeschlossen und mit einer Infusionsrate von 10 µl/min infundiert. Im Verlauf des Versuchs wurde zunächst direkt nach dem Infusionsstart und dann in 10- beziehungsweise 30-minütigen Abständen eine Aufnahme angefertigt. Außerdem wurde bei jeder Aufnahme darauf geachtet, dass die Form des Glomerulums der der basalen Aufnahme entspricht. Da das Glomerulum in der Bowman-Kapsel statisch nicht verankert ist, sondern auch zu einer Bewegung fähig ist, musste die Ebene an mancher Stelle korrigiert werden, damit die Messbereiche vergleichbar waren. Für das Auftreten dieser Bewegung war kein eindeutiger Trend erkennbar. Im Falle einer Bewegung korrelierte dies auch nicht mit einer Blutdruckveränderung.

Damit das Hydrocortison ausreichend im Organismus anfluten kann, wurde es bereits am Ende der Operation noch vor der basalen Aufnahme des Glomerulums als Bolus (50 mg/ml) verabreicht. In einer Dosierung von 1 µl/g KGW wurde der Bolus an das Körpergewicht der Ratte angepasst.

5.1.9 Vorbereitung und Applikation einer Infusion mit 0,9%-iger Natriumchloridlösung

Als Kontrolle zu den Infusionen mit einem Wirkstoff wurden zufällig ausgewählte, sowohl männliche als auch weibliche MWF Ratten über die gleiche Zeit hinweg mit einer 0,9%-igen Natriumchloridlösung (gleicher Volumenfluss und gleiche Infusionsdauer wie bei den Infusionen mit den Aktivsubstanzen) infundiert und währenddessen Aufnahmen von der glomerulären endothelialen Glykokalyx angefertigt, die vorab mit WGA-Fluorescein markiert wurde.

5.2 *In vitro*-Versuche mit humanen renalen glomerulären endothelialen Primärzellen (HRGEC)

Um das Verhalten und die Kinetik der renalen glomerulären Endothelzellen auch *in vitro* beurteilen zu können, wurden humane renale glomeruläre endotheliale Primärzellen (HRGEC) in Kultur gebracht und ebenso behandelt.

5.2.1 Vorbereitung des Zellmediums

Einen Tag vor dem Versuchsstart wurden die Komponenten für das Endothelzellmedium im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und anschließend unter dem Abzug unter sterilen Bedingungen zum sogenannten Medium_{full} miteinander vermischt. Enthalten waren 500 ml basales Endothelzellmedium, 25 ml fetales Kälberserum, 5 ml endotheliales Wachstumssupplement sowie 5 ml einer Penicillin-Streptomycin-Lösung. Außerhalb des Gebrauchs wurde es stets im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

5.2.2 Kultivierung und Handling von HRGEC

Für die Kultivierung der glomerulären Endothelzellen wurde die Zellsuspension mit 500.000 Zellen/ml aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Im Anschluss wurde die aufgetaute Zellsuspension unter dem Abzug der Sicherheitswerkbank verbraucht. Nach Aliquotierung der Lösung wurde eine Zellfraktion vorsichtig in ein 50 ml-Falcon mit 15 ml vorgewärmtem Medium gegeben, um tote Zellen und alle potenziell zellschädigenden Substanzen aus der Zellsuspension zu waschen. Dafür erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 37 °C und 402 g. Danach wurde das überstehende Medium unter dem Abzug vorsichtig abgenommen, verworfen sowie die restliche Zellsuspension mit dem Zellpellet am Falconboden zu einer homogenen Zellsuspension resuspendiert. Nun erfolgte die gleichmäßige Aufteilung des Volumens auf die Zellkulturschalen (24-well-Platte) beziehungsweise die Kanälchen der μ -Platte. Die Zellmenge wurde so gewählt, dass pro Zellkulturschale beziehungsweise Kanal 6000 bis 8000 Zellen ausgesät wurden. Unter diesen Bedingungen wurden die Zellen noch zwei weitere Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, während jeweils nach 24 Stunden ein Wechsel des Mediums erfolgte. Das Wachstumsverhalten und die Vitalität sowie das Vorhandensein der Fluoreszenz der Zellen wurde am zweiten und dritten Tag nach dem Aussäen am Mikroskop kontrolliert.

Die Beschreibung der Kultivierung von HRGEC in einer Zellkulturplatte wird an späterer Stelle im Rahmen einer Immunzytochemie fortgeführt.

5.2.3 Aufbau der Kurzzeitversuche

Für die Behandlung der Zellen wurden unmittelbar vor Versuchsstart die Wirkstoffe mit Medium_{full} in folgenden Konzentrationen verdünnt:

Wirkstoff	Verdünnung	Endvolumen
PAPP-A2	1 zu 9 (388 nM)	60 µl
CXCL14	1 zu 10 (7500 nM)	
Sema3C	1 zu 10 (233 nM)	

Die verwendeten µ-Platten sind Träger von insgesamt 6 Kanälen, die jeweils 60 µl an Volumen fassen können und über jeweils zwei Reservoirs befüllt werden können. Mittels Kapillarkräften wird beim Befüllen die Flüssigkeit in den Kanal gezogen. Darum ist es wichtig, dass die Reservoirs während der Inkubation der Zellen stets mit Flüssigkeit gefüllt sind, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Vor dem Start der Behandlung wurden die Vitalität und die Menge der Zellen unter dem Mikroskop geprüft. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen teils Kontakt zueinander haben, teils auch frei liegen, um die zur einzelnen Zelle zugehörige Glykokalyx zu den benachbarten Zellen abgrenzen können. Zudem sollte dadurch die Ausbildung der Glykokalyx mit und ohne Zellkontakt beurteilt werden.

In diesen Versuchen fand PAPP-A keine Anwendung, da der Fokus auf Substanzen der MD-Zellen gesetzt wurde.

5.2.3.1 Visualisierung der endothelialen Glykokalyx mittels WGA

Für die Darstellung der endothelialen Glykokalyx der HRGEC wurde ebenso das WGA-Fluorescein gewählt. Dafür erfolgte vorab seine Verdünnung mit *Hank's balanced salt solution++* (HBSS++) in einer Konzentration von 10 µg/ml. Um die Vitalität der Zellen beurteilen zu können, wurden deren Zellkerne zusätzlich mit DAPI in einer Konzentration von 12,5 µg/ml angefärbt. Für die Färbung wurde zunächst das Medium aus den Reservoirs abgenommen und die Zellen daraufhin mit vorgewärmter HBSS++ gewaschen, um alle Mediumbestandteile zu entfernen. Direkt im Anschluss erfolgte die Färbung der Zellen für zehn Minuten, die danach wiederum mit HBSS++ gewaschen wurden, um alle ungebundenen Farbstoffpartikel abzunehmen. Für die Mikroskopie wurden die Reservoirs mit frischem Medium_{full} befüllt, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern und ihre Vitalität zu erhalten. Um möglichst optimale Lebensbedingungen während der Mikroskopie zu schaffen, wurden die Zellen am Mikroskop auf eine Wärmeplatte mit 37 °C verbracht und mit einer

Abdeckung versehen, die ein Auskühlen der Zellen verhinderte und eine Begasung mit 5 % CO₂ ermöglichte.

5.2.3.2 Einstellungen für die konfokale Mikroskopie

Für die visuelle Darstellung und die mikroskopischen Aufnahmen der HRGEC wurde am konfokalen Mikroskop ein Argon-Laser verwendet, der die benötigten Wellenlängen für die Anregung von WGA-Fluorescein ($\lambda = 488 \text{ nm}$) und DAPI ($\lambda = 405 \text{ nm}$) erreichen konnte. Mit einer Power von 55 % beziehungsweise 65 % erfolgte die Anregung des WGA-Fluorescein beziehungsweise DAPI. Der Bildausschnitt wurde in einer 40fachen Vergrößerung festgehalten und eine Rahmengröße von 1024 x 1024 wurde gewählt, um mit einer Aufnahme möglichst viele Zellen abzubilden.

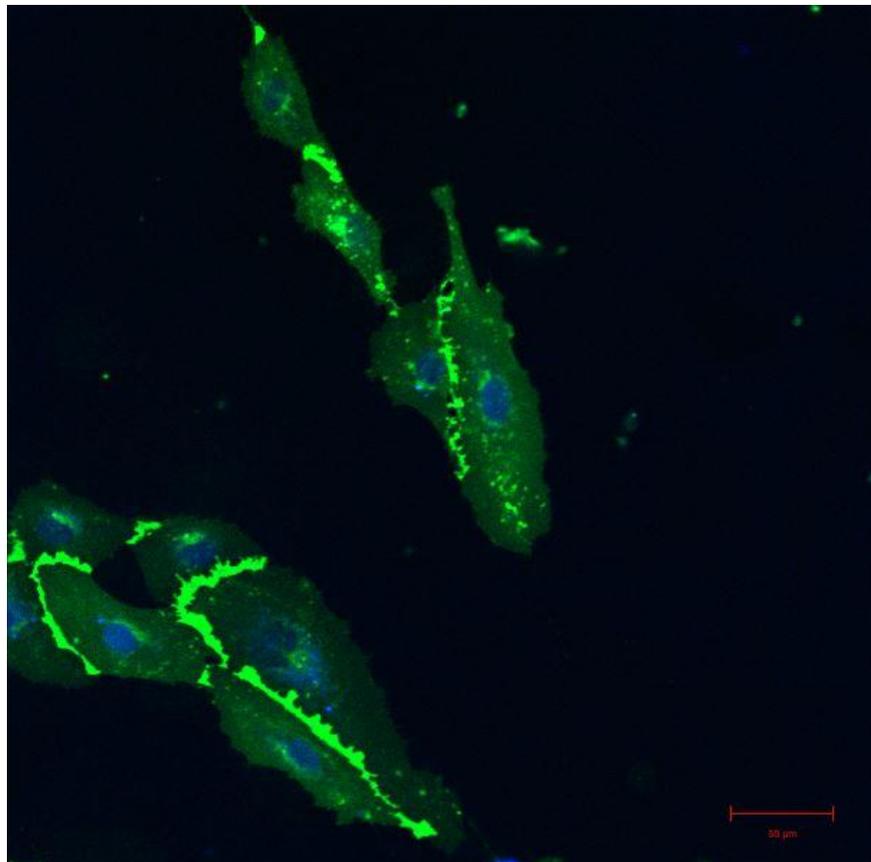


Abbildung 3: HRGEC nach einstündiger Behandlung mit PAPP-A2: Die glomeruläre endotheliale Glykokalyx wurde mit Wheat germ agglutinin-Fluorescein (grün) angefärbt, die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die Skala zeigt 50 µm an.

5.2.3.3 Vermessung der Dichte und Fläche der endothelialen Glykokalyx

Um den Einfluss der Wirkstoffe auf die Struktur der endothelialen Glykokalyx beurteilen zu können, wurde diese zunächst an unbehandelten (= basalen) Zellen vermessen. Dabei wurde einerseits die Intensität des WGA-Fluoresceins, welches die Glykokalyx einer einzelnen Zelle markiert hat, und andererseits die Fläche der angefärbten Glykokalyx einer Einzelzelle ermittelt. Daraus ergab sich eine mittlere Intensität pro Flächeneinheit.

Im folgenden Abschnitt erfolgt die Erläuterung der *in vitro*-Versuche mit den interstitiellen PDGFR- β -positiven Zellen. Dies schließt die Experimente sowohl zur Migrationskapazität als auch zur Quantifizierung ihres profibrotischen Potenzials mittels Western Blots ein.

5.3 *In-vitro*-Versuche mit PDGFR- β -positiven Zellen

5.3.1 Migrationsassay

Der Anteil von renalen interstitiellen PDGFR- β -positiven Zellen an regenerativen Prozessen in der Niere wurde bereits in der Einleitung thematisiert und erörtert. Offen bleibt jedoch, durch welche Signale diese Zellen zum Ort des Defekts wandern können. Um dies genauer beurteilen zu können, wurden Migrationsversuche mit diversen Lockstoffen durchgeführt und das Wanderungsverhalten der Zellen ausgewertet.

5.3.1.1 PDGFR- β +/*Cre* Mauslinie

In einer universitätsinternen Haltung wurden Mäuse von beiden Geschlechtern mit dem Genotyp *Cg-Tg (Pdgfrb-cre/ERT2)/Polr2a<tml(CAG-GCaMP5g tdTomato)TvrD>/K* gezüchtet. Sie wurden unter denselben Bedingungen wie die MWF-Ratten, jedoch in anderen Tierhaltungsräumen als diese, gehalten. Nach Entnahme der Nieren und enzymatischer Zellvereinzelnung wurden die PDGFR- β -positiven Zellen aufgrund ihrer Transgenexpression von dem Fluoreszenzprotein GFP (*green fluorescent protein*) in der Durchflusszytometrie (FACS, *Fluorescence activated cell sorting*) identifiziert und in einem Auffanggefäß selektiert aufgefangen.

5.3.1.2 *Aufarbeitung von murinen Nieren für Fluorescence activated cell sorting von PDGFR- β -positiven Zellen*

Vor dem Versuchsstart wurden zunächst Pronase E und Kollagenase II für den enzymatischen Verdau der Nieren in HBSS++ gelöst und die Percoll-Lösung mit HBSS++ für die Dichtegradientenzentrifugation hergestellt. Unmittelbar nach dem Töten der Mäuse mittels Genickzug wurden jeweils die beiden Nieren entnommen, ihre Kapsel entfernt und pärenchenweise in ein Schälchen auf Eis gegeben. Nun wurden die Nieren für sterile Bedingungen unter den Abzug der Sicherheitswerkbank verbracht. Dort erfolgte zunächst das Zerkleinern der Nieren durch Zerschneiden und dann ihr Vermischen mit der Enzym-Lösung in einem Falcon. Nach einem 40-minütigen Verdau bei 37 °C wurden das Falcon wieder auf Eis gestellt und das enzymatisch aufgespaltene Gemisch durch ein Nylonsieb mit einer Porengröße von 100 μm gepresst. Alle verwendeten Materialien wurden im Anschluss mit HBSS++ gespült. Darauf folgten noch zwei weitere Zentrifugationsschritte bei 4 °C, zwischen denen das verdaute Organgemisch nochmals durch ein Nylonsieb mit einer geringeren Porengröße (40 μm) gepresst wurde. Nach der zweiten Zentrifugation erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation mittels Percoll-Lösung, indem die Nierenlösung bei 4 °C ohne Bremsvorgang zentrifugiert wurde. Die daraufhin entstandene Interphase wurde nun in FACS-Röhrchen überführt, darin mit basalem Medium und fötalem Kälberserum (FCS) versetzt und nochmals zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde der Rest in PBS aufgenommen, steril filtriert und in basales RPMI-Medium gegeben, das mit FCS versetzt wurde. Anschließend wurde diese Lösung direkt für den Transport zum FACS vorbereitet. Die Durchflusszytometrie erfolgte in einem externen Labor des Universitätsklinikums in Regensburg (AG PD Dr. Hoffmann). Während des Transports sowohl der Zellsuspension als auch der isolierten Zellen wurde das Probenmaterial stets auf Eis gelagert.

5.3.1.3 *Kultivierung und Handling von PDGFR- β -positiven Zellen*

Für das Kultivieren der PDGFR- β -positiven Zellen wurde ein basales, besonders glucosereiches Medium unter sterilen Bedingungen mit 5 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,5 % Amphotericin B versetzt. Wenn das Medium_{full} nicht benötigt wurde, wurde es stets bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Die frisch gesorteten Zellen wurden nach Rückkehr aus dem externen Labor umgehend von der Lagerung auf Eis in einer vorgekühlten Zentrifuge herunterzentrifugiert, der Überstand abgenommen, in frisches Zellmedium verbracht und zunächst auf einem einzelnen Zellschälchen ausgesät. Während die Zellen bis zur Konfluenz gezüchtet wurden, wurde das Medium im zweitägigen Rhythmus gewechselt. Die Konfluenz des Zellverbandes, das generelle Wachstumsverhalten sowie die

Vitalität der Zellen wurden am Mikroskop regelmäßig kontrolliert. Als der Zeitpunkt der Konfluenz erreicht war, wurden die Zellen zunächst mit Trypsin-EDTA beschichtet (= trypsiniert), um sie vom Zellschälchen abzulösen. Anschließend wurde die Zell-Trypsin-Suspension zur Entfernung von Trypsinresten mit frischem Medium verdünnt und danach zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde die restliche Zell-Medium-Suspension nochmals mit frischem Medium verdünnt, zu einem homogenen Gemisch resuspendiert und auf eine größere Anzahl an Zellschälchen gesplittet.

5.3.1.4 *Ablauf eines Migrationsassay*

Da der eingesetzte Migrationsassay eine hohe Zelldichte benötigt, wurde für jeden Versuchsansatz je μ -Slide ein konfluentes Zellschälchen verwendet. Dafür wurden die Zellen eines Schälchens zunächst trypsiniert. Nach einer Zentrifugation mit frischem Medium_{full} wurde dies weitgehend bis auf einen kleinen Rest abgenommen. Der Rest an Zellsuspension wurde mittels Resuspendieren homogenisiert und konnte daraufhin in dem dafür vorgesehenen Kanal des μ -Slides mit einem Volumen von 6 μ l eingebracht werden. Dafür wurde das Volumen über einen Zugang (A) lediglich auf die Öffnung pipettiert und über die Aspiration von Luft am gegenüberliegenden Zugang (B) in den Kanal (1) gesogen. Links und rechts vom Kanal wurde auf der einen Seite (3) eine Negativkontrolle eingegeben, während das andere Reservoir (2) den potenziell chemotaktischen Wirkstoff beinhalten konnte. Bevor das Reservoir mit dem Lockstoff befüllt werden konnte, wurde zunächst frisches Medium_{full} eingegeben, das dann teilweise durch Eingabe auf der einen und Aspiration auf der gegenüberliegenden Seite verdrängt wurde. Die Inkubation des potenziell chemotaktischen Wirkstoffes dauerte jeweils 24 h und erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. Währenddessen wurde das Wanderungsverhalten der Zellen in einer 10fachen Vergrößerung mikroskopisch beobachtet und über eine Videofunktion aufgezeichnet. Dabei wurde *AxioVision 4* als Software verwendet.

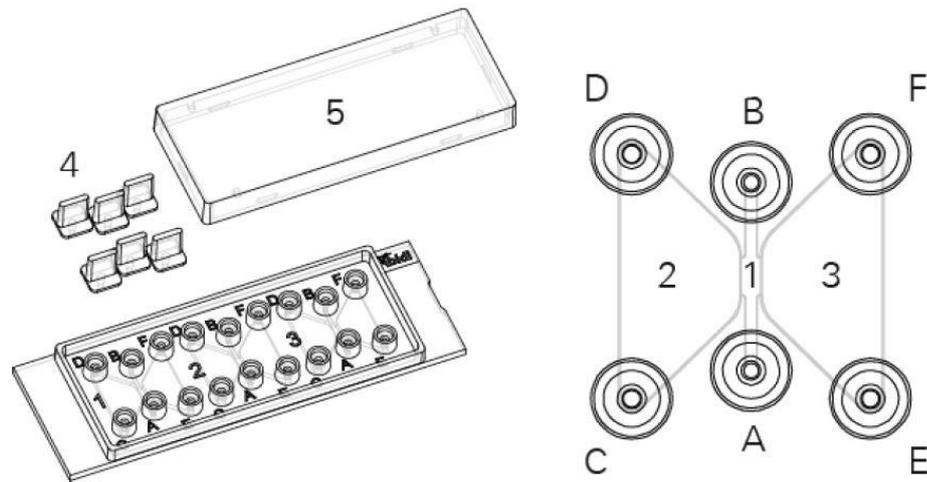


Abbildung 4: Aufbau des μ -Slides für den Migrationsassay (ibidi): links: Bestandteile eines Assays mit drei Kanälen (1-3) und je zwei Kammern, den Stempeln (4) für den Verschluss der Zugänge (A-F) und einer Abdeckung (5); rechts: vergrößerte Ansicht eines Zellkanals (1) mit zwei Zugängen (A+B) und zwei sich daran anschließenden Reservoiren (2+3) mit je zwei Zugängen (C+D bzw. E+F).

5.3.1.5 Vorbereitung und Verdünnung der Wirkstoffe

Für die Migrationsversuche kamen folgende Substanzen zum Einsatz:

Substanz	Verdünnung in Medium _{full}
Rekombinantes humanes PDGF-DD	7 μ M Lösung in Medium _{full}
Muriner Urin (gleicher pH wie Medium _{full})	unverdünnt
Denaturierter muriner Urin (3 Min, 70 °C)	unverdünnt
Murines FGF-9	50 ng/ml
Hyaluronsäure	2,5 mg/ml
EGF	10 μ g/ml
Prostaglandin I ₂	50 μ g/ml
Natives murines Albumin	10 ng/ml
Rekombinantes THP	10 μ g/ml
Trapidil	100 μ g/ml, dann PDGF-DD (s.o.)

Diese Substanzen wurden vor dem Versuchsstart noch am gleichen Tag unter sterilen Bedingungen vorbereitet und mit frischem Medium_{full} verdünnt.

5.3.1.6 *Auswertung der Migrationsversuche*

Für die Auswertung wurde vom Hersteller der μ -Slides ein *Chemotaxis and Migration Tool* bereitgestellt. Darin wurden zunächst die getrackten Zellbewegungen geladen und auf einer x-y-Achse aufgetragen. Im Anschluss erfolgte die Kalibrierung der Daten, indem die Länge eines Pixels in μm , die Anzahl der Bilder und die Zeit zwischen den Aufnahmen vorgegeben wurde. Die Null-Achse wurde dabei als Startpunkt der Zellen gesetzt. Die Strecke jeder einzelnen Zelle wurde dann von Hand ausgewertet und dokumentiert.

5.3.2 Induktion fibrotischer Aktivität

Neben ihrer Fähigkeit zur Migration und der Reaktion auf chemotaktische Signale wurde auch untersucht, ob und in welchem Ausmaß PDGFR- β -positive Zellen profibrotisch wirken. Dafür wurde vorab das Vorkommen von extrazellulärer Matrix in den interstitiellen Zellen geprüft. Im Anschluss daran wurden die Zellen zunächst mit Zytokinen als profibrotische Stimuli behandelt und dann über die Herstellung von Zellysats ihr profibrotisches Potenzial mittels Western Blots quantifiziert.

5.3.2.1 *Nachweis von extrazellulärer Matrix in interstitiellen Zellen*

Um die profibrotischen Eigenschaften der PDGFR- β -positiven Zellen zu prüfen, wurde eine Immunzytochemie mit unbehandelten Zellen angefertigt. Zum Einsatz kamen Antikörper für Kollagen I (1:500 Verdünnung), Kollagen III (1:100), Decorin (1:100) und Fibronectin (1:500). Die Methode wird im Abschnitt 5.4.3.2 näher erläutert. Auf den Ergebnissen basierend wurden im weiteren Verlauf des Projekts passende Antikörper für die Proteinquantifizierung mittels Western Blots etabliert.

5.3.2.2 *Verdünnung der profibrotischen Stimuli (IL-1 β , IL-17A, TNF- α , TGF- β 1, PDGF-BB)*

IL-1 β , IL-17A, TGF- β 1 und PDGF-BB waren bereits vom Hersteller in Lösung gebracht. TNF- α wurde als lyophilisiertes Pulver geliefert und unter sterilen Bedingungen in PBS gelöst. Nach Aliquotierung der Stocklösung mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurden die Fraktionen bis zum Gebrauch bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Testsubstanzen wurden unmittelbar vor Versuchsstart unter sterilen Bedingungen verdünnt und schließlich in den folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Substanz	Verdünnung mit Medium _{full}	Endvolumen
IL-1 β	50 bzw. 100 ng/ml	500 μ l pro well
IL-17A	50 bzw. 100 ng/ml	
TNF- α	50 bzw. 100 ng/ml	
TGF-1 β	2 bzw. 10 bzw. 20 ng/ml	
PDGF-BB	48 ng/ml	

5.3.2.3 Versuchsaufbau mit anschließender Proteinlysatherstellung

Zum Zeitpunkt des Versuchs betrug das Alter der Zellen seit der Durchflusszytometrie 7 bis 11 Wochen. Nachdem eine weitgehend vollständige Konfluenz des Zellverbandes mittels Fluoreszenzmikroskop kontrolliert und bestätigt wurde, wurde das Medium an der Sicherheitswerkbank zunächst abgenommen und anschließend durch Medium ersetzt, das die jeweilige Testsubstanz enthielt und für 4h auf den Zellen verblieb. Als Kontrolle dienten jeweils konfluente Zellen, die für 4h mit frischem Medium_{full} kultiviert wurden. Anschließend wurden die Zellen nach zwei Waschgängen mit 4 °C kalter PBS entweder noch weitere 15 Minuten mit PDGF-BB (48 ng/ml) behandelt oder wurden mittels RIPA-Puffer der Zelllysatherstellung zugeführt. Letzterer Schritt erfolgte auch im Falle einer zusätzlichen Behandlung mit PDGF-BB. Ihm gingen ebenso zwei Waschgänge mit PBS voraus. Dafür wurden 100 μ l RIPA-Puffer auf die gewaschenen Zellen pipettiert und die Kulturschale für fünf Minuten bei -80 °C weggefroren. Das angefrorene Zelllysate wurde nun an der Sicherheitswerkbank mittels Zellschaber so an den Schalenrand geschoben, dass es mit der Pipette aufgenommen und in ein steriles Reagiergefäß auf Eis gegeben werden konnte. Nach einer Zentrifugation (4 °C; 16100 g; zehn Minuten) wurden die Zelllysate jeweils zu einer homogenen Lösung (inkl. Kernpellet) resuspendiert und schließlich bei -20 °C bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration gelagert.

5.3.2.4 Quantifizierung der Proteinmenge mittels BCA Protein Assay

Das Pierce BCA Protein Assay Kit dient der unspezifischen, quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung. Als Referenz fungiert dabei eine Standardkurve aus BSA-Lösungen. Mittels Spektralphotometer wurden die jeweiligen Absorptionen gemessen und ins Verhältnis zu den Werten der Standardkurve gesetzt.

Der BCA Protein Assay basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Protein im basischen Medium. Mit sehr hoher Empfindlichkeit und Selektivität detektiert die Bicinchoninsäure daraufhin kolorimetrisch die Kupfer-Kationen (Cu^{1+}). In einem ersten Schritt kommt es zur Chelatisierung von Kupfer mit Protein in einem alkalischen Milieu, welche zur Bildung eines hellblauen Komplexes führt und auch als Biuretreaktion bezeichnet wird. Dabei bildet sich ein farbiger Chelatkomplex zwischen Peptiden mit drei oder mehr Aminosäureresten und Kupferionen. Im nächsten Schritt reagieren BCA und das reduzierte Cu^+ , indem eine Chelatisierung zweier BCA-Moleküle mit einem Kupferion eintritt. Daraufhin verfärbt sich die Lösung intensiv violett. Der entstandene hydrophile BCA-Kupfer-Komplex zeichnet sich bei ansteigenden Proteinkonzentrationen durch eine lineare Extinktion bei 562 nm aus. Im Anschluss wurde die Quantifizierung der Proteinmenge der jeweiligen Lysate mittels des Programms ND-1000 V3.8.1 durchgeführt.

Nach Ermittlung der absoluten Proteinkonzentration des jeweiligen Lysates wurden die benötigten Volumina und ihre Verdünnungen für die Quantifizierung des Zielproteins mittels einer Excel-Tabelle berechnet. Ebenso die Volumina vom Probenpuffer wurden damit festgelegt.

5.3.2.5 Proteinquantifizierung von Zelllysate mittels Western Blot

Um im Detail beurteilen zu können, ob und in welchem Ausmaß PDGFR- β -positive Zellen zur Produktion von extrazellulärer Matrix fähig sind, wurden die Zelllysate auf ihren Gehalt an Decorin, Fibronectin sowie Kollagen I geprüft.

Vorbereitung der Lysatproben und der Pufferlösungen

Anhand der Berechnung der benötigten Volumina mittels Excel-Tabelle wurden die Proben einen Tag vor Versuchsbeginn auf Eis vorbereitet und im Anschluss bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Dabei wurde für die Bestimmung von Decorin $15\text{ }\mu\text{g}$ sowie von Fibronectin und Kollagen I $10\text{ }\mu\text{g}$ Protein eingesetzt. Die Proben wurden stets mit RIPA-Puffer verdünnt. Die Lysate für die Bestimmung von Decorin und Fibronectin wurden auf $20\text{ }\mu\text{l}$ Volumen mit $5\text{ }\mu\text{l}$ Gel loading dye + DTT versetzt. Proben für Kollagen I wurden auf ein Volumen von $18\text{ }\mu\text{l}$ verdünnt und enthielten zusätzlich $6\text{ }\mu\text{l}$ Lämmli-Puffer. Durch Vortexen wurden die Proben homogenisiert.

Die Pufferlösungen für die Gelelektrophorese, den Proteintransfer und die anschließenden Waschgänge wurden stets frisch vorbereitet und auch nur für einen Versuch verwendet.

Der Laufpuffer 10X wurde mit folgenden Komponenten hergestellt (pH 8,5 – 8,7):

1l Laufpuffer	Tris-Base	30,24 g
	Glycin	147 g
	SDS	10 g
	Wasser	900 ml

Der Transferpuffer 10X enthielt folgende Komponenten (pH 8,9 – 9,2):

1l Transferpuffer	Tris-Base	58,2 g
	Glycin	29,3 g
	Wasser	950 ml

Für den Transferpuffer 1x wurden auf einen 1 Liter 100ml des Transferpuffer 10X, 700 ml Wasser und 200 ml Methanol abgemessen und vermischt.

Der Waschpuffer 10X wurde wie folgt hergestellt (pH 7,4 – 7,6):

1l Waschpuffer	Tris-Base	22,7 g
	Tris-HCl	127,5 g
	NaCl	58 g
	Magnesiumchloridhexahydrat	5,1 g
	Wasser	850 ml

Nachdem jeweils die Bestandteile der Rezepturen in Schraubflaschen abgewogen und auf 1 Liter Gesamtvolumen mit Milli Q-Wasser aufgefüllt wurden, wurden die Flaschen für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einen Magnetrührer gestellt, bis die pulverisierten Komponenten vollständig gelöst waren. Das Methanol des Transferpuffers wurde erst am Tag des Versuchs zum restlichen Puffer hinzugegeben. Da die Gelelektrophorese stets bei 4 °C in einer Kühlkammer durchgeführt wurde, wurden auch die Pufferlösungen vorab auf 4 °C vorgekühlt.

Ablauf und Einstellungen der Gelelektrophorese

Am Tag des Versuchs wurden für die Denaturierung der Proben diese zunächst in einen vorgewärmten Thermomixer gegeben. Die Einstellungen waren wie folgt:

Protein	Temperatur	Dauer
Decorin	56 °C	15 Minuten
Fibronectin	56 °C	10 Minuten
Kollagen I	37 °C	10 Minuten

Nach der Denaturierung wurden die Proben direkt auf Eis gestellt, gevortext und nach einer kurzen Zentrifugation bei 4 °C für die Überführung in das Proteingel vorbereitet.

Für die Gelelektrophorese wurde ein Tank Blot System eingesetzt, in das jeweils zwei Polyacrylamid-gele parallel eingespannt werden konnten. Dabei wurde stets ein 4 – 20%-iges Tris-Glycin Polyacrylamid-Gradientengel verwendet, das mit seinen Eigenschaften Proteine über einen großen kDa-Bereich auftrennen kann. Es fasst insgesamt 18 Spuren und seine Taschen können maximal ein Volumen von 30 µl aufnehmen. Während die erste Spur Träger des Längenstandards war, wurde die zweite Spur mit einem UJO-Lysat beladen, um auch einen internen Standard als Kontrolle und für die Wanderung und Detektion der Banden zu haben. Daran anschließend wurden die restlichen Spuren mit Proteinlysate gefüllt. Je nach Proteinnachweis wurden folgende zweistufige Einstellungen für die Gelelektrophorese gewählt:

	1. Schritt	2. Schritt
Decorin	100 V für 35 Min	200 V für 1 h 25 Min
Fibronectin	100 V für 35 Min	200 V für 2 h 25 Min
Kollagen I	100 V für 35 Min	200 V für 1 h 25 Min

Nach dem Start der Gelelektrophorese erfolgte eine senkrechte Auftrennung des Proteinlysats nach der Proteingröße.

Vorbereitung, Ablauf und Einstellungen für den Proteintransfer

In den folgenden Schritten lag ein besonderes Augenmerk darauf, dass ein Austrocknen sämtlicher Komponenten stets vermieden wurde, da dies einen negativen Einfluss auf das Endergebnis hatte. Darum wurden vor Entnahme des Proteingels aus dem Laufpuffer zunächst die Nitrocellulosemembranen, die Filterpapiere und auch die Schlitten mit den Schwämmen in methanolhaltigem

Transferpuffer getränkt. Ebenso das Proteingel wurde nach vorsichtigem Öffnen der Plastikkammer mit Transferpuffer begossen. Überflüssige Gelanteile an den Rändern, die keine Proteine enthielten, wurden mit einem Spatel abgetrennt und entsorgt. Das verkleinerte Gel wurde nun von der Plastikschaablone auf eine doppelte Schicht an puffergetränktem Filterpapier übertragen und so direkt in Transferpuffer getaucht, dass das Gel oben lag. Nun erfolgte darauf ein bündiges Ablegen der Nitrocellulosemembran, welche wiederum von einer doppelten Lage an Filterpapier bedeckt wurde. Dieses geschichtete Paket wurde nun so zwischen den beiden Schwämmen der Blotting-schlitten gelegt, dass das Proteingel in Richtung Kathode und die Membran in Richtung Anode zeigte. Am Ende wurden die Schlitten verschlossen und in die dafür vorgesehene Einrichtung in der Blottingkammer gesteckt. Nach dem Schließen der Kammer wurde ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, sodass die Proteine vom Gel auf die Membran transferiert wurden. Dort verblieben sie aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen. Der Transfer dauerte 1 h und erfolgte bei Raumtemperatur und einer konstanten Spannung von 100 V, während der vorgekühlte Transferpuffer mittels Magnetrührstäbchen und Magnetrührer während der gesamten Transferzeit umgeschichtet wurde, um die Anheftung von Salzkomponenten des Puffers an die Nitrocellulosemembran zu verhindern. Eine Anheftung würde die Qualität des entwickelten Blots beeinträchtigen und ist darum stets zu vermeiden.

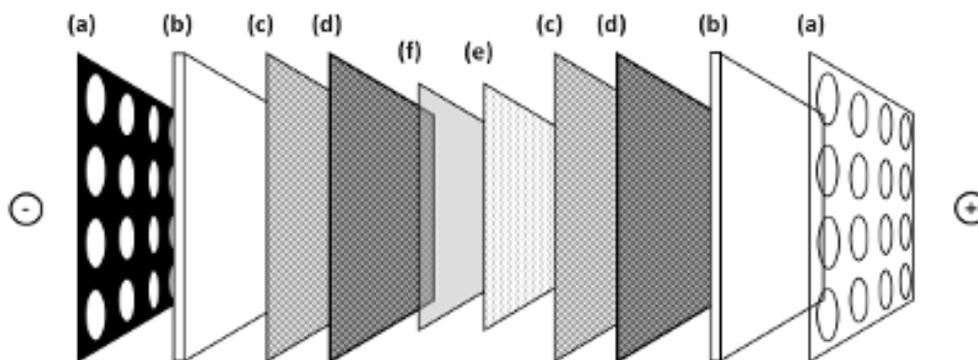


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Proteintransfers (Freyer 2015): (a): Schlitten; (b): Schwämme; (c) + (d): Filterpapier; (e): Nitrocellulosemembran; (f): Polyacrylamidgel; Der Proteintransfer erfolgt von der Kathode (-) zur Anode (+), hier im Bild von links nach rechts.

Kontrolle des Proteintransfers mittels Ponceau S-Färbung

Um den Erfolg und die rein adspektorische Qualität des Proteintransfers zu prüfen, wurde die Membran nach Abschluss des Transfers für fünf Minuten in einer Ponceau S-Lösung belassen und anschließend zweimalig für eine Minute in Millipore-Wasser gewaschen. Das Ponceau S hatte

keinerlei Einfluss auf die Qualität des jeweiligen Blots und wurde während des Blockiervorgangs in kürzester Zeit aus der Membran gewaschen.

Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen der Proteine

Der nächste Schritt hatte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der Proteine zum Ziel, um eine möglichst hohe Spezifität des primären und sekundären Antikörpers zu erreichen. Der Vorgang dauerte insgesamt 2 h und erfolgte beim Nachweis von Decorin mit einer fertigen Blockierlösung sowie beim Nachweis von Fibronectin und Kollagen I mit einer 1 % BSA Fraktion V-Lösung.

Bindung des primären Antikörpers

Für das Auftragen des primären und sekundären Antikörpers wurden flache Plastikschaalen an ihrem Boden mit Parafilm beklebt. Dies verhindert ein Verlaufen der Lösungen über die Membran hinweg. Der primäre Antikörper wurde für eine Inkubation über Nacht bei 4 °C aufgetragen. Alle primären Antikörper wurden in einer 1:500 – Verdünnung eingesetzt. Während der Antikörper für Decorin mit der bereits aufgeführten Blockierlösung verdünnt wurde, wurden die Antikörper für Fibronectin und Kollagen I in eine 0,5 % BSA Fraktion V-Lösung gegeben und auf die Membranen aufgebracht.

Bindung des sekundären Antikörpers

Nachdem die Lösungen mit dem primären Antikörper am nächsten Tag abgenommen wurden, wurden die Membranen fünfmal für 6 Minuten in frischem 1x Waschpuffer mit 0,05 % Tween 20 gewaschen. Währenddessen wurden die Lösungen für den sekundären Antikörper vorbereitet. Dafür wurde dieselbe Art von Lösungsmittel wie für den primären Antikörper verwendet. In einer 1:2500 – Verdünnung wurde stets derselbe Antikörper eingesetzt, der an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Nach dem Auftragen auf die Membranen folgte eine Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur, während die Membranen durch eine Abdeckung im Dunkeln lagerten. Nach dieser Inkubation wurden wieder fünf Waschgänge à 6 Minuten mit Waschpuffer durchgeführt. Im Anschluss lagerten die Membranen bis zur Entwicklung der Proteinbanden in 1x Waschpuffer ohne Tween 20.

Entwicklung und Darstellung der Proteinbanden mittels Chemilumineszenz

Die Entwicklung der Proteinbanden erfolgte stets am gleichen Tag wie die Inkubation des zweiten Antikörpers. Während am Imager als Aufnahmemodus der Multimodus gewählt wurde, wurden die Proteinbanden im Anschluss mittels Chemilumineszenz detektiert. Vor Entnahme der Membranen aus dem Waschpuffer wurden die beiden Chemilumineszenzreagenzien in einem 1:1 – Verhältnis in einem Falcon vermischt. Nachdem die Membran nun auf die am Imager dafür vorgesehene Platte aufgelegt wurde, wurde das Entwicklerreagenz aufgetragen und mit einer Folie abgedeckt, um die Membran vor dem Austrocknen zu schützen. Nach einer zweiminütigen Inkubation im Dunkeln wurde überschüssige Entwicklerlösung unter der Folie ausgestrichen und eine Aufnahme angefertigt.

Quantifizierung der Proteinbanden

Die Auswertung der entwickelten Western Blots wurde über das Programm *ImageJ* generiert. Dafür wurde zunächst die Aufnahme der entwickelten Membran mit den Proteinbanden im Programm geladen. Mittels eines programmierten Messwerkzeugs wurde nun die Pixeldichte der Proteinbande(n) ermittelt und als absolute Werte in eine Excel-Tabelle überführt. Dort erfolgte dann auch die weitere Berechnung der Daten für die statistische Auswertung. Hierfür wurde die Gesamtpixeldichte der jeweiligen Bande(n) stets zur Pixeldichte der Bande mit dem UUO-Nierenlysat ins Verhältnis gesetzt.

5.4 Histologische Methoden

Um die bereits gewonnenen Erkenntnisse auch auf Gewebe- beziehungsweise Zellebene zu untersuchen, wurden histologische Methoden eingesetzt. Anhand unterschiedlicher Protokolle wurden die zu untersuchenden Bereiche in der Niere immunhistologisch angefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie detektiert. Auf Gewebeebene wurden Paraffinschnitte erstellt, indem das Nierenmaterial mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert wurde. Diese Fixierung ist notwendig, um das Gewebe auszuhärten und autokatalytische Vorgänge zu unterbinden. Im nächsten Abschnitt wird dieser Schritt im Detail erläutert.

5.4.1 Retrograde arterielle Perfusionsfixierung

Zur retrograden arteriellen Perfusionsfixierung wurde die Ratte nach der Euthanasie (Pentobarbital 400 mg/kg KGW) auf einem Operationstisch abgelegt und dort fixiert. Mäuse wurden nach einer kurzen Inhalationsnarkose mit 5 Vol. % Isofluran mittels Genickzug getötet. Nach der Eröffnung der Bauchhöhle wurden die Darmschlingen außerhalb des Körpers verlagert und es erfolgte die Präparation der großen Bauchgefäße. Nun wurde die *Aorta abdominalis* eröffnet und mit einer Butterfly-Kanüle katheterisiert, welche mit einer Klemme fixiert wurde. Direkt im Anschluss wurde auch die *Vena cava caudalis* eröffnet, um einen Abfluss der Infusionslösung zu ermöglichen. Daraufhin wurde das Tier über die *Aorta abdominalis* mit heparinierter Natriumchloridlösung infundiert, um die Gefäße von Blutbestandteilen zu befreien. Dies wurde so lange fortgeführt, bis der Abfluss über die Vene weitgehend frei von Blut war und es folgte zur Gewebefixierung eine Infusion mit 3%-igem Paraformaldehyd (pH 7,35). Ein konstanter Perfusionsdruck von 70 mmHg wurde stets über eine Perfusionspumpe aufrechterhalten. Daraufhin wurden die perfundierten Nieren entnommen, von ihrer Kapsel befreit und in ihrer Längsachse halbiert. Die Nierenhälften wurden in einer Einbettkassette positioniert und zur Weiterverarbeitung bei 4 °C in 70%-igem Methanol gelagert.

5.4.2 Paraffineinbettung der Niere und Erstellung von Schnittpräparaten

Mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die perfundierten Nierenhälften schrittweise dehydriert, um sie danach bei 60 °C in flüssiges Paraffin zu verbringen und darin für 48 h zu inkubieren. Daraufhin erfolgte die eigentliche Einbettung der Nieren in flüssigen, in Formen vorgegossenen Paraffinblöcken. Darin wurden die Nieren mit ihrer Schnittfläche nach unten positioniert und ins Wasserbad gestellt, um ein Aushärten des Paraffins zu erreichen. Als die Aushärtung der Paraffinblöcke abgeschlossen war, wurden an einem Rotationsmikrotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die nach Glättung in einem erwärmten Wasserbad auf Objektträger aufgebracht wurden. Um eine sichere Fixierung der Schnitte auf dem Objektträger garantieren zu können, wurden diese über Nacht bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet.

5.4.3 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung ist bei der Immunhistochemie die Entfernung des Paraffins von den Schnittpräparaten erforderlich. Dies wurde mithilfe von Xylol und einer daran anschließenden aufsteigenden Alkoholreihe erreicht. Zunächst wurde je nach Bindungsaffinität des primären und sekundären Antikörpers ein individuelles Protokoll für jeden Antikörper etabliert und angepasst.

Der Ablauf der Immunzytochemie der HRGEC beziehungsweise der PDGFR dagegen wird im jeweiligen Abschnitt erläutert.

5.4.3.1 Immunhistochemie

Zunächst erfolgte eine Inkubation der Schnittpräparate in Citrat- oder TRIS/EDTA-Puffer bei 95 °C beziehungsweise Raumtemperatur. Nach anschließender Reinigung in PBS wurden die Objektträger in Inkubationskammern positioniert. Um die unspezifischen Bindungsstellen zu besetzen und damit die Spezifität des Antikörpers zu erhöhen, wurden die Gewebeschnitte entweder mit Horse serum (1 % BSA + 10 % HS in PBS) oder Triton-X 100 (5 % BSA + 0,3 % TX in PBS) blockiert. Der primäre Antikörper wurde nun in derselben Blockierlösung verdünnt und im Anschluss auf den Nierenschnitt aufgetragen. Die Inkubation des Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C in den Inkubationskammern, die währenddessen feucht gehalten wurden. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit Hilfe von PBS gewaschen und damit von ungebundenem primärem Antikörper befreit. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in der jeweiligen Blockierlösung verdünnt und auf die Schnitte pipettiert sowie für 1,5 h bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Ebenso wie beim primären Antikörper wurde nach der Inkubation ungebundener sekundärer Antikörper mit PBS entfernt. Am Ende wurden die Schnitte mittels *Dako Fluorescence Mounting Medium* und einem Deckgläschen eingebettet.

5.4.3.2 Immunzytochemie

Immunzytochemien wurden sowohl mit HRGEC als auch mit PDGFR- β -positiven Zellen durchgeführt. An dieser Stelle wird der Ablauf der Immunzytochemie mit den HRGEC exemplarisch dargestellt.

Nach Abschluss der Behandlung der HRGEC wurde das Medium abgenommen, verworfen und die Zellen mit kalter PBS-Lösung gewaschen. Alle nun folgenden Schritte liefen unter unsterilen Bedingungen ab. Zunächst wurde das PBS von den Zellen entfernt und diese mit 4%-igem Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert, um ihr aktuelles Zyklusstadium festzuhalten und sie damit haltbar zu machen. Nach der Inkubation wurde das PFA abgenommen und die Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung vorbereitet. Ebenso wie bei der Histologie von Gewebe ist es notwendig, vorab ein passendes Protokoll für jeden Antikörper zu etablieren. So wurden die Zellen nun mit Citrat- oder TRIS/EDTA-Puffer bei 95 °C beziehungsweise Raumtemperatur inkubiert. Die restlichen Arbeitsschritte wurden wie in 5.4.3.1 beschrieben durchgeführt. Die Färbung erfolgte allerdings

in Zellkulturschalen und die Zellen wurden am Ende nicht eingebettet, sondern mit Hilfe von PBS vor dem Austrocknen geschützt.

Die HRGEC wurden einerseits mit WGA-Fluorescein und DAPI angefärbt, um generell die Ausmaße der endothelialen Glykokalyx in physiologischem und behandeltem Zustand beurteilen zu können. Andererseits wurden in einem weiteren Schritt spezifisch Syndecan 1, Versican, Biglycan und die Hyaluronsäure als Bestandteile der Glykokalyx detektiert und eine mögliche Modulation dieser Bausteine nach einer Behandlung mit PAPP-A2, CXCL14/BRAK und Semaphorin-3C untersucht.

5.4.4 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie zeichnet sich durch zwei Charakteristika aus. Zum einen wird die Probe durch eine punktförmige Lichtquelle auf die Brennebene des Objektivs projiziert. Zum anderen wird das Bündeln des ausgesendeten Signals durch eine Lochblende begrenzt, die vor dem Detektor platziert ist und variabel eingestellt werden kann. Somit wird der Detektor vor Licht abgeschirmt, das außerhalb der Brennebene ankommt. Des Weiteren zeichnet sich die konfokale Mikroskopie durch eine sehr hohe Auflösung und präzise sowie schnelle Bildverarbeitung aus (Turillazzi et al. 2008).

Für die Darstellung der immunhistologischen Präparate wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop verwendet. Daran angeschlossene Laser mit verschiedenen Wellenlängen (405 nm, 458 nm, 488 nm, 514 nm, 543 nm, 633 nm) sorgten für die Anregung der Fluorophore des sekundären Antikörpers. Die Prinzipien der Entstehung von Fluoreszenz wurde bereits im Kapitel 2.6 beschrieben. Demzufolge erkennen interne Detektoren die emittierte Fluoreszenz und setzen die Signale zu einem vollständigen Bild zusammen.

5.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde über das Programm *Graph Pad Prism 5* generiert. Für unabhängige Vergleiche mit mehreren Stichproben wurde der *ANOVA-Test* mit *post-hoc-Korrektur* angewendet. Wurden lediglich zwei unabhängige Gruppen verglichen, erfolgte die statistische Prüfung mittels ungepaartem t-Test. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p), die weniger als 0,05 betrug, wurde eine bestehende Signifikanz zwischen den Ergebnissen angenommen, welche mit einem Stern gekennzeichnet wurde. Lag die Irrtumswahrscheinlichkeit von Ergebnissen bei kleiner als 0,01, wurde dies mit zwei Sternen dargestellt. Drei Sterne standen für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 0,001 und somit auch für p -Werte, die kleiner als 0,0001 waren.

6 Ergebnisse

6.1 *In vivo* - Modulation der endothelialen Glykokalyx durch parakrine Faktoren der Macula densa-Zellen

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Prof. Castrop konnte gezeigt werden, dass nach einem Laserschaden am proximalen Tubulusepithel die Dichte der glomerulären endothelialen Glykokalyx abnimmt. Wie dieser Prozess im Detail initiiert wird und welche Signalwege dabei eine Rolle spielen, ist bisher nicht bekannt. Dem Glomerulum und damit auch der endothelialen Glykokalyx ist der juxtaglomeruläre Apparat und im Speziellen die MD benachbart. Um die Hypothese zu prüfen, dass parakrine Faktoren aus den MD-Zellen die endotheliale Glykokalyx modulieren können, wurden MWF-Ratten jene Faktoren infundiert und die endotheliale Glykokalyx eines einzelnen Glomerulums mittels Intravitalmikroskopie im zeitlichen Verlauf beobachtet.

Zunächst wurde der Einfluss von PAPP-A2 auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx untersucht. Darauf folgten Versuche mit PAPP-A, CXCL14/BRAK, Semaphorin-3C, NaCl und Hydrocortison, deren Ergebnisse nun graphisch und statistisch erläutert werden. Die Versuchsreihe mit einer NaCl-Infusion diente als Kontrollgruppe. Alle Aufnahmen wurden stets über einen Zeitraum von 60 Minuten angefertigt. Der Zeitpunkt 0 steht für die Bezeichnung „basal“, während die Beschriftung „direkt“ stets eine Aufnahme unmittelbar nach Infusionsstart kennzeichnet. Alle weiteren zeitlichen Angaben beziehen sich ebenso auf den Infusionsstart (10 Min, 20 Min, 30 Min etc.). Außerdem wurde zum Zeitpunkt 0 (= „basal“) eine Dichte der endothelialen Glykokalyx von 100 % angenommen. Die Infusionsrate betrug stets 10 µl/Min. Bei jeder Versuchsgruppe wurden auch Aufnahmen in 30-minütigen Abständen erstellt, um zu prüfen, ob die Veränderung der Intensität durch eine laserbedingte Modulation des Farbstoffs verursacht wird. In dieser Arbeit wurde vorwiegend die Darstellung in 10-minütigen Abständen gewählt, um den zeitlichen Verlauf der Intensitätsveränderung zu verdeutlichen. Die Versuchsreihe mit PAPP-A bzw. CXCL14/BRAK wurden exemplarisch für die Darstellung mit 30-minütigen Abständen zwischen den Aufnahmen gewählt. PAPP-A gilt nicht als ein nachgewiesener Bestandteil der MD-Zellen und wurde vor allem aufgrund seiner Homologie zum PAPP-A2 eingesetzt.

6.1.1 Einfluss von PAPP-A2 auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx

Eine Infusion mit PAPP-A2 (244 nM) hatte bei einer Infusionsrate von 10 $\mu\text{l}/\text{Min}$ einen abschwächenden Effekt auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx. Nach 60 Minuten hatte die Intensität der mittels WGA-Fluorescein markierten Glykokalyx nur noch $78 \pm 4 \%$ ($n = 6$; $p = 0,0006$) der Ausgangsintensität zum Zeitpunkt 0 (Abbildung 6). Der mittlere Blutdruck der eingesetzten Ratten hatte zum basalen Zeitpunkt einen Wert von $102,2 \pm 7,45 \text{ mmHg}$.

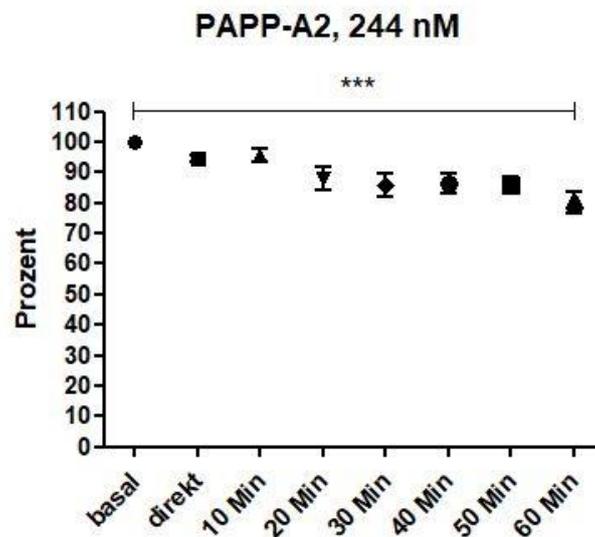


Abbildung 6: Einfluss von PAPP-A2 (244 nM) auf die prozentuale Intensität der endothelialen Glykokalyx eines einzelnen Glomerulums: Zwischen dem Zeitpunkt „basal“ und dem Zeitpunkt „60 Min“ kam es zu einer signifikanten Reduktion der Dichte der endothelialen Glykokalyx ($78 \pm 4 \%$; $n = 6$; $p = 0,0006$).

6.1.2 Einfluss von PAPP-A auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx

In einer weiteren Versuchsreihe wurde das PAPP-A als Infusion (136 nM) appliziert, da es eine 45%-ige Homologie zum PAPP-A2 besitzt und letzteres nach 60 Minuten eine Dichteabnahme der endothelialen Glykokalyx herbeiführte. 60 Minuten nach dem Start der PAPP-A-Infusion konnte ebenso eine signifikant reduzierte Dichte der endothelialen Glykokalyx ermittelt werden (Abbildung 7; $79 \pm 7 \%$; $n = 6$; $p = 0,0152$). Der basale mittlere Blutdruck der MWF Ratten betrug $101,3 \pm 11,3 \text{ mmHg}$.

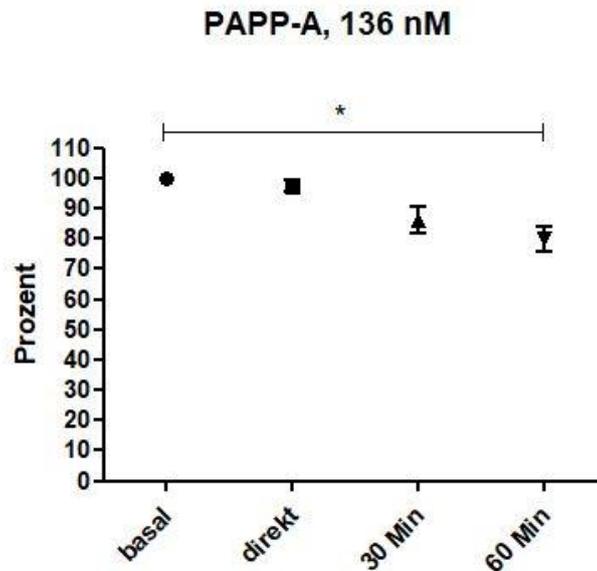


Abbildung 7: Einfluss von PAPP-A (136 nM) auf die prozentuale Fluoreszenzintensität der Glykokalyx eines einzelnen Glomerulums: Zwischen dem Zeitpunkt „basal“ und dem Zeitpunkt „60 Min“ kam es zu einer signifikanten Abnahme der Dichte der endothelialen Glykokalyx ($79 \pm 7\%$; $n = 6$; $p = 0,0152$).

6.1.3 Einfluss von CXCL14/BRAK auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx

Eine Infusion mit 1280 nanomolarem CXCL14/BRAK (hier und an späterer Stelle gleichbedeutend mit CXCL14) hatte bei Aufnahmen in 10-minütigen Zeitabständen bei 60 Minuten nach Versuchsstart einen signifikant reduzierenden Effekt auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx ($n = 6$; $p < 0,0001$) im Vergleich zum Zeitpunkt „basal“. $65 \pm 6\%$ der basalen Intensität des WGA-Fluoresceins konnten gemessen werden (Abbildung 8). Mit einem basalen mittleren Blutdruck von $103,6 \pm 7,45$ mmHg befanden sich die Werte im physiologischen Bereich. Bei den Aufnahmen in 30-minütigen Abständen war ebenfalls ein signifikanter Abfall zwischen dem Zeitpunkt „basal“ und „60 Min“ zu verzeichnen ($79 \pm 8\%$; $n = 6$; $p = 0,0223$).

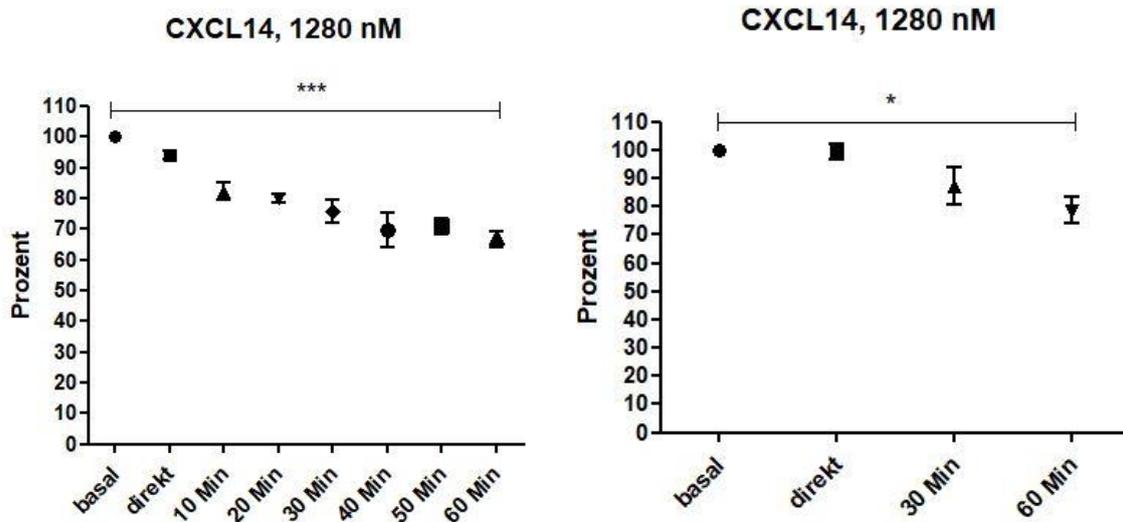


Abbildung 8 (links): Einfluss von CXCL14/BRAK (1280 nM) auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx: 60 Minuten nach dem Infusionsstart betrug der prozentuale Anteil an der Ausgangsintensität noch $65 \pm 6 \%$ ($n = 6$; $p < 0,0001$).

Abbildung 9 (rechts): Einfluss von CXCL14/BRAK (1280 nM) auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx: Der Unterschied zwischen dem Zeitpunkt basal und dem Zeitpunkt 60 Minuten nach Infusionsstart war signifikant ($79 \pm 8 \%$; $n = 6$; $p = 0,0223$).

6.1.4 Einfluss von Semaphorin-3C auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx

Als ein weiterer parakriner Faktor der MD-Zellen wurde Semaphorin-3C als Infusion (110 nM) verabreicht. Zwischen der basalen Aufnahme und 60 Minuten nach Infusionsstart konnte ein signifikanter Abfall der Fluoreszenzintensität des WGA-Fluoresceins verzeichnet werden ($69,5 \pm 8,5 \%$; $n = 6$; $p = 0,0058$). Der basale mittlere Blutdruck konnte mit Werten von $104,5 \pm 4,0$ mmHg gemessen werden.

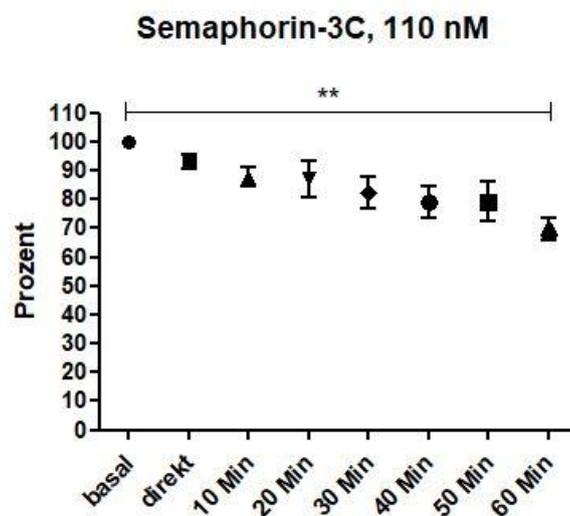


Abbildung 10: Einfluss von Semaphorin-3C (110 nM) auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx: Während der 60 Minuten kam es zu einer signifikanten Reduktion der Dichte der endothelialen Glykokalyx ($69,5 \pm 8,5 \%$; $n = 6$; $p = 0,0058$).

Eine Auswahl an Komponenten der endothelialen Glykokalyx, deren Anteil während der Infusion moduliert wird und zu einer verringerten Dichte führen könnte, wird im Abschnitt 5.4.2 behandelt.

6.1.5 Einfluss von NaCl auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx

Um zu prüfen, ob eine Infusion aufgrund von Scherkräften einen Einfluss auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx hat, wurden MWF-Ratten eine isotone (0,9 %) Natriumchlorid-Infusion mit dem gleichen Volumenfluss und der gleichen Infusionsdauer wie die Aktivsubstanzen in den vorangegangenen Versuchen verabreicht. Während basal eine Intensität der endothelialen Glykokalyx von 100 % angenommen wurde, hatte sie 60 Minuten nach Infusionsstart noch eine Intensität von $100,5 \pm 4,5$ % (Abbildung 10). Damit war der Unterschied zwischen den beiden Zeitpunkten nicht signifikant ($n = 6$; $p = 0,9024$). Der mittlere Blutdruck zu Beginn des Versuchs betrug $102,8 \pm 7,8$ mmHg. Am Ende des Versuchs lag der mittlere Blutdruck bei $92,0 \pm 8,8$ mmHg.

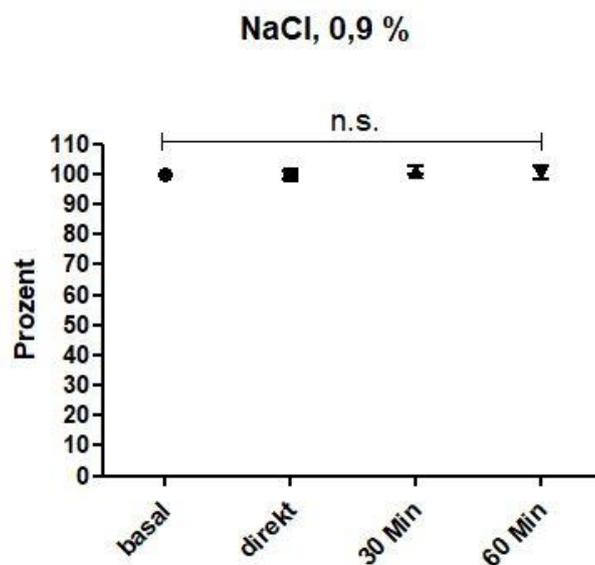


Abbildung 11: Einfluss einer isotonen Natriumchloridinfusion auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx. Der Unterschied der Intensitäten zwischen dem basalen Zeitpunkt und 60 Minuten nach Infusionsstart war nicht signifikant ($n = 6$; $p = 0,9024$).

6.1.6 Einfluss von Hydrocortison auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx nach einem Laserschaden im Epithel des proximalen Tubulus

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss von Hydrocortison nach Applikation eines Laserschadens im proximalen Tubulusepithel untersucht. Nach der Verabreichung eines Hydrocortison-Bolus (50 mg/ml; 1 μ l/g KWG) wurde ein Laserschaden herbeigeführt und im Anschluss Aufnahmen vom Glomerulum des beschädigten Nephrons sowie von einem benachbarten Glomerulum als Kontrolle angefertigt. Der basale mittlere Blutdruck der eingesetzten Tiere betrug $102,1 \pm 3,2$ mmHg. Die Dichte der endothelialen Glykokalyx veränderte sich im Verlauf der Versuche zwar signifikant, allerdings fiel der prozentuale Abfall der Dichte deutlich weniger stark ab als bei den Tieren, denen die parakrinen Faktoren der MD-Zellen infundiert wurden. Beim benachbarten Glomerulum veränderte sich die Dichte der endothelialen Glykokalyx nicht signifikant (s. Abbildung 12 + 13).

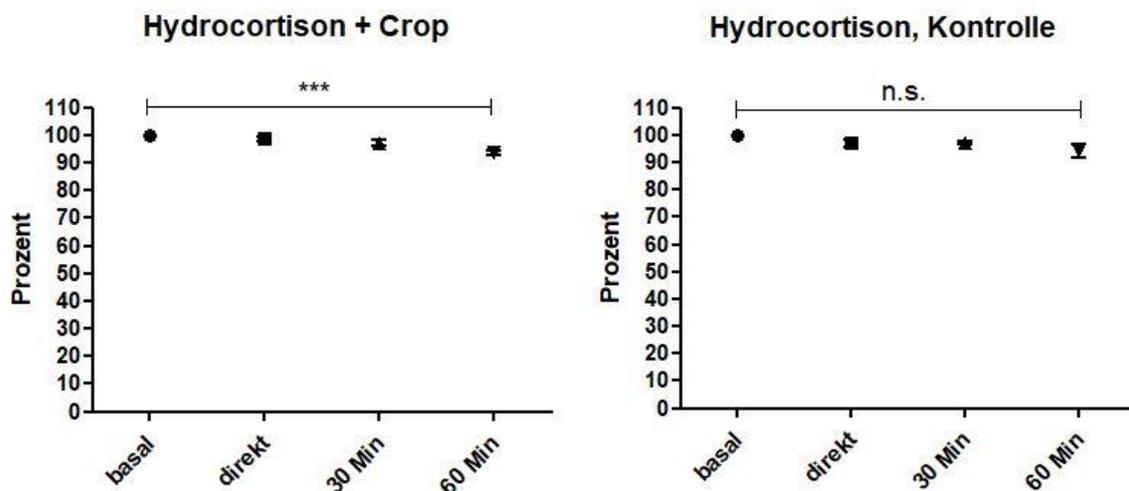


Abbildung 12 (links): Dichte der endothelialen Glykokalyx nach Crop (+ HC-Bolus): Während der Unterschied zwischen dem Zeitpunkt „basal“ und 60 Minuten nach Versuchsstart signifikant war, konnte kein großer prozentualer Unterschied gemessen werden ($n = 6$; $p = 0,0009$). Zum Zeitpunkt „60 Min“ betrug die Intensität $94,5 \pm 2,5$ %.

Abbildung 13 (rechts): Dichte der endothelialen Glykokalyx eines benachbarten Glomerulums (+ HC-Bolus): Beim benachbarten Glomerulum kam es zu keiner signifikanten Abnahme der Dichte ($94 \pm 7,5$ %; $n = 6$; $p = 0,0741$).

6.1.7 Veränderungen am Bürstensaum des proximalen Tubulus

Ein Nebenbefund aller Intravitaexperimente war, dass es im Verlauf der Versuche zu einer signifikanten Zunahme der Höhe des Bürstensaums des proximalen Tubulus kam ($n = 50$; $p < 0,0001$). Für die Darstellung wurde als basaler Vergleichswert die durchschnittliche Höhe des Bürstensaums zu Beginn einer NaCl-Infusion genommen und dieser mit Messungen am Ende der anderen Versuchsreihen verglichen (Abbildung 14).

Während der Bürstensaum basal vor der Applikation einer NaCl-Infusion Werte von $2,85 \pm 1,9 \mu\text{m}$ hatte ($n = 50$), stieg die Höhe nach 60 Minuten signifikant auf $5,41 \pm 0,91 \mu\text{m}$. Nach einem Hydrocortison-Bolus und anschließendem Laserschaden im proximalen Tubulus konnte zum Zeitpunkt „60 Min“ eine Höhe von $5,145 \pm 1,005 \mu\text{m}$ gemessen werden. Dagegen nach einer CXCL14/BRAK-Infusion hatte der Bürstensaum nach 60 Minuten eine Höhe von $6,99 \pm 1,71 \mu\text{m}$. Wurde ausschließlich ein Laserschaden im proximalen Tubulusepithel herbeigeführt, konnte am Ende des Versuchs eine Höhe von $6,145 \pm 1,675 \mu\text{m}$ verzeichnet werden. Die Höhe des Bürstensaums des proximalen Tubulus betrug 60 Minuten nach dem Start einer PAPP-A2-Infusion $6,6 \pm 1,81 \mu\text{m}$, nach dem Start einer Semaphorin-3C-Infusion $6,48 \pm 1,25 \mu\text{m}$ und nach dem Start einer PAPP-A-Infusion $5,985 \pm 1,245 \mu\text{m}$. Während die durchschnittlichen Werte in der Versuchsgruppe „60 Min NaCl“ und „60 Min HC + Crop“ annähernd gleich waren und zwischen ihnen keine Signifikanz festgestellt werden konnte, besaßen eben diese beiden eine deutliche Signifikanz zu allen anderen Versuchsgruppen.

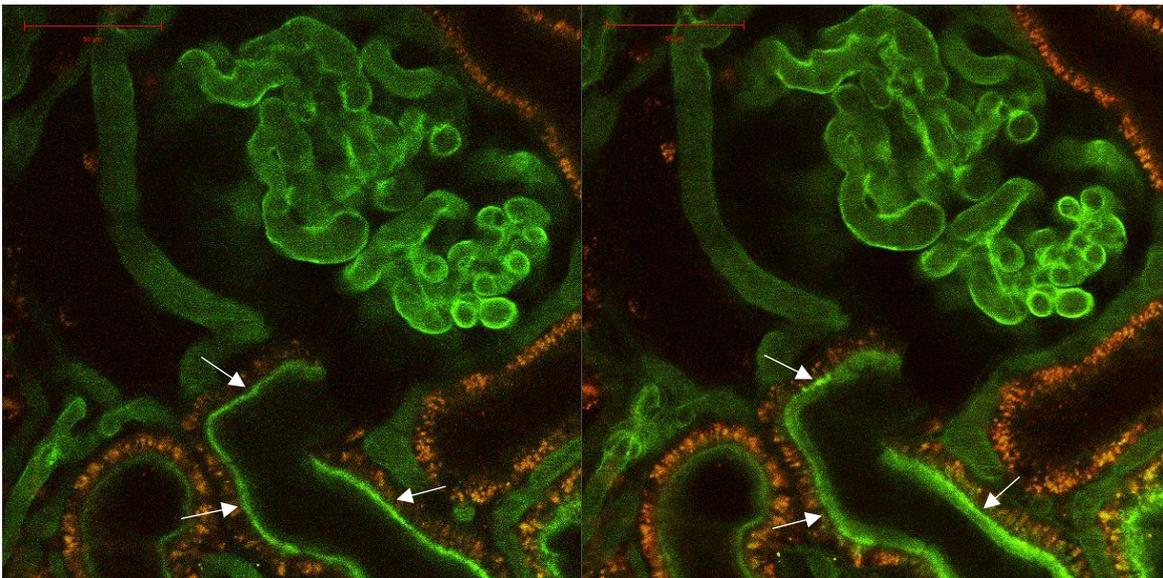


Abbildung 14: Intravitale Aufnahme eines Glomerulums mit proximalem Tubulus zu Beginn (links) und am Ende (rechts) des Versuchs: In der unteren Bildhälfte ist deutlich der zum Glomerulum gehörige proximale Tubulus zu erkennen. Während auf der linken Aufnahme der Bürstensaum (grün) den Epithelzellen (orange) als schmale Schicht aufsitzt, kommt es auf der rechten Aufnahme zu einer signifikanten Höhenzunahme des Bürstensaums (s. Abb. 15, weiße Pfeile). In diesem Fall wurde der Ratte eine NaCl-Infusion verabreicht. Die rote Skala im linken oberen Bildrand zeigt jeweils eine Länge von $50 \mu\text{m}$ an.

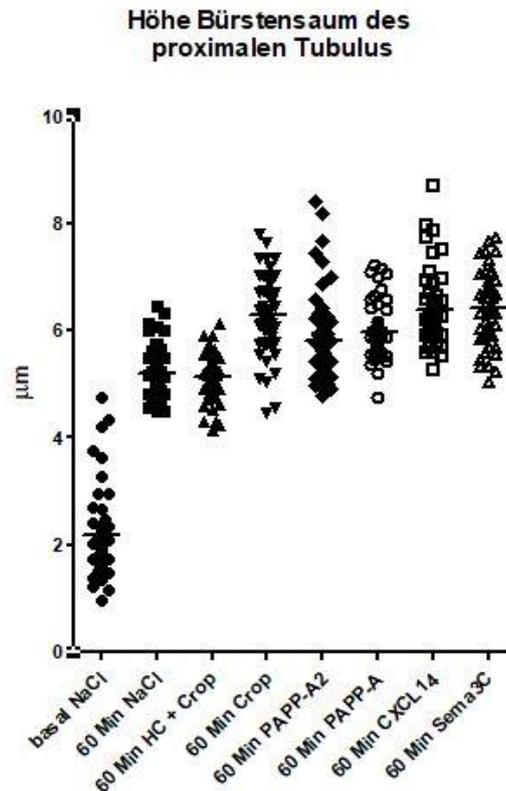


Abbildung 15: Höhe des Bürstensaums des proximalen Tubulus im Vergleich: Im Verlauf der Versuche kam es stets zu einem signifikanten Anstieg der Höhe des Bürstensaums im proximalen Tubulus ($n = 50$; $p < 0,0001$).

6.2 *In vitro* - Modulation der endothelialen Glykokalyx von HRGEC durch parakrine Faktoren der Macula densa-Zellen

Für eine weitere Einschätzung des Einflusses von parakrinen Faktoren der MD-Zellen wurde die Dichte der endothelialen Glykokalyx auch in der Zellkultur untersucht. Dafür wurden humane renale glomeruläre Endothelzellen (HRGEC) kultiviert und für 1h mit dem jeweiligen Faktor behandelt.

Zur Beurteilung der Auswirkungen auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx wurde die mittlere Intensität pro Fläche ermittelt. Bei den unbehandelten Zellen konnte eine Intensität von $5603,25 \pm 2906,45$ gemessen werden. HRGEC, die mit CXCL14/BRAK ($7,5 \mu\text{M}$; hier als CXCL14 bezeichnet) behandelt wurden, zeigten dagegen eine Intensität von $8067,8 \pm 3862,3$, die sich damit signifikant zur Intensität der basalen Zellen veränderte ($p < 0,05$). Ebenso signifikant stieg die Intensität der Glykokalyx nach einer Behandlung mit PAPP-A2 (388 nM) an ($11309 \pm 2947,65$; $p < 0,0001$). Nach einer Behandlung mit Semaphorin-3C (232 nM) dagegen konnte kein signifikanter Unterschied zur basalen Intensität verzeichnet werden ($7684,75 \pm 4019,45$).

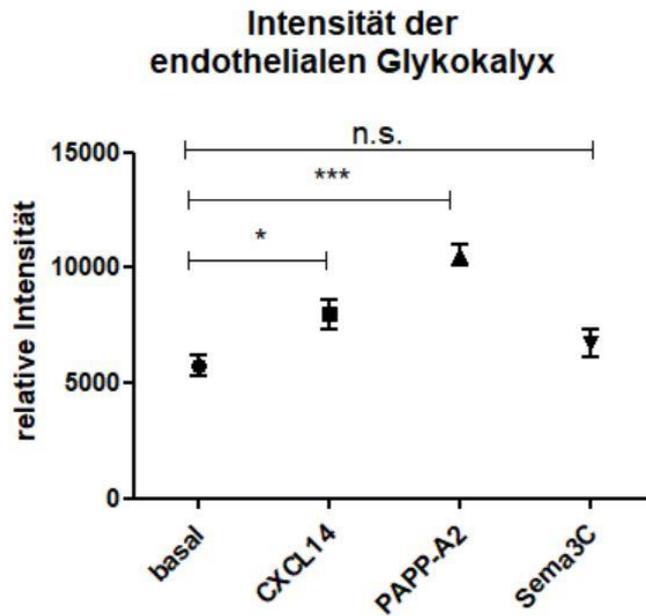


Abbildung 16: Vergleich der mittleren Intensität der endothelialen Glykokalyx von unbehandelten und behandelten HRGEC: Während eine Inkubation mit CXCL14/BRAK und PAPP-A2 eine signifikante Zunahme der Intensität der endothelialen Glykokalyx zur Folge hatte, kam es nach der Behandlung mit Semaphorin-3C ($n = 15$; $p < 0,0001$).

6.3 Immunhistochemische Untersuchungen an der Macula densa und am Glomerulum

6.3.1 Nachweis von Proteinen in Macula densa-Zellen

Um vorab eine Auswahl an parakrinen Faktoren aus MD-Zellen treffen zu können, wurde ihr Vorkommen in Vorarbeiten immunhistologisch an Serienschnitten geprüft. Spezifisch nachgewiesen werden konnten PAPP-A2, CXCL14/BRAK und das Semaphorin-3C. Um sicher zu gehen, dass die jeweilige Färbung auch in den MD-Zellen lokalisiert war, wurde immer auch eine Ko-Lokalisation von COX2, einem Marker für MD-Zellen, dargestellt.

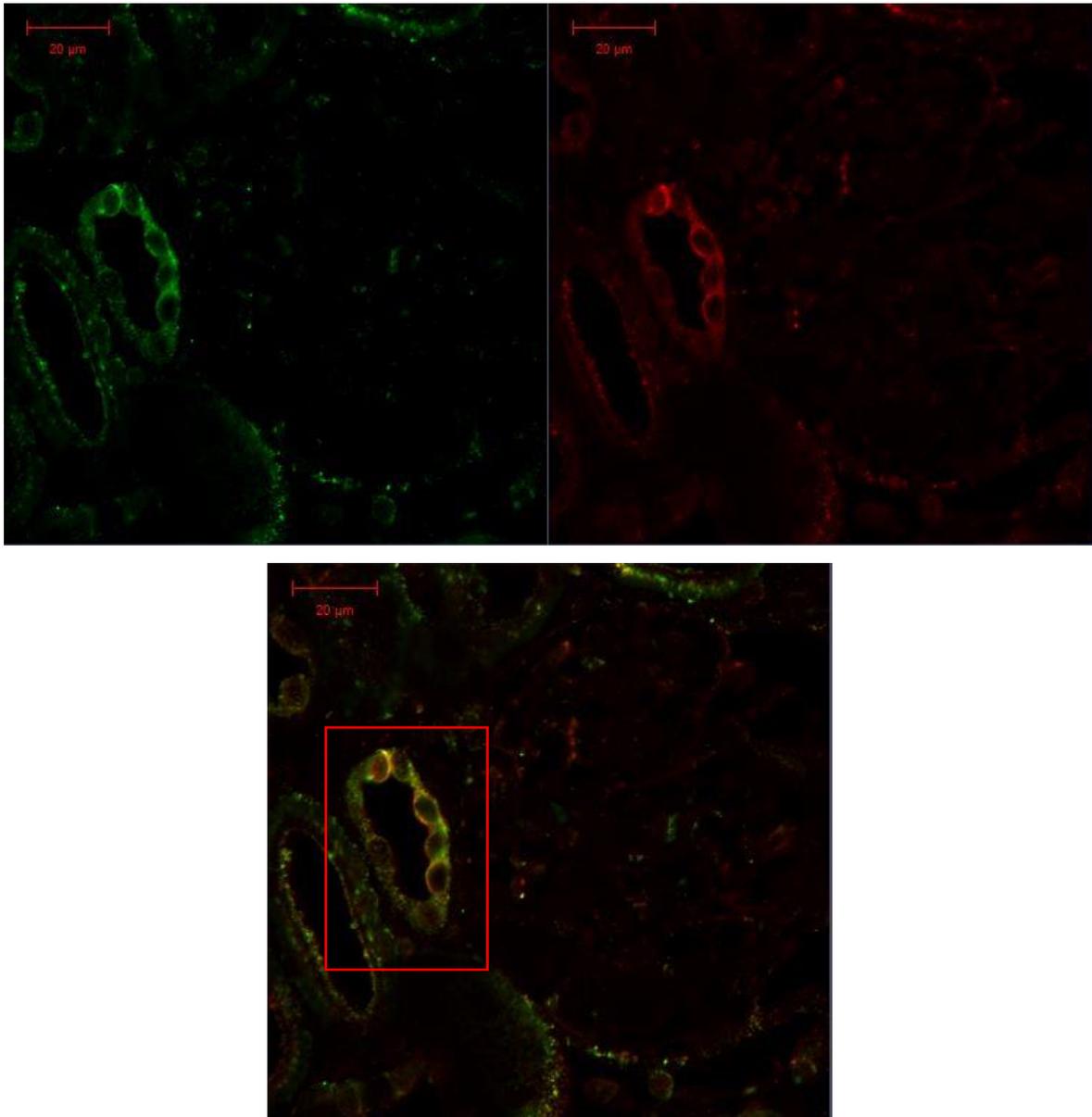


Abbildung 17: Immunhistologische Ko-Färbung von COX2 und PAPP-A2: Im unteren Bild ist die Überlagerung beider Färbungen erkennbar, während in den oberen beiden Bildern die Fluoreszenz von PAPP-A2 (links, Cy2) und die von COX2 (rechts, Cy5) abgebildet ist. In der rechten Bildhälfte ist jeweils schemenhaft das Glomerulum sichtbar. Die rote Skala im rechten oberen Bildrand zeigt jeweils eine Länge von 20 μm an.

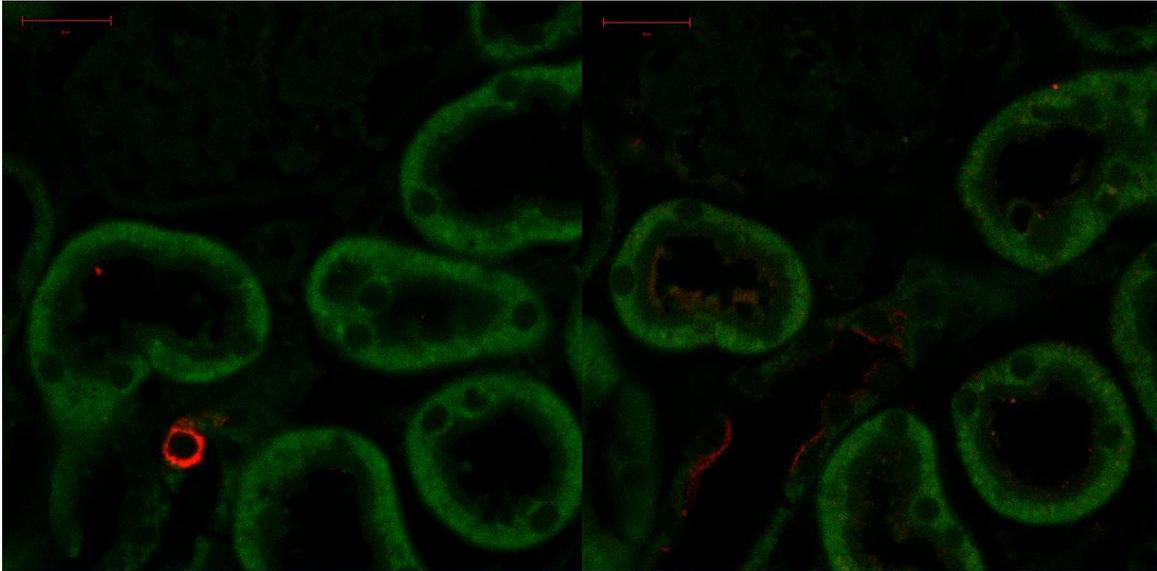


Abbildung 18 (links): Immunhistologische Färbung von COX2 in MD-Zellen: In einem Serienschnitt wurde ein Bereich in der Nierenrinde mit einem Glomerulum fokussiert und die MD-Zellen mittels spezifischer Färbung von COX2 (rot; Cy5) identifiziert. Im oberen Bildbereich sind schemenhaft die glomerulären Kapillarschlingen erkennbar. Außerdem zeichnen sich die angeschnittenen Tubuli aufgrund der Autofluoreszenz des Gewebes ab (grün). Die rote Skala im linken oberen Bildrand zeigt eine Länge von 20 μm an.

Abbildung 19 (rechts): Immunhistologische Färbung von CXCL14/BRAK in MD-Zellen: Einen Serienschnitt weiter wurde dieselbe Stelle wie in Abb. 18 fokussiert und die Fluoreszenz des markierten CXCL14/BRAK (rot; Cy5) dargestellt. Die rote Skala im linken oberen Bildrand steht für eine Länge von 20 μm .

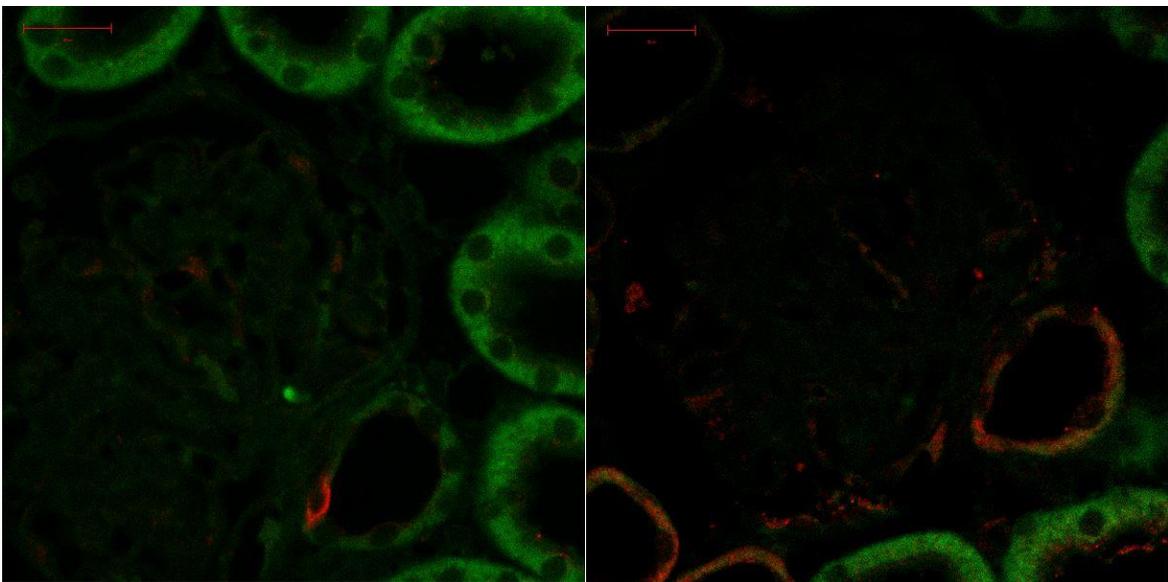


Abbildung 20 (links): Immunhistologische Färbung von COX2 in MD-Zellen: Über die Fluoreszenz von Cy5 wird die Lokalisation des COX2 (rot) und damit der MD sichtbar. Die Autofluoreszenz des umliegenden Gewebes ist in grün dargestellt. Die rote Skala im linken oberen Bildrand steht für eine Länge von 20 μm .

Abbildung 21 (rechts): Immunhistologische Färbung von Semaphorin-3C in MD-Zellen: Während sich das Semaphorin-3C (rot; Cy5) im Bereich der MD anfärbt, ist es auch in benachbarten Tubuli erkennbar. Die rote Skala im linken oberen Bildrand bildet eine Länge von 20 μm ab.

6.3.2 PAPP-A als Bestandteil von Podozyten

Da PAPP-A aufgrund seiner Homologie zum PAPP-A2 bei der Intravitalmikroskopie zum Einsatz kam, wurde immunhistologisch geprüft, ob es im Bereich des Glomerulums lokalisiert ist und dort potenziell eine Modulation herbeiführen kann. PAPP-A konnte zwar nicht in MD-Zellen detektiert, allerdings sehr spezifisch in Podozyten angefärbt werden.

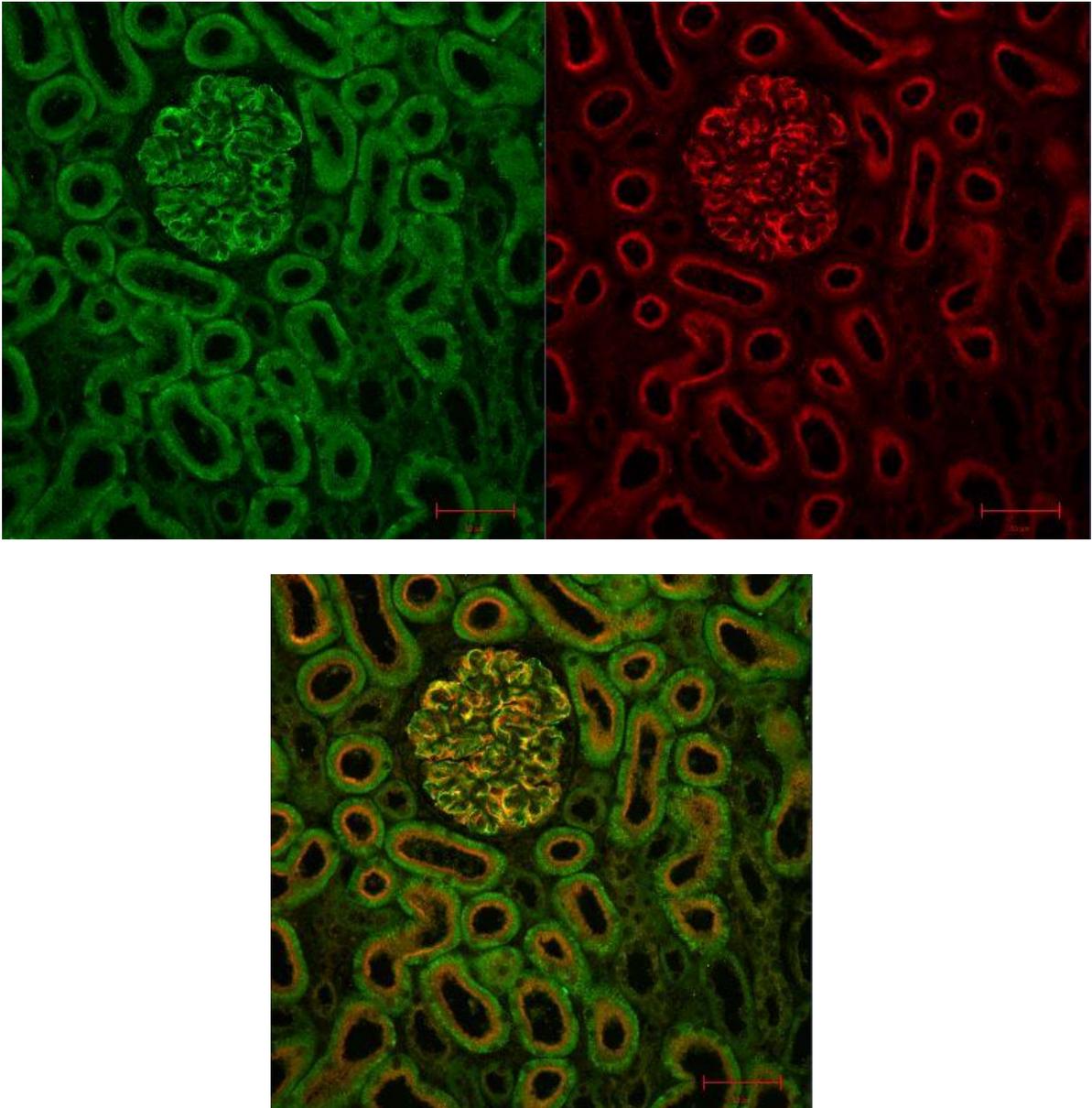


Abbildung 22: Immunhistologische Ko-Färbung von PAPP-A und Synaptopodin: Während das Synaptopodin (grün, Cy2) als spezifischer Marker die Podozyten markiert, färbt sich PAPP-A (rot, Cy5) in den Podozyten und im Bürstensaum des proximalen Tubulus spezifisch an. Die rote Skala im rechten unteren Bildrand steht für 50 μm.

6.4 Immunzytochemische Untersuchungen der physiologischen Glykokalyxstruktur glomerulärer Endothelzellen und deren Modulation durch parakrine Faktoren aus Macula densa-Zellen

6.4.1 Nachweis von Bestandteilen der endothelialen Glykokalyx

Als Komponenten der endothelialen Glykokalyx wurden zum einen Syndecan 1, Versican und Biglycan als stationäre Elemente, zum anderen die Hyaluronsäure als dynamischer Baustein in den Fokus genommen. Zunächst wurde an unbehandelten HRGEC geprüft, ob die jeweiligen Bestandteile immunhistologisch detektiert werden können. Die jeweilige Komponente trug als sekundären Antikörper das Cy5, für den Nachweis einer intakten Zellvitalität diente die Färbung der Zellkerne mit DAPI.

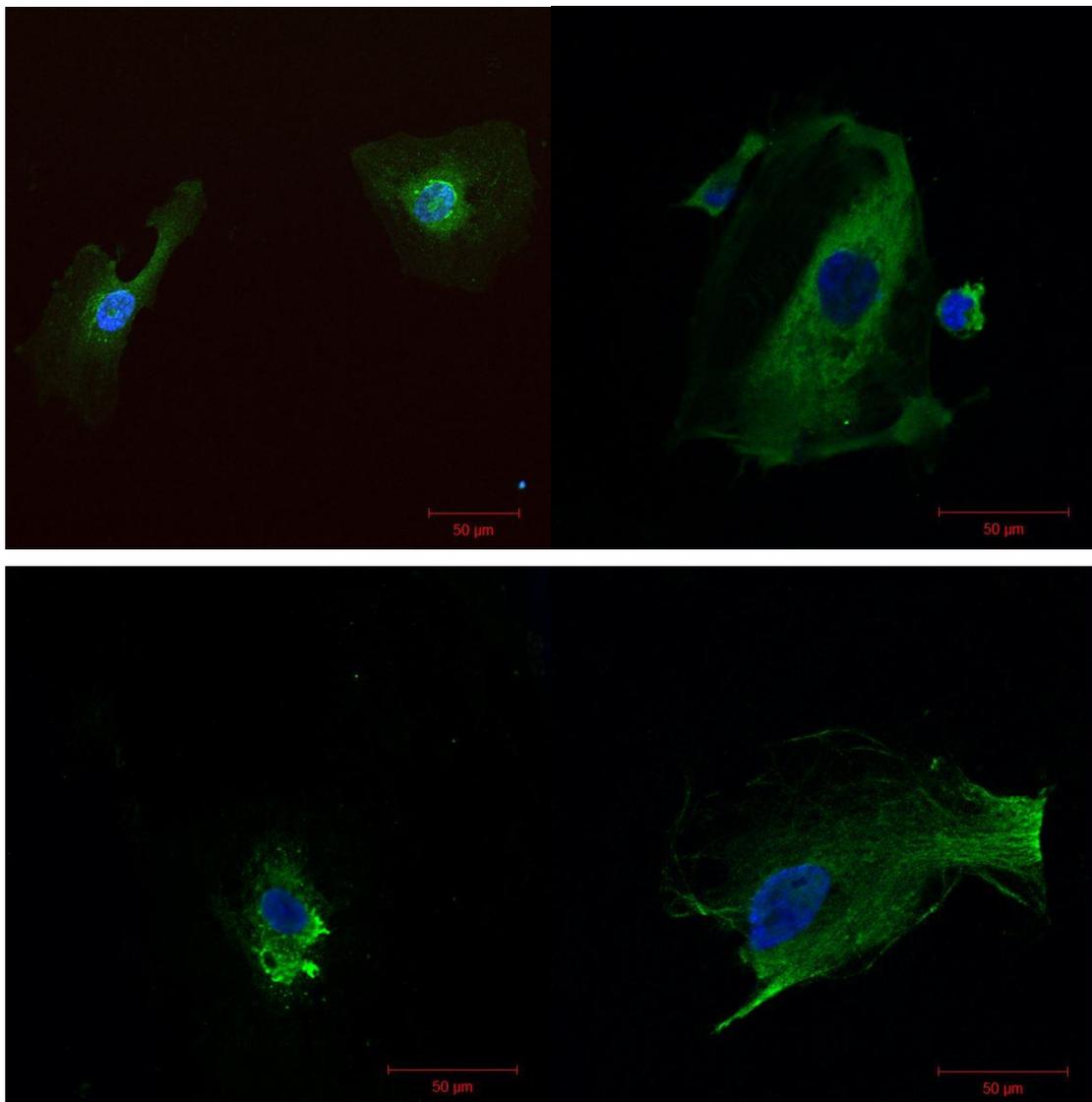


Abbildung 23: Immunhistologischer Nachweis von Komponenten der endothelialen Glykokalyx (grün, Cy5: Baustein der Glykokalyx; blau, DAPI: Zellkerne der HRGEC): links oben: Biglycan, rechts oben: Hyaluronsäure, links unten: Syndecan 1, rechts unten: Versican. Die rote Skala im rechten unteren Bildrand zeigt 50 µm an.

6.4.2 *In vitro*-Modulation der endothelialen Glykokalyx durch parakrine Faktoren aus Macula densa-Zellen

Im nächsten Schritt wurde in der Zellkultur von HRGEC untersucht, welchen Einfluss PAPP-A2, CXCL14/BRAK sowie Semaphorin-3C auf die Integrität der endothelialen Glykokalyx haben. Die parakrinen Faktoren wurden in den gleichen Konzentrationen eingesetzt wie in 5.2 beschrieben. Nach der Behandlung erfolgte die spezifische Detektion von Syndecan 1, Biglycan, Versican und Hyaluronsäure entsprechend den zuvor etablierten Protokollen (s. 4.4.3.2). Während im gleichen Ansatz auch unbehandelte Zellen immunhistologisch angefärbt wurden, erfolgte im weiteren Verlauf der Vergleich der Fluoreszenzen mit den behandelten HRGEC, indem die mittleren Intensitäten von Einzelzellen ermittelt wurden. Für diese Versuchsreihe ist n als die Anzahl an Zellen definiert.

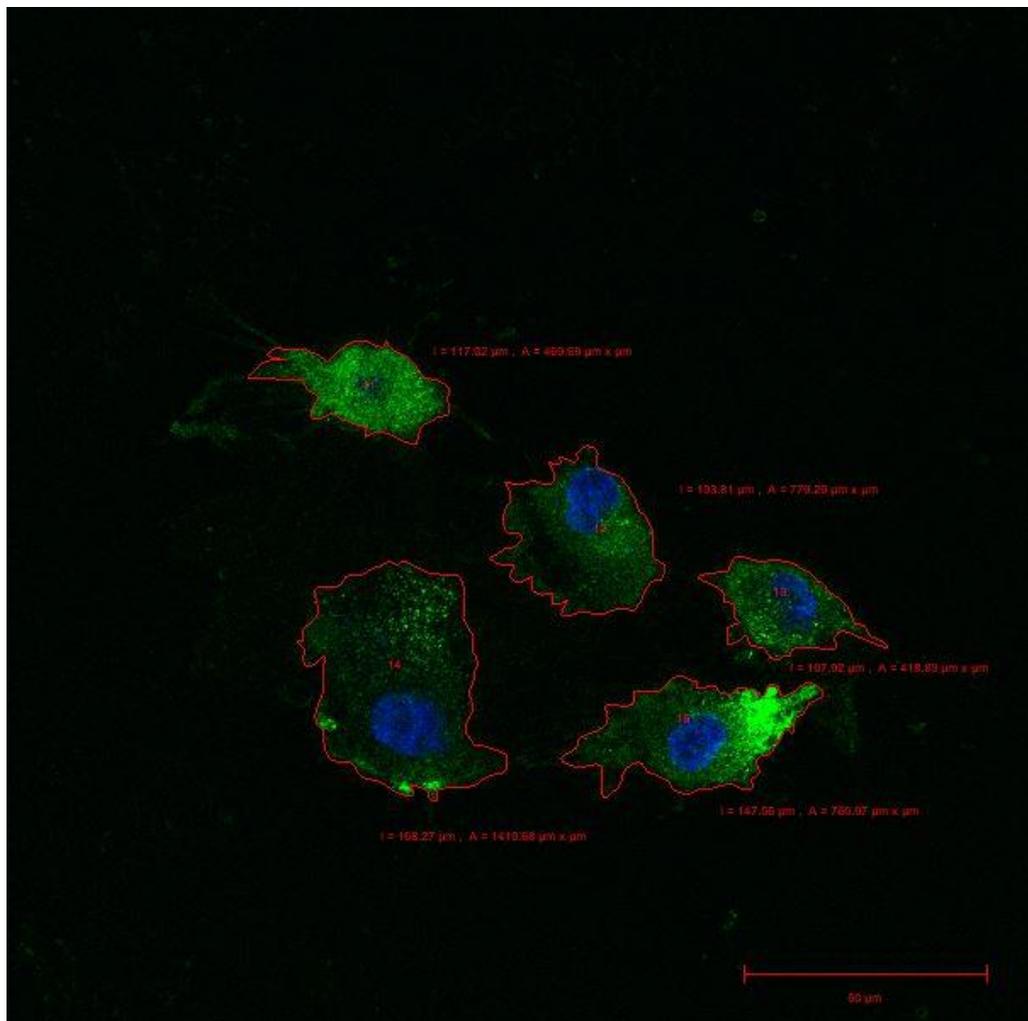


Abbildung 24: Messung der mittleren Intensität der Hyaluronsäure (grün; Cy5) von unbehandelten Zellen: Mittels eines Messtools wurde die Intensität der Hyaluronsäure umrahmt, welche daraufhin vom Programm *Zen black* als mittlere Intensität pro Fläche angegeben wurde. Die rote Skala im rechten unteren Bildrand bildet eine Länge von 50 µm ab.

Während eine Behandlung mit CXCL14/BRAK und Semaphorin-3C keinen signifikanten Unterschied zur Intensität des Syndecan 1 der unbehandelten Zellen erbrachte, hatte eine Behandlung mit PAPP-A2 einen signifikant reduzierenden Effekt auf die Intensität des markierten Syndecan 1 ($n = 10$; $p = 0,0066$). Auf den Anteil an Biglycan der endothelialen Glykokalyx hatte eine Behandlung mit keiner der drei Substanzen einen Einfluss auf die Intensität ($n = 15$; $p = 0,1397$).

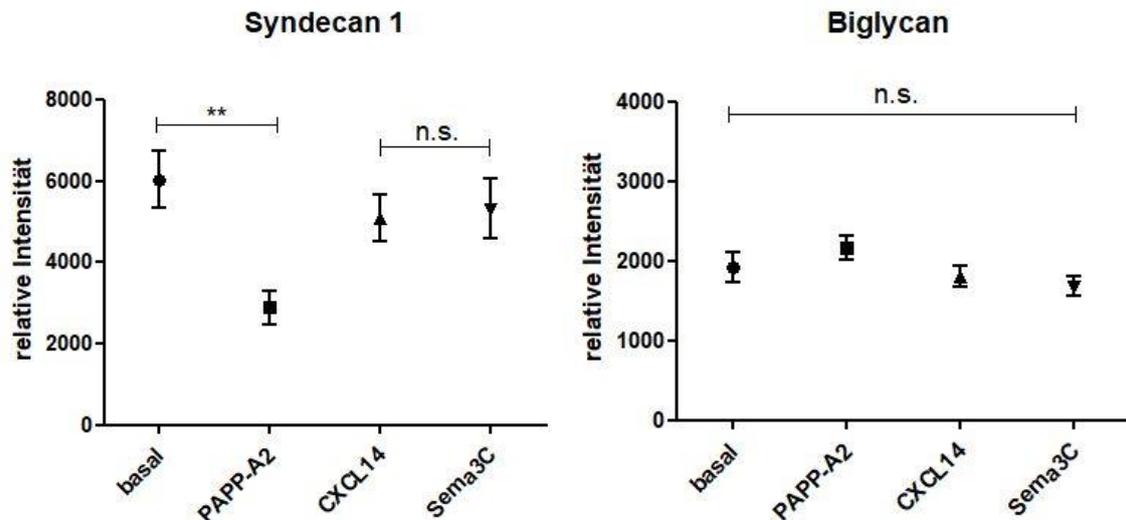


Abbildung 25 (links): Modulation von Syndecan 1 nach Behandlung mit PAPP-A2, CXCL14/BRAK und Semaphorin-3C: Eine Behandlung mit PAPP-A2 hatte eine signifikante Reduktion der Fluoreszenz von Syndecan 1 zur Folge. Dagegen hatte die Behandlung mit CXCL14/BRAK und Semaphorin-3C keinen signifikanten Einfluss auf die Intensität ($n = 10$; $p = 0,0066$).

Abbildung 26 (rechts): Modulation von Biglycan nach Behandlung mit PAPP-A2, CXCL14/BRAK und Semaphorin-3C: Alle drei Faktoren hatten keinen signifikanten Effekt im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ($n = 15$; $p = 0,1397$).

Der Anteil an Versican konnte nach Behandlung sowohl mit CXCL14/BRAK als auch mit Semaphorin-3C moduliert werden. In beiden Fällen kam es zu einer signifikanten Reduktion der Intensität des Cy5, welches das Versican anfärbte ($n = 13$; $p < 0,0001$). Eine Behandlung mit PAPP-A2 dagegen hatte keinen signifikanten Effekt.

Bei der Ermittlung der Intensität der Hyaluronsäure hatten alle drei Substanzen einen reduzierenden Effekt mit statistischer Signifikanz im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Dabei war der Unterschied nach einer Behandlung mit PAPP-A2 weniger stark als nach einer Behandlung mit CXCL14/BRAK bzw. Semaphorin-3C ($n = 15$; $p < 0,0001$).

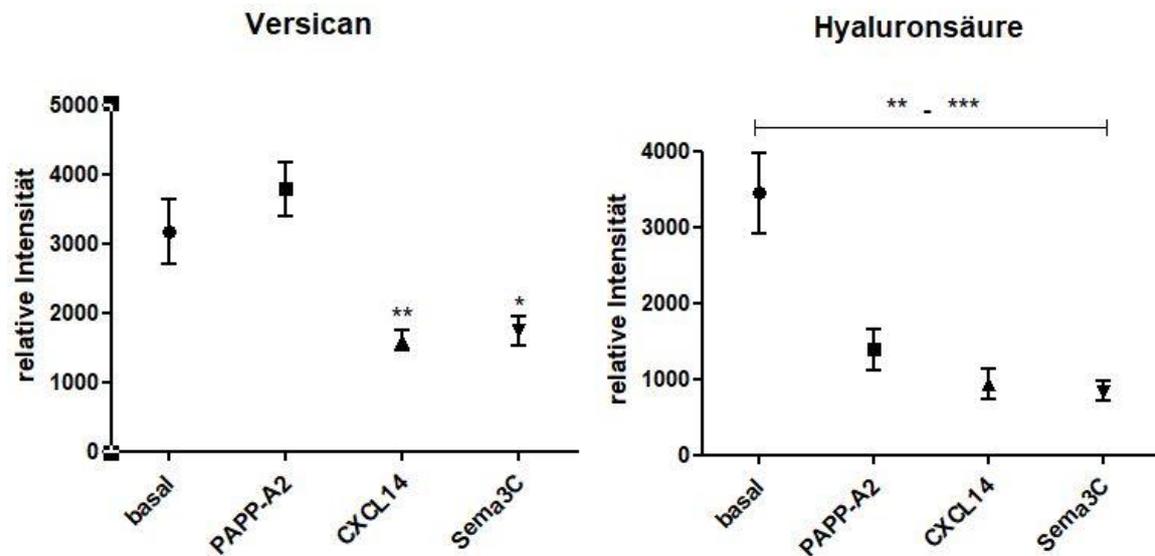


Abbildung 27 (links): Modulation von Versican nach Behandlung mit PAPP-A2, CXCL14/BRAK und Semaphorin-3C: Während eine Behandlung mit PAPP-A2 keinen signifikanten Effekt hatte, kam es nach einer Inkubation sowohl mit CXCL14/BRAK als auch mit Semaphorin-3C zu einem deutlichen Unterschied im Vergleich zur Intensität der unbehandelten Zellen (n = 13; p < 0,0001).

Abbildung 28 (rechts): Modulation der Hyaluronsäure nach Behandlung mit PAPP-A2, CXCL14/BRAK und Semaphorin-3C: Nach der Behandlung mit allen drei Substanzen kam es zu einem signifikanten Abfall der Intensität des Cy5, welches die Hyaluronsäure anfärbte (n = 15; p < 0,0001).

6.5 Untersuchung der Eigenschaften von PDGFR- β -positiven Zellen

6.5.1 Migrationskapazität nach Induktion durch chemotaktische Faktoren

Nach Etablierung eines Migrationsassays mit PDGFR- β -positiven Zellen wurden in verschiedenen Ansätzen Lockstoffe eingesetzt und das Wanderungsverhalten der Zellen innerhalb von 24 Stunden beobachtet. Während die Zellen in einem mittleren Kanal kultiviert wurden, wurde auf der einen Seite des Kanals die jeweilige chemotaktisch aktive Substanz (in Medium verdünnt) und auf der anderen Seite reines Medium als Kontrolle eingegeben. Anhand von regelmäßigen Aufnahmen wurden der Start- und Endpunkt mehrerer Zellen verfolgt. Die Bezeichnung „CT“ steht für die „Chemotaxis“ der Zellen. Für jeden Lockstoff wurden jeweils neun unabhängige Migrationsassays durchgeführt.

6.5.1.1 Einfluss von PDGF-DD auf die Migrationskapazität von PDGFR- β -positiven Zellen

Als erste Substanz wurde das PDGF-DD eingesetzt, da es eine Affinität zum PDGFR- β besitzt. (Kazlauskas 2017; Ostendorf et al. 2014). Zudem ist bekannt, dass es von geschädigten Tubuli freigesetzt wird (Buhl et al. 2016). Eine statistisch signifikante Anzahl von Zellen wanderte dabei vermehrt zu der Seite mit Medium, in der das PDGF-DD enthalten war (91 %; n = 253; p < 0,0001).

In diesem Zusammenhang wurde auch geprüft, ob das Anlocken der Zellen ebenso erfolgt, wenn diese vier Tage lang mit Trapidil behandelt wurden (tägliches Wechsel des Trapidils in Medium). Dabei handelt es sich um einen selektiven Hemmstoff, der den PDGFR- β blockiert und somit eine Anheftung von PDGF-DD unterbindet (Schiessl et al. 2018; Ostendorf et al. 2014). Es konnte beobachtet werden, dass einerseits insgesamt weniger Zellen (76 %) in Richtung des PDGF-DD gewandert und andererseits diese auch weniger weit migriert sind. Der Unterschied zwischen den beiden Zellgruppen war statistisch signifikant ($n = 271$; $p < 0,0001$).

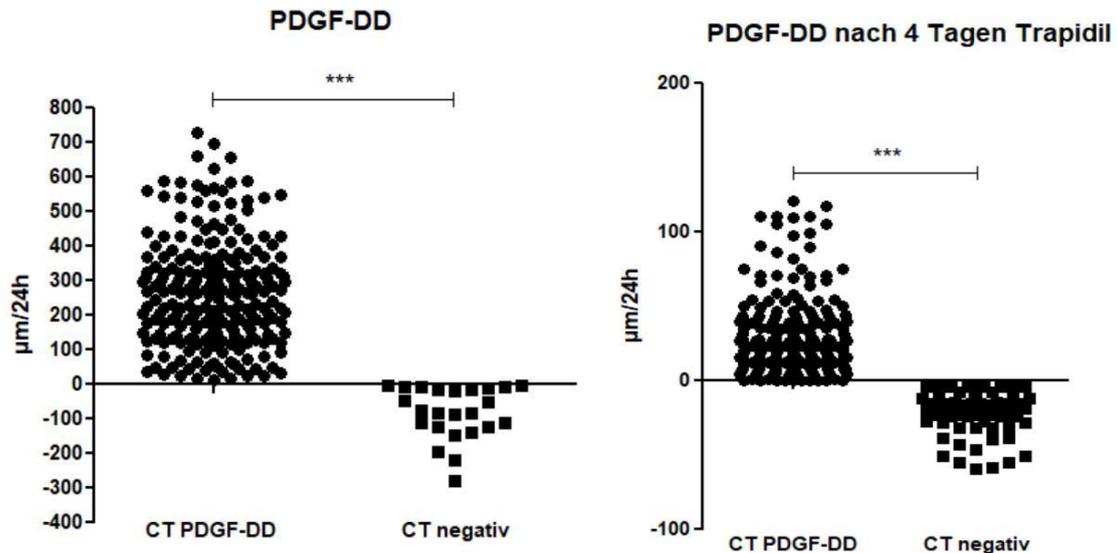


Abbildung 29 (links): Migrationsassay mit PDGF-DD: Eine deutliche Mehrheit der Zellen (91 %) wanderte in Richtung des PDGF-DD und nur wenige in Richtung des Mediums ($n = 253$; $p < 0,0001$).

Abbildung 30 (rechts): Migrationsassay mit PDGF-DD mit vorheriger Behandlung mit Trapidil: Nach einer Vorbehandlung bewegten sich insgesamt weniger Zellen und auch weniger weit in Richtung des PDGF-DD (76 %; $n = 271$; $p < 0,0001$).

6.5.1.2 Einfluss von Urin auf die Migrationskapazität von PDGFR- β -positiven Zellen

Aufgrund der Lokalisation von PDGFR- β -positiven Zellen im renalen Interstitium wurde in einem weiteren Ansatz untersucht, ob Urin von Mäusen einen Einfluss auf die Migration von PDGFR- β -positiven Zellen hat. Im Falle einer tubulären Schädigung wird der Tubulus undicht und das Ultrafiltrat gelangt aus dem Tubuluslumen in das Interstitium. Für diese Versuchsreihe wurde zunächst Urin von Mäusen gewonnen und danach in Zentrifugenkonzentratoren gereinigt (Centrifugal Devices, 1k; 16100 g, 30 Minuten). Eine deutliche Mehrheit der Zellen (90 %) wanderte in die entgegengesetzte Richtung des Urins, während nur ein kleiner Bruchteil zum Urin hin migrierte ($n = 342$; $p < 0,0001$). Daran anschließend wurde derselbe Urin hergenommen, für drei Minuten bei 70 °C denaturiert und dann im Migrationsassay eingesetzt. Nun bewegten sich vermehrt

PDGFR- β -positive Zellen (77 %) in Richtung des denaturierten Urins, während vergleichsweise wenige Zellen zum Medium wanderten (n = 281; p < 0,0001).

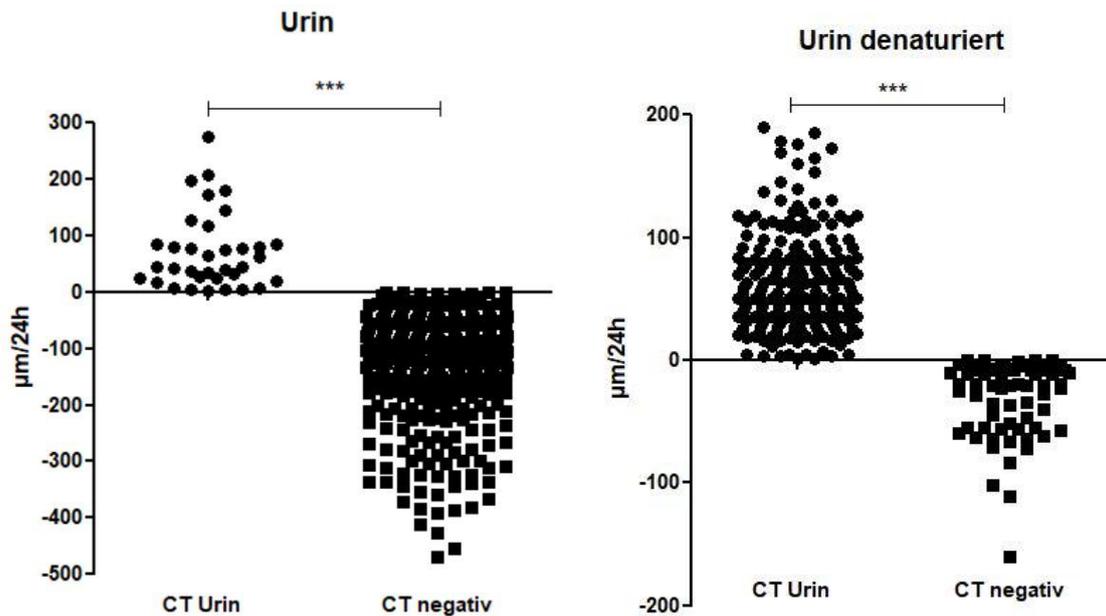


Abbildung 31 (links): Migrationsassay mit Urin: Während nur vereinzelt Zellen zum Urin migrierten, wanderten 90 % der Zellen in die entgegengesetzte Richtung des Urins (n = 342; p < 0,0001).

Abbildung 32 (rechts): Migrationsassay mit denaturiertem Urin: Nach Denaturierung des Urins bei 70 °C wanderten die Zellen vermehrt in Richtung des Urins (77 %) und weniger stark auf die Seite mit dem Medium (n = 281; p < 0,0001).

6.5.1.3 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Migrationskapazität von PDGFR- β -positiven Zellen

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Migrationskapazität von PDGFR- β -positiven Zellen untersucht, da jene stets vermehrt auftreten, wenn an einer Stelle im Organismus Regeneration stattfindet (Barrientos et al. 2008; Gallegos et al. 2019). Zum einen wurde der Einfluss vom *endothelial growth factor* (EGF) auf das Migrationsverhalten der PDGFR- β -positiven Zellen geprüft. Der überwiegende Anteil an Zellen (92 %) bewegte sich in Richtung des Wachstumsfaktors, allerdings war die durchschnittlich zurückgelegte Strecke mit $88,732 \pm 88,632 \mu\text{m}$ in 24 Stunden im Vergleich zu anderen Lockstoffen gering (n = 304; p < 0,0001).

Des Weiteren wurden die Zellen dem *fibroblast growth factor-9* (FGF-9) ausgesetzt. Auch in diesem Fall erfolgte eine Migration zum Wachstumsfaktor hin (95 % der Zellen), allerdings war die durchschnittlich zurückgelegte Strecke größer als beim Einsatz des EGF (n = 255; p < 0,0001).

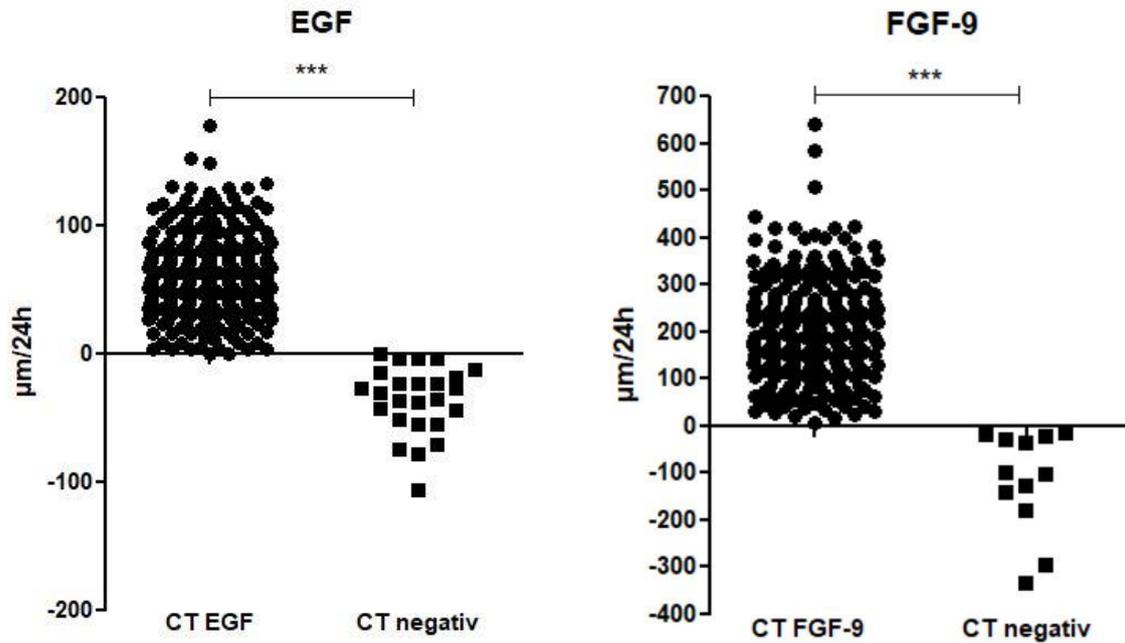


Abbildung 33 (links): Migrationsassay mit EGF: Wenn auch mit vergleichsweise geringer Strecke wanderten die Zellen überwiegend (92 %) in Richtung des Reservoirs mit EGF. Ein kleiner Bruchteil an Zellen bewegte sich in Richtung des Mediums ($n = 304$; $p < 0,0001$).

Abbildung 34 (rechts): Migrationsassay mit FGF-9: 95 % der Zellen migrierten zur Seite des FGF-9. Nur wenige Zellen wanderten auf die gegenüberliegende Seite mit dem Medium ($n = 255$; $p < 0,0001$).

6.5.1.4 Einfluss von Albumin auf die Migrationskapazität von PDGFR- β -positiven Zellen

Albumin wird bei der Filtration des Blutes neben der Abgabe in den Primärharn auch vom Epithel des proximalen Tubulus rückresorbiert, um dem Organismus nicht verloren zu gehen und ihm damit wieder zugeführt zu werden. Wird die Resorptionskapazität des proximalen Tubulus für Albumin überschritten, kommt es zum vermehrten Auftreten von Albumin im Endharn (= Albuminurie). Im Falle einer Schädigung des Tubulusepithels gelangt Albumin entweder aus dem Ultrafiltrat oder aus den Epithelzellen selbst ins Interstitium. Da Albumin ein Marker für die Funktionsfähigkeit des Resorptionsweges und auch für die Integrität der glomerulären Filtration ist, wurde in einem Assay diejenige Konzentration des Albumins eingesetzt, die physiologisch im Urin vorliegt (10 ng/ml). Der überwiegende Teil der Zellen wanderte in Richtung des Albumins, allerdings war der Anteil mit 64 % aller ausgewerteten Zellen nur geringfügig größer als der der Kontrolle ($n = 285$; $p < 0,0001$). Nach Erhöhung der Albuminmenge auf eine Konzentration, wie sie physiologisch im Blut vorliegt (35 mg/ml), erhöhte sich dieser Prozentsatz auf 89 % aller ausgewerteten Zellen ($n = 274$; $p < 0,0001$).

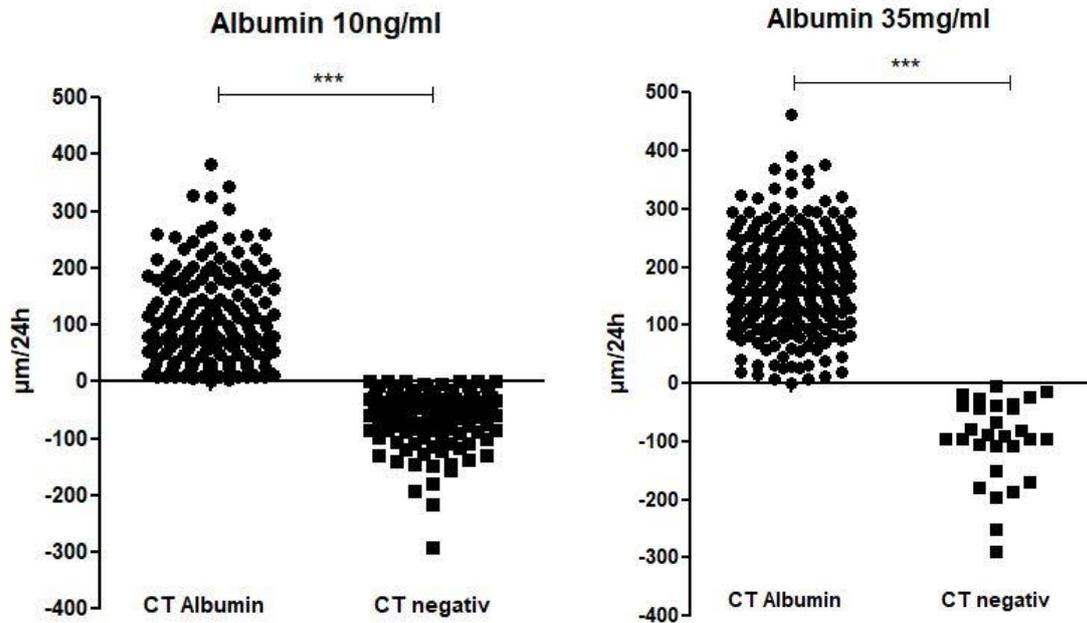


Abbildung 35 (links): Migrationsassay mit Albumin (10 ng/ml): Zum Albumin mit einer Konzentration, wie sie physiologisch im Urin vorliegt, wanderten PDGFR- β -positive Zellen mehr als zum Medium ($n = 285$; $p < 0,0001$). Allerdings war der Anteil mit 64 % nur geringfügig größer.

Abbildung 36 (rechts): Migrationsassay mit Albumin (35 mg/ml): Auf eine physiologische Blutkonzentration von Albumin reagierten die Zellen mit einer überwiegenden Migration zum Albumin ($n = 274$; $p < 0,0001$). 11 % der ausgewerteten Zellen wanderte stattdessen zum Medium.

Ergänzend dazu wurde in einem Ansatz der Effekt von denaturiertem Albumin auf das Bewegungsverhalten von PDGFR- β -positiven Zellen untersucht. Dafür wurde vorab Albumin mit Medium in einer Konzentration von 35 mg/ml für drei Minuten bei 70 °C denaturiert. 74 % aller ausgewerteten Zellen migrierten in Richtung des denaturierten Proteins, während sich der übrige Teil zum Medium hinbewegte ($n = 268$; $p < 0,0001$; Abbildung nicht dargestellt).

6.5.1.5 Einfluss von THP und Prostaglandin I_2 auf die Migrationskapazität von PDGFR- β -positiven Zellen

In einem weiteren Versuch wurde die Wirkung vom Tamm-Horsefall-Protein (THP) auf das Bewegungsverhalten von PDGFR- β -positiven Zellen untersucht. Mit 75 % aller ausgewerteter Zellen wanderte zwar die Mehrheit in Richtung des Lockstoffs, allerdings war die zurückgelegte Strecke mit $85,2812 \pm 85,1748 \mu\text{m}$ in 24 Stunden vergleichsweise gering ($n = 353$; $p < 0,0001$). Ähnlich verhielt es sich mit Prostaglandin I_2 . Während 85 % aller Zellen mit einer geringen Strecke in Richtung des Entzündungsmediators wanderten, bewegte sich der Rest auf die Seite des Mediums ($n = 247$; $p < 0,0001$).

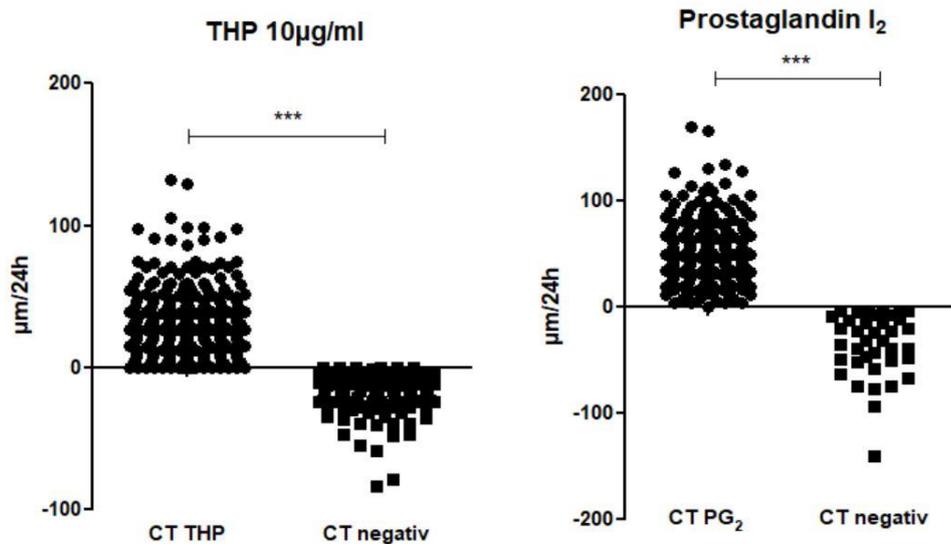


Abbildung 37 (links): Migrationsassay mit THP: 75 % aller ausgewerteten Zellen bewegten sich vermehrt in Richtung des THP. Die zurückgelegte Strecke mit $85,2812 \pm 85,1748 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ war vergleichsweise gering ($n = 353$; $p < 0,0001$).

Abbildung 38 (rechts): Migrationsassay mit Prostaglandin I₂: Mit 85 % aller Zellen bewegte sich der Großteil zum Prostaglandin I₂. Die restliche Zellfraktion wanderte in Richtung des Mediums ($n = 247$; $p < 0,0001$).

6.5.1.6 Einfluss von Hyaluronsäure auf die Migrationskapazität von PDGFR- β -positiven Zellen

Abschließend wurde in einem letzten Ansatz geklärt, welche Wirkung Hyaluronsäure auf das Migrationsverhalten von PDGFR- β -positiven Zellen hat. Von insgesamt 245 ausgewerteten Zellen bewegten sich 91 % davon gar nicht oder in Richtung der Hyaluronsäure. Einige wenige Zellen migrierten zum Medium ($n = 245$). Damit war der Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen statistisch signifikant ($p < 0,0001$).

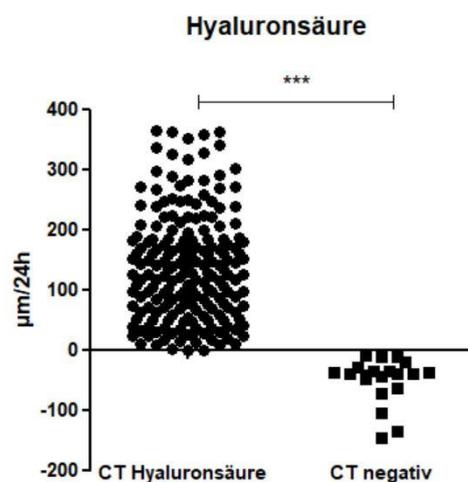


Abbildung 39: Migrationassay mit Hyaluronsäure: Während 91 % aller Zellen sich gar nicht oder in Richtung der Hyaluronsäure bewegten, wanderten die restlichen Zellen zum Medium ($n = 245$; $p < 0,0001$).

6.5.2 Nachweis von fibrotischen Proteinen in PDGFR- β -positiven Zellen

Das Vorliegen von fibrotischen Proteinen in den PDGFR- β -positiven Zellen und damit die potenzielle Möglichkeit zur Sekretion derselben wurden anhand einer Auswahl immunhistologisch geprüft. Nachgewiesen werden konnten Kollagen I, Kollagen III, Fibronectin und Decorin. Parallel erfolgte ein Nachweis von GFP, um das Vorkommen des PDGFR- β zu bestätigen.

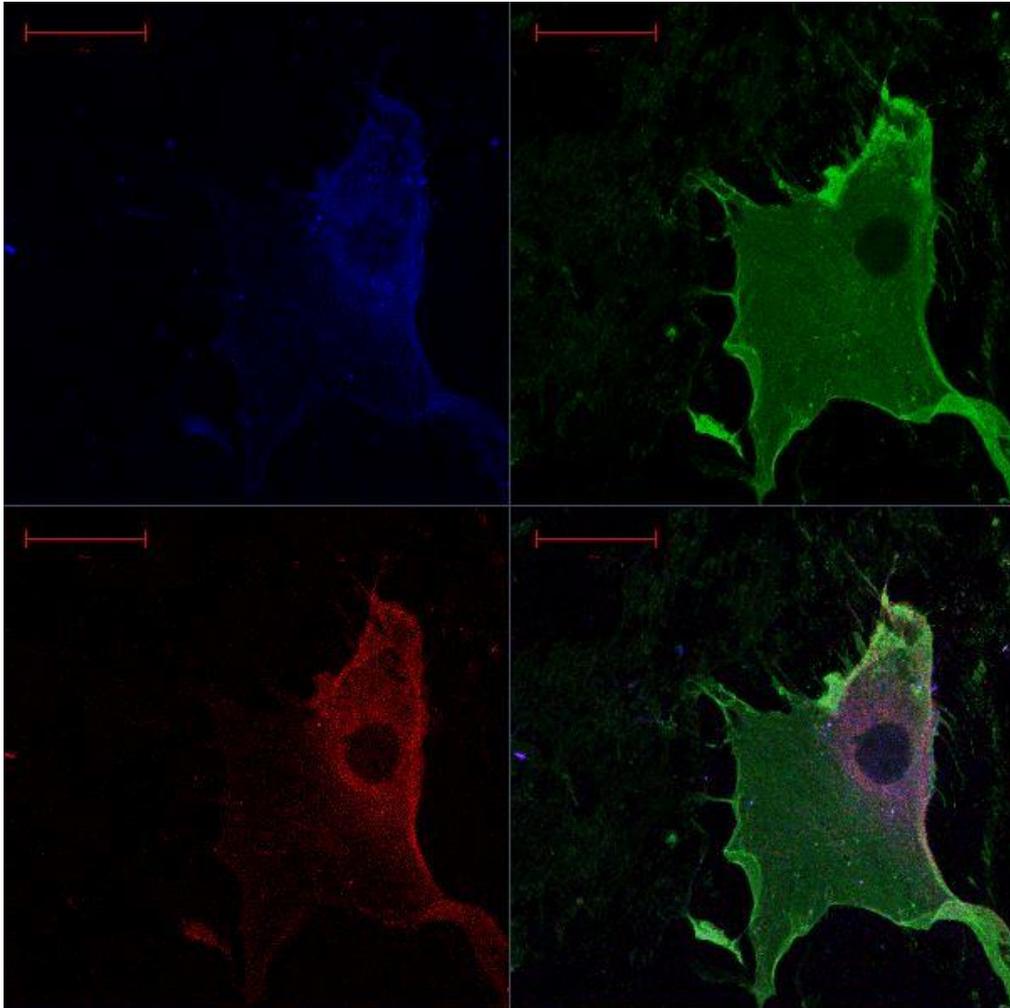


Abbildung 40: Immunzytochemischer Nachweis von Kollagen I (TRITC, links oben), GFP (Cy2, rechts oben) und Decorin (Cy5, links unten), rechts unten im Bild sind alle drei Farbstoffe zusammen dargestellt. Die rote Skala im linken oberen Bildrand steht für eine Länge von 50 μm .

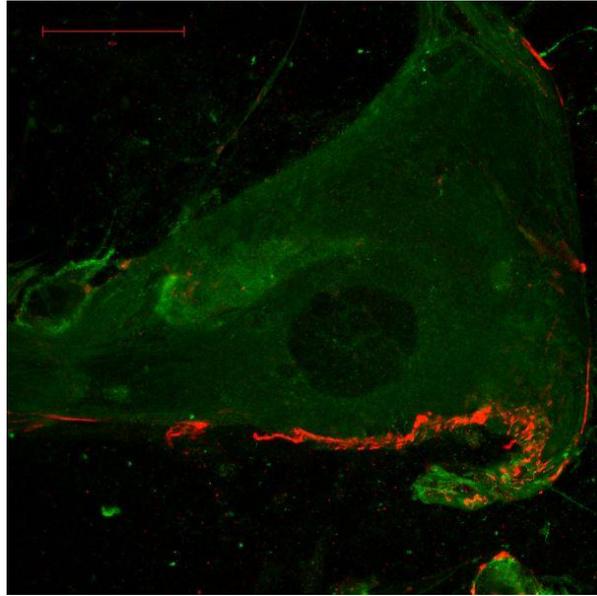


Abbildung 41: Immunzytochemischer Nachweis von Fibronectin (Cy5, rot) und GFP (Cy2, grün) (Skala = 50 μm)

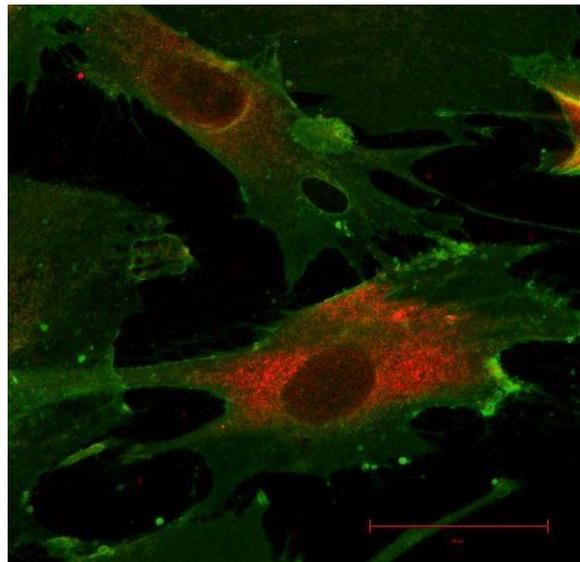


Abbildung 42: Immunzytochemischer Nachweis von Kollagen III (Cy5, rot) und GFP (Cy2, grün) (Skala = 50 μm)

6.5.3 Induktion profibrotischer Aktivität von PDGFR- β -positiven Zellen

Aufgrund der Annahme, dass PDGFR- β -positive Zellen extrazelluläre Matrix synthetisieren können und damit fibrotische Eigenschaften haben, wurden renale PDGFR- β -positive Zellen (Isolierung durch FACS) in Kultur gebracht, mit Zytokinen (IL-1 β , IL-17A, TNF- α , TGF- β 1) behandelt und ihr fibrotisches Potenzial mittels Western Blots quantifiziert. Dabei erfolgte eine Detektion von Kollagen I, Fibronectin und Decorin. Wenn es nicht anderweitig bezeichnet ist, wurden die Zytokine in einer Konzentration von 50 ng/ml eingesetzt. Die Inkubation mit PDGF-BB erfolgte stets in einer Konzentration von 48 ng/ml.

6.5.3.1 Wirkung von IL-1 β , IL-17A und TNF- α auf die Synthese extrazellulärer Matrix durch PDGFR- β -positive Zellen

In einem ersten Schritt wurden zwei verschiedene Konzentrationen der drei Zytokine IL-1 β , IL-17A und TNF- α eingesetzt. Bei allen Versuchsgruppen folgte im Anschluss an die Behandlung eine Inkubation mit PDGF-BB (48 ng/ml). Die Bezeichnung „basal“ steht dabei für PDGFR- β -positive Zellen, die ausschließlich mit frischem Medium_{full} versetzt wurden. Während beide Konzentrationen des IL-1 β keinen Einfluss auf den Gehalt an Kollagen I im Zelllysat hatte, kam es bei allen anderen Behandlungskonstellationen zu einer signifikanten Zunahme des Proteingehalts ($p < 0,0001$).

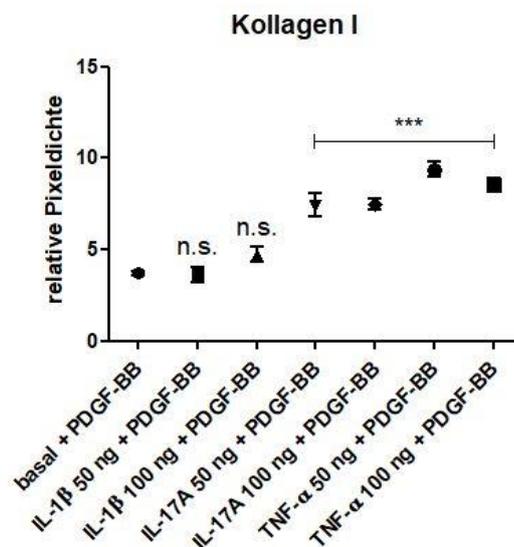


Abbildung 43: Quantifizierung von Kollagen I im Zelllysat mittels Western Blot nach Behandlung mit IL-1 β , IL-17A und TNF- α : Nach einer vierstündigen Behandlung mit IL-1 β (50 bzw. 100 ng/ml), IL-17A (50 bzw. 100 ng/ml) und TNF- α (50 bzw. 100 ng/ml) und einer anschließenden Inkubation mit PDGF-BB (48 ng/ml) wurde der Gehalt an Kollagen I im Zelllysat mittels Western Blot quantifiziert. Während die Inkubation mit IL-1 β keinen signifikanten Einfluss auf die Kollagen-I-Menge hatte, kam es nach der Behandlung mit sowohl IL-17A als auch TNF- α zu einem deutlichen Anstieg der Proteinmenge ($n = 6$; $p < 0,0001$).

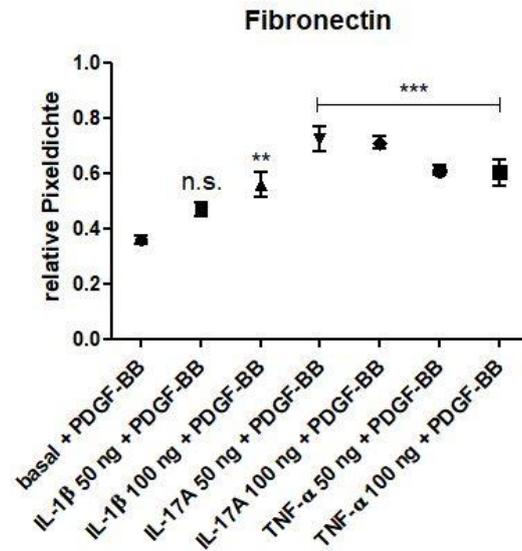


Abbildung 44: Quantifizierung von Fibronectin im Zelllysate mittels Western Blot nach Behandlung mit IL-1 β , IL-17A und TNF- α : Nach einer vierstündigen Behandlung mit IL-1 β (50 bzw. 100ng/ml), IL-17A (50 bzw. 100 ng/ml) und TNF- α (50 bzw. 100 ng/ml) und einer anschließenden Inkubation mit PDGF-BB (48 ng/ml) wurde der Gehalt an Fibronectin im Zelllysate mittels Western Blot ermittelt. Während die Inkubation mit 50 ng/ml IL-1 β keine signifikante Zunahme bewirkte, führten alle weiteren Behandlungskonstellationen zu einem signifikanten Anstieg des Gehalts an Fibronectin im Zelllysate (n = 6; p < 0,0001).

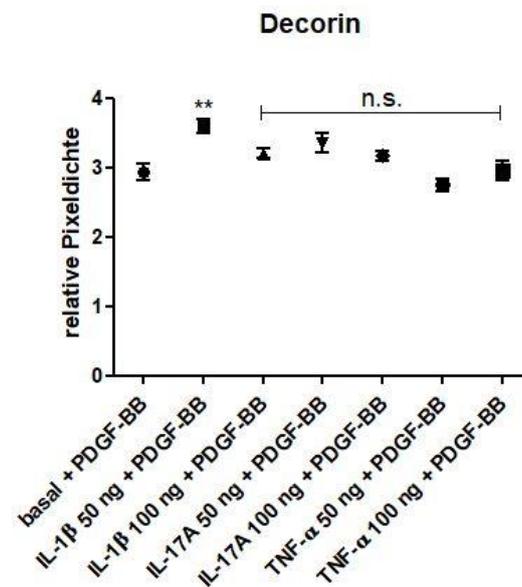


Abbildung 45: Quantifizierung von Decorin im Zelllysate mittels Western Blot nach Behandlung mit IL-1 β , IL-17A und TNF- α : Lediglich eine Behandlung mit 50 ng/ml IL-1 β und einer anschließenden Inkubation mit 48 ng/ml PDGF-BB sorgte für eine signifikante Zunahme der Menge an Decorin. Bei allen anderen Versuchsgruppen gab es keine signifikante Änderung im Vergleich zu den basalen Zellen (n = 6; p = 0,0002).

Ergänzend zur ersten Versuchsreihe wurde eine weitere durchgeführt, bei der kein zweiter Inkubationsschritt mit PDGF-BB erfolgte. Somit wurden die Zellen nach der Behandlung mit den Zytokinen direkt für die Zellysatherstellung vorbereitet. Bei der anschließenden Quantifizierung mittels Western Blots führte keine der Behandlungen zu einer signifikanten Zunahme der Kollagen I-Produktion ($p = 0,4709$). Der Gehalt an Fibronectin nahm dagegen nach der Inkubation mit jedem der drei Zytokine signifikant zu ($p = 0,0016$). Eine Zunahme des Decoringehalts im Zellysate erfolgte lediglich im Falle einer Behandlung mit IL-17A ($p = 0,0069$).

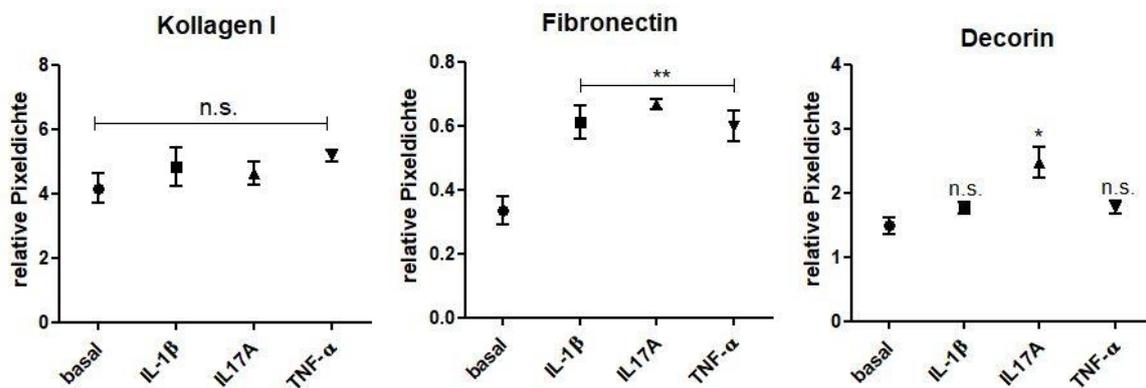


Abbildung 46: Quantifizierung von Kollagen I, Fibronectin und Decorin im Zellysate mittels Western Blot nach Behandlung mit IL-1 β , IL-17A und TNF- α : Während eine Behandlung mit allen drei Zytokinen keinen Einfluss auf die Synthese von Kollagen I hatte ($n = 4$; $p = 0,4709$), erreichten sie dagegen bei Fibronectin eine signifikante Erhöhung der Proteinmenge ($n = 4$; $p = 0,0016$). Eine Zunahme des Decoringehalts im Zellysate war lediglich nach einer Behandlung mit IL-17A zu verzeichnen ($n = 4$; $p = 0,0069$).

6.5.3.2 Wirkung von TGF- β 1 auf die Synthese extrazellulärer Matrix durch PDGFR- β -positive Zellen

Als ein weiteres Zytokin mit profibrotischer Wirkung kam das TGF- β 1 zum Einsatz. Es wurde in den Konzentrationen 2 ng/ml und 20 ng/ml eingesetzt. Während das TGF- β 1 in der niedrigeren Konzentration sowohl mit als auch ohne das PDGF-BB eine signifikante Zunahme der Kollagen I-Menge bewirkte ($p = 0,0034$; s. Abb. 47), hatte lediglich die alleinige Behandlung mit TGF- β 1 einen Einfluss auf den Gehalt an Fibronectin ($p < 0,0001$) und Decorin ($p < 0,0001$) im Zellysate. Eine zusätzliche Inkubation mit PDGF-BB hatte ein nicht signifikantes Ergebnis zur Folge (s. Abbildung 48 + 49).

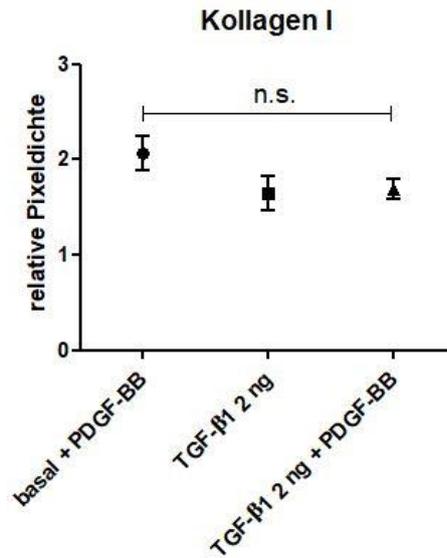


Abbildung 47: Quantifizierung des Kollagen I im Zelllysate mittels Western Blot nach Behandlung mit TGF-β1: Sowohl eine alleinige Behandlung mit TGF-β1 (2 ng/ml) als auch eine zusätzliche Inkubation mit PDGF-BB (48 ng/ml) hatten einen signifikanten Einfluss auf den Gehalt an Kollagen I und sorgten für einen Anstieg der Proteinmenge im Zelllysate (n = 4; p = 0,0034).

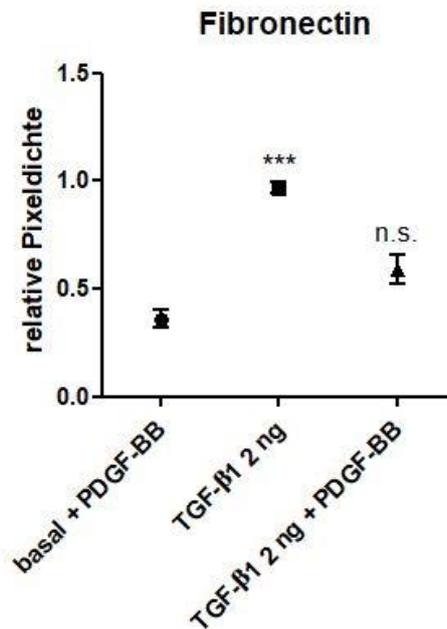


Abbildung 48: Quantifizierung des Fibronectin im Zelllysate mittels Western Blot nach Behandlung mit TGF-β1: Nach einer Behandlung mit TGF-β1 (2 ng/ml) kam es zu einem signifikanten Anstieg des Fibronectingehalts im Zelllysate. Eine zusätzliche Inkubation mit PDGF-BB hatte keinen Einfluss auf die fibrotische Aktivität der PDGFR-β-positiven Zellen bezüglich der Fibronectinmenge (n = 4; p < 0,0001).

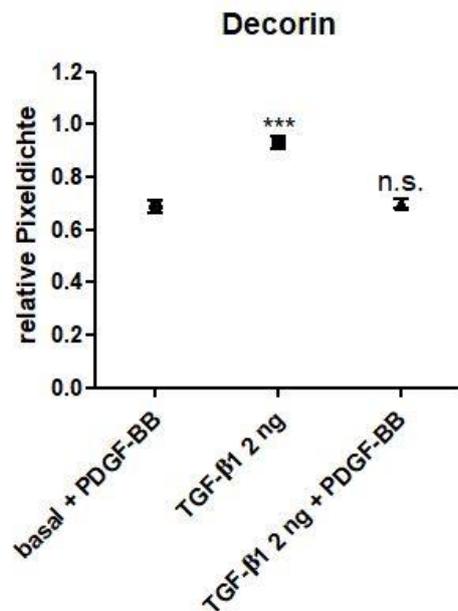


Abbildung 49: Quantifizierung des Decorin im Zelllysate mittels Western Blot nach Behandlung mit TGF-β1: Während die alleinige Behandlung der PDGFR-β-positiven Zellen mit TGF-β1 eine signifikante Zunahme des Decoringehalts im Zelllysate zur Folge hatte, erbrachte eine zusätzliche Inkubation mit PDGF-BB keinen signifikanten Unterschied zum Zelllysate der basalen Zellen ($n = 4$; $p < 0,0001$).

In einem weiteren Schritt wurde die Konzentration des TGF-β1 um das 10fache erhöht. Der Versuch lief unter denselben Bedingungen ab wie bei der kleineren Konzentration. Durch die Änderung der Konzentration erfolgte ein Anstieg des Kollagen I-Gehalts nach alleiniger Behandlung mit dem Zytokin. Der zweite Inkubationsschritt mit PDGF-BB sorgte für keine signifikante Zunahme der Proteinanteils ($p = 0,0190$). Dagegen konnte wiederum nach beiden Inkubationskonstellationen eine Erhöhung des Fibronectingehalts verzeichnet werden ($p = 0,0054$). Die Behandlung hatte auch auf die Decorinmenge einen Einfluss. Während das TGF-β1 alleine eine Zunahme herbeiführte, kam es nach einer zusätzlichen Behandlung mit PDGF-BB zu einem signifikanten Abfall im Vergleich zum Decoringehalt der unbehandelten Zellen ($p = 0,0013$).

Da die basalen PDGFR-β-positiven Zellen in den verschiedenen Ansätzen teils mit und teils ohne PDGF-BB (48 ng/ml) inkubiert wurden, wurde zusätzlich geprüft, ob das PDGF-BB einen Einfluss auf die fibrotische Aktivität der interstitiellen Zellen hat. Zwischen den beiden Versuchsgruppen gab es allerdings bei keinem der drei Proteine einen signifikanten Unterschied (Kollagen I: $p = 0,4260$; Fibronectin: $p = 0,7025$; Decorin: $p = 0,3317$; Abbildungen nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurde in der Versuchsreihe mit 20 ng/ml TGF-β1 das PDGF-BB bei der Inkubation der basalen Zellen außer Acht gelassen.

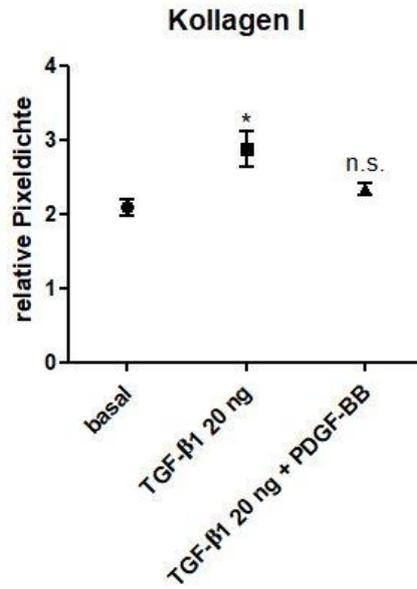


Abbildung 50: Quantifizierung des Kollagen I im Zelllysate mittels Western Blot nach Behandlung mit TGF-β1: Während eine alleinige Behandlung mit TGF-β1 eine Zunahme des Kollagen I-Gehalts im Zelllysate zur Folge hatte, erbrachte eine zusätzliche Inkubation mit PDGF-BB keinen signifikanten Unterschied zu den unbehandelten Zellen (n = 4; p = 0,0190).

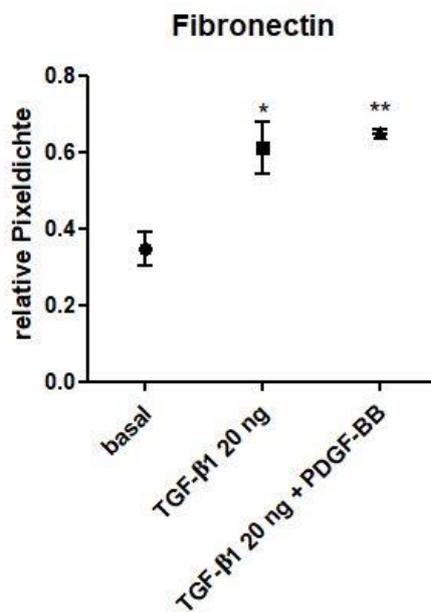


Abbildung 51: Quantifizierung des Fibronectin im Zelllysate mittels Western Blot nach Behandlung mit TGF-β1: Sowohl eine alleinige Behandlung mit 20 ng/ml TGF-β1 als auch eine zusätzliche Inkubation mit PDGF-BB führte zu einem signifikanten Anstieg des Fibronectingehalts im Zelllysate (n = 4; p = 0,0054).

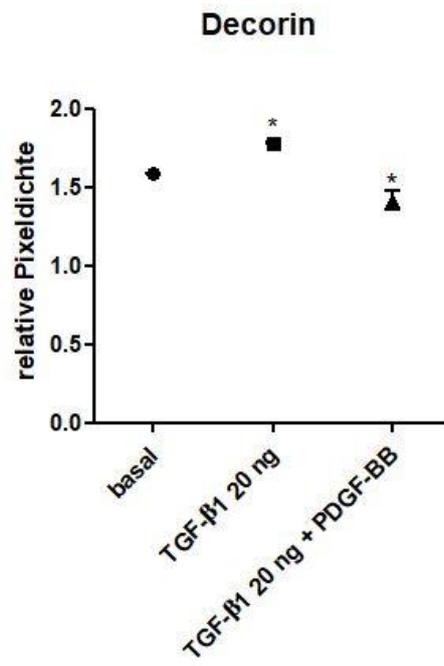


Abbildung 52: Quantifizierung des Decorin im Zelllysate mittels Western Blot nach Behandlung mit TGF- β 1: Während es nach einer Inkubation mit 20 ng/ml TGF- β 1 zu einer signifikanten Zunahme des Decoringehalts kam, fiel er nach einer zusätzlichen Behandlung mit PDGF-BB ab (n = 4; p = 0,0013).

7 Diskussion

7.1 Bedeutung parakriner Faktoren der Macula densa-Zellen für die Integrität der glomerulären endothelialen Glykokalyx

Mit Hilfe der intravitralen Multiphotonenmikroskopie sollte zunächst der Einfluss von parakrinen Faktoren aus den benachbarten MD-Zellen auf die Integrität der endothelialen Glykokalyx des Glomerulums am Tiermodell geprüft werden. Anhand von immunhistologischen Färbungen konnte vorab das Vorkommen einiger bereits in der Literatur beschriebener Bestandteile der MD bestätigt werden (Gyarmati et al. 2021b). Während PAPP-A2 und CXCL14/BRAK bei *in vitro*-Experimenten eine Erhöhung der Dichte der endothelialen Glykokalyx zur Folge hatten, zeigte sich nach einer Behandlung mit Semaphorin 3C keine signifikante Änderung. *In vivo* dagegen konnte ein degradierender Effekt durch alle drei Substanzen verzeichnet werden. Dies kommt der Beobachtung aus Vorarbeiten gleich, in denen ein Epithelschaden des proximalen Tubulus in einer verminderten Dichte der endothelialen Glykokalyx und einer vermehrten Filtration von Plasmaproteinen mündete. Innerhalb einer Versuchsreihe konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede festgestellt werden. Außerdem befand sich der mittlere Blutdruck der Versuchstiere stets im physiologischen Bereich und konnte somit auch kein Shedding der endothelialen Glykokalyx aufgrund von hypertensiven Phasen herbeiführen.

Mechanistisch ist denkbar, dass es durch den Laserschaden am Tubulusepithel zu einer Zellablation kommt, die an dieser Stelle das Tubuluslumen deutlich schmälert und somit eine Passage des Ultrafiltrats erschwert. Das damit einhergehende geringe Volumen und die geringe NaCl-Konzentration entlang des Tubulussystems wird am juxtaglomerulären Apparat über die Sensoren der MD-Zellen registriert. Folglich kommt es durch einen tubuloglomerulären Feedbackmechanismus zu einer Dilatation am *Vas afferens* des Glomerulums und somit zu einer Steigerung der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Durch das höhere Angebot an Blutvolumen kommt es über Scherkräfte zum Shedding an der endothelialen Glykokalyx, was deren Funktion als Barriere vermindert.

Ebenso ist es möglich, dass die entlang des Tubulussystems mitgeschwemmten nekrotischen Zelltrümmer bzw. Zellinhalt von den MD-Zellen als Schädigung im zugehörigen Nephron erkannt werden. Eine „olfaktorische“ Kapazität der MD-Zellen wurde bereits in einem anderen Zusammenhang postuliert (Pluznick et al. 2009). Daraufhin könnte es über bislang unbekanntes Signalkaskaden zur Sekretion von Faktoren aus den MD-Zellen ins glomeruläre Gefäßlumen kommen, die zu einer Schädigung der Glykokalyx führen können. Möglich wäre auch ein kurzzeitiger Abbau der Glykokalyx, der anschließend durch zirkulierende Bestandteile kompensiert und somit ersetzt wird. So ist

bereits bekannt, dass Klasse-3-Semaphorine mit weiteren Faktoren in Interaktion treten und daraufhin Einfluss auf die Gefäßarchitektur haben können (Bussolino et al. 2006).

Der Unterschied zwischen den hier erhobenen *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnissen resultiert wohl aus der Tatsache, dass am intravitalen Glomerulum andere Bedingungen und Einflussfaktoren vorherrschen als es in einer Zellkultur der Fall ist. Gerade am Glomerulum als Kapillarknäuel und damit Bestandteil des renalen vaskulären Systems sind die lokal vorliegenden Konditionen einem fortwährenden Wechsel unterworfen. Während der Blutdruck und zirkulierende Faktoren aus dem Blutgefäßsystem eine sich ständig ändernde Situation am Glomerulum schaffen, sind diese Einflüsse bei *in vitro*-Ansätzen nicht gegeben. Zudem ist das Glomerulum im lebenden Organismus in das Nierengewebe eingebettet und liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zu anderen funktionalen Zellen, die Einfluss auf die endotheliale Glykokalyx des Glomerulums nehmen können. Während beispielsweise intra- und extraglomerulären Mesangiumzellen als stationäre Elemente ein stetiger Modulator des Glomerulums sein können, wirken zirkulierende Bestandteile aus der Blutbahn wie Leukozyten oder Zytokine nur, wenn sie das jeweilige Glomerulum passieren. Somit ist auch nur eine kurzfristige Modulation der Endothelzellen denkbar. Im Falle der durchgeführten Experimente konnten die infundierten parakrinen Faktoren einerseits direkt aus der Richtung des Lumens auf die endotheliale Glykokalyx und damit anatomisch von der gegensätzlichen Seite aus wirken und in Interaktion treten. Andererseits ist eine Wechselwirkung und damit biochemische Veränderung der synthetisch zugeführten Faktoren mit zirkulierenden Blutbestandteilen und eine anschließende Kommunikation mit den Elementen der endothelialen Glykokalyx nicht auszuschließen.

Um den Zusammenhang zwischen einem Gewebeschaden des proximalen Tubulus und einer daraus resultierenden Degradierung der endothelialen Glykokalyx des Glomerulums abschließend zu sichern, sind weitere Forschungen bezüglich der beteiligten Signalkaskaden erforderlich.

7.1.1 Erhalt der Integrität der endothelialen Glykokalyx mittels Hydrocortison nach einem Laserschaden im proximalen Tubulusepithel

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, ob eine Dichteabnahme der endothelialen Glykokalyx durch die Gabe von Hydrocortison abgeschwächt oder sogar verhindert werden kann. An isolierten Meerschweinchenherzen konnte bereits ein protektiver Effekt durch Hydrocortison dokumentiert werden, indem das Shedding abgeschwächt wurde, welches bei einem Ischämie-Reperfusionsschaden die endotheliale Glykokalyx degradiert (Chappell et al. 2007). Speziell bei der Niere werden Glukokortikoide zur Therapie einer Vielzahl an renalen Erkrankungen eingesetzt, wie z.B. bei der Minimal Change Glomerulonephritis oder bei der IgA-Nephropathie, da

sie je nach Dosis, Dauer der Therapie und Einnahmehäufigkeit einen nephroprotektiven Effekt auf die Organfunktion haben. So können sie abschwächend auf eine bestehende Proteinurie wirken oder oftmals zu Beginn einer renalen Erkrankung die Schwere des Krankheitsverlaufs positiv beeinflussen (Ponticelli und Locatelli 2018). In den durchgeführten Intravitalversuchen hatte ein Hydrocortison-Bolus mit anschließendem laserinduziertem Epithelschaden im proximalen Tubulus *in vivo* eine deutlich schwächere Degradierung der glomerulären endothelialen Glykokalyx zur Folge. Mit einer Reduktion auf $94,5 \pm 2,5$ % der basalen Intensität der endothelialen Glykokalyx fiel der Effekt weniger stark aus als nach der Infusion parakriner Faktoren der MD-Zellen. In einem benachbarten intakten Nephron konnte nur eine geringe Änderung der Dichte der Glykokalyx verzeichnet werden. Somit wurde die Hypothese bestätigt, dass Hydrocortison zur Erhaltung der Integrität der endothelialen Glykokalyx und damit auch der glomerulären Filtrationsbarriere beiträgt.

7.1.2 Intraoperative Veränderungen am Bürstensaum des proximalen Tubulus

Ein Nebenbefund der Intravitalexperimente war, dass im Laufe der 60 Minuten eine signifikante Zunahme der Höhe des Bürstensaums im proximalen Tubulus beobachtet werden konnte. Die Zunahme war bei den Experimenten mit der Kochsalzlösung und dem Hydrocortison-Bolus und anschließendem Crop weniger stark ausgeprägt als bei Applikation von Infusionen mit PAPP-A2, PAPP-A, CXCL14/BRAK und Semaphorin-3C. Denkbar ist, dass es unter Narkosebedingungen zu einer Filtration von Glykokalyxbestandteilen kommt, die sich anschließend an die proximalen Tubulusepithelzellen anlagern und damit den Bürstensaum erhöhen. Dieser Effekt zeigte sich von proximal nach distal mit abnehmender Ausprägung, was die Vermutung einer Filtration zusätzlich stützt. Das Phänomen wurde durch die Anfärbung mittels WGA-Fluorescein sichtbar, das ein Molekulargewicht von 35 kDa aufweist und über zwei Bindungsstellen an N-Acetylglucosamin binden kann (Nagata und Burger 1974). Neben dem Molekulargewicht ist auch die Ladung und Gestalt eines Moleküls entscheidend für die Filtrierbarkeit entlang der glomerulären Filtrationsbarriere (Ballermann et al. 2021). Da Albumin mit einem Molekulargewicht von 69 kDa die glomeruläre Filtrationsbarriere partiell passieren kann, ist eine Passage des WGA-Fluorescein nicht auszuschließen (Tojo und Kinugasa 2012). Dies erklärt möglicherweise, dass im Falle einer Infusion mit Natriumchlorid ebenso eine Passage des Farbstoffs erfolgt. Bei der Natriumchlorid-Infusion handelte es sich um eine isotone Lösung, die in einer Infusionsrate appliziert wurde, wie sie auch im klinischen Bereich Anwendung findet und somit keine Degradierung der endothelialen Glykokalyx aufgrund eines Sheddings hervorrufen sollte. Der Unterschied zwischen den Versuchen mit NaCl und Hydrocortison sowie denen mit den parakrinen Faktoren und PAPP-A war statistisch signifikant. Darum

ist weitgehend ausgeschlossen, dass der Dichteabfall der endothelialen Glykokalyx aufgrund der Größe des Farbstoffs und seiner potenziellen Filtration im Laufe des Versuchs zu verzeichnen war, sondern tatsächlich aufgrund einer Degradierung an der endothelialen Glykokalyx stattgefunden hat.

Abschließend bleibt offen, inwieweit eine Erhöhung des Bürstensaums im proximalen Tubulus tubuläre Mechanismen insbesondere Rezeptoraktivitäten und die Resorptionskapazität für Albumin beeinflusst. Außerdem stellt sich die Frage, ob diese Modulierung des Bürstensaums bei einer potenziell veränderter Resorptionskapazität des proximalen Tubulus eine Proteinurie hervorrufen könnte.

7.1.3 Modulation von Bausteinen der glomerulären endothelialen Glykokalyx mittels parakriner Faktoren aus den Macula densa-Zellen

Um unter kontrollierten Bedingungen zu klären, welche Bestandteile der endothelialen Glykokalyx nach einer Modulation mittels parakriner Faktoren aus den MD-Zellen betroffen sein könnten, wurden humane renale glomeruläre Endothelzellen (HRGEC) zunächst *in vitro* behandelt und anschließend die Auswirkungen auf ausgewählte Elemente der Glykokalyx immunzytochemisch untersucht. Markiert und damit sichtbar gemacht wurde die endotheliale Glykokalyx mit dem WGA-Fluorescein, das sich mit zwei Bindungsstellen an N-Acetylglucosamin bindet (Nagata und Burger 1974). Dies ist vermehrt in der Hyaluronsäure sowie im Heparan- und Keratansulfat zu finden, welche als Bestandteile der endothelialen Glykokalyx gelten (Ballermann et al. 2021).

Bei dieser Versuchsreihe lag der Fokus auf den Bausteinen Syndecan 1, Versican, Biglycan und der Hyaluronsäure. Während die ersten drei genannten zu den Core-Komponenten der endothelialen Glykokalyx zählen, ist der Anteil an der Hyaluronsäure dynamisch und steht in einem ständigen Gleichgewicht mit der Fraktion, die im Blut zirkuliert (Ballermann et al. 2021). Die Hyaluronsäure gilt als ein Ligand des CD44-Rezeptors, der neben Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie Osteopontin, Kollagenen und Wachstumsfaktoren auch Metalloproteinasen bindet (Nandi et al. 2000; Thapa und Wilson 2016). So ist es denkbar, dass CD44 auch die Metalloproteinase PAPP-A2 als Ligand erkennt und diese mit einer höheren Affinität bindet als die Hyaluronsäure. Dies könnte die Ursache dafür sein, dass die Hyaluronsäure nach einer Inkubation mit PAPP-A2 mit einem geringeren Gehalt nachweisbar ist. Da alle drei parakrinen Faktoren der MD-Zellen einen Abfall des Hyaluronsäuregehalts bewirkten, lag es nahe, dass jene auch einen Einfluss auf das Versican haben können. Versican gehört zu den Hyalektinen und bindet beispielsweise Zytokine und Wachstumsfaktoren. Somit geht es sowohl eine Bindung mit der Hyaluronsäure als auch mit Lektinen ein (Iozzo

und Schaefer 2015; Ballermann et al. 2021). Es ist nicht auszuschließen, dass sich CXCL14/BRAK entweder in seiner Funktion als Zytokin an das Versican bindet und es dabei moduliert oder dass es über die Hyaluronsäure indirekt eine Wirkung auf das Versican hat. Auch Semaphorin-3C hatte einen abschwächenden Effekt auf die Intensität des angefärbten Versicans. Nachdem die Wirkung des Semaphorin-3C der des VEGF-A – ein Wachstumsfaktor mit proliferativen und adhäsiven Eigenschaften bei der Angiogenese – sehr ähnlich ist, lässt sich vermuten, dass das Versican neben den klassischen Wachstumsfaktoren auch eine Bindung mit dem Semaphorin-3C eingehen und die Glykokalyx der glomerulären Endothelzellen beeinflussen kann (Banu et al. 2006). Des Weiteren wurde in dieser Versuchsreihe festgestellt, dass nach einer Inkubation mit PAPP-A2 der Anteil am Syndecan-1 der Endothelzellen verringert war. Dass Matrixmetalloproteinasen Syndecan 1 spalten können, ist schon länger bekannt (Manon-Jensen et al. 2013; Endo et al. 2003). Daher ist es auch denkbar, dass PAPP-A2 über bislang unbekannt Signalwege am Syndecan 1 enzymatisch aktiv wird und deren Struktur so abbaut, dass es immunzytochemisch weniger deutlich nachweisbar ist. Dass die Filtrationsfunktion des Glomerulums aufgrund eines geringeren Gehalts an Syndecan 1 beeinträchtigt wird, ist unwahrscheinlich (Savery et al. 2013). Ein reduzierter Anteil an Hyaluronsäure in der endothelialen Glykokalyx dagegen verschlechtert im Allgemeinen die endotheliale Barrierefunktion (Henry und Duling 1999). Auch die glomeruläre Filtrationsbarriere wird bei einem Mangel an Hyaluronsäure so beeinflusst, dass es in Form einer erhöhten Filtration von Proteinen, im Speziellen einer Albuminurie in Erscheinung tritt (van den Berg et al. 2019).

Die erhobenen Befunde der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, wie wichtig die Integrität der endothelialen Glykokalyx für die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere ist. Dass einzelne Komponenten moduliert werden können, zeigt, wie komplex ihre Struktur ist und gleichzeitig, wie empfindlich sie auf äußere Einflüsse reagieren kann. Umso offensichtlicher ist es, dass eine dauerhafte Degradierung der endothelialen Glykokalyx vermieden bzw. durch protektive Maßnahmen verhindert werden sollte, um nicht in einer pathologischen Proteinurie und weiteren Folgeerkrankungen zu münden.

7.2 PDGFR- β -positive Zellen als Regulator im renalen Interstitium

7.2.1 Migrationskapazität von interstitiellen PDGFR- β -positiven Zellen

Um neben dem renalen Glomerulum eine weitere anatomische Struktur unter dem Gesichtspunkt der Degeneration und Regeneration zu betrachten, wurden in einem zweiten Teilprojekt interstitielle PDGFR- β -positive Zellen der Niere und ihre funktionellen Eigenschaften in den Fokus genommen. Es ist bereits bekannt, dass jene Zellen zur Migration fähig sind und dass sie die

tubuläre Regeneration unterstützen können (Schiessl et al. 2018). Somit wurde nach Etablierung eines Assays die Migrationskapazität von PDGFR- β -positiven Zellen untersucht. Damit wurde die Hypothese geprüft, dass diverse Stimuli eine Bewegung der Zellen mit unterschiedlich starkem Ausmaß hervorrufen können. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf Faktoren, die mit regenerativen Prozessen assoziiert sind.

In einem ersten Ansatz wurde festgestellt, dass das PDGF-DD als Lockstoff eine verstärkte Migration von PDGFR- β -positiven Zellen hervorrufen kann. Dieser Effekt war zu erwarten, da PDGF-DD eine Affinität zum PDGFR- β besitzt (Kazlauskas 2017; Ostendorf et al. 2014). Wurden dagegen die Zellen mit Trepidil, einem Inhibitor des PDGFR- β , vorbehandelt, fiel die zurückgelegte Strecke zum PDGF-DD deutlich geringer aus (Schiessl et al. 2018; Ostendorf et al. 2014). Es konnte bereits beobachtet werden, dass PDGF-DD von beschädigten Tubuli exprimiert wird (Changsirikulchai et al. 2002; Schiessl et al. 2018). Dies untermauert die Hypothese, dass PDGFR- β -positive Zellen regenerative Vorgänge unterstützen, indem sie zum Ort des Defekts wandern und dort eine reparative Funktion erfüllen.

In den beschriebenen Versuchen konnte auch eine verstärkte Migration der interstitiellen Zellen zum FGF-9 festgestellt werden. FGF-9 gilt neben FGF-1 und FGF-2 als ein Ligand des FGFR-3 (*fibroblast growth factor receptor-3*), welcher in den Epithelien vom proximalen und distalen Tubulus sowie in medullären Sammelrohren lokalisiert ist (Cancilla et al. 2001; Ornitz et al. 1996). Da FGF-9 allerdings lediglich im proximalen Tubulus nachweisbar ist, geht man davon aus, dass es in diesem Bereich der Niere ausschließlich eine Bindung mit dem FGFR-3 eingeht (Cancilla et al. 2001). Zudem wird angenommen, dass FGF-9 die Zellmigration in der Niere reguliert (LI et al. 2021). Die Ergebnisse des Migrationsassays mit FGF-9 lassen vermuten, dass die Regulation der Migration auch PDGFR- β -positive Zellen betrifft.

In einem weiteren Ansatz wurde der Einfluss von Albumin auf das Migrationsverhalten der interstitiellen Zellen geprüft. Bei einer Albuminkonzentration, wie sie physiologisch im Urin vorliegt (10 ng/ml), kam es zu einer deutlichen Bewegung in Richtung des Lockstoffs. Bei der höheren Konzentration (35 μ g/ml) erhöhte sich die Anzahl und Strecke der Zellen in Richtung des Albumins. Dieser Versuch wurde vor dem Hintergrund durchgeführt, dass bei einer Schädigung von Tubuli oder Blutgefäßen Urin bzw. Blutserum mit der jeweiligen Albuminkonzentration ins Interstitium eintritt und damit potenziell interstitiellen Zellen ausgesetzt ist. Albumin, das über die glomeruläre Filtrationsbarriere in den proximalen Tubulus gelangt, wird dort überwiegend von den Epithelzellen resorbiert. Die restlichen Anteile werden entweder im Verlauf des Tubulussystems zurückgewonnen oder über den Endharn ausgeschieden. Im Falle einer geschädigten Filtrationsbarriere oder

gestörten Resorptionsfunktion des proximalen Tubulus, kommt es im proximalen Tubulus zu einem Überangebot an Albumin, welches nicht mehr verhältnismäßig resorbiert werden kann. Folglich muss das überschüssige Albumin über den Endharn ausgeschieden werden (Tojo und Kinugasa 2012). Fraglich bleibt dabei, ob PDGFR- β -positive Zellen auch von Albumin angelockt werden, das im Überschuss durch Endozytose in die Epithelzellen des proximalen Tubulus gelangt. Dort wird es in Lysosomen abgebaut und anschließend dem Blutgefäßsystem zugeführt oder durch Transzytose direkt in benachbarte Kapillaren abgegeben (Dickson et al. 2014). Im Falle einer tubulären Schädigung würde der proximale Tubulus undicht werden und das Albumin könnte ins Interstitium austreten. Möglicherweise erkennen interstitielle Zellen über unbekannte Signalwege, dass die Menge des resorbierten Albumins nicht physiologisch ist und werden deshalb zur Reparatur ange-lockt.

Abschließend wurde untersucht, welchen Einfluss die Hyaluronsäure auf das Migrationsverhalten von PDGFR- β -positiven Zellen hat. Im Migrationsassay löste sie eine Chemotaxis der interstitiellen Zellen aus. Da die Hyaluronsäure den PDGFR- β erkennen und seine Komplexierung mit dem PDGF modulieren kann, liegt die Vermutung nahe, dass sie jene Zellen auch anlocken kann (Balamurugan et al. 2021). Des Weiteren wurde in den letzten Jahren erkannt, dass die Hyaluronsäure sowohl einen degenerativen und als auch einen regenerativen Charakter hat und damit paradoxe Funktionen im Organismus erfüllt (Kaul et al. 2021). Während sie einerseits an der Pathogenese fibrotischer Prozesse im Organismus beteiligt ist, kann sie andererseits antiinflammatorische und antifibrotische Effekte initiieren. Dabei scheint das Molekulargewicht der Hyaluronsäure entscheidend zu sein (Inokoshi et al. 2013; Litwiniuk et al. 2016). Speziell in der Niere ist die Paradoxität ebenso zu verzeichnen. HMW (= „high molecular weight“)-Hyaluronsäure beispielsweise, deren Synthese durch IL-10 induziert wurde, kann fibrotische Vorgänge im I/R (= „ischemia reperfusion“)-Modell reduzieren (Wang et al. 2020). Die Interaktion von LMW (= „low molecular weight“)-Hyaluronsäure mit CD44 dagegen erhöht die Anwesenheit fibrotischer Moleküle wie Kollagen und α -SMA (Colombaro et al. 2013). Außerdem konnte in einem I/R-Modell ebenso beobachtet werden, dass zu Beginn des Ischämie-Reperfusionsschadens der Niere das Vorkommen von HMW-Hyaluronsäure dominiert, die dann im Anschluss in kleinere Fragmente degradiert wird und somit als LMW-Hyaluronsäure vorliegt (Declèves et al. 2012). Nachdem im durchgeführten Migrationsassay HMW-Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von 1200 kDa zur Anwendung kam, kann abschließend nicht klar definiert werden, ob die interstitiellen PDGFR- β -positiven Zellen entweder unter dem potenziellen Vorwand von Regeneration oder von Degeneration ange-lockt wurden. Trotz allem lag das Augenmerk vorwiegend auf der Migration im Allgemeinen, zumal in diesem Assay unter

in vitro-Bedingungen eine Vielzahl von Faktoren nicht berücksichtigt werden kann, die im lebenden Organismus zwangsläufig vorausgesetzt werden müssen.

Anhand dieses Spektrums an chemotaktisch aktiven Stoffen, die Einfluss auf die Migrationskapazität von PDGFR- β -positiven Zellen hatten, wird verdeutlicht, dass die Funktion dieser Zellen keineswegs nur auf einen Ort in der Niere beschränkt ist. Ihre Fähigkeit zur Migration lässt vermuten, dass sie durch diverse Stimuli dorthin angelockt werden können, wo ihr Einsatz benötigt wird, z.B. zur Regeneration eines Gewebedefekts.

7.2.2 *In vitro*-Modulation des profibrotischen Potenzials von PDGFR- β -positiven Zellen durch Zytokine

Die Beteiligung von PDGFR- β -positiven Zellen an der Pathogenese der interstitiellen Nierenfibrose ist schon länger bekannt (Ortiz 2020; Fuchs et al. 2021; Floege et al. 2008). Ebenso in anderen Organen, wie zum Beispiel dem Colon oder der Lunge, ist ihr Potenzial zur Synthese extrazellulärer Matrix nachgewiesen (Abdollahi et al. 2005; Nair et al. 2014). So wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese geprüft, ob IL-1 β , IL-17A, TNF- α und TGF- β 1 die Produktion extrazellulärer Matrix durch interstitielle PDGFR- β -positive Zellen induzieren können.

Zunächst wurde an unbehandelten PDGFR- β -positiven Zellen immunzytochemisch der Nachweis von Kollagen I, Kollagen III, Fibronectin und Decorin erbracht. Im Anschluss wurden wiederum PDGFR- β -positive Zellen bis zur Konfluenz kultiviert und in verschiedenen Konstellationen mit den oben genannten Zytokinen und dem PDGF-BB behandelt. Das anschließend hergestellte Zelllysats wurde in Western Blots eingesetzt und ihr Gehalt an Kollagen I, Fibronectin und Decorin quantitativ bestimmt.

Nach einer Behandlung mit IL-1 β konnte keine höhere Syntheserate von Kollagen I verzeichnet werden. Auch eine Verdopplung der Konzentration des Zytokins und eine zusätzliche Inkubation mit PDGF-BB konnten keinen signifikanten Unterschied zu den basalen Zellen erzielen. Lediglich bei der niedrigeren Konzentration des IL-1 β und einer anschließenden Behandlung mit PDGF-BB erhöhte sich der Decoringehalt des Zelllysats. Eine Zunahme der Fibronectinmenge wurde bei einer IL-1 β -Konzentration von 100 ng/ml mit einer Inkubation von PDGF-BB sowie einer alleinigen Behandlung mit 50 ng/ml des IL-1 β erreicht.

Wurden die interstitiellen Zellen mit IL-17A inkubiert, konnte stets ein Mehrgehalt an Fibronectin festgestellt werden. Dabei war sowohl die Konzentration des Zytokins als auch eine zusätzliche Behandlung mit PDGF-BB unerheblich. Auf die Synthese von Decorin hatte ausschließlich das IL-17A

mit 50 ng/ml ohne PDGF-BB einen Einfluss. Die Kollagen I-Produktion konnte bei 50 und 100 ng/ml des IL-17A mit einer PDGF-BB-Inkubation gesteigert werden. Das Zytokin TNF- α hatte keine Auswirkung auf die Decorin-Produktion. Dagegen konnte bei allen Konstellationen ein höherer Gehalt an Fibronectin bestimmt werden. Beide Konzentrationen und eine anschließende Inkubation mit PDGF-BB erhöhten die Menge an Kollagen I.

In einem letzten Ansatz wurden die Zellen mit dem TGF- β 1 behandelt. In den meisten Ansätzen genügte eine alleinige Behandlung mit dem Zytokin, um die Proteinmenge zu erhöhen. Eine weitere Inkubation mit PDGF-BB erhöhte bei vorherigem Einsatz von 2 ng/ml des TGF- β 1 nur die Syntheserate für das Kollagen I. Gleiches galt für das Fibronectin, wenn 20 ng/ml des TGF- β 1 verwendet wurden.

Während IL-1 β und TNF- α die Kollagen-I-Produktion im Herzen *in vitro* abschwächen können, erzielen IL-1 β , IL-17A und TNF- α in Kombination mit PDGF-BB eine Proliferation von glatten Muskelzellen im Darm, welche mit einer Synthese von extrazellulärer Matrix assoziiert sind (Siwik et al. 2000; Nair et al. 2014). Ebenso die Bindung von TGF- β 1 an seinen Rezeptor korreliert mit der Synthese von Kollagen I und Fibronectin, die potenziell von interstitiellen PDGFR- β -positiven Zellen ausgeht. Auch wenn ein Knock-out des TGF- β -Rezeptors bei PDGFR- β -positiven Zellen eine Reduktion der mRNA für Kollagen und Fibronectin in der Niere bewirkten, konnte dies fibrotische Prozesse in der Niere insgesamt nicht reduzieren. Dabei ist zu beachten, dass die Quantität eines mRNA-Vorkommens nicht zwangsläufig die tatsächliche Syntheserate widerspiegeln muss (Fuchs et al. 2021). Zudem ist es auch möglich, dass das TGF- β 1 die Aktivität von Metalloproteinasen erhöht und somit der tatsächliche Gehalt an extrazellulärer Matrix niedriger erscheint, obwohl ihre Synthese ebenso durch das TGF- β 1 induziert wurde (Meng et al. 2015). An anderer Stelle konnte *in vitro* gezeigt werden, dass TGF- β 1 die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten im Prozess der Wundheilung initiieren und darum die Synthese von Kollagen und Fibronectin indirekt modulieren kann (Sapudom et al. 2015).

Diese Inkonsistenz der fibrotischen Wirkung durch Zytokine spiegelt sich auch in den durchgeführten Versuchen wider. Es wurde zwar stets auf die nahezu 100%-ige Konfluenz der Zellkulturschale sowie die Fluoreszenz des GFP und damit ein Vorliegen des PDGFR- β geachtet, allerdings konnte kein Einfluss auf den Anteil an den jeweiligen Zelltypen genommen werden. Somit ist nicht auszuschließen, dass in einzelnen Zellkulturschalen ein überdurchschnittlich hoher Anteil an Zellen vorkam, die vor allem für die Synthese von z.B. Fibronectin verantwortlich waren. Trotz allem wird deutlich, dass PDGFR- β -positive Zellen *in vitro* unter der Beteiligung von inflammatorischen Zytokinen einen signifikanten Einfluss auf die Pathogenese von fibrotischen Prozessen haben.

In vitro-Versuche und ihre erhobenen Ergebnisse sind als Anstoß für zukünftige Projekte zu verstehen. Für eine abschließende Beurteilung der Rolle von PDGFR- β -positiven Zellen in der interstitiellen Nierenfibrose bedarf es einer Ergänzung durch weitere Experimente (z.B. *in vivo*), die den Hinweis auf mögliche Mechanismen untermauern können.

8 Zusammenfassung

Die endotheliale Glykokalyx ist Bestandteil der glomerulären Filtrationsbarriere und trägt damit zur Ultrafiltration des Blutes bei. Da in Vorarbeiten gezeigt wurde, dass ihre Dichte nach einer laserinduzierten Zellablation im proximalen Tubulus abnahm, sollte nun geklärt werden, inwieweit eine Modulation ihrer Struktur möglich ist und welche Komponenten dabei betroffen sein können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese geprüft, dass drei ausgewählte parakrine Faktoren aus den MD-Zellen (PAPP-A2, CXCL14/BRAK, Semaphorin-3C) einen Einfluss auf die Integrität der glomerulären endothelialen Glykokalyx haben. Als Komponente der glomerulären Filtrationsbarriere konnte sie in ihrer Dichte mittels PAPP-A2, PAPP-A, CXCL14/BRAK sowie Semaphorin-3C degradiert und damit in ihrer Gesamtstruktur moduliert werden.

Um besser nachvollziehen zu können, welche Bestandteile der endothelialen Glykokalyx bei Veränderungen der Dichte betroffen sein könnten, wurde mittels Immunzytochemie vier wesentliche Bausteine der Glykokalyx untersucht. Syndecan 1, Versican und Biglycan als Core-Komponenten und Hyaluronsäure als dynamisches Element wurde auf basalen und behandelten (PAPP-A2, CXCL14/BRAK, Semaphorin-3C) HRGEC angefärbt. Während beim Nachweis von Biglycan kein signifikanter Unterschied zwischen den basalen und den behandelten Zellen festgestellt werden konnte, wurde nach dem Einsatz von PAPP-A2 ein signifikanter Abfall der Intensität von Syndecan 1 gemessen. Eine Inkubation mit CXCL14/BRAK oder Semaphorin-3C hatte keinen Einfluss auf den Anteil an Syndecan 1. Dieselben parakrinen Faktoren hatten einen signifikant abschwächenden Effekt auf die Fraktion des Versicans, während die Behandlung mit PAPP-A2 ohne Auswirkung auf die Intensität des Hyalektins blieb. Der Anteil an Hyaluronsäure verringerte sich in allen drei Versuchsgruppen signifikant.

In einem zweiten Teilprojekt wurden die Migrationskapazität und die profibrotische Aktivität von interstitiellen PDGFR- β -positiven Zellen in der Niere untersucht. Es sollte zum einen geprüft werden, ob und welche Faktoren *in vitro* eine Migration der Zellen bewirken können. Zum anderen wurde dokumentiert, ob eine Behandlung mit Zytokinen die fibrotische Aktivität der interstitiellen Zellen induzieren kann.

PDGFR- β -positive Zellen konnten durch ihren Liganden PDGF-DD angelockt werden. Eine Vorbehandlung der Zellen mit dem PDGFR- β -Inhibitor Trapidil dagegen schwächte die Chemotaxis durch PDGF-DD ab. Neben dem Wachstumsfaktor FGF-9 und einer Albuminkonzentration, wie sie physiologisch im Blut vorliegt, konnte auch die Hyaluronsäure eine Migration der interstitiellen Zellen herbeiführen. Der Wachstumsfaktor EGF, Urin von Mäusen sowie das Tamm-Horsefall-Protein und

der Entzündungsmediator Prostaglandin I₂ dagegen hatten keinen signifikanten Effekt auf die Migrationskapazität PDGFR- β -positiver Zellen.

Abschließend wurde der Einfluss von Zytokinen auf PDGFR- β -positive Zellen im Hinblick auf ihr Potenzial, extrazelluläre Matrix zu synthetisieren, untersucht. Dafür wurden PDGFR- β -positive Zellen in unterschiedlichen Konstellationen mit IL-1 β , IL-17A, TNF- α , TGF- β 1 sowie PDGF-BB inkubiert und im Anschluss jeweils der Herstellung von Zelllysat zugeführt. In Western Blots wurde daraufhin der Gehalt an Kollagen I, Fibronectin und Decorin detektiert. Während IL-1 β , IL-17A sowie TNF- α ohne eine zusätzliche Behandlung mit PDGF-BB vor allem die Produktion von Fibronectin und weniger die des Kollagen I sowie Decorins beeinflussten, hatte eine Inkubation mit TGF- β 1 ohne PDGF-BB stets eine Zunahme der extrazellulären Matrixproteine zur Folge. Eine Behandlung mit IL-17A bzw. TNF- α und zusätzlichem Einsatz von PDGF-BB konnte die Syntheserate von Kollagen I signifikant erhöhen. Dieselben Substanzen bewirkten allerdings keine Zunahme der Menge an Decorin im jeweiligen PDGFR- β -Zelllysat.

Insgesamt stützen die erhobenen Daten die Hypothese, dass die endotheliale Glykokalyx nach einem Laserschaden im proximalen Tubulus durch die Sekretion von parakrinen Faktoren aus den MD-Zellen degradiert wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch *in vitro* eine Modulation einzelner Komponenten der endothelialen Glykokalyx möglich ist und diese als Angriffspunkte der parakrinen Faktoren angesehen werden können.

PDGFR- β -positive Zellen leisten einen Beitrag zu Regulationsmechanismen im renalen Interstitium. Neben ihrer Fähigkeit zur Migration und damit Reaktion auf diverse Stimuli sind sie in der Lage, nach Induktion durch inflammatorische Zytokine ihre Synthese von extrazellulärer Matrix zu modulieren. Somit wurde die Annahme bestätigt, dass sie an der Pathogenese der interstitiellen Nierenfibrose beteiligt sind.

9 Summary

The endothelial glycocalyx is an integral part of the glomerular filtration barrier and thus contributes to the ultrafiltration of the blood. Since their density has decreased in preliminary work after laser-induced cell ablation in the proximal tubule, we wanted to figure out if a modulation of the structure is possible and which components could be affected.

In the present work, we formulated a hypothesis on whether selected paracrine factors from the MD cells have an influence on the integrity of the glomerular endothelial glycocalyx via the bloodstream. As an element of the glomerular filtration barrier, its density could be degraded using PAPP-A2, PAPP-A, CXCL14/BRAK and Semaphorin-3C, which resulted in the modulation of its structure.

In order to understand which components of the endothelial glycocalyx could be affected by density changes, four essential components of the glycocalyx were examined using immunocytochemistry. Syndecan 1, versican and biglycan as core components and hyaluronic acid as dynamic element were stained on human renal glomerular endothelial cells which were either untreated or treated with PAPP-A2, CXCL14/BRAK, Semaphorin-3C. Whereas in the case of biglycan no significant difference between the control cells and cells after treatment could be determined, a significant drop in the intensity of syndecan 1 was measured after treatment with PAPP-A2. Incubation with CXCL14/BRAK or Semaphorin-3C had no effect on syndecan 1 levels. The same paracrine factors significantly decreased the content of versican, whereas treatment with PAPP-A2 had no effect on hyaluronin intensity. The proportion of hyaluronic acid diminished significantly in the three test groups.

In a second part of the project, the migration capacity and profibrotic activity of interstitial PDGFR- β -positive cells in the kidney were investigated. On the one hand, we checked if specific factors, and which one of them, can lead to cell migration *in vitro*. On the other hand, the effect of cytokines on the induction of fibrotic activity of the interstitial cells was documented.

As expected, PDGFR- β positive cells could be attracted by their ligand PDGF-DD. Pretreatment with Trapidil, an inhibitor of the PDGFR- β , weakened chemotaxis after repeated use of PDGF-DD. In addition to the growth factor FGF-9 and a physiological albumin (blood) concentration, hyaluronic acid was also able to induce migration of the interstitial cells. In contrast, the growth factor EGF, mouse urine, the Tamm-Horsefall protein and the inflammatory mediator prostaglandin I₂ had no significant effect on the migration capacity of PDGFR- β -positive cells.

Finally, the influence of cytokines on PDGFR- β -positive cells was examined with regard to their potential to synthesize extracellular matrix. For this purpose, PDGFR- β -positive cells were treated in

according to different protocols with IL-1 β , IL-17A, TNF- α , TGF- β 1 and PDGF-BB and then used to produce cell lysate. After that, the content of collagen I, fibronectin and decorin was detected in Western blots. IL-1 β , IL-17A and TNF- α , without additional treatment with PDGF-BB, primarily influenced the production of fibronectin, but induced to a lower content of collagen I and decorin. Nonetheless, incubation with TGF- β 1 without PDGF-BB always resulted in an increase of extracellular matrix proteins. Incubation with IL-17A or TNF- α and the additional use of PDGF-BB significantly increased collagen I production. However, the same substances did not cause an increase in the amount of decorin in the respective PDGFR- β cell lysate.

Overall, the collected data support the hypothesis that the endothelial glycocalyx is degraded after laser-induced damage in the proximal tubule by the secretion of paracrine factors from MD cells. In addition, it could be demonstrated that a modulation of individual components of the endothelial glycocalyx is also possible *in vitro*. This structure could represent a target for the paracrine factors.

PDGFR- β -positive cells contribute to regulatory mechanisms in the renal interstitium. They can migrate through their ability to react to various stimuli; moreover, after induction by inflammatory cytokines, they are able to modulate their synthesis of extracellular matrix. Taken together, those findings confirm the assumption that they are involved in the pathogenesis of interstitial renal fibrosis.

10 Literaturverzeichnis

- Abdollahi, Amir; Li, Minglun; Ping, Gong; Plathow, Christian; Domhan, Sophie; Kiessling, Fabian et al. (2005): Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. 421. In: *The Journal of Experimental Medicine* 201 (6), S. 925–935. DOI: 10.1084/jem.20041393.
- Abrahamson, D. R. (1987): Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membrane. 339. In: *American journal of physiology. Renal physiology*. DOI: 10.1152/ajprenal.1987.253.5.F783.
- Adembri, Chiara; Sgambati, Eleonora; Vitali, Luca; Selmi, Valentina; Margheri, Martina; Tani, Alessia et al. (2011): Sepsis induces albuminuria and alterations in the glomerular filtration barrier: a morphofunctional study in the rat. 356. In: *Critical care (London, England)* 15 (6), R277. DOI: 10.1186/cc10559.
- Andrew, Melissa; Liao, Lihong; Fujimoto, Masanobu; Khoury, Jane; Hwa, Vivian; Dauber, Andrew (2018): PAPP2 as a Therapeutic Modulator of IGF-I Bioavailability: in Vivo and in Vitro Evidence. 155. In: *Journal of the Endocrine Society* 2 (7), S. 646–656. DOI: 10.1210/js.2018-00106.
- Aufbau-wb.png (PNG-Grafik, 400 × 148 Pixel) (2015), zuletzt aktualisiert am 30.10.2015, zuletzt geprüft am 04.03.2022.
- Avasthi, P. S.; Koshy, V. (1988): The anionic matrix at the rat glomerular endothelial surface. 352. In: *The Anatomical record* 220 (3), S. 258–266. DOI: 10.1002/ar.1092200306.
- Balamurugan, Kanagasabai; Koehler, Linda; Dürig, Jan-Niklas; Hempel, Ute; Rademann, Jörg; Hintze, Vera; Pisabarro, M. Teresa (2021): Structural insights into the modulation of PDGF/PDGFR- β complexation by hyaluronan derivatives. 416. In: *Biological chemistry* 402 (11), S. 1441–1452. DOI: 10.1515/hsz-2021-0173.
- Ballermann, Barbara J.; Nyström, Jenny; Haraldsson, Börje (2021): The Glomerular Endothelium Restricts Albumin Filtration. 348. In: *Frontiers in medicine* 8, S. 766689. DOI: 10.3389/fmed.2021.766689.
- Banaszak-Ziemska Magdalena; Niedziela, Marek (2017): PAPP-A2 a new key regulator of growth. 230. In: *Endokrynologia Polska* 68 (5), S. 568–573. DOI: 10.5603/EP.2017.0060.
- Banu, N.; Teichman, J.; Dunlap-Brown, M.; Villegas, G.; Tufro, A. (2006): Semaphorin 3C regulates endothelial cell function by increasing integrin activity. 107. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (12), S. 2150–2152. DOI: 10.1096/fj.05-5698fje.
- Barrientos, Stephan; Stojadinovic, Olivera; Golinko, Michael S.; Brem, Harold; Tomic-Canic, Marjana (2008): Growth factors and cytokines in wound healing. 132. In: *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 16 (5), S. 585–601. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x.
- Bell, P. D.; Lapointe, J. Y.; Peti-Peterdi, J. (2003): Macula densa cell signaling. 304. In: *Annual review of physiology* 65, S. 481–500. DOI: 10.1146/annurev.physiol.65.050102.085730.
- Betteridge, Kai B.; Arkill, Kenton P.; Neal, Christopher R.; Harper, Steven J.; Foster, Rebecca R.; Satchell, Simon C. et al. (2017): Sialic acids regulate microvessel permeability, revealed by novel in vivo studies of endothelial glycocalyx structure and function. In: *The Journal of physiology* 595 (15), S. 5015–5035. DOI: 10.1113/JP274167.

- Buhl, E. M.; Djudjaj, S.; Klinkhammer, B. M.; Ermert, K.; Puelles, V. G.; Lindenmeyer, M. T. et al. (2020): Dysregulated mesenchymal PDGFR- β drives kidney fibrosis. 167. In: *EMBO molecular medicine* 12 (3), e11021. DOI: 10.15252/emmm.201911021.
- Buhl, Eva M.; Djudjaj, Sonja; Babickova, Janka; Klinkhammer, Barbara M.; Folestad, Erika; Borkham-Kamphorst, Erawan et al. (2016): The role of PDGF-D in healthy and fibrotic kidneys. 432. In: *Kidney international* 89 (4), S. 848–861. DOI: 10.1016/j.kint.2015.12.037.
- Bussolino, Federico; Valdembri, Donatella; Caccavari, Francesca; Serini, Guido (2006): Semaphorin signaling in vascular morphogenesis. In: *Endothelium : journal of endothelial cell research* 13 (2), S. 81–91. DOI: 10.1080/10623320600698003.
- Cancilla, B.; Davies, A.; Cauchi, J. A.; Risbridger, G. P.; Bertram, J. F. (2001): Fibroblast growth factor receptors and their ligands in the adult rat kidney. 413. In: *Kidney international* 60 (1), S. 147–155. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2001.00781.x.
- Changsirikulchai, Siribha; Hudkins, Kelly L.; Goodpaster, Tracy A.; Volpone, John; Topouzis, Stavros; Gilbertson, Debra G.; Alpers, Charles E. (2002): Platelet-derived growth factor-D expression in developing and mature human kidneys. 412. In: *Kidney international* 62 (6), S. 2043–2054. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2002.00662.x.
- Chappell, D.; Jacob, M.; Hofmann-Kiefer, K.; Bruegger, D.; Rehm, M.; Conzen, P. et al. (2007): Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. 7. In: *Anesthesiology* 107 (5), S. 776–784. DOI: 10.1097/01.anes.0000286984.39328.96.
- Chen, Yi-Ting; Chang, Fan-Chi; Wu, Ching-Fang; Chou, Yu-Hsiang; Hsu, Huan-Lun; Chiang, Wen-Chih et al. (2011): Platelet-derived growth factor receptor signaling activates pericyte-myofibroblast transition in obstructive and post-ischemic kidney fibrosis. 388. In: *Kidney international* 80 (11), S. 1170–1181. DOI: 10.1038/ki.2011.208.
- Clevers, Hans (2006): Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. 372. In: *Cell* 127 (3), S. 469–480. DOI: 10.1016/j.cell.2006.10.018.
- Colombaro, Vanessa; Declèves, Anne-Emilie; Jadot, Inès; Voisin, Virginie; Giordano, Laetitia; Habsch, Isabelle et al. (2013): Inhibition of hyaluronan is protective against renal ischaemia-reperfusion injury. 420. In: *Nephrology Dialysis Transplantation* 28 (10), S. 2484–2493. DOI: 10.1093/ndt/gft314.
- Conover, C. A.; Kiefer, M. C.; Zapf, J. (1993): Posttranslational regulation of insulin-like growth factor binding protein-4 in normal and transformed human fibroblasts. Insulin-like growth factor dependence and biological studies. 376. In: *J. Clin. Invest.* 91 (3), S. 1129–1137. DOI: 10.1172/JCI116272.
- Dauber, Andrew; Muñoz-Calvo, María T.; Barrios, Vicente; Domené, Horacio M.; Kloverpris, Soren; Serra-Juhé, Clara et al. (2016): Mutations in pregnancy-associated plasma protein A2 cause short stature due to low IGF-I availability. 374. In: *EMBO molecular medicine* 8 (4), S. 363–374. DOI: 10.15252/emmm.201506106.
- Declèves, Anne-Emilie; Caron, Nathalie; Voisin, Virginie; Legrand, Alexandre; Bouby, Nadine; Kultti, Anne et al. (2012): Synthesis and fragmentation of hyaluronan in renal ischaemia. 421. In: *Nephrology Dialysis Transplantation* 27 (10), S. 3771–3781. DOI: 10.1093/ndt/gfs098.
- Deetjen, P.; Speckmann, E.-J.; Hescheler, J. (4. Auflage 2004): Physiologie: © Elsevier GmbH Urban & Fischer Verlag, München.

- Diaspro, Alberto; Bianchini, Paolo; Vicidomini, Giuseppe; Faretta, Mario; Ramoino, Paola; Usai, Cesare (2006): Multi-photon excitation microscopy. 430. In: *Biomedical engineering online* 5, S. 36. DOI: 10.1186/1475-925X-5-36.
- Dickson, Landon E.; Wagner, Mark C.; Sandoval, Ruben M.; Molitoris, Bruce A. (2014): The proximal tubule and albuminuria: really! 415. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 25 (3), S. 443–453. DOI: 10.1681/ASN.2013090950.
- Eddy, A. A. (1996): Molecular insights into renal interstitial fibrosis. 389. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 7 (12), S. 2495–2508. DOI: 10.1681/ASN.V7122495.
- Endo, Kazuhira; Takino, Takahisa; Miyamori, Hisashi; Kinsen, Hidenori; Yoshizaki, Tomokazu; Furukawa, Mitsuru; Sato, Hiroshi (2003): Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (42), S. 40764–40770. DOI: 10.1074/jbc.M306736200.
- Floege, Jürgen; Eitner, Frank; Alpers, Charles E. (2008): A new look at platelet-derived growth factor in renal disease. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 19 (1), S. 12–23. DOI: 10.1681/ASN.2007050532.
- Freyer, Timo (2015): Aufbau Western Blot. Hg. v. DocCheck Medical Services GmbH, zuletzt aktualisiert am 30.10.2015, zuletzt geprüft am 04.03.2022.
- Frick, Inga-Maria; Nordin, Sara L.; Baumgarten, Maria; Mörgelin, Matthias; Sørensen, Ole E.; Olin, Anders I.; Egesten, Arne (2011): Constitutive and inflammation-dependent antimicrobial peptides produced by epithelium are differentially processed and inactivated by the commensal *Fingoldia magna* and the pathogen *Streptococcus pyogenes*. 380. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187 (8), S. 4300–4309. DOI: 10.4049/jimmunol.1004179.
- Fridén, Vincent; Oveland, Eystein; Tenstad, Olav; Ebefors, Kerstin; Nyström, Jenny; Nilsson, Ulf A.; Haraldsson, Börje (2011): The glomerular endothelial cell coat is essential for glomerular filtration. 359. In: *Kidney international* 79 (12), S. 1322–1330. DOI: 10.1038/ki.2011.58.
- Fuchs, M. A. A.; Broeker, K. A. E.; Schrankl, J.; Burzlaff, N.; Willam, C.; Wagner, C.; Kurtz, A. (2021): Inhibition of transforming growth factor β 1 signaling in resident interstitial cells attenuates profibrotic gene expression and preserves erythropoietin production during experimental kidney fibrosis in mice. 331. In: *Kidney international* 100 (1), S. 122–137. DOI: 10.1016/j.kint.2021.02.035.
- Gallegos, Thomas F.; Kamei, Caramai N.; Rohly, Michael; Drummond, Iain A. (2019): Fibroblast growth factor signaling mediates progenitor cell aggregation and nephron regeneration in the adult zebrafish kidney. In: *Developmental biology* 454 (1), S. 44–51. DOI: 10.1016/j.ydbio.2019.06.011.
- Gerl, K.; Nolan, K. A.; Karger, C.; Fuchs, M.; Wenger, R. H.; Stolt, C. C. et al. (2016): Erythropoietin production by PDGFR- β (+) cells. 169. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 468 (8), S. 1479–1487. DOI: 10.1007/s00424-016-1829-2.
- Goldberg, Seth; Harvey, Scott J.; Cunningham, Jeanette; Tryggvason, Karl; Miner, Jeffrey H. (2009): Glomerular filtration is normal in the absence of both agrin and perlecan-heparan sulfate from the glomerular basement membrane. 358. In: *Nephrology Dialysis Transplantation* 24 (7), S. 2044–2051. DOI: 10.1093/ndt/gfn758.
- Gyarmati, G.; Shroff, U. N.; Riquier-Brison, A.; Kriz, W.; Kaissling, B.; Neal, C. R. et al. (2021a): A new view of macula densa cell microanatomy. 297. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 320 (3), F492-F504. DOI: 10.1152/ajprenal.00546.2020.

- Gyarmati, Georgina; Shroff, Urvi Nikhil; Riquier-Brison, Anne; Desposito, Dorinne; Ju, Wenjun; Izuhara, Audrey et al. (2021b): Physiological activation of the nephron central command drives endogenous kidney tissue regeneration. 343. DOI: 10.1101/2021.12.07.471692.
- 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. S.; Johnsson, E. K.; Rippe, B. (1992): Glomerular permselectivity is dependent on adequate serum concentrations of orosomucoid. 366. In: *Kidney international* 41 (2), S. 310–316. DOI: 10.1038/ki.1992.43.
- Harvey, Scott J.; Jarad, George; Cunningham, Jeanette; Rops, Angelique L.; van der Vlag, Johan; Berden, Jo H. et al. (2007): Disruption of glomerular basement membrane charge through podocyte-specific mutation of agrin does not alter glomerular permselectivity. 347. In: *The American journal of pathology* 171 (1), S. 139–152. DOI: 10.2353/ajpath.2007.061116.
- Helmchen, Fritjof; Denk, Winfried (2005): Deep tissue two-photon microscopy. In: *Nature methods* 2 (12), S. 932–940. DOI: 10.1038/nmeth818.
- Henry, C. B.; Duling, B. R. (1999): Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. 11. In: *The American journal of physiology* 277 (2), H508-14. DOI: 10.1152/ajpheart.1999.277.2.H508.
- Hromas, R.; Broxmeyer, H. E.; Kim, C.; Nakshatri, H.; Christopherson, K.; Azam, M.; Hou, Y. H. (1999): Cloning of BRAK, a novel divergent CXC chemokine preferentially expressed in normal versus malignant cells. 379. In: *Biochemical and biophysical research communications* 255 (3), S. 703–706. DOI: 10.1006/bbrc.1999.0257.
- Humphreys, B. D. (2018): Mechanisms of Renal Fibrosis. 176. In: *Annual review of physiology* 80, S. 309–326. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034227.
- Inokoshi, Yayoi; Tanino, Yoshinori; Wang, Xintao; Sato, Suguru; Fukuhara, Naoko; Nikaido, Takefumi et al. (2013): Clinical significance of serum hyaluronan in chronic fibrotic interstitial pneumonia. In: *Respirology (Carlton, Vic.)* 18 (8), S. 1236–1243. DOI: 10.1111/resp.12144.
- Iozzo, Renato V.; Schaefer, Liliana (2015): Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 42, S. 11–55. DOI: 10.1016/j.matbio.2015.02.003.
- Jarad, George; Miner, Jeffrey H. (2009): Update on the glomerular filtration barrier. 346. In: *Current opinion in nephrology and hypertension* 18 (3), S. 226–232. DOI: 10.1097/mnh.0b013e3283296044.
- Jeansson, M.; Haraldsson, B. (2006): Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier. 13. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 290 (1), F111-6. DOI: 10.1152/ajprenal.00173.2005.
- Kalousová, Marta; Tesař, Vladimír; Muravská, Alexandra; Zima, Tomáš (2012): Pregnancy-associated plasma protein A: spotlight on kidney diseases. In: *Clinical chemistry and laboratory medicine* 50 (7), S. 1183–1190. DOI: 10.1515/cclm-2011-0640.
- Kataoka, H.; Ushiyama, A.; Kawakami, H.; Akimoto, Y.; Matsubara, S.; Iijima, T. (2016): Fluorescent imaging of endothelial glycocalyx layer with wheat germ agglutinin using intravital microscopy. 112. In: *Microscopy research and technique* 79 (1), S. 31–37. DOI: 10.1002/jemt.22602.

- Kaul, Aditya; Singampalli, Kavya L.; Parikh, Umang M.; Yu, Ling; Keswani, Sundeep G.; Wang, Xinyi (2021): Hyaluronan, a double-edged sword in kidney diseases. 417. In: *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. DOI: 10.1007/s00467-021-05113-9.
- Kazlauskas, Andrius (2017): PDGFs and their receptors. 385. In: *Gene* 614, S. 1–7. DOI: 10.1016/j.gene.2017.03.003.
- König, H. E.; Liebich, H.-G. (2012): Anatomie der Haussäugetiere: Schattauer GmbH.
- Kramann, Rafael; Dirocco, Derek P.; Maarouf, Omar H.; Humphreys, Benjamin D. (2013): Matrix Producing Cells in Chronic Kidney Disease: Origin, Regulation, and Activation. 390. In: *Current pathobiology reports* 1 (4). DOI: 10.1007/s40139-013-0026-7.
- Kramann, Rafael; Kusaba, Tetsuro; Humphreys, Benjamin D. (2015): Who regenerates the kidney tubule? 386. In: *Nephrology Dialysis Transplantation* 30 (6), S. 903–910. DOI: 10.1093/ndt/gfu281.
- Kusaba, Tetsuro; Lalli, Matthew; Kramann, Rafael; Kobayashi, Akio; Humphreys, Benjamin D. (2014): Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule. 387. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (4), S. 1527–1532. DOI: 10.1073/pnas.1310653110.
- Lakowicz, Joseph R. (2010): Principles of fluorescence spectroscopy. Third edition, corrected at 4. printing. New York, NY: Springer.
- Lawrence, J. B.; Oxvig, C.; Overgaard, M. T.; Sottrup-Jensen, L.; Gleich, G. J.; Hays, L. G. et al. (1999): The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. 375. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (6), S. 3149–3153. DOI: 10.1073/pnas.96.6.3149.
- Leggio, Claudia; Galantini, Luciano; Pavel, Nicolae Viorel (2008): About the albumin structure in solution: cigar Expanded form versus heart Normal shape. 361. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10 (45), S. 6741–6750. DOI: 10.1039/b808938h.
- Lepedda, Antonio Junior; Nieddu, Gabriele; Piperigkou, Zoi; Kyriakopoulou, Konstantina; Karmanos, Nikolaos; Formato, Marilena (2021): Circulating Heparan Sulfate Proteoglycans as Biomarkers in Health and Disease. In: *Seminars in thrombosis and hemostasis* 47 (3), S. 295–307. DOI: 10.1055/s-0041-1725063.
- Li, Jinhua; Deane, James A.; Campanale, Naomi V.; Bertram, John F.; Ricardo, Sharon D. (2007): The contribution of bone marrow-derived cells to the development of renal interstitial fibrosis. 391. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25 (3), S. 697–706. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0133.
- LI, TING; SUN, XINHUI; LI, NANNAN; GUO, HONGMIN (2021): Fibroblast growth factor 9 promotes kidney cell proliferation via WNT signaling-mediated activation of ANXA4. 415. In: *BIOCELL* 45 (4), S. 985–994. DOI: 10.32604/biocell.2021.012371.
- Litwiniuk, Malgorzata; Krejner, Alicja; Speyrer, Marcus S.; Gauto, Anibal R.; Grzela, Tomasz (2016): Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. In: *Wounds : a compendium of clinical research and practice* 28 (3), S. 78–88.
- Lu, Jing; Chatterjee, Mita; Schmid, Hannes; Beck, Sandra; Gawaz, Meinrad (2016): CXCL14 as an emerging immune and inflammatory modulator. 237. In: *Journal of inflammation (London, England)* 13, S. 1. DOI: 10.1186/s12950-015-0109-9.

- Mahmoud, Marwa; Mayer, Mariya; Cancel, Limary M.; Bartosch, Anne Marie; Mathews, Rick; Tarbell, John M. (2021): The glycocalyx core protein Glypican 1 protects vessel wall endothelial cells from stiffness-mediated dysfunction and disease. 286. In: *Cardiovascular research* 117 (6), S. 1592–1605. DOI: 10.1093/cvr/cvaa201.
- Manon-Jensen, Tina; Multhaupt, Hinke A. B.; Couchman, John R. (2013): Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains. 408. In: *The FEBS journal* 280 (10), S. 2320–2331. DOI: 10.1111/febs.12174.
- Meng, Xiao-ming; Tang, Patrick Ming-Kuen; Li, Jun; Lan, Hui Yao (2015): TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. In: *Frontiers in physiology* 6, S. 82. DOI: 10.3389/fphys.2015.00082.
- Menon, M. C.; Chuang, P. Y.; He, C. J. (2012): The glomerular filtration barrier: components and crosstalk. 14. In: *International journal of nephrology* 2012, S. 749010. DOI: 10.1155/2012/749010.
- Miner, Jeffrey H. (2012): The glomerular basement membrane. In: *Experimental cell research* 318 (9), S. 973–978. DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.02.031.
- Miyato, Hideyo; Tsuno, Nelson Hirokazu; Kitayama, Joji (2012): Semaphorin 3C is involved in the progression of gastric cancer. 382. In: *Cancer science* 103 (11), S. 1961–1966. DOI: 10.1111/cas.12003.
- Müller-Deile, J.; Gellrich, F.; Schenk, H.; Schroder, P.; Nyström, J.; Lorenzen, J. et al. (2016): Overexpression of TGF- β Inducible microRNA-143 in Zebrafish Leads to Impairment of the Glomerular Filtration Barrier by Targeting Proteoglycans. 32. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 40 (5), S. 819–830. DOI: 10.1159/000453142.
- Nagata, Y.; Burger, M. M. (1974): Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. In: *Journal of Biological Chemistry* 249 (10), S. 3116–3122.
- Nair, D. G.; Miller, K. G.; Lourenssen, S. R.; Blennerhassett, M. G. (2014): Inflammatory cytokines promote growth of intestinal smooth muscle cells by induced expression of PDGF-R β . 174. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 18 (3), S. 444–454. DOI: 10.1111/jcmm.12193.
- Nandi, A.; Estess, P.; Siegelman, M. H. (2000): Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. In: *Journal of Biological Chemistry* 275 (20), S. 14939–14948. DOI: 10.1074/jbc.275.20.14939.
- Nikolic-Paterson, David J.; Wang, Shuang; Lan, Hui Yao (2014): Macrophages promote renal fibrosis through direct and indirect mechanisms. 438. In: *Kidney international supplements* 4 (1), S. 34–38. DOI: 10.1038/kisup.2014.7.
- Nishiyama, Akira; Navar, L. Gabriel (2002): ATP mediates tubuloglomerular feedback. 369. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 283 (1), R273–5; discussion R278–9. DOI: 10.1152/ajpregu.00071.2002.
- Obeidat, Marya; Obeidat, Motaz; Ballermann, Barbara J. (2012): Glomerular endothelium: a porous sieve and formidable barrier. 351. In: *Experimental cell research* 318 (9), S. 964–972. DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.02.032.
- Ornitz, D. M.; Xu, J.; Colvin, J. S.; McEwen, D. G.; MacArthur, C. A.; Coulier, F. et al. (1996): Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. 414. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (25), S. 15292–15297. DOI: 10.1074/jbc.271.25.15292.

- Ortiz, A. (2020): PDGFR- β and kidney fibrosis. 178. In: *EMBO molecular medicine* 12 (3), e11729. DOI: 10.15252/emmm.201911729.
- Ostendorf, Tammo; Boor, Peter; van Roeyen, Claudia R. C.; Floege, Jürgen (2014): Platelet-derived growth factors (PDGFs) in glomerular and tubulointerstitial fibrosis. In: *Kidney international supplements* 4 (1), S. 65–69. DOI: 10.1038/kisup.2014.12.
- Overgaard, M. T.; Boldt, H. B.; Laursen, L. S.; Sottrup-Jensen, L.; Conover, C. A.; Oxvig, C. (2001): Pregnancy-associated plasma protein-A2 (PAPP-A2), a novel insulin-like growth factor-binding protein-5 proteinase. 157. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (24), S. 21849–21853. DOI: 10.1074/jbc.M102191200.
- Pavenstädt, Hermann; Kriz, Wilhelm; Kretzler, Matthias (2003): Cell biology of the glomerular podocyte. 345. In: *Physiological reviews* 83 (1), S. 253–307. DOI: 10.1152/physrev.00020.2002.
- Peti-Peterdi, J.; Harris, R. C. (2010): Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release. 306. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21 (7), S. 1093–1096. DOI: 10.1681/ASN.2009070759.
- Pluznick, Jennifer L.; Zou, Dong-Jing; Zhang, Xiaohong; Yan, Qingshang; Rodriguez-Gil, Diego J.; Eisner, Christoph et al. (2009): Functional expression of the olfactory signaling system in the kidney. 342. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (6), S. 2059–2064. DOI: 10.1073/pnas.0812859106.
- Ponticelli, Claudio; Locatelli, Francesco (2018): Glucocorticoids in the Treatment of Glomerular Diseases: Pitfalls and Pearls. 432. In: *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 13 (5), S. 815–822. DOI: 10.2215/CJN.12991117.
- Pries, A. R.; Secomb, T. W.; Gaetgens, P. (2000): The endothelial surface layer. 261. In: *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 440 (5), S. 653–666. DOI: 10.1007/s004240000307.
- Qi, Weier; Chen, Xinming; Poronnik, Philip; Pollock, Carol A. (2006): The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis. 392. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 38 (1), S. 1–5. DOI: 10.1016/j.biocel.2005.09.005.
- Queisser, Kimberly A.; Mellema, Rebecca A.; Petrey, Aaron C. (2021): Hyaluronan and Its Receptors as Regulatory Molecules of the Endothelial Interface. 355. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 69 (1), S. 25–34. DOI: 10.1369/0022155420954296.
- Ren, Yilin; Arima, Shuji; Carretero, Oscar A.; Ito, Sadayoshi (2002): Possible role of adenosine in macula densa control of glomerular hemodynamics. 367. In: *Kidney international* 61 (1), S. 169–176. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2002.00093.x.
- Romagnani, Paola; Remuzzi, Giuseppe; Glassock, Richard; Levin, Adeera; Jager, Kitty J.; Tonelli, Marcello et al. (2017): Chronic kidney disease. In: *Nature reviews. Disease primers* 3, S. 17088. DOI: 10.1038/nrdp.2017.88.
- Rostgaard, Jørgen; Qvortrup, Klaus (2002): Sieve plugs in fenestrae of glomerular capillaries--site of the filtration barrier? 349. In: *Cells, tissues, organs* 170 (2-3), S. 132–138. DOI: 10.1159/000046186.
- Ruiz, Mario (2021): Into the Labyrinth of the Lipocalin α 1-Acid Glycoprotein. 364. In: *Frontiers in physiology* 12, S. 686251. DOI: 10.3389/fphys.2021.686251.

- Ryan, G. B.; Karnovsky, M. J. (1976): Distribution of endogenous albumin in the rat glomerulus: role of hemodynamic factors in glomerular barrier function. 361. In: *Kidney international* 9 (1), S. 36–45. DOI: 10.1038/ki.1976.5.
- Salomon, F.-V.; Geyer, H.; Gille, U. (2008): Anatomie für die Tiermedizin: Enke Verlag.
- Sapudom, Jiranuwat; Rubner, Stefan; Martin, Steve; Thoenes, Stephan; Anderegg, Ulf; Pompe, Tilo (2015): The interplay of fibronectin functionalization and TGF- β 1 presence on fibroblast proliferation, differentiation and migration in 3D matrices. 425. In: *Biomaterials science* 3 (9), S. 1291–1301. DOI: 10.1039/c5bm00140d.
- Savery, Michele D.; Jiang, John X.; Park, Pyong Woo; Damiano, Edward R. (2013): The endothelial glycocalyx in syndecan-1 deficient mice. In: *Microvascular research* 87, S. 83–91. DOI: 10.1016/j.mvr.2013.02.001.
- Schellenberg, S.; Mettler, M.; Gentilini, F.; Portmann, R.; Glaus, T. M.; Reusch, C. E. (2008): The effects of hydrocortisone on systemic arterial blood pressure and urinary protein excretion in dogs. 338. In: *Journal of veterinary internal medicine* 22 (2), S. 273–281. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2007.0039.x.
- Schiessl, I. M.; Grill, A.; Fremter, K.; Steppan, D.; Hellmuth, M.-K.; Castrop, Hayo (2018): Renal Interstitial Platelet-Derived Growth Factor Receptor- β Cells Support Proximal Tubular Regeneration. 87. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 29 (5), S. 1383–1396. DOI: 10.1681/ASN.2017101069.
- Schnermann, Jurgen (2002): Adenosine mediates tubuloglomerular feedback. 370. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 283 (1), R276-7; discussion R278-9. DOI: 10.1152/ajpregu.00072.2002.
- Shellenberger, T. D.; Wang, M.; Gujrati, M.; Jayakumar, A.; Strieter, R. M.; Burdick, M. D. et al. (2004): BRAK/CXCL14 is a potent inhibitor of angiogenesis and a chemotactic factor for immature dendritic cells. 228. In: *Cancer research* 64 (22), S. 8262–8270. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2056.
- Shroff, U. N.; Gyarmati, G.; Riquier-Brison, A.; Izuhara, A.; Peti-Peterdi, J. (2020): A New View of Macula Densa Cell Protein Synthesis. 298.
- Simpson, Melanie A.; La Motte, Carol de; Sherman, Larry S.; Weigel, Paul H. (2015): Advances in Hyaluronan Biology: Signaling, Regulation, and Disease Mechanisms. 354. In: *International journal of cell biology* 2015, S. 690572. DOI: 10.1155/2015/690572.
- Singh, A.; Satchell, S. C.; Neal, C. R.; McKenzie, E. A.; Tooke, J. E.; Mathieson, P. W. (2007): Glomerular endothelial glycocalyx constitutes a barrier to protein permeability. 23. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18 (11), S. 2885–2893. DOI: 10.1681/ASN.2007010119.
- Siwik, D. A.; Chang, D. L.; Colucci, W. S. (2000): Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. 425. In: *Circulation research* 86 (12), S. 1259–1265. DOI: 10.1161/01.res.86.12.1259.
- So, P. T.; Dong, C. Y.; Masters, B. R.; Berland, K. M. (2000): Two-photon excitation fluorescence microscopy. 397. In: *Annual review of biomedical engineering* 2, S. 399–429. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.2.1.399.
- Sörensson, J.; Matejka, G. L.; Ohlson, M.; Haraldsson, B. (1999): Human endothelial cells produce orosomucoid, an important component of the capillary barrier. 365. In: *The American journal of physiology* 276 (2), H530-4. DOI: 10.1152/ajpheart.1999.276.2.H530.

- Sun, D.; Samuelson, L. C.; Yang, T.; Huang, Y.; Paliege, A.; Saunders, T. et al. (2001): Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. 369. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (17), S. 9983–9988. DOI: 10.1073/pnas.171317998.
- Sun, Hai-Jian (2019): Current Opinion for Hypertension in Renal Fibrosis. 393. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1165, S. 37–47. DOI: 10.1007/978-981-13-8871-2_3.
- Sun, Yu Bo Yang; Qu, Xinli; Caruana, Georgina; Li, Jinhua (2016): The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis. 437. In: *Differentiation; research in biological diversity* 92 (3), S. 102–107. DOI: 10.1016/j.diff.2016.05.008.
- Thapa, Ranjeeta; Wilson, George D. (2016): The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. In: *Stem cells international* 2016, S. 2087204. DOI: 10.1155/2016/2087204.
- Theer, Patrick; Hasan, Mazahir T.; Denk, Winfried (2003): Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier. 396. In: *Optics letters* 28 (12), S. 1022–1024. DOI: 10.1364/ol.28.001022.
- Tojo, Akihiro; Kinugasa, Satoshi (2012): Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. 411. In: *International journal of nephrology* 2012, S. 481520. DOI: 10.1155/2012/481520.
- Turillazzi, Emanuela; Karch, Steven B.; Neri, Margherita; Pomara, Cristoforo; Riezzo, Irene; Fineschi, Vittorio (2008): Confocal laser scanning microscopy: Using new technology to answer old questions in forensic investigations. 395. In: *Int J Legal Med* 122 (2), S. 173–177. DOI: 10.1007/s00414-007-0208-0.
- Valiulytė, Indrė; Curkūnavičiūtė, Rūta; Ribokaitė, Laura; Kazlauskas, Arunas; Vaitkevičiūtė, Monika; Skauminas, Kęstutis; Valančiūtė, Angelija (2019): The Anti-Tumorigenic Activity of Sema3C in the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Model. 381. In: *International journal of molecular sciences* 20 (22). DOI: 10.3390/ijms20225672.
- van den Berg, Bernard M.; Wang, Gangqi; Boels, Margien G. S.; Avramut, M. Cristina; Jansen, Erik; Sol, Wendy M. P. J. et al. (2019): Glomerular Function and Structural Integrity Depend on Hyaluronan Synthesis by Glomerular Endothelium. 410. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 30 (10), S. 1886–1897. DOI: 10.1681/ASN.2019020192.
- Vischer, P.; Feitsma, K.; Schön, P.; Völker, W. (1997): Perlecan is responsible for thrombospondin 1 binding on the cell surface of cultured porcine endothelial cells. In: *European journal of cell biology* 73 (4), S. 332–343.
- Wang, Nan; Deng, Yiyao; Liu, Anqi; Shen, Nan; Wang, Weidong; Du, Xiangning et al. (2017): Novel Mechanism of the Pericyte-Myofibroblast Transition in Renal Interstitial Fibrosis: Core Fucosylation Regulation. 428. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 16914. DOI: 10.1038/s41598-017-17193-5.
- Wang, Xinyi; Balaji, Swathi; Steen, Emily H.; Blum, Alexander J.; Li, Hui; Chan, Christina K. et al. (2020): High-molecular weight hyaluronan attenuates tubulointerstitial scarring in kidney injury. In: *JCI insight* 5 (12). DOI: 10.1172/jci.insight.136345.
- Yang, Wan-Jen; Hu, Junhao; Uemura, Akiyoshi; Tetzlaff, Fabian; Augustin, Hellmut G.; Fischer, Andreas (2015): Semaphorin-3C signals through Neuropilin-1 and PlexinD1 receptors to inhibit pathological angiogenesis. 383. In: *EMBO molecular medicine* 7 (10), S. 1267–1284. DOI: 10.15252/emmm.201404922.

Yin, Yancun; Hua, Hui; Li, Minjing; Liu, Shu; Kong, Qingbin; Shao, Ting et al. (2016): mTORC2 promotes type I insulin-like growth factor receptor and insulin receptor activation through the tyrosine kinase activity of mTOR. 372. In: *Cell research* 26 (1), S. 46–65. DOI: 10.1038/cr.2015.133.

Zlotnik, Albert; Yoshie, Osamu (2000): Chemokines. 377. In: *Immunity* 12 (2), S. 121–127. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80165-X.

Zlotnik, Albert; Yoshie, Osamu; Nomiya, Hisayuki (2006): The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. 378. In: *Genome biology* 7 (12), S. 243. DOI: 10.1186/gb-2006-7-12-243.

11 Anhang

11.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt einer Glomeruluskapillare (Deetjen et al. 2004):.....	3
Abbildung 2: Juxtaglomerulärer Apparat (Deetjen et al. 2004):	10
Abbildung 3: HRGEC nach einstündiger Behandlung mit PAPP-A2:	37
Abbildung 4: Aufbau des μ -Slides für den Migrationsassay (ibidi):.....	41
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Proteintransfers (Freyer 2015):	47
Abbildung 6: Einfluss von PAPP-A2.....	54
Abbildung 7: Einfluss von PAPP-A.....	55
Abbildung 8 (links): Einfluss von CXCL14/BRAK (1280 nM)	56
Abbildung 9 (rechts): Einfluss von CXCL14/BRAK (1280 nM)	56
Abbildung 10: Einfluss von Semaphorin-3C.....	56
Abbildung 11: Einfluss einer isotonen Natriumchloridinfusion	57
Abbildung 12 (links): Dichte der endothelialen Glykokalyx nach Crop.....	58
Abbildung 13 (rechts): Dichte der endothelialen Glykokalyx	58
Abbildung 14: Intravitale Aufnahme eines Glomerulums mit proximalem Tubulus	59
Abbildung 15: Höhe des Bürstensaums des proximalen Tubulus im Vergleich:.....	60
Abbildung 16: Vergleich der mittleren Intensität der endothelialen Glykokalyx.....	61
Abbildung 17: Immunhistologische Cofärbung von COX2 und PAPP-A2:	62
Abbildung 18 (links): Immunhistologische Färbung von COX2 in MD-Zellen:	63
Abbildung 19 (rechts): Immunhistologische Färbung von CXCL14/BRAK in MD-Zellen:.....	63
Abbildung 20 (links): Immunhistologische Färbung von COX2 in MD-Zellen:	63
Abbildung 21 (rechts): Immunhistologische Färbung von Semaphorin-3C in MD-Zellen:.....	63
Abbildung 22: Immunhistologische Cofärbung von PAPP-A und Synaptopodin:	64
Abbildung 23: Immunhistologischer Nachweis von Komponenten	65
Abbildung 24: Messung der mittleren Intensität.....	66
Abbildung 25 (links): Modulation von Syndecan 1 nach Behandlung	67
Abbildung 26 (rechts): Modulation von Biglycan nach Behandlung.....	67
Abbildung 27 (links): Modulation von Versican nach Behandlung.....	68
Abbildung 28 (rechts): Modulation der Hyaluronsäure nach Behandlung	68
Abbildung 29 (links): Migrationsassay mit PDGF-DD:	69
Abbildung 30 (rechts): Migrationsassay mit PDGF-DD	69
Abbildung 31 (links): Migrationsassay mit Urin:.....	70
Abbildung 32 (rechts): Migrationsassay mit denaturiertem Urin:	70

Abbildung 33 (links): Migrationsassay mit EGF:.....	71
Abbildung 34 (rechts): Migrationsassay mit FGF-9:	71
Abbildung 35 (links): Migrationsassay mit Albumin (10 ng/ml):.....	72
Abbildung 36 (rechts): Migrationsassay mit Albumin (35 mg/ml):	72
Abbildung 37 (links): Migrationsassay mit THP:	73
Abbildung 38 (rechts): Migrationsassay mit Prostaglandin I₂:	73
Abbildung 39: Migrationassay mit Hyaluronsäure:.....	73
Abbildung 40: Immunzytochemischer Nachweis von Kollagen I.....	74
Abbildung 41: Immunzytochemischer Nachweis von Fibronectin	75
Abbildung 42: Immunzytochemischer Nachweis von Kollagen III.....	75
Abbildung 43: Quantifizierung von Kollagen I im Zelllysate mittels Western Blot.....	76
Abbildung 44: Quantifizierung von Fibronectin im Zelllysate mittels Western Blot	77
Abbildung 45: Quantifizierung von Decorin im Zelllysate mittels Western Blot.....	77
Abbildung 46: Quantifizierung von Kollagen I, Fibronectin und Decorin im Zelllysate.....	78
Abbildung 47: Quantifizierung des Kollagen I im Zelllysate mittels Western Blot	79
Abbildung 48: Quantifizierung des Fibronectin im Zelllysate mittels Western Blot.....	79
Abbildung 49: Quantifizierung des Decorin im Zelllysate mittels Western Blot	80
Abbildung 50: Quantifizierung des Kollagen I im Zelllysate mittels Western Blot	81
Abbildung 51: Quantifizierung des Fibronectin im Zelllysate mittels Western Blot.....	81
Abbildung 52: Quantifizierung des Decorin im Zelllysate mittels Western Blot	82

11.2 Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of variance
α -SMA	alpha-smooth muscle actin
BCA	bicichoninic acid, Bicinchinonsäure
BRAK	breast and kidney
BSA	bovine serum albumin
CD44	Cluster of differentiation 44
cm	Zentimeter
Cy2	Carbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
CT	Chemotaxis
DTT	Dithiothreitol
EGF	endothelial growth factor
et al.	at alii; und andere
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal cattle serum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FGF	fibroblast growth factor
FGFR-3	fibroblast growth factor receptor-3
g	Gramm
g	Beschleunigungsgröße der Zentrifuge
GFP	green fluorescent protein
GLD	gel loading dye
h	Stunde
HBSS	Hank's balanced salt solution
HMW	high molecular weight
HRGEC	human renal glomerular endothelial cells
HRP	Horseradish peroxidase; Meerrettichperoxidase
HS	horse serum
IL1 β	Interleukin 1 beta
I/R	ischemia reperfusion

kDa	Kilodalton
l	Liter
LMW	low molecular weight
LSM	Laser scanning microscope
lt.	laut
mA	Milliampère
mg	Milligramm
Milli-Q	Millipore
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MWF	Munich Wistar Froemter
µl	Mikroliter
n	Stichprobe
NaCl	Natriumchlorid
NDD	non-descanned detector
ng	Nanogramm
NKCC2	Natrium-Kalium-2-Chlorid-Cotransporter
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAPP-A	pregnancy associated plasma protein-A
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PDGF-BB	platelet derived growth factor-BB
PDGFR-β	platelet derived growth factor receptor-β
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	sodium dodecyl sulfat
snGFR	single nephron glomerular filtration rate
TGF-β1	transforming growth factor-β1

TGF	tubuloglomerulärer Feedback
THP	Tamm-Horsfall-Protein
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TRITC	Tetramethylrhodamin
TX	Triton-X 100
UUO	unilateral ureteral obstruction
V	Volt
Vol. %	Volumenprozent
WGA	wheat germ agglutinin
°C	Grad Celsius
%	Prozent
<	kleiner als
10X	10fach
1X	1fach
λ	Lambda (Wellenlänge)