

**Chronische und akute Effekte von Angiotensin II auf
die glomeruläre Filtration und die podozytäre
Endozytose von Albumin**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Ina Maria Schießl
aus Heidelberg
im Jahr 2014

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

18. Februar 2014

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Hayo Castrop

Die Arbeit wurde angefertigt:

Mai 2011 – Februar 2014

Unterschrift:

„Falls Gott die Welt geschaffen hat, war seine Hauptsorge sicher nicht, sie so zu machen, dass wir sie verstehen können.“

Albert Einstein

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.	Die Niere – Aufbau und Funktion	1
2.	Die glomeruläre Filtrationsbarriere	2
2.1.	Der Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere.....	2
2.1.1.	Das Endothel	3
2.1.2.	Die glomeruläre Basalmembran.....	3
2.1.3.	Die podozytäre Schlitzmembran	4
2.2.	Die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere	4
2.2.1.	Das Tryggvason-Modell.....	4
2.2.2.	Das Smithies-Modell.....	5
3.	Die Pathophysiologie der Proteinurie.....	6
3.1.	Ursachen der Proteinurie – Woher stammt das Protein im Urin?.....	7
3.1.1.	Die kontroverse Sicht der glomerulären Albuminfiltration	7
3.1.2.	Das klassische Modell der glomerulären Albuminfiltration	8
3.1.3.	Das Modell der proximal-tubulären Rückresorption von Albumin	10
3.2.	Die pathologische Bedeutung der Proteinurie.....	11
4.	Proteinendozytose in Podozyten	13
4.1.	Physiologische Konzepte podozytärer Proteinendozytose.....	13
4.2.	Pathophysiologische Konzepte podozytärer Proteinendozytose.....	14
4.2.1.	Transzytose von Albumin durch Podozyten als alternativer Filtrationsweg im nephrotischen Syndrom.....	14
4.2.2.	Entzündungsreaktion in der gesunden Niere infolge podozytärer Albuminendozytose.....	16
5.	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	16
5.1.	Das Effektorpeptid des RAAS – Angiotensin II.....	18
5.1.1.	Der AT1-Rezeptor.....	18
5.1.2.	Der AT2-Rezeptor.....	20
5.2.	Pathophysiologische Effekte von Angiotensin II.....	21
5.2.1.	Chronische Effekte von Angiotensin II.....	21
5.2.2.	Akute Effekte von Angiotensin II auf die glomeruläre Proteinfiltration ...	22
6.	Therapie der Proteinurie – Hemmung des RAAS	23

6.1.	Überblick über die Wirkstoffe zur Hemmung des RAAS.....	24
6.1.1.	ACE-Hemmer.....	24
6.1.2.	AT1-Rezeptor-Antagonisten	25
6.1.3.	Renin-Inhibitoren	25
6.1.4.	Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten.....	25
6.2.	Die Aktivierung des AT2-Rezeptors – positive Effekte auf die Nierenfunktion?.....	26
7.	Untersuchung der Morphologie und Funktion des Glomerulus.....	27
8.	Grundlagen der Multiphotonen-Mikroskopie.....	27
8.1.	Konventionelle Einphotonen-Fluoreszenz-Mikroskopie und konfokale Mikroskopie	28
8.2.	Simultane Absorption von zwei oder mehr Photonen in der Multiphotonen-Mikroskopie	29
8.3.	Second Harmonic Generation	31
8.4.	Vorteile der Multiphotonen-Mikroskopie gegenüber konventioneller Einphotonen-Mikroskopie.....	31
II.	FRAGESTELLUNG	33
III.	MATERIAL UND METHODEN	34
1.	Untersuchungen der Nierenfunktion mit Hilfe der Multiphotonen- Mikroskopie	34
1.1.	Versuchstiere	34
1.2.	Versuchsvorbereitung.....	34
1.2.1.	Chirurgischer Eingriff für die mikroskopische Untersuchung.....	34
1.2.2.	Equipment des Multiphotonen-Mikroskops zur Untersuchung der Nierenfunktion am anästhesierten Tier.	35
1.3.	Darstellung verschiedener Nierenstrukturen mit Hilfe der Multiphotonen- Mikroskopie	36
1.4.	Bestimmung dynamischer Parameter der Nierenfunktion mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie	36
1.4.1.	Ermittlung des glomerulären Siebkoeffizienten von Albumin	37
1.4.1.1.	Messeinstellungen für die Bestimmung des GSC_A	38
1.4.1.2.	Aufreinigung und Dosierung des Alexa 594-BSA.....	39
1.4.1.3.	Experimentelle Bestimmung des GSC_A	40

1.4.1.4.	Ermittlung der Nachweisgrenze für die Fluoreszenzintensitäten im Harnraum.....	41
1.4.2.	Bestimmung der proximal-tubulären Rückresorption von Alexa 594-BSA ..	42
1.4.3.	Ermittlung der glomerulären Filtrationsrate des Einzelneurons (Einzelneuron-GFR).....	42
1.4.3.1.	Experimentelle Bestimmung der Einzelneuron-GFR	42
1.4.3.2.	Messeinstellungen für die Bestimmung der Einzelneuron-GFR	44
1.4.4.	Untersuchung und Quantifizierung der podozytären Proteinendozytose...44	
1.4.4.1.	Visualisierung von Podozyten.....	44
1.4.4.2.	Messeinstellungen für die Untersuchung podozytärer Proteinendozytose	45
1.4.4.3.	Quantifizierung endozytotischer Vesikel	45
2.1.	Uringewinnungsverfahren.....	46
2.1.1.	Blasenpunktion.....	46
2.1.2.	Stoffwechselkäfigexperimente	46
2.1.3.	Quantifizierungsverfahren.....	46
3.	Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)	47
4.	Versuchsprotokolle.....	48
4.1.	Ermittlung chronischer Effekte von Angiotensin II auf die Albuminausscheidung	48
4.2.	Ermittlung akuter Effekte von Angiotensin II auf den GSC_A	49
4.2.1.	Ermittlung der Rolle des AT1-Rezeptors.....	49
4.2.2.	Ermittlung der Rolle des AT2-Rezeptors.....	50
4.2.3.	Einfluss des mittleren arteriellen Blutdrucks auf den GSC_A	50
4.3.	Ermittlung akuter Effekte von Angiotensin II auf die podozytäre Proteinendozytose	51
5.	Methodische Vorarbeiten – Identifizierung geeigneter Mausstämme für die renale Untersuchung mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie	52
5.1.	Versuchstiere	53
5.2.	Histologie und Ermittlung der Tiefe der Glomeruli.....	53
5.3.	Statistische Auswertung	53
5.4.	Multiphotonen-Mikroskopie von Niere, Leber und Gehirn der Maus	54

IV.	ERGEBNISSE	56
1.	Methodische Vorarbeiten – Identifizierung geeigneter Mausstämme für Untersuchungen der Niere mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie	56
1.1.	Untersuchung der Laserpenetration von Niere, Leber und Gehirn der Maus mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie.....	56
1.2.	Die Tiefe der Glomeruli in vier Wochen alten Mäusen verschiedener Stämme.....	61
1.3.	Die Tiefe der Glomeruli in zehn Wochen alten Mäusen unterschiedlicher Stämme.....	62
2.	Chronische Effekte von Angiotensin II auf die Albuminfiltration.....	64
2.1.	Charakterisierung der Albuminausscheidung im Urin von heranwachsenden MWF und Wistar Ratten.....	64
2.2.	Chronische Effekte von Angiotensin II auf den GSC_A	66
3.	Akute Effekte von Angiotensin II auf die Albuminfiltration	69
3.1.	Akute Effekte von Angiotensin II auf den GSC_A , die tubuläre Rückresorption von Albumin und die Albuminausscheidung	69
3.2.	Akute Effekte von Angiotensin II auf die Einzelnephron-GFR.....	72
3.3.	Rolle der Angiotensin II-Rezeptoren AT1 und AT2 für den Angiotensin II-vermittelten Anstieg des GSC_A	73
3.4.	Rolle des renalen Perfusionsdrucks für den durch Angiotensin II-vermittelten Anstieg der Albuminfiltration.....	75
4.	Akute Effekte von Angiotensin II auf die podozytäre Proteinendozytose.....	78
4.1.	Akute Effekte von Angiotensin II auf die podozytäre Endozytose von Rhodamin B-gefärbten Plasmaproteinen	79
4.2.	Akute Effekte von Angiotensin II auf die podozytäre Endozytose von Albumin.....	81
4.2.1.	Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Angiotensin II und podozytärer Endozytose von Albumin	81
4.2.2.	Angiotensin II-vermittelte Transzytose von Albumin durch Podozyten ...	85
V.	DISKUSSION	88
1.	Chronische Effekte von Angiotensin II auf die Albuminfiltration.....	88

1.1.	Charakterisierung der Albuminausscheidung im Urin von heranwachsenden MWF und Wistar Ratten.....	88
1.2.	Das physiologische Ausmaß der glomerulären Albuminfiltration.....	89
1.3.	Chronische Effekte von Angiotensin II auf den GSC_A	92
2.	Akute Effekte von Angiotensin II auf die Albuminfiltration	93
2.1.	Akute Effekte von Angiotensin II auf die Einzelnephron-GFR.....	94
2.2.	Rolle der Angiotensin II-Rezeptoren AT1 und AT2 für den durch Angiotensin II-vermittelten Anstieg des GSC_A	95
2.2.1.	Protektive Effekte des AT2-Rezeptors auf die Integrität der Filtrationsbarriere	96
2.3.	Rolle des renalen Perfusionsdrucks für den durch Angiotensin II- vermittelten Anstieg der Albuminfiltration.....	96
2.4.	Mögliche direkte Effekte von Angiotensin II auf die Filtrationsbarriere...97	
3.	Akute Effekte von Angiotensin II auf die podozytäre Endozytose von Proteinen	99
3.1.	Durch Angiotensin II-induzierte podozytäre Proteinendozytose: Physiologisches Konzept.....	100
3.2.	Durch Angiotensin II-induzierte podozytäre Proteinendozytose: Pathophysiologisches Konzept.....	100
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	103
VII.	APPENDIX	105
VIII.	EIGENE PUBLIKATIONEN	107
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	108
X.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	127
XI.	DANKSAGUNG	130

I. EINLEITUNG

1. Die Niere – Aufbau und Funktion

Die Nieren übernehmen zahlreiche essentielle Aufgaben im menschlichen Körper. Sie filtern das Blut und entsorgen somit harnpflichtige Bestandteile wie Harnstoff, Harnsäure oder Kreatinin in den Urin. Sie regulieren die Homöostase von Elektrolyten wie Natrium, Kalium, Kalzium, Magnesium und Phosphat und stellen den Säure-Base-Haushalt und den Blutdruck ein. Zudem sind sie der Syntheseort der Hormone Calcitriol, Erythropoetin und Renin (Klinke 2001).

Die kleinste funktionelle Einheit der Nieren ist das Nephron (Abbildung 1). Jede Niere besitzt etwa eine Million solcher Nephrone, die aus dem Glomerulus (Nierenkörperchen) und dem dort entspringenden Tubulussystem bestehen. Der Glomerulus ist aus einem kapillaren Gefäßknäuel mit einem zu- (Vas afferens) und einem ablaufenden Gefäß (Vas efferens) aufgebaut, das von der Bowman Kapsel umschlossen ist. Die Oberfläche der glomerulären Kapillaren verfügt über größen- und ladungsselektive Eigenschaften und fungiert somit als Filtrationsbarriere für das Blut, das den Glomerulus passiert. Durch die glomeruläre Filtration des Blutplasmas in den Harnraum der Bowman Kapsel entsteht der Primärharn. Dabei werden die Blutzellen und große Plasmaproteine von der Filtration zurückgehalten. Der Primärharn durchläuft anschließend das Tubulussystem, in dem durch Resorptions- und Sekretionsprozesse der Sekundärharn gebildet wird. Der wesentliche Anteil der Rückresorption von filtrierte niedermolekulare Substanzen, wie Glucose und kleineren Proteinen, findet dabei im ersten Abschnitt des Tubulussystems, dem proximalen Tubulus, statt. Durch aktive Transportprozesse erfolgt hier zum Beispiel (z.B.) die vollständige Rückresorption der frei filtierbaren Glucose. Der Sekundärharn wird durch die Sammelrohre ins Nierenbecken geleitet. Von dort aus verläuft der Abtransport in die Blase und schlussendlich die Ausscheidung über die Harnröhre (Klinke 2001).

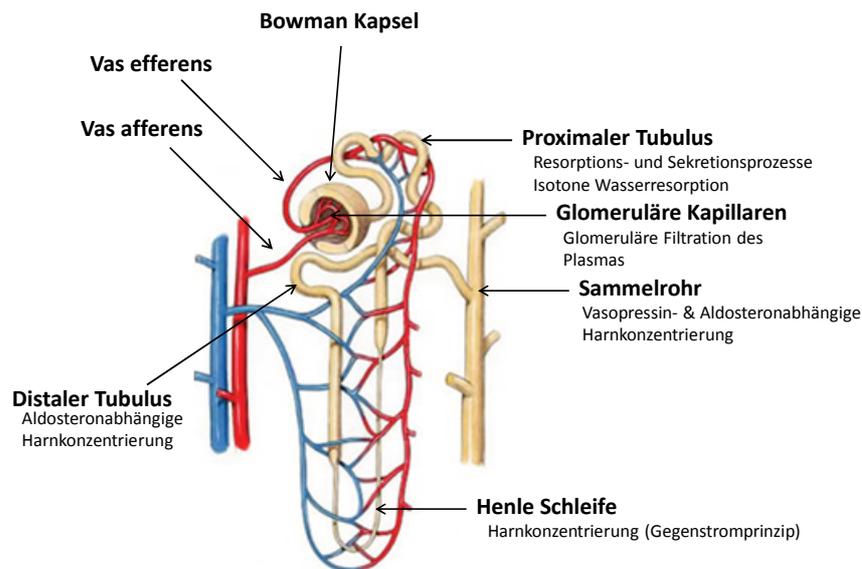


Abbildung 1: Das Nephron - Vereinfachter Überblick des Aufbaus und der Funktionen (Klinke 2001). Modifiziert nach „Nephron diagram gallery“ (<http://gal9.piclab.us/key/nephron%20diagram#>).

2. Die glomeruläre Filtrationsbarriere

Die glomeruläre Filtrationsbarriere ist eine hochkomplexe biologische Membran mit größen- und ladungsselektiven Eigenschaften. Täglich werden bis zu 180 L Primärharn in den Glomeruli der Nieren produziert. Dabei erfolgt die Filtration von Wasser und niedermolekularen Bestandteilen sowie kleineren Proteinen des Blutplasmas relativ frei, während die Filtration von großen Plasmaproteinen und Blutzellen durch die Filtrationsbarriere unterbunden wird (Haraldsson et al. 2008).

2.1. Der Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere

Die glomeruläre Filtrationsbarriere besteht aus drei zusammenwirkenden Schichten: Dem fenestrierten Endothel, der glomerulären Basalmembran sowie der podozytären Schlitzmembran (Abbildung 2). Sie verfügt über größen- und ladungsselektive Eigenschaften und moduliert dadurch die Filtration des Blutplasmas. Die ladungsselektiven Eigenschaften sind besonders bedeutsam für die Restriktion von endogenem, negativ geladenem Albumin von der glomerulären Filtration. So werden gleichgroße, neutrale Ficoll-Moleküle in wesentlich höherem Maß filtrierte als natives Albumin (Haraldsson et al. 2008).

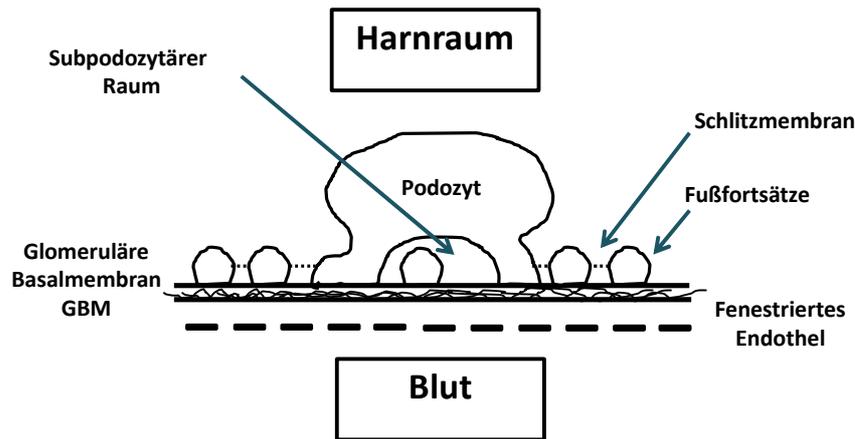


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere.

2.1.1. Das Endothel

Ein Endothel ist die innerste, luminal gerichtete Zellschicht, die ein Blutgefäß auskleidet. Das Endothel der glomerulären Kapillaren zeichnet sich im Vergleich zum Endothel anderer Blutgefäße durch eine Besonderheit aus: Es ist fenestriert und weist Lücken mit einem Durchmesser von 60 nm auf (Tisher 1978). Im Vergleich dazu besitzt z.B. Albumin einen Durchmesser von nur 3,6 nm und müsste das fenestrierte Endothel problemlos überwinden. Trotzdem unterbindet diese Schicht des glomerulären Filters zum Teil die Filtration von größeren Plasmaproteinen als Albumin. Zudem leistet sie aufgrund der darauf lokalisierten, negativ geladenen Glykokalyx einen wesentlichen Beitrag zur Ladungsselektivität der glomerulären Filtrationsbarriere. Die Glykokalyx besteht aus negativ geladenen Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen und ragt in das Lumen der glomerulären Kapillare hinein (Haraldsson et al. 2008).

2.1.2. Die glomeruläre Basalmembran

Das Endothel von Blutgefäßen sitzt einer Basalmembran auf. Die glomeruläre Basalmembran ist mit einer Dicke von 240-370 nm im Vergleich zur Basalmembran anderer Gefäße (40-80 nm) wesentlich dicker (Simionescu und Antohe 2006). Sie besteht aus einem fibrösen Netzwerk mit den Hauptbestandteilen Typ-4-Kollagen, Laminin, Nidogen sowie Heparinsulfat-konjugierten Proteoglykanen (Haraldsson et al. 2008). Letzterem Bestandteil wird zusammen mit der Glykokalyx des fenestrierten Endothels die Ladungsselektivität der Filtrationsbarriere zugeschrieben (Hassell et al. 1980). Die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere wird durch die glomeruläre Basalmembran wesentlich mitbestimmt. Eine Mutation des Kollagen-4-Netzwerkes, wie sie beim

sogenannten Alport-Syndrom vorliegt, führt zu einer Glomerulonephritis, die mit einer Proteinurie einhergeht (Barker et al. 1990).

2.1.3. Die podozytäre Schlitzmembran

Die Epithelzellen des Glomerulus, die Podozyten, sind hochdifferenzierte und spezialisierte Zellen, die an der Außenseite der glomerulären Kapillaren aufsitzen und in den Harnraum der Bowman Kapsel hineinragen. Sie verfügen über einen großen Zellkörper, von dem ausgehend sich zahlreiche Fußfortsätze um die glomerulären Kapillaren herum verzweigen. Diese Fußfortsätze sind durch 30-40 nm breite Filtrationsschlitze voneinander getrennt und durch eine dünne, elektronendichte Membran, die Schlitzmembran, überbrückt (Huber 2008). Die Schlitzmembran verfügt über eine porenähnliche Struktur, die eine Filtration von Albumin weitgehend verhindert (Haraldsson et al. 2008). Die molekularen Bestandteile der Schlitzmembran wurden eingehend studiert. Es handelt sich um spezialisierte Zell-Zell-Kontakte, basierend auf den Schlitzmembranproteinen Nephrin, Neph-1, CD2AP (= CD2 assoziiertes Protein) und Podozin. Dieser hochkonservierte Komplex, über den die Podozyten miteinander in Verbindung stehen, steuert die Podozytenfunktion (Huber 2008). Eine Beeinträchtigung der Signaltransduktion in der Schlitzmembran geht nicht nur mit einer Podozytendysfunktion einher, sondern kann zu einer irreversiblen Podozytenschädigung mit Proteinurie führen (Huber et al. 2003, Pavenstadt et al. 2003).

2.2. Die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere

Der Aufbau der einzelnen Schichten der glomerulären Filtrationsbarriere wurde bereits gut beschrieben. Über das funktionelle Zusammenspiel dieser Schichten im Hinblick auf die Größenselektivität der Filtrationsbarriere gibt es jedoch kontroverse Theorien. Die beiden Wichtigsten sollen hier vorgestellt werden.

2.2.1. Das Tryggvason-Modell

Das weitgehend akzeptierte Modell nach Tryggvason beschreibt die glomeruläre Filtrationsbarriere als eine Aneinanderreihung von mehreren Filtern mit zunehmender Größenselektivität (Huber 2008). Diese Theorie festigte sich mit der Entdeckung des Schlitzmembranproteins Nephrin und dessen tragender Bedeutung für die Funktion der Filtrationsbarriere (Ruotsalainen et al. 1999, Tryggvason 1999). Nach dieser Theorie ist die podozytäre Schlitzmembran der Feinfilter des

Systems, dessen Größenselektivität die der glomerulären Basalmembran überschreitet.

2.2.2. Das Smithies-Modell

Wenn die Schlitzmembran der Podozyten als Feinfilter der glomerulären Filtrationsbarriere fungieren soll, stellt sich die Frage nach dem Verbleib von Proteinen, welche die glomeruläre Basalmembran jedoch nicht die podozytäre Schlitzmembran überwinden können. Diese Proteine müssten folglich im subpodozytären Raum unterhalb der Schlitzmembran akkumulieren und würden schlussendlich zu einer Verstopfung des Feinfilters führen (Smithies 2003). Motiviert durch diese Problematik entwickelte Oliver Smithies ein alternatives Modell, um den funktionellen Aufbau der Filtrationsbarriere zu erklären.

Smithies schreibt den wesentlichen Beitrag der Protein-Restriktion der glomerulären Filtrationsbarriere nicht der Schlitzmembran, sondern der glomerulären Basalmembran zu. Seine Theorie beruht dabei auf zwei wesentlichen Annahmen:

1. Die glomeruläre Basalmembran kann aufgrund ihrer fibrösen, netzwerkartigen Beschaffenheit als Gel angesehen werden und weist als Konsequenz daraus eine gewisse Größenselektivität für die Durchlässigkeit eines Stoffes auf. Smithies postuliert, dass die Permeabilität der glomerulären Filtrationsbarriere für Makromoleküle ausschließlich von Diffusion und nicht von Konvektion bestimmt wird.
2. Des Weiteren definiert Smithies die podozytäre Schlitzmembran als einen essentiellen Bestandteil der podozytären Funktion, jedoch ohne gröÙenselektiven Einfluss auf die Filtrationsbarriere. Außerdem postuliert er einen wesentlichen Einfluss der Schlitzmembran auf die Regulierung der glomerulären Filtrationsrate des Einzelneurons (Einzelneuron-GFR) und somit auf den Fluidfluss durch die Filtrationsbarriere. Als Grundlage für letztere Annahme nennt er die Feinregulierung des Flusswiderstandes durch bereits beschriebene Veränderungen der Länge der epithelialen Schlitze (Bohman et al. 1984).

Die Konsequenz seiner Argumentation ist, dass sich bei einem Absinken der Einzelneuron-GFR die Stoffmenge der in den Harnraum filtrierte Makromoleküle nicht ändert, da diese nur von der Diffusion der Moleküle

abhängt. Das Absinken der Einzelnephron-GFR reduziert jedoch die in den Harnraum filtrierte Fluidmenge, was zu einer erhöhten Konzentration der filtrierten Makromoleküle im Harnraum führt (Smithies 2003).

3. Die Pathophysiologie der Proteinurie

Von einer Proteinurie spricht man, wenn die Proteinausscheidung im Urin mindestens 150 mg/24 h beträgt (Greten et al. 2010). Eine spezifische Albuminausscheidung von über 30 mg/24h im Urin wird als Albuminurie definiert (Haraldsson et al. 2008). Sehr geringe Mengen von unter 30 mg/24 h Albumin im Urin gelten dabei als normal (Currie und Delles 2013).

Eine Proteinurie kann alleinstehend auftreten oder in Kombination mit anderen Symptomen. Die wichtigsten Ausprägungen der Proteinurie werden kurz aufgelistet:

- Das nephrotische Syndrom ist eine stark ausgeprägte Proteinurie ($> 3\text{-}3,5$ g/Tag) in Kombination mit Hypoalbuminämie (< 3 g/dl) und Ödemen (Cadnapaphornchai et al. 2013).
- Bei einer Glomerulonephritis kann eine Proteinurie in Kombination mit einer Hämaturie, Hypertonie und morphologischen Veränderungen des Glomerulus auftreten (Haraldsson et al. 2008).
- Eine diabetische Nephropathie tritt im Zusammenhang mit einem manifestierten Diabetes Mellitus Typ 1 oder 2 auf (Mooyaart 2013). Weltweit leiden etwa 170 Millionen Menschen an Diabetes, wodurch die diabetische Nephropathie eine der häufigsten Ursachen einer Proteinurie darstellt (Haraldsson et al. 2008).
- Die häufigste Form der Proteinurie bei Kindern ist die „Minimal-Change-Glomerulonephritis“ (Haraldsson et al. 2008), die keine sklerotischen Veränderungen des Glomerulus aufweist (Fogo 2001, Lahdenkari et al. 2004).
- Eine angeborene Form des nephrotischen Syndroms, das „congenital nephrotic syndrome of the finnish type“ (NPHS1), tritt gehäuft in Finnland auf und beruht auf einen Gendefekt (NPHS1-Gen), der die

Nephrin-Expression in den Podozyten stört: (Kestila et al. 1998, Haraldsson et al. 2008).

- Die Präeklampsie bezeichnet eine Proteinurie, die zusammen mit einem erhöhten Blutdruck bei schwangeren Frauen auftreten kann (Haraldsson et al. 2008).

3.1. Ursachen der Proteinurie – Woher stammt das Protein im Urin?

Es gibt grundsätzlich verschiedene Wege, wie Proteine aus dem Blut in den Harn gelangen können. Der klassische Weg ist die glomeruläre Filtration. Die Stoffmenge des filtrierte Proteins im Sekundärharn wird anschließend durch die proximal-tubuläre Rückresorption determiniert. Proteine können aber auch aus dem Blut über den proximalen Tubulus in das Lumen sezerniert werden oder durch Tubuluszellen gebildet und anschließend sezerniert werden (Haraldsson et al. 2008).

Die Ursachen der Proteinurie sind vielseitig, basieren jedoch, dem klassischen Verständnis zufolge, überwiegend auf einer pathologisch verstärkten glomerulären Filtration von Proteinen (Haraldsson et al. 2008).

Beispielsweise liegen bei der Glomerulonephritis starke morphologische Veränderungen des Glomerulus vor, die mit einem Funktionsverlust der glomerulären Filtrationsbarriere einhergehen (Haraldsson et al. 2008).

Bei Formen der Proteinurie, die ohne sklerotische Veränderungen des Glomerulus oder dem Verlust von Podozyten einhergehen, wird eine verminderte Expression von Schlitzmembranproteinen als Ursache diskutiert. In der Minimal-Change-Glomerulonephritis soll beispielsweise die reduzierte Expression von Nephrin zur Bildung von interzellulären Lücken der Podozyten führen, durch die Proteine vermehrt filtrierte werden können (Pricam et al. 1975, Lahdenkari et al. 2004). Beim NPHS1 ist die Erkrankung auf einen Gendefekt des Schlitzmembranproteins Nephrin zurückzuführen (Kestila et al. 1998).

3.1.1. Die kontroverse Sicht der glomerulären Albuminfiltration

Albumin zählt zusammen mit den Globulinen zu den bedeutendsten und am häufigsten im Blut vorkommenden Proteinen und ist wichtig für die Flüssigkeitsverteilung im Körper. Ändert sich die Albuminkonzentration, kann es zu Flüssigkeitseinlagerungen im Gewebe (Ödemen) kommen. Zudem ist Albumin

ein wichtiges Transportprotein im Blut, das unter physiologischen Bedingungen nur minimal mit dem Urin ausgeschieden wird (Schmidt et al. 2005).

Das klassische Verständnis der glomerulären Permselectivität beschreibt die glomeruläre Filtrationsbarriere als einen stark ladungs- und gröbenselektiven Filter, der die Filtration von Albumin weitgehend unterbindet (Chang et al. 1975). Mit der Entdeckung von Nephrin festigte sich die Vorstellung, dass die podozytäre Schlitzmembran den Feinfilter der glomerulären Filtrationsbarriere darstellt (Tryggvason 1999). Obgleich es Theorien gibt, die der glomerulären Basalmembran die entscheidende Größenselektivität zuschreiben (Smithies 2003), finden all diese Thesen einen gemeinsamen Nenner, wenn sich die Frage stellt, ob Albumin durch die glomeruläre Filtrationsbarriere von der Filtration zurückgehalten werden kann:

Ja, die glomeruläre Filtrationsbarriere unterbindet die Filtration von Albumin aufgrund ihrer größen- und ladungsselektiven Eigenschaften nahezu vollständig. Diese Antwort basiert auf zahlreichen Daten, in denen der sogenannte glomeruläre Siebkoeffizient von Albumin (GSC_A) als Maß für die glomeruläre Albuminfiltration bestimmt wurde (Oken und Flamenbaum 1971, Stolte et al. 1979, Tojo und Endou 1992, Ohlson et al. 2000, Norden et al. 2001, Christensen et al. 2007).

Dieser GSC_A errechnet sich als die durchschnittliche Konzentration von Albumin im Harnraum, dividiert durch die Konzentration von Albumin in den glomerulären Kapillaren (Deen et al. 2001).

Trotzdem ist die Frage nach der glomerulären Permselectivität für Albumin keinesfalls abschließend geklärt. Seit über einem Jahrzehnt besteht eine andauernde kontroverse Diskussion, in der die klassische Vorstellung der Funktion des glomerulären Filters in Frage gestellt wird (Russo et al. 2002, Russo et al. 2007).

3.1.2. Das klassische Modell der glomerulären Albuminfiltration

Die Beschaffenheit der glomerulären Filtrationsbarriere und ihre Permeabilitätseigenschaften bezüglich Plasmaproteinen, wie Albumin, hat Forscher seit Jahrzehnten fasziniert und dazu bewegt diesen Sachverhalt zu untersuchen. Es gibt verschiedene experimentelle Ansätze, mit denen das Ausmaß der glomerulären Albuminfiltration in der Vergangenheit in Form des GSC_A

quantifiziert wurde. Auf den Ergebnissen dieser Studien beruht die klassische Vorstellung, dass die Filtration von Albumin durch die glomeruläre Filtrationsbarriere nahezu vollständig unterbunden wird:

- Die klassische Herangehensweise zur Ermittlung des GSC_A *in vivo* ist die Mikropunktion. Durch Punktion der freigelegten Niere eines anästhesierten Tieres werden hier mit einer feinen Pipette Fluidproben aus dem Harnraum und den Kapillaren entnommen und die enthaltene Albuminkonzentration quantifiziert. Die Ergebnisse für den GSC_A von Studien verschiedener Labore lagen im Bereich von 0,0003-0,0006 und zeigten somit, dass die glomeruläre Filtration von Albumin physiologisch sehr niedrig ist (Oken und Flamenbaum 1971, Stolte, Schurek et al. 1979, Tojo und Endou 1992).
- Alternativ dazu wurde der GSC_A in einem *in vitro*-Ansatz im Modell der isoliert-perfundierten-Niere ermittelt. Dabei wurde die Niere bei Temperaturen von 8 °C untersucht, um die proximal-zelluläre Aktivität und somit die Rückresorption von möglichem filtriertem Albumin durch den proximalen Tubulus zu minimieren. Diese Herangehensweise gilt als der Goldstandard, um die Zellaktivität zu unterbinden (Haraldsson und Sorensson 2004). Ohlsen et al. erzielte dabei einen leicht höheren GSC_A von 0,0019 (Ohlson, Sorensson et al. 2000). In einem alternativen Versuch, unter Nutzung dieses Modells, wurde die proximal-tubuläre Rückresorption durch Verabreichung von L-Lysin geblockt. Durch diesen experimentellen Ansatz wurde ein GSC_A von 0,00033 gemessen (Tencer, Frick et al. 1998).
- Der Mechanismus der proximal-tubulären Rückresorption von Albumin wird mittlerweile sehr gut verstanden. Glomerulär filtriertes Albumin wird luminal über den Megalin-Cubilin-Komplex in Lysosomen aufgenommen und unter Spaltung in einzelne Aminosäuren basolateral wieder in den Blutkreislauf zurückgegeben (Christensen und Birn 2001). Unter Kenntnis dieses Mechanismus, wurde die glomeruläre Albuminfiltration durch Vermessung der Albuminausscheidung im Urin von Megalin-Knockout (KO)-Mäusen untersucht. Die Forscher stellten dabei einen niedrigen GSC_A von 0,00016 fest (Christensen, Birn et al. 2007).

- Einen zusätzlichen Beweis für die niedrige glomeruläre Albuminfiltration lieferten Norden et al. in einem humanen Experiment. Hier wurde die Albuminausscheidung im Urin von Patienten mit renalem Fanconi-Syndrom untersucht. Diese Patienten leiden an einer proximal-tubulären Dysfunktion, wodurch glomerulär filtrierte Albumin nicht proximal-tubulär rückresorbiert werden kann. Aufgrund dieses Krankheitsbildes entspricht die glomeruläre Albuminfiltration dieser Patienten in etwa der Albuminausscheidung im Urin. Bei Fanconi-Patienten wurde ein GSC_A von 0,00008 festgestellt (Norden, Lapsley et al. 2001).
- Zu guter Letzt wurde der GSC_A durch zwei weitere Labore mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie untersucht. Bei der Ermittlung von Fluoreszenzintensitäten eines an Albumin konjugierten Farbstoffes im Harnraum und in den glomerulären Kapillaren konnte ein GSC_A von 0,004 (Peti-Peterdi 2009) beziehungsweise 0,002 (Tanner 2009) gemessen werden.

Die Dichte der Datenlage bestätigt die klassische Vorstellung der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere, laut der die glomeruläre Filtration von Albumin minimal ist (Haraldsson und Sorensson 2004). Daher ist es wahrscheinlich, dass eine Proteinurie unmittelbar mit einer pathologischen Erhöhung der glomerulären Proteinfiltration im Zusammenhang steht.

3.1.3. Das Modell der proximal-tubulären Rückresorption von Albumin

Unter physiologischen Bedingungen wird Albumin nur minimal mit dem Urin ausgeschieden. Nach dem klassischen Verständnis der Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere wird Albumin von der Filtration in den Harnraum zurückgehalten. Comper und Kollegen vertreten hingegen die Theorie, dass in den Glomeruli auch unter physiologischen Bedingungen nephrotische Mengen Albumin in den Harnraum filtrierte werden. Das glomerulär filtrierte Albumin soll dann beim gesunden Menschen durch die proximalen Tubuli wieder vollständig rückresorbiert werden (Osicka et al. 1996) (Russo et al. 2002, Russo et al. 2007). Weiter wurde die Hypothese aufgestellt, dass die glomeruläre Filtrationsbarriere keine nennenswerten ladungsselektiven Eigenschaften besitzt (Russo et al. 2002).

In einem ersten experimentellen Ansatz veröffentlichten Osicka et al. eine auf der isoliert-perfundierten-Niere basierende Studie. Indem sie die proximal-tubuläre Funktion unter Einsatz mehrerer Toxine (Ammoniumchlorid, Chloroquin und Cytochalasin B, L-Lysin) hemmten, stellten sie bei 37°C einen GSC_A in Höhe von 0,074 fest (Osicka et al. 1996). Seither folgten zahlreiche Publikation von Comper und Kollegen, welche die These verteidigten, dass Albumin in diesem großen Ausmaß glomerulär filtrierte wird (Eppel et al. 1999, Russo et al. 2002).

Im Jahr 2007 untersuchten Russo et al den glomerulären Siebkoeffizienten von Albumin erstmals durch die Nutzung der Intravitalmikroskopie. Mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie ermittelten sie den GSC von Albumin-konjugiertem Alexa 568 in glomerulären Kapillaren und im Harnraum. Erneut erzielten Comper und seine Kollegen hohe Werte für den GSC_A (0,034), (Russo et al. 2007).

Die GSC_A -Werte, die Comper und Kollegen in ihren Studien ermittelten, sind in etwa 50-fach höher, als die Werte, die durch andere Methoden ermittelt wurden (~0,0006; siehe Kapitel 3.1.2). Eine Albuminfiltration von diesem Ausmaß hätte für das herrschende Verständnis der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere drastische Konsequenzen. In der menschlichen Niere würde dies eine totale glomeruläre Albuminfiltration von mindestens 225 g Albumin pro Tag bedeuten (Christensen et al. 2007, Gekle 2007). Dabei ist anzumerken, dass der Gehalt von Albumin im Plasma nur in etwa 125 g beträgt (Christensen et al. 2007). Diese Ergebnisse implizieren also eine tägliche glomeruläre Albuminfiltration von mehr als 200% des totalen Plasmaalbumins, das über proximal-tubuläre Resorption wieder zurückgewonnen werden müsste (Christensen et al. 2007).

Das Modell von Comper und Kollegen hätte zudem Konsequenzen für das herrschende Verständnis der Pathologie einer Proteinurie. Demnach läge die Ursache einer Proteinurie nicht in einer erhöhten glomerulären Proteinfiltration, sondern in einer proximal-tubulären Dysfunktion (Dickson et al. 2014).

3.2. Die pathologische Bedeutung der Proteinurie

Proteinurie kann verschiedene Ausprägungen haben und ist unter anderem stark mit chronischem Nierenversagen assoziiert, das als hochsignifikanter Risikofaktor für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse mit erhöhter Mortalität gilt (Keith et al. 2004).

Die Proteinurie stellt dabei aber nicht nur ein Symptom verschiedener Nierenerkrankungen dar. Beim Menschen ist das Auftreten einer Proteinurie der aussagekräftigste Faktor für die Progression einer renalen Erkrankung (Remuzzi und Bertani 1998). Das Ausmaß der Proteinurie zeigt zudem eine hochsignifikante Korrelation mit einer Verschlechterung der glomerulären Filtrationsrate (Remuzzi et al. 2005, Currie und Delles 2013).

Das proteinenthaltende Ultrafiltrat wirkt toxisch auf den proximalen Tubulus (Remuzzi und Bertani 1998). Filtriertes Protein wird physiologisch in den proximalen Tubuluszellen durch Endozytose wieder resorbiert (Christensen und Birn 2001). Im Falle einer erhöhten glomerulären Proteinfiltration kommt es zu einer Akkumulation der proteinenthaltenden Lysosomen im proximalen Tubulus (Bertani et al. 1989). In Zellkultur-Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass Proteine, insbesondere Albumin, in proximalen Tubuluszellen vermehrt die Produktion inflammatorischer Zytokine induzieren (Abbate et al. 1999). Dies führt zu einer Schädigung der betroffenen Tubuluszellen. Eine Reduktion der Proteinurie ist daher eine erfolgreiche Therapie zur Erhaltung der Nierenfunktion (Remuzzi und Bertani 1998).

Das Ausmaß einer Proteinurie ist auch bei Patienten, die nicht an chronischem Nierenversagen leiden, ein individueller Risikofaktor für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse (Wagner et al. 1994). In einer Meta-Analyse verschiedener Studien mit insgesamt 48000 Probanden, konnte ein 90 % höheres Schlaganfallrisiko bei Patienten mit Mikroalbuminurie festgestellt werden als bei Patienten ohne eine erhöhte Albuminausscheidung (Lee et al. 2010). Problematisch ist es ebenfalls, wenn die Mikroalbuminurie in Kombination mit Krankheiten auftritt, die man zusammengefasst unter dem Begriff „Metabolisches Syndrom“ (= Hypertonie, Insulinresistenz, Fettstoffwechselstörungen und Adipositas) kennt. Eine Mikroalbuminurie führt beispielsweise in Kombination mit einer Hypertonie zu einem vierfach erhöhten Risiko eine koronare Herzkrankheit zu entwickeln als bei hypertonen Patienten mit normaler Albuminausscheidung (Jensen et al. 2000).

Die zugrundeliegenden Mechanismen für das erhöhte kardiovaskuläre Risiko unter Proteinurie basieren wahrscheinlich auf einer Verschlechterung der endothelialen Funktion (Currie und Delles 2013). Konkret wurden bei Patienten mit Proteinurie erhöhte Spiegel von Substanzen festgestellt, die die endotheliale

Funktion negativ beeinflussen. Als Beispiele sind das C-Reaktive Protein (CRP), das asymmetrische Dimethylarginin (ADMA), welches die endotheliale Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion inhibiert, der von Willebrand-Faktor (vWF) und der Vascular Endothelial Growth Faktor (VEGF) zu nennen (Currie und Delles 2013).

Eine Proteinurie erhöht somit das Risiko von 1) einer Verschlechterung der glomerulären Filtrationsrate, 2) der Progression des chronischen Nierenversagens und 3) des Auftretens von kardiovaskulären Ereignissen.

4. Proteinendozytose in Podozyten

Nach der klassischen Vorstellung entsteht eine Proteinurie durch eine vermehrte glomeruläre Filtration von Plasmaproteinen, was einen erhöhten Risikofaktor für die Progression einer Nierenerkrankung darstellt (Remuzzi et al. 2005, Haraldsson et al. 2008). Dabei wird vermutet, dass es durch den erhöhten Proteinfluss zu einer direkten Interaktion mit den Zellen der glomerulären Filtrationsbarriere kommt. Ein Beispiel für eine solche Interaktion ist die Proteinendozytose durch Podozyten (Huber 2008, Tojo und Kinugasa 2012).

Das Auffinden von glomerulären Vakuolen in humanen Nierenbiopsien von Patienten mit nephrotischem Syndrom wurde bereits in den 80er Jahren dokumentiert und in Zusammenhang mit der erhöhten Proteinfiltration dieser Patienten gebracht (Yoshikawa et al. 1986, Toth und Takebayashi 1992). Im Jahr 2006 wurde die podozytäre Endozytose von Albumin zum ersten Mal von Eyre et al. quantifiziert (Eyre et al. 2007). Die Existenz der Proteinendozytose in Podozyten ist seither unumstritten, jedoch herrschen verschiedene Theorien, die dem Phänomen entweder eine physiologische oder eine pathophysiologische Bedeutung zuschreiben.

4.1. Physiologische Konzepte podozytärer Proteinendozytose

Nach dem Tryggvason-Modell wird die glomeruläre Filtrationsbarriere als eine Aneinanderreihung einzelner Filter mit aufsteigender Größenselektivität beschrieben. Demnach ist die podozytäre Schlitzmembran der Feinfilter der glomerulären Filtrationsbarriere (Tryggvason 1999, Huber 2008). Die Folge daraus könnte sein, dass Proteine, welche die glomeruläre Basalmembran überwinden können, jedoch nicht die podozytäre Schlitzmembran, im

subpodozytären Raum akkumulieren. Es stellt sich somit die Frage, warum die glomeruläre Filtrationsbarriere unter diesen Umständen nicht verstopft. Ein alternatives Modell von Smithies postuliert deswegen, dass die glomeruläre Basalmembran die gröbenselektivste Schicht der glomerulären Filtrationsbarriere ist. Doch auch in diesem Modell können signifikante Mengen Protein die glomeruläre Basalmembran überwinden (Smithies 2003, Huber 2008).

Die rezeptorvermittelte podozytäre Endozytose von akkumulierten Proteinen aus dem subpodozytären Raum ist eine elegante Lösung dieses Problems (Huber 2008). Der Immunglobulin G (IgG)- bzw. Albuminrezeptor FcRn ist in Podozyten exprimiert (Akilesh et al. 2008) und könnte die Transzytose von IgG in den Harnraum vermitteln. Um dies zu untersuchen wurden Experimente mit FcRn-KO-Mäusen durchgeführt. Die FcRn-KO-Mäuse und ihre Wildtyp-Wurfgeschwister erhielten eine intra peritoneale (i.p.) Injektion von humanem IgG. Im Anschluss wurde die Ablagerung des humanen IgG in den Glomeruli dieser Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion nachgewiesen (Immunfluoreszenzfärbungen). FcRn-KO-Mäuse zeigten im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern eine starke Akkumulation des IgG. Unbehandelte FcRn-KO-Mäuse zeigten außerdem im Alter von sechs Monaten im Glomerulus stärkere Ablagerungen von murinem IgG als gleichaltrige Wildtyp-Mäuse (Akilesh et al. 2008).

Podozyten können somit Proteine aus dem subpodozytären Raum aufnehmen und durch Transzytose in den Harnraum abgeben. Dieser aktive Eiweißtransport ist rezeptorvermittelt und gewährleistet, dass der Nierenfilter nicht verstopft (Huber 2008).

4.2. Pathophysiologische Konzepte podozytärer Proteinendozytose

Neben der Theorie, dass Podozyten durch Proteinendozytose den glomerulären Filter säubern, gibt es auch pathophysiologische Ansätze.

4.2.1. Transzytose von Albumin durch Podozyten als alternativer Filtrationsweg im nephrotischen Syndrom

Die Entwicklung einer Proteinurie kann über die Hypothese erklärt werden, dass sich in bestimmten Arealen des Glomerulus die Podozyten von der Basalmembran ablösen. Durch die entstehenden Lücken wird vermehrt Wasser filtriert und Plasmaproteine werden dadurch in den Harnraum gespült (Lahdenkari et al.

2004). Eine Evidenz für diese Theorie konnte sowohl in Tierversuchen (Ryan und Karnovsky 1975) als auch durch die Untersuchung von humanem Nierengewebe erbracht werden (Grishman und Churg 1975). Diese Theorie erklärt jedoch nicht in allen Fällen das Auftreten einer Proteinurie, wie beispielsweise bei der „Minimal-Change-Glomerulonephritis“. Diese Form der Proteinurie tritt häufig bei Kindern auf und zeigt nur sehr geringe morphologische Veränderungen des Glomerulus (Lahdenkari et al. 2004). In diesem Fall erklärt man die erhöhte Albuminfiltration durch die Entstehung von interzellulären Lücken der Podozyten, durch die Proteine entweichen können (Pricam et al. 1975). Ursache für dieses Phänomen ist wahrscheinlich eine lokal reduzierte Nephrin-Expression (Lahdenkari et al. 2004). In Tierversuchen konnte jedoch festgestellt werden, dass das Auftreten von Proteinurie und Änderungen der Nephrin-Expression teilweise zeitlich nicht übereinstimmen (Kawachi et al. 2000).

Tojo et al. diskutieren deswegen eine alternative Theorie. Bei Patienten mit Minimal-Change-Glomerulonephritis oder selektiver Albuminurie könnte die Proteinurie zudem durch einen alternativen Weg der „Albuminfiltration“ erklärt werden: Unter pathologischen Bedingungen transportieren Podozyten Albumin aktiv durch Transzytose in den Harnraum (Lahdenkari et al. 2004, Tojo und Kinugasa 2012).

Im Puromycin-Aminonucleosid (PAN)-Modell für das nephrotische Syndrom in der Ratte konnte injiziertes Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gefärbtes Albumin in den Glomeruli (Immunfluoreszenzfärbung) detektiert werden. Zudem zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen Gold-gefärbte Albuminvesikel in den Podozyten von PAN-Ratten (Tojo et al. 2008). In einer weiteren Studie konnten diese Befunde durch Injektion von Evans-Blue-gefärbtem Albumin (EB-Albumin) in PAN-Ratten belegt werden. Die Nieren der Tiere wurden 15 Minuten nach der Injektion in Scheiben geschnitten, wodurch bei der Untersuchung mit konfokaler Mikroskopie Endozytosevesikel in den Podozyten festgestellt werden konnten. Außerdem scheint die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies eine Rolle in diesem Prozess zu spielen. Durch Hemmung der NADPH-Oxidase konnte die Proteinurie in diesen Tieren reduziert werden (Kinugasa et al. 2011).

Zusammenfassend weisen diese Befunde auf eine Transzytose von Albumin durch Podozyten unter pathologischen Bedingungen hin. Dieser alternative Weg der

Albuminfiltration könnte eine selektive Albuminurie in der „Minimal-Change-Glomerulonephritis“ erklären (Tojo und Kinugasa 2012).

4.2.2. Entzündungsreaktion in der gesunden Niere infolge podozytärer Albuminendozytose

Proximale Tubuluszellen reagieren auf eine Albuminexposition in Form einer Entzündungsreaktion (Zoja et al. 1998, Abbate et al. 1999). Eine ähnliche Reaktion auf Albumin konnte kürzlich auch für Podozyten gezeigt werden. Eine Exposition von kultivierten humanen Podozytenzellen mit 5 mg/ml Albumin führte zu einem signifikanten Anstieg von Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 1 β (IL-1 β) und dem Tumornekrosefaktor (TNF). Außerdem wurde ein vermehrter Zelltod der Podozyten beobachtet. Diese Effekte konnten nicht festgestellt werden, wenn die Zellen einer Dextranlösung an Stelle einer Albuminlösung ausgesetzt wurden. Durch eine wiederholte i.p. Injektion von Albumin in hohen Dosen bei gesunden Mäusen, konnten diese Ergebnisse zudem in einem *in vivo*-Modell rekapituliert werden. In den isolierten Glomeruli dieser Tiere konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg von TNF und IL-1 β gemessen werden (Okamura et al. 2013).

Wie auch in proximalen Tubuluszellen beobachtet, wirkt eine Exposition von Albumin auch auf Podozyten inflammatorisch und erhöht das Auftreten einer Apoptose.

5. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Eine ausgeprägte Proteinurie, wie sie beispielsweise beim nephrotischen Syndrom vorkommt, entsteht durch eine erhöhte glomeruläre Filtration von Plasmaproteinen (Haraldsson et al. 2008). Die Ursachen für die erhöhte Filtration von Makromolekülen sind multifaktoriell.

Unabhängig von der zugrundeliegenden Pathogenese gehören ACE-Hemmer und AT1-Rezeptor-Antagonisten zur Standardtherapie für die Reduktion der Proteinausscheidung (Ruggenti et al. 2012). Diese Arzneistoffe sind Hemmstoffe des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Aufgrund ihrer hohen Wirksamkeit liegt nahe, dass das RAAS eine pathologische Bedeutung für die Entwicklung und die Progression der Proteinurie hat. Im Folgenden soll das RAAS erklärt und die physiologische und pathophysiologische Bedeutung dieses Systems vorgestellt werden.

Das RAAS ist ein wesentlicher regulativer Kreislauf des arteriellen Blutdrucks sowie der Salz- und Wasser-Homöostase (Weir und Dzau 1999, Castrop et al. 2010).

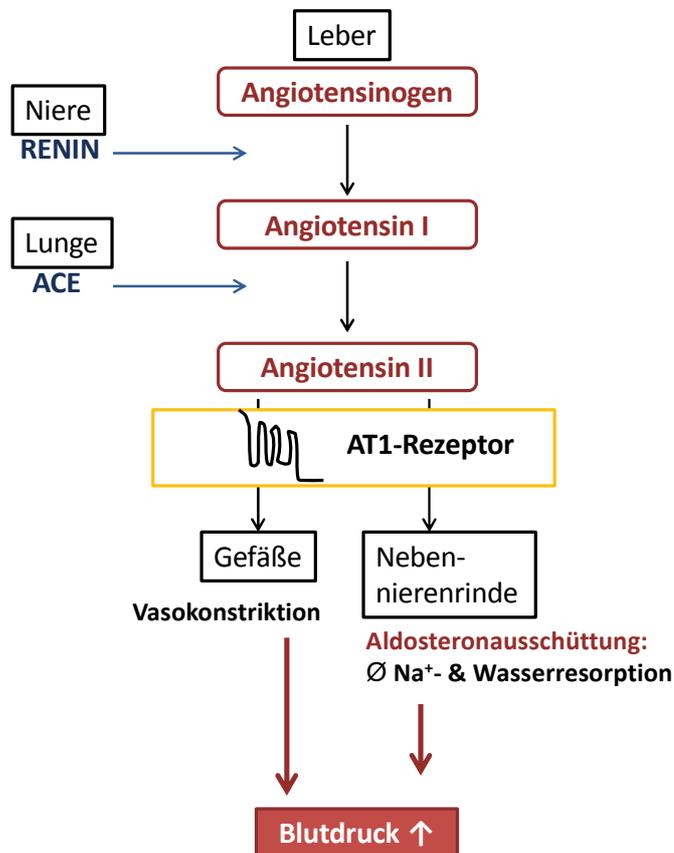


Abbildung 3: Vereinfachtes Schema des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Angiotensinogen wird durch die aus der Niere stammende Protease Renin in Angiotensin I gespalten. Angiotensin I wird durch das ACE (=Angiotensin-konvertierendes-Enzym) in das Effektorpeptid Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II erhöht über verschiedene Mechanismen den arteriellen Blutdruck.

Ein Absinken des systemischen Blutdrucks sowie der intratubulären Chloridkonzentration führt in der Niere zur Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen der afferenten Arteriole. Renin ist eine Protease, die das in der Leber synthetisierte Angiotensinogen in Angiotensin I spaltet. Durch das Angiotensin-konvertierende-Enzym wird Angiotensin I in das eigentliche Effektorpeptid Angiotensin II umgewandelt (Castrop et al. 2010). Angiotensin II ist ein starker Vasokonstriktor und steigert den Blutdruck neben dem spezifischen Angriff an der glatten Gefäßmuskulatur zusätzlich über die Ausschüttung von Aldosteron und durch seine direkte Wirkung auf das Tubulussystem. Durch Aldosteron wird die Neusynthese von epithelialen Natrium-Kanälen im

Verbindungstubulus und dem kortikalen Sammelrohr reguliert. Hierdurch wird die Salz - und somit auch die Wasser-Retention erhöht (Aguilera 1992, Klinka 2001). Über eine direkte Stimulation des Tubulussystems aktiviert Angiotensin II Natrium-Protonen-Austauscher (NHE3) in der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen sowie Natrium-Bikarbonattransporter und Natrium-Kalium-ATPasen auf der basolateralen Seite. Auf diesem Weg wird wiederum die Natriumreabsorption gesteigert (Timmermans et al. 1993, Mehta und Griendling 2007).

Das RAAS unterliegt einem lokalen negativen Feedback-System. Die Bildung von Angiotensin II führt zu einer Hemmung der Synthese und der Sekretion von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen (Hackenthal et al. 1990, Castrop et al. 2010).

5.1. Das Effektorpeptid des RAAS – Angiotensin II

Eine Stimulation des RAAS führt zur Bildung von Angiotensin II, das physiologisch über verschiedene Mechanismen wesentlich an der Blutdruckregulierung beteiligt ist. Die Wirkung von Angiotensin II ist nicht nur essentiell für die mittelfristige Blutdruckregulation (Klinka 2001), sondern spielt ebenfalls eine Rolle bei der kurzfristigen Blutdruckadaptierung- zum Beispiel beim Übergang vom Liegen ins Stehen (Orthostase-Reaktion), (Mehta und Griendling 2007).

Angiotensin II, das Effektorpeptid des RAAS, wirkt durch Bindung an seine beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren AT1 und AT2. Dabei ist die Affinität von Angiotensin II zu beiden Rezeptoren gleichermaßen ausgeprägt (Helmy und Siragy 2009).

5.1.1. Der AT1-Rezeptor

Die klassischen Effekte von Angiotensin II werden durch Stimulation des Angiotensin II-Rezeptor-Subtyp 1 (AT1-Rezeptor) reguliert (Castrop et al. 2010). Hierzu gehören die Angiotensin II-vermittelte Vasokonstriktion, die erhöhte tubuläre Salzreabsorption sowie die Ausschüttung von Aldosteron. AT1-Rezeptoren sind außerdem am negativen Feedback-Mechanismus des RAAS beteiligt. Eine Stimulation von AT1-Rezeptoren in den juxtaglomerulären Zellen unterdrückt sowohl die Synthese als auch die Ausschüttung von Renin (Castrop et al. 2010).

Der AT1-Rezeptor ist in zahlreichen Organen exprimiert, wie beispielsweise in glatten Muskelzellen, der Nebennierenrinde, dem Herz, der Leber, dem Gehirn und der Niere (Mehta und Griendling 2007). In der Niere befindet sich der AT1-Rezeptor überwiegend in den Gefäßen des Nierenkortex, im S3-Segment des proximalen Tubulus sowie im Glomerulus. Dort konnte die Expression von AT1-Rezeptoren in Mesangialzellen und Podozyten nachgewiesen werden (Sharma et al. 1998, Miyata et al. 1999).

Die Signalkaskade des AT1-Rezeptors verläuft über Kopplung an den Gq-Komplex mit anschließender Aktivierung der Phospholipase C, welche die Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) steigert (Castrop et al. 2010). Zudem kommt es zur Aktivierung der Phospholipase A₂ und der Phospholipase D (Ushio-Fukai et al. 1999).

Die Expression der AT1-Rezeptoren in der Membran zahlreicher Organe unterliegt einem Angiotensin II-abhängigen Desensibilisierungsmechanismus. Als Resultat der Angiotensin II-Bindung kann es zur Internalisierung des Rezeptors kommen, wodurch sich die Menge an AT1-Rezeptoren in der Zellmembran reduziert (Gunther et al. 1980).

Im Mausmodell konnte zudem die Existenz von Angiotensin-Rezeptor-assoziierten Proteinen nachgewiesen werden, welche die Internalisierung des AT1-Rezeptors in unterschiedlichen Geweben regulieren. ATRAP (Angiotensin-Rezeptor-assoziiertes Protein) bewirkt im proximalen Tubulus eine verstärkte Internalisierung des AT1-Rezeptors in Folge einer Angiotensin II-Stimulation und reduziert somit die Rezeptordichte in der Membran. Die Expression von ATRAP wird zudem durch die Salzaufnahme mit der Nahrung reguliert. Eine salzarme Diät reduziert die Expression von ATRAP im proximalen Tubulus, was die Angiotensin II-vermittelte Salzurückresorption stimuliert (Castrop 2013).

Ein weiteres AT1-Rezeptor-assoziiertes Protein, ARAP1 (Angiotensin-Rezeptor-assoziiertes Protein 1) wird überwiegend in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert. ARAP1 sensibilisiert dort die Wirkung von Angiotensin II, indem es die Reinternalisierung des AT1-Rezeptors in die Membran bewirkt und somit die Rezeptordichte erhöht. Ebenso wie bei ATRAP wird auch die ARAP1-Expression durch eine salzarme Kost vermindert (Castrop 2013). Die Wirkung Rezeptor-assoziiierter Proteine, wie ATRAP und ARAP1 erklärt beispielsweise, warum eine

salzarme Kost zwar die Natriumreabsorption im proximalen Tubulus stimuliert, jedoch nicht zu einer ausgeprägten Angiotensin II-vermittelten Vasokonstriktion führt (Castrop 2013).

5.1.2. Der AT2-Rezeptor

Die vom Angiotensin II-Rezeptor-Subtyp 2 (AT2-Rezeptor) vermittelten Effekte sind nicht vollständig verstanden, scheinen jedoch gegenläufig zu den klassischen Effekten der AT1-Rezeptoren zu wirken (Castrop et al. 2010). In der Niere führt die Aktivierung von AT2-Rezeptoren zu einer entzündungshemmenden Wirkung (Abdel-Rahman et al. 2008), zu einer Vasodilatation (Tsutsumi et al. 1999) sowie zu einer verstärkten Natriurese (Siragy et al. 1999). Die Wirkung auf die Renin-Synthese und dessen Ausschüttung hingegen ist identisch mit der des AT1-Rezeptors. Sowohl die Angiotensin II-vermittelte Aktivierung des AT1- als auch des AT2-Rezeptors führt zu einer Hemmung der Bildung und Freisetzung von Renin (Siragy et al. 2005).

Der AT2-Rezeptor ist vor allem in fetalem Gewebe hoch exprimiert (z.B.: Aorta, gastrointestinales Mesenchym, Bindegewebe und Gehirn) und deswegen höchstwahrscheinlich maßgeblich an der fetalen Entwicklung beteiligt (Mehta und Griendling 2007, Castrop et al. 2010). Nach der Geburt nimmt die Expression rapide ab. In adultem Gewebe finden sich niedrige Expressionslevel des AT2-Rezeptors in Lunge, Leber und Niere (Mehta und Griendling 2007). In der Niere ist der AT2-Rezeptor hauptsächlich in proximalen und distalen Tubuli des Nierenkortex sowie in der afferenten Arteriole, in den Podozyten und in den Mesangialzellen des Glomerulus exprimiert (Sharma et al. 1998, Miyata et al. 1999).

Die Signalkaskade des AT2-Rezeptors, die bisweilen weitgehend unverstanden bleibt, involviert verschiedene Protein-Phosphatasen sowie die Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium. Zudem konnte durch die Aktivierung des AT2-Rezeptors eine vasodilatatorische Wirkung durch den Anstieg von Stickstoffmonoxid (NO) und cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) beobachtet werden (Carey et al. 2001). Der AT2-Rezeptor ist außerdem in der Lage, die Effekte des AT1-Rezeptors direkt zu unterbinden. Zum Einen erfolgt dies über eine Heterodimerisierung mit dem AT1-Rezeptor (AbdAlla et al. 2001),

zum Anderen durch eine inhibierende Interaktion mit der Signalkaskade des AT1-Rezeptors (Munzenmaier und Greene 1996).

Die Expression des AT2-Rezeptors ist im Gegensatz zur Expression des AT1-Rezeptors einem positiven Angiotensin II-vermittelten Feedback-Mechanismus unterworfen. Die Blockade des AT2-Rezeptors mit PD123319, einem selektiven AT2-Rezeptor-Antagonisten, führt zu einer Verringerung der AT2-Rezeptor-Expression, wohingegen diese durch Einsatz eines AT2-Rezeptor-Agonisten (CGB42112A) stimuliert wird (Jin et al. 2002). Außerdem ist die Expression des AT2-Rezeptors durch die Aktivität des AT1-Rezeptors beeinflusst. Eine Angiotensin II-vermittelte Stimulation des AT1-Rezeptors unterdrückt die Expression von AT2-Rezeptor-mRNA. Umgekehrt scheint eine AT1-Rezeptor-Blockade die Expression des AT2-Rezeptors zu stimulieren (De Paolis et al. 1999).

5.2. Pathophysiologische Effekte von Angiotensin II

Das RAAS ist in die kurz- und mittelfristige Blutdruckregulation involviert. Angiotensin II, das Effektorpeptid des RAAS, hat jedoch auch erhebliche pathologische Bedeutung. Die meisten Effekte wurden hierbei für eine chronische Angiotensin II-Exposition beschrieben (Tylicki et al. 2012).

5.2.1. Chronische Effekte von Angiotensin II

Eine Langzeit-Stimulation des RAAS spielt eine tragende Rolle für die Entwicklung und die Progression von chronischem Nierenversagen (Remuzzi et al. 2005). Dieses Phänomen wird über zwei verschiedene Mechanismen erklärt:

- 1) Angiotensin II erhöht als starker Vasokonstriktor den Tonus der efferenten Arteriole und steigert dadurch den intraglomerulären Druck, der als Risikofaktor für eine Schädigung der glomerulären Kapillaren gilt (Remuzzi et al. 2005, Tylicki et al. 2012). Durch den erhöhten hydrostatischen Druck wird vermutet, dass die glomeruläre Filtrationsbarriere langfristig ihre gröbenselektive Funktion verliert und somit vermehrt Makromoleküle in den Harnraum filtriert werden (Yoshioka et al. 1987).
- 2) Chronisches Nierenversagen ist ein Zustand anhaltender Inflammation und korreliert mit oxidativem Stress, endothelialer Dysfunktion und

Gefäßverkalkung (Remuzzi et al. 2005, Stenvinkel et al. 2005). Angiotensin II ist nicht nur ein Vasokonstriktor, sondern, ähnlich einem Zytokin, ein Regulator von Zellwachstum, Entzündung und Fibrose (Ruiz-Ortega et al. 2001, Remuzzi et al. 2005). Es stimuliert den Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) sowie Interleukin-6 (IL-6) und Nuklear-Faktor- κ B (NF κ B), die an renalen Entzündungsprozessen maßgeblich beteiligt sind (Remuzzi et al. 2005). Angiotensin II ist außerdem an der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie an einer durch oxidativen Stress-vermittelten endothelialen Dysfunktion beteiligt. Aus diesem Grund wird vermutet, dass Angiotensin II ebenfalls zu den pathologischen Prozessen der Arteriosklerose beiträgt (Mehta und Griendling 2007) (Rajagopalan et al. 1996).

Die chronische Angiotensin II-Exposition spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer Proteinurie und einem chronischen Nierenversagen (Remuzzi und Bertani 1998). Als zugrundeliegende Mechanismen werden hämodynamische und entzündungsbedingte Prozesse diskutiert. Ob Angiotensin II auch direkte Effekte auf die glomeruläre Filtrationsbarriere aufweist, ist weitgehend unklar.

5.2.2. Akute Effekte von Angiotensin II auf die glomeruläre Proteinfiltration

Neben der erhöhten Proteinfiltration unter chronischer Angiotensin II-Exposition gibt es die Evidenz, dass auch eine akute Einwirkung von Angiotensin II die glomeruläre Filtration von Albumin steigern könnte. AT1-Rezeptoren sind sowohl in Podozyten als auch in Mesangialzellen vorhanden, womit die Voraussetzung für eine direkte und akute Intervention durch das Peptid auf die glomeruläre Filtration von Proteinen gegeben ist (Miyata et al. 1999).

Im Jahr 1975 erbrachte eine Mikropunktionsstudie erste Hinweise auf eine Steigerung der Proteinfiltration unter Angiotensin II-Exposition (Eisenbach et al. 1975). *In vitro* konnten diese Befunde am Modell der isoliert-perfundierten-Niere der Ratte bestätigt werden (Lapinski et al. 1996).

Eine jüngere Studie von Axelsson et al. untersuchte mögliche akute Effekte von Angiotensin II auf die glomeruläre Filtration von Makromolekülen durch die Bestimmung des glomerulären Siebkoeffizienten von FITC-gefärbten Ficoll-Molekülen (70 und 400 kDa). Diese Messungen erfolgten basal und unter

Angiotensin II-Infusion verschiedener Konzentration. Ficoll ist ein neutrales Polysaccharid, das im proximalen Tubulus nicht signifikant reabsorbiert wird. Daher entspricht die Ausscheidung im Urin in etwa der filtrierten Menge des fluoreszierenden Makromoleküls (Haraldsson et al. 2008). Unter Angiotensin II-Exposition konnte eine Erhöhung der Permeabilität für das Ficoll festgestellt werden (Axelsson et al. 2012).

6. Therapie der Proteinurie – Hemmung des RAAS

Angiotensin II spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Progression einer Proteinurie (Remuzzi et al. 2005). Daher werden Arzneistoffe, die das RAAS hemmen, standardmäßig eingesetzt, um die erhöhte Proteinausscheidung zu reduzieren (Ruggenti et al. 2012).

Medikamente zur Hemmung des RAAS werden unter anderem in der Therapie der Hypertonie eingesetzt. Im Vergleich zu anderen Wirkstoffen, die zur Senkung des arteriellen Blutdrucks Verwendung finden, bieten sie jedoch entscheidende klinische Vorteile. Eine Blockade des RAAS senkt nicht nur den Blutdruck, sondern reduziert das Auftreten einer Proteinurie, verbessert die glomeruläre Hämodynamik und reduziert die Progression der Nierenerkrankung (Barnett 2005, Tylicki et al. 2012).

Die medikamentöse Hemmung des RAAS ist somit renoprotektiv. Dies konnte in zahlreichen klinischen Studien belegt werden (Lewis et al. 1993, Barnett 2005, Tylicki et al. 2012). Die Blockade des RAAS wirkt der glomerulären Hyperperfusion und Hyperfiltration entgegen und reduziert die Proteinausscheidung im Urin. Unabhängig von ihren blutdrucksenkenden Effekten wirkt die Blockade des RAAS auch den nicht-hämodynamischen Wirkungen von Angiotensin II entgegen (Taal und Brenner 2000). Vermehrt glomerulär filtriertes Protein führt z.B. infolge einer Akkumulation der proteinenthaltenden Lysosomen im proximalen Tubulus zu einer Entzündung dieser Tubuluszellen (Abbate et al. 1999). Durch die Reduktion der glomerulären Filtration von Proteinen wirkt eine RAAS-Blockade diesen entzündlichen Prozessen entgegen und verbessert die Nierenfunktion (Zoja et al. 1998).

Arzneistoffe, die das RAAS hemmen, wirken nicht nur renoprotektiv und vermindern die Progression einer Niereninsuffizienz (Tylicki et al. 2012), sondern

vermindern ebenfalls das erhöhte kardiovaskuläre Risiko unter einer Proteinurie. Dies konnte in der HOPE-Studie gezeigt werden (Mann et al. 2001, Currie und Delles 2013).

6.1. Überblick über die Wirkstoffe zur Hemmung des RAAS

Es gibt verschiedene Interventionsmöglichkeiten zur Hemmung des RAAS, die in Abbildung 4 im Überblick dargestellt sind. Die bedeutendsten Wirkstoffe, die in der RAAS-inhibierenden-Therapie eingesetzt werden, sind die ACE-Hemmer und die AT1-Rezeptor-Antagonisten, deren renoprotektive Wirkung bereits in zahlreichen Studien belegt wurde (Currie und Delles 2013).

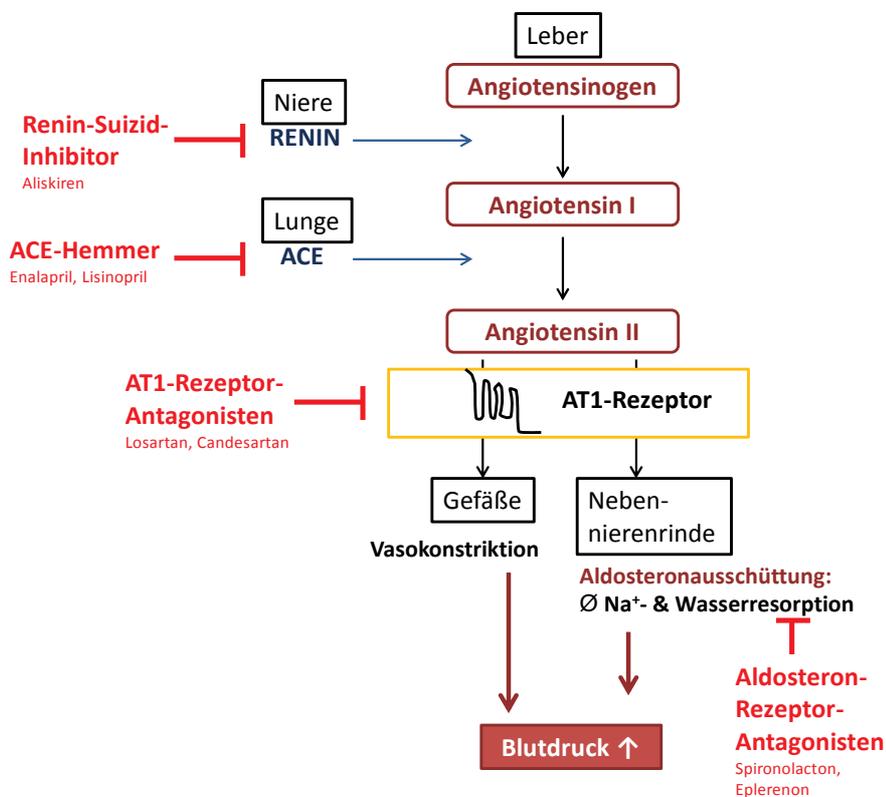


Abbildung 4: Eingriffsmöglichkeiten zur Hemmung des RAAS.

6.1.1. ACE-Hemmer

ACE-Hemmer, wie Lisinopril oder Enalapril sind Arzneistoffe, die das Angiotensin-konvertierende-Enzym (ACE), eine Metalloprotease kompetitiv hemmen. Dies verhindert die Umsetzung von Angiotensin I zu Angiotensin II. Als Konsequenz wird Aldosteron vermindert ausgeschüttet, die Vasokonstriktion und die direkte Wirkung von Angiotensin II auf das Tubulssystem reduziert. Das ACE, auch Kininase II genannt, ist zudem für den Abbau von Bradikinin und der

Substanz P verantwortlich. Die Applikation von ACE-Hemmern kann deswegen zur Akkumulation dieser Moleküle in bestimmten Geweben führen (Atlas 2007). Die Bradikinin-abhängige Freisetzung von NO, Prostaglandin E₂ und Prostacyclin könnte zu der beobachteten Vasodilatation unter einer ACE-Hemmer-Therapie beitragen (Lopez-Sendon et al. 2004). Gleichzeitig wird angenommen, dass die Akkumulation von Bradikinin und der Substanz P auch mit dem durch ACE-Hemmer verursachten Quincke Ödem und dem trockenen Reizhusten in Verbindung steht (Wong et al. 2004, Atlas 2007).

6.1.2. AT1-Rezeptor-Antagonisten

Angiotensin II reguliert seine klassischen Effekte, wie die Vasokonstriktion, die Salz- und Wasserretention sowie die Ausschüttung von Aldosteron über den AT₁-Rezeptor. Zusätzlich werden auch die proinflammatorischen und prothrombotischen Effekte von Angiotensin II über den AT₁-Rezeptor vermittelt (Remuzzi et al. 2005). AT₁-Rezeptor-Antagonisten, wie Losartan oder Candesartan, hemmen den AT₁-Rezeptor kompetitiv. Im Gegensatz zur Applikation von ACE-Hemmern unterbinden die AT₁-Rezeptor-Blocker also nicht die Bildung von Angiotensin II, sondern die Bindung des Peptids an den AT₁-Rezeptor. Der Abbau von Bradikinin und der Substanz P wird nicht beeinflusst und AT₁-Rezeptor-Antagonisten werden deswegen oft verordnet, wenn bei der Therapie unter ACE-Hemmern ein Reizhusten oder ein Quincke Ödem aufgetreten ist (Atlas 2007).

6.1.3. Renin-Inhibitoren

Die Umwandlung von Angiotensinogen zu Angiotensin I ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des RAAS. Daher ist die Wissenschaft schon seit über 50 Jahren auf der Suche nach einem oral bioverfügbaren Renin-Hemmer. Mit Aliskiren, einem nicht-peptidischen, direkten Renin-Hemmstoff, ist dies erstmals gelungen. Die blutdrucksenkende Wirkung von Aliskiren ist vergleichbar mit der von Lisinopril (Pool 2007, Strasser et al. 2007). In ersten Studien konnten außerdem renoprotektive Effekte des Arzneistoffs und die Reduktion einer Proteinurie nachgewiesen werden (Lizakowski et al. 2012).

6.1.4. Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten

Aldosteron trägt möglicherweise neben Angiotensin II zur Progression von chronischem Nierenversagen bei (Greene et al. 1996). In ersten Humanstudien

wurde der Erfolg der Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten Spironolacton und Eplerenon bei der Therapie der Proteinurie untersucht. Im Vergleich mit ACE-Hemmern konnte durch den Einsatz von Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten die Proteinurie signifikant stärker reduziert werden. Jedoch litten die Patienten unter dieser Therapie vermehrt an einer Hyperkaliämie (Epstein 2003, Remuzzi et al. 2005).

6.2. Die Aktivierung des AT2-Rezeptors – positive Effekte auf die Nierenfunktion?

Die pathologischen Effekte von Angiotensin II werden überwiegend über den AT1-Rezeptor vermittelt (Atlas 2007). Der AT2-Rezeptor wirkt den Effekten des AT1-Rezeptors entgegen. Verschiedene präklinische Studien schreiben dem AT2-Rezeptor sogar einen positiven Einfluss auf die Reduktion des kardiovaskulären Risikos zu (Siragy 2009). Gerade unter AT1-Blockade könnten diese Vorteile besonders zur Geltung kommen:

Eine Aktivierung des AT2-Rezeptors führt über die vermehrte Ausschüttung von NO, cGMP und Prostaglandinen zu einer Vasodilatation (Tsutsumi et al. 1999, Abadir et al. 2003). Unter Salzrestriktion wird beispielsweise eine cGMP-abhängige Vasodilatation beobachtet, die durch AT2-Blockade gehemmt werden kann (Siragy und Carey 1996).

Eine Therapie mit AT1-Rezeptor-Antagonisten führt zu einer verstärkten Natriurese, die durch parallele Applikation eines AT2-Rezeptor-Antagonisten gehemmt werden kann (Padia et al. 2006). Diese Versuchsergebnisse deuten darauf hin, dass der AT2-Rezeptor wesentlich an der erhöhten Natriumausscheidung durch eine Therapie mit AT1-Rezeptor-Antagonisten beteiligt ist (Siragy 2009).

Weitere Studien konnten einen positiven Einfluss des AT2-Rezeptors auf die Angiotensin II-abhängigen Entzündungsprozesse (Abdel-Rahman et al. 2008) und die sklerotischen Gefäßwanddeformationen zeigen (Daugherty et al. 2001).

Durch Heterodimerisierung mit dem AT1-Rezeptor unterdrückt der AT2-Rezeptor nach einer Stimulation dessen Effekte (AbdAlla et al. 2001). Zusätzlich führt die Aktivierung des AT2-Rezeptors zu einer Verminderung der AT1-Expression (Downregulation). Umgekehrt führt eine AT1-Rezeptor-Blockade zu einer erhöhten Expression des AT2-Rezeptors (De Paolis et al. 1999, Siragy 2009).

Diese präklinischen Untersuchungen sprechen dafür, dass die Therapie von Patienten mit AT1-Rezeptor-Antagonisten, aufgrund der bevorzugten Bindung von Angiotensin II an den AT2-Rezeptor, klinische Vorteile gegenüber dem Einsatz von ACE-Hemmern aufweisen könnte. Da die Hemmung des AT1-Rezeptors zudem die Expression von AT2-Rezeptoren steigert, könnten Patienten vermehrt von der vasodilatatorischen, natriuretischen und entzündungshemmenden Wirkung der AT2-Rezeptoren profitieren (Siragy 2009).

Trotz der guten präklinischen Datenlage wird der positive Einfluss des AT2-Rezeptors für den Erhalt der Nierenfunktion jedoch kontrovers diskutiert (Remuzzi et al. 2005, Atlas 2007). Der Grund hierfür ist, dass bisher in Humanstudien nicht nachgewiesen werden konnte, dass AT1-Rezeptor-Antagonisten signifikant bessere Therapieerfolge erzielen als ACE-Hemmer (Barnett et al. 2004).

7. Untersuchung der Morphologie und Funktion des Glomerulus

Die oben aufgeführten Kenntnisse basieren auf verschiedenen Messmethoden, die zum Teil bereits beschrieben wurden. Die gezielte Untersuchung eines einzelnen Glomerulus ist aufgrund der begrenzten Zugänglichkeit schwierig. Neben der *in vitro*-Untersuchung an isolierten Glomeruli gibt es klassische bildgebende Verfahren an fixiertem Gewebe, wie die Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie. Eine Möglichkeit zur *in vivo*-Untersuchung der Funktion eines Glomerulus ist die Technik der Mikropunktion, die jedoch aufgrund der Punktion des Nephrons mit Kapillaren invasiv ist. Keine der aufgeführten Methoden erlaubt die gleichzeitige Erfassung von Struktur und Funktion des Glomerulus *in vivo*. Seit etwa zehn Jahren wird jedoch eine neue bildgebende Technologie zur Untersuchung der Nierenfunktion eingesetzt, welche die Voraussetzung der gleichzeitigen Analyse morphologischer und funktioneller Parametern ermöglicht: Die Multiphotonen-Mikroskopie.

8. Grundlagen der Multiphotonen-Mikroskopie

1931 etablierte die deutsch-amerikanische Physikerin Maria Göppert-Mayer die theoretischen Grundlagen für die simultane Absorption zweier Photonen in einem Atom (Goepfert-Mayer 1931). Die praktische Umsetzung ihrer Theorie sollte bis

1976 auf sich warten lassen, als geeignete Laser entwickelt wurden und erste Berichte über mögliche 2-Photonen-Effekte veröffentlicht wurden (Berns 1976). Seither gewann die Multiphotonen-Mikroskopie in der biomedizinischen Forschung zunehmend an Bedeutung. Unter anderem öffnete sie die Türen für das „Deep Tissue Imaging“ - die Abbildung tiefer Gewebeschichten - und schuf somit die Voraussetzung für die mikroskopische Untersuchung von Gewebe im lebendigen Tier.

Um die Vorteile der Multiphotonen-Mikroskopie gegenüber der konventionellen Einphotonen-Mikroskopie verständlich machen zu können, erfolgt zunächst eine kurze Einführung in die physikalischen Grundlagen der beiden Phänomene.

8.1. Konventionelle Einphotonen-Fluoreszenz-Mikroskopie und konfokale Mikroskopie

Die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie sowie die konfokale Mikroskopie basieren auf der Grundlage der 1-Photonen-Absorption. Durch Anregung eines Fluorophors mit Licht geeigneter Wellenlänge wird ein Elektron des Moleküls aus seinem Grundzustand S_0 auf ein höheres Energielevel angehoben (Abbildung 5). Voraussetzung für die Anregung ist, dass die Energie der Lichtquelle in etwa der Energiedifferenz zwischen dem Grund- und dem angeregten Zustand des Moleküls entspricht. Das Elektron wird zunächst in den Singulett-Zustand S_2 angehoben, von wo aus es durch strahlungsfreie, sogenannte „Internal Conversion“ unter Energieverlust in den S_1 -Zustand übergeht. Unter Fluoreszenz kann es nun wieder in den Grundzustand zurückfallen. Das bedeutet, dass die verbliebene Energie der Anregung in Form eines Photons mit größerer Wellenlänge (also mit geringerer Energie im Vergleich zum anregenden Photon) wieder abgegeben werden kann. Die Verschiebung der Wellenlänge zwischen dem anregenden und dem emittierten Photon in den längerwelligen Bereich wird Stokes-Verschiebung genannt (Diaspro et al. 2006, Oheim et al. 2006,).

Die Stokes-Verschiebung ist eine essentielle Voraussetzung für die Fluoreszenzmikroskopie. Fluorophore in einer Probe werden zunächst mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, um dann gezielt die Emission aufgrund der Stokes-Verschiebung im längerwelligen Bereich detektieren zu können. Die Anregung erfolgt dabei jedoch nicht nur im Brennpunkt, sondern ebenfalls in

höher oder tiefer gelegenen Arealen der Probe, was dazu führt, dass das abgebildete Objekt insbesondere an den Rändern unscharf erscheint.

Um den Kontrast der Abbildung wesentlich zu verbessern, wurde die konfokale Mikroskopie entwickelt. Durch das Einführen einer Lochblende vor dem Detektor, wird der Beobachtungsstrahlengang, der den Detektor erreicht in einer solchen Form selektiert, dass sich dieser konfokal zum Beleuchtungsstrahlengang verhält. Das bedeutet, dass beide optischen Systeme denselben Brennpunkt haben. Emittiertes Licht, das aus der Anregung außerhalb des Brennpunktes resultiert, wird durch die Lochblende von der Detektion ausgeschlossen (Oheim et al. 2006).

Das konfokale Prinzip findet überwiegend Einsatz in der Laserrastermikroskopie. Dabei wird die Probe von einem fokussierten Laser abgerastert, der sich, gesteuert über einen Scan-Spiegel, über die Probenoberfläche bewegt. Um Konfokalität für die Detektion der Emission zu erreichen, muss der Beobachtungsstrahlengang über denselben Scan-Spiegel wieder zurück gescannt und detektiert werden, bevor sich die Position des Scan-Spiegels für die Bewegung des Lasers über den Rest der Probe verändern darf. Da das emittierte Licht für die Detektion somit über denselben Weg zurückgescannt werden muss, den das anregende Licht in Form des Laserstrahls zuvor passierte, spricht man von sogenannten „Descanned-Detektoren“ oder „Internen Detektoren“ (Oheim et al. 2006).

8.2. Simultane Absorption von zwei oder mehr Photonen in der Multiphotonen-Mikroskopie

Das Prinzip der Multiphotonen-Mikroskopie basiert auf der Anregung des Fluorophors durch nicht nur ein Photon, sondern durch zwei oder mehrere langwelligere Photonen, die gemeinsam die benötigte Energie für die Anregung aufbringen (Oheim et al. 2006), (Abbildung 5). Dabei wird bei der 2-Photonen-Absorption klassischerweise eine Lichtquelle mit doppelter Wellenlänge verwendet, als bei der 1-Photonen-Absorption benötigt würde. Wenn der Fluoreszenzfarbstoff bei der 1-Photonen-Absorption ein Absorptionsmaximum von beispielsweise 360 nm aufweist, würde die Anregung durch die 2-Photonen-Absorption also einer Wellenlänge von je 720 nm entsprechen. Voraussetzung ist, dass diese beiden Photonen simultan eintreffen, um gemeinsam die benötigte Energie zur Anregung bereitzustellen (Abbildung 5). Die darauffolgende

Erholung des angeregten Elektrons zurück in den Grundzustand unterscheidet sich nicht von der bei der konventionellen 1-Photonen-Absorption (Oheim et al. 2006).

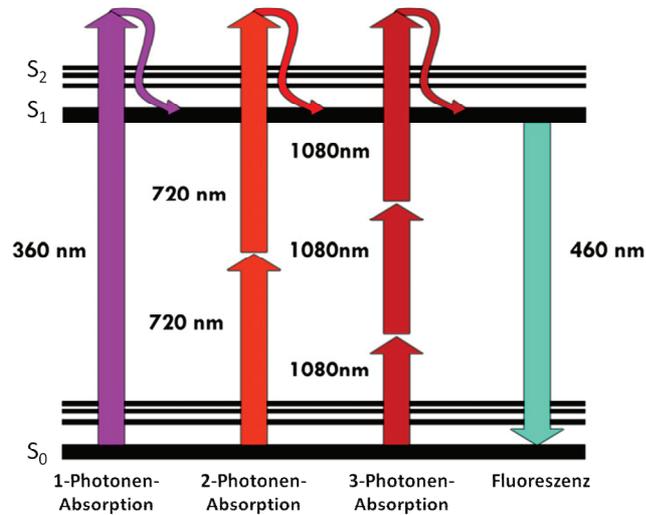


Abbildung 5: Vereinfachtes Perrin-Jablonski Fluoreszenz-Diagramm für die 1-, 2- und 3-Photonen-Absorption. Der wesentliche Unterschied der Multiphotonen-Mikroskopie liegt im Vorgang der Absorption. In der darauffolgenden Emission finden sich keine Unterschiede. Modifiziert nach (Diaspro et al. 2006).

Goeppert-Mayer berechnete in ihrer Dissertation die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer 2-Photonen-Absorption (Goeppert-Mayer 1931). Voraussetzung für die simultane Absorption zweier Photonen ist ein sehr hoher Photonenfluss von typischerweise 10^{20} - 10^{30} Photonen/($\text{cm}^2 \cdot \text{s}$), der unter linearer und kontinuierlicher Laseranregung nicht gegeben ist. Daher erfolgte die experimentelle Bestätigung ihrer Berechnung erst nach der Etablierung nichtlinearer Laser, die durch diskontinuierliche, pulsierende Laserstrahlung einen entsprechend hohen Photonenfluss bereitstellen konnten. Heutzutage verwendet man überwiegend Titan-Saphir-Laser mit einer Pulsrate von 100 MHz. Da für die Multiphotonen-Mikroskopie mindestens eine 2-Photonen-Absorption benötigt wird, unterliegt die Anregung einer quadratischen Abhängigkeit von der Anzahl der Photonen pro Zeit und Fläche. Diese quadratische Abhängigkeit von der Laserintensität ist die Ursache für den quadratischen Abfall der gemessenen Fluoreszenzintensität mit zunehmender Distanz vom Brennpunkt. Die Wahrscheinlichkeit der 2-Photonen-Absorption und somit der Anregung eines Fluorophors durch den Multiphotonen-Laser beschränkt sich dadurch auf ein Volumen von weniger als einem Femtoliter im Brennpunkt (Oheim et al. 2006). Die Multiphotonen-Mikroskopie ist somit intrinsisch bereits fokal und benötigt bei der Detektion der Fluoreszenz keine Lochblende, um Emission aus anderen

Ebenen der Probe für ein scharfes, kontrastreiches Bild abzutrennen. Zudem besteht beim Einsatz der Laserrastermikroskopie unter Multiphotonen-Anregung keine Notwendigkeit, den Beobachtungsstrahlengang über die Scan-Spiegel zurück zu scannen, um eine konfokale Abbildung zu erhalten. Die Detektoren können daher näher an der Probe positioniert werden und sind durch den Verzicht der Rückscannung des Beobachtungsstrahlengangs sowie durch den Verzicht der Lochblende sensitiver. Solche Detektoren werden daher „Non-Descanned-Detektoren“ oder „Externe Detektoren“ genannt (Diaspro et al. 2006, Oheim et al. 2006).

8.3. Second Harmonic Generation

Die Second Harmonic Generation (SHG) ist eine besondere Technik in der Multiphotonen-Mikroskopie, bei der zwei Photonen nicht zur Anregung eines Fluorophors führen, sondern zur Reflektion eines neuen Photons mit exakt der doppelten Energie ($1/2$ der ursprünglichen Wellenlänge). Dieses Phänomen tritt auf, wenn diese Photonen auf eine nicht-zentrosymmetrische Struktur, wie beispielsweise Kollagen, treffen (Oheim et al. 2006, Brown et al. 2013).

8.4. Vorteile der Multiphotonen-Mikroskopie gegenüber konventioneller Einphotonen-Mikroskopie

Aus den wesentlichen physikalischen Unterschieden im Prozess der Absorption bei der Multiphotonen-Mikroskopie ergeben sich zahlreiche Vorteile:

- Die Anregung verschiedener Fluorophore kann durch eine einzige Lichtquelle erfolgen, da das Absorptionsspektrum der 2-Photonen-Absorption wesentlich breiter ist als das der 1-Photonen-Absorption.
- Da die Multiphotonen-Mikroskopie intrinsisch fokal ist und die gesamte entstehende Fluoreszenz aus dem Brennpunkt stammt, können sensiblere Detektoren eingesetzt werden (s. oben).
- Die verwendete Wellenlänge dieser Lichtquelle ist im Vergleich zur 1-Photonen-Absorption doppelt so groß. Daraus ergibt sich:
 1. eine geringere Phototoxizität des anregenden Lichts auf das untersuchte Gewebe, da Licht längerer Wellenlänge energieärmer ist.

2. aufgrund der energieärmeren Strahlung ebenfalls eine geringere Photobleichung der verwendeten Farbstoffe.
3. durch die geringere Frequenz des anregenden Lichts, die sich in einer geringeren Streuung im Gewebe äußert, eine tiefere Penetration des Gewebes durch den Laser.

(Oheim et al. 2006)

Diese Vorteile ermöglichen die Abbildung tieferer Gewebeschichten und schaffen somit die Voraussetzung für die Untersuchung von lebendem Gewebe. In den vergangenen Jahren gewann die Technologie sowohl zunehmend an Bedeutung für die Abbildung lebender Strukturen, als auch für die Messung funktioneller Parameter in lebendem Gewebe.

Seit etwa zehn Jahren wird die Multiphotonen-Mikroskopie mit zunehmender Intensität für die Untersuchung der Morphologie und der Funktion der Niere genutzt (Dunn et al. 2007, Tanner 2009, Peti-Peterdi et al. 2012). Trotz des Potentials der Multiphotonen-Mikroskopie zur Untersuchung der Nierenfunktion, wird die Methode bisher nur in wenigen Laboren praktiziert. Grund hierfür sind unter anderem die hohen Anschaffungskosten eines funktionsfähigen Multiphotonen-Mikroskops und die methodische Komplexität dieser Technologie für die Untersuchung der Nierenfunktion.

II. FRAGESTELLUNG

Eine Albuminurie gehört zu den Kardinalsymptomen vieler Erkrankungen der Niere. Dabei ist eine vermehrte Ausscheidung von Plasmaproteinen wie Albumin meist auf einen Verlust der Selektivität der glomerulären Filtrationsbarriere zurückzuführen. Eine Albuminurie besitzt allerdings nicht nur eine diagnostische Bedeutung. Vielmehr mehren sich die Befunde, dass sie *per se* einen Risikofaktor für die Progression der jeweiligen Nierenerkrankung und das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse darstellt. Somit hat eine pharmakologische Reduktion der Albuminurie unabhängig von der jeweiligen Pathogenese einen renoprotektiven Effekt.

Eine Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems wirkt in vielen Fällen antiproteinurisch und ist in diesem Sinne protektiv für die Nierenfunktion. Die zugrundeliegenden Mechanismen beruhen wahrscheinlich sowohl auf hämodynamischen als auch auf nicht-hämodynamischen Effekten. Ob das RAAS auch direkte Effekte auf die glomeruläre Filtrationsbarriere ausübt ist nicht abschließend geklärt, u.a. weil die Glomeruli als Ort der Filtration *in vivo* experimentell schwer zugänglich sind.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher chronische und akute Effekte von Angiotensin II auf die Filtrationsbarriere mittels Multiphotonen-Mikroskopie *in vivo* charakterisiert, und die Mechanismen der proteinurischen Effekte von Angiotensin II aufgeklärt werden.

Weiter sollte *in vivo* untersucht werden, über welche Mechanismen im Falle einer vermehrten Filtration von Plasmaproteinen eine Akkumulation von Proteinen innerhalb der Filtrationsbarriere - wie etwa im Subpodozytenraum - verhindert wird.

III. MATERIAL UND METHODEN

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

1. Untersuchungen der Nierenfunktion mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie

Multiphotonen-Mikroskopie ist eine neue Technik, welche die *in vivo* Untersuchung der Niere am lebenden Tier erlaubt. Neben der Erfassung von morphologischen Aspekten, kann die Technik insbesondere genutzt werden, um wesentliche Parameter der Nierenfunktion zu messen, wie beispielsweise die glomeruläre Filtrationsrate des Einzelneurons oder den glomerulären Siebkoeffizienten von Albumin (Kang et al. 2006).

1.1. Versuchstiere

Für die Evaluierung der Nierenfunktion mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie wurden junge, 110 bis 160 g schwere Munich Wistar Frömter (MWF) Ratten beider Geschlechter verwendet, die sich aufgrund zahlreicher oberflächlicher Glomeruli für die Methode besonders gut eignen (Hackbarth et al. 1983). Für eine gezielte Untersuchung der Nierenfunktion in einem pathologischen Modell wurden zusätzlich einjährige, männliche MWF Ratten untersucht, die, wie später näher erläutert, unter Hypertonie, Proteinurie und Glomerulosklerose leiden (Hackbarth et al. 1991). Die Tierhaltung (Temperatur: $23 \pm 2^\circ\text{C}$, Luftfeuchtigkeit: $55 \pm 5\%$, Hell-Dunkel-Intervall: 12 h, Futter und Wasser ad libitum) und die Versuchsdurchführung erfolgten gemäß der Empfehlungen der FELASA.

1.2. Versuchsvorbereitung

Voraussetzung für die Durchführung des Experiments ist sowohl ein chirurgischer Eingriff beim Versuchstier, als auch ein geeignetes Equipment des Multiphotonen-Mikroskops, welches die Stabilität physiologischer Parameter während des Versuches gewährleistet.

1.2.1. Chirurgischer Eingriff für die mikroskopische Untersuchung

Um während der mikroskopischen Untersuchung des Versuchstieres ein Monitoring des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz zu

ermöglichen sowie über venöse Katheter Fluoreszenzfarbstoffe oder Arzneistoffe injizieren zu können, erfolgte zunächst folgender operativer Eingriff.

Die Versuchsratte wurde mit 113 mg/kg Körpergewicht Thiobutabarbitol i.p. narkotisiert und dann in Rückenlage auf einem Operationstisch fixiert. Während der Operation wurde die Körpertemperatur des Versuchstieres überwacht und adäquat durch eine in den Operationstisch integrierte Rektalsonde auf 37 °C gehalten. Um während der anschließenden *in vivo*-Experimente am Multiphotonen-Mikroskop den Blutdruck und die Herzfrequenz überwachen zu können, wurde die rechte Arteria (A.) carotis mit einem handgezogenen, heparinisierten Polyethylen-Tubing kanüliert. Dieser Katheter wurde mit einem Druckmessfühler verbunden, das resultierende Signal über einen Brückenverstärker amplifiziert und mittels eines Powerlabs (AD Instruments) aufgezeichnet. Für die intra venöse (i.v.) Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen sowie für die Dauerinfusion von Angiotensin II oder einer Kochsalzlösung wurde die rechte Vena (V.) jugularis mit zwei bis drei handgezogenen Polyethylen-Tubings katheterisiert. Die Wunde wurde anschließend mit in steriler Kochsalzlösung getränkter Gaze abgedeckt. Zur Freilegung der Niere wurde das Versuchstier nun auf die Seite gedreht und die Lage der linken Niere ertastet. Durch einen kleinen Schnitt wurde zunächst die Haut, dann das Peritoneum über der anatomischen Position der rechten Niere geöffnet. Diese konnte durch sanften Druck unterhalb des Organs durch die Öffnung des Abdomens entblößt werden. Die Niere wurde für den Transport zum Multiphotonen-Mikroskop mit feuchter Gaze überdeckt.

1.2.2. Equipment des Multiphotonen-Mikroskops zur Untersuchung der Nierenfunktion am anästhesierten Tier.

Für die mikroskopische Untersuchung der Nierenfunktion wurde der Mikroskopisch des LSM 710 mit einem Einsatz ausgestattet, der über ein beheizbares Wasserbad verfügt. Hierdurch konnte die Körpertemperatur des Versuchstiers während des Experiments konstant gehalten werden (Abbildung 6). In der Mitte des Einsatzes befand sich ein Deckglas, auf dem die Niere in eine physiologische Kochsalzlösung gebettet wurde.

Die Anregung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte unter Verwendung eines Chameleon Ultra-II Multiphotonen-Lasers (Coherent), bei einer

Wellenlänge von 860 nm. Die Vergrößerung wurde mittels eines 40 x Wasserobjektivs erzeugt, das sich durch einen hohen Arbeitsabstand und eine adäquate numerische Apertur auszeichnet. Zur Detektion der Fluoreszenzemission wurden externe Detektoren verwendet, die mit folgenden Beamsplittern ausgestattet waren: Grüner Kanal: 500-550 nm, roter Kanal: 565-610 nm. Zusätzlich wurden bei Bedarf interne Detektoren verwendet.

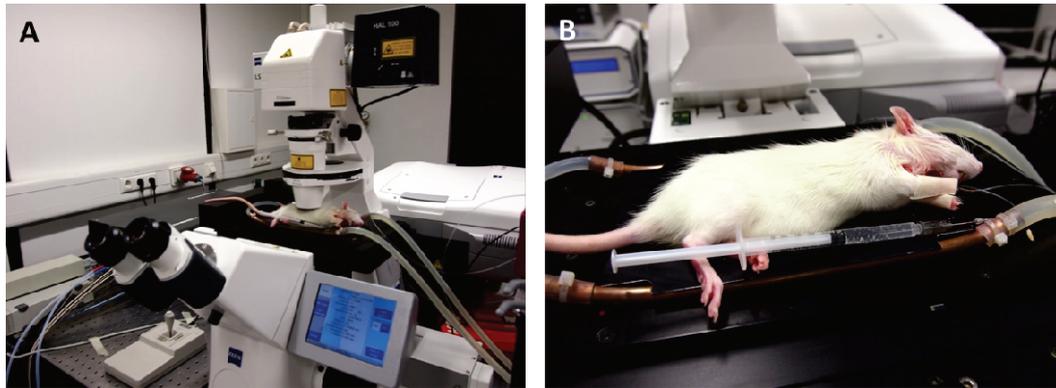


Abbildung 6: Platzierung des Versuchstiers auf dem Multiphotonen-Mikroskop zur Untersuchung der Nierenfunktion. A: Großaufnahme. B: In der Nahaufnahme sieht man das Versuchstier liegend auf dem beheizbaren Einsatz für den Mikroskoptisch.

1.3. Darstellung verschiedener Nierenstrukturen mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie

Dieser Abschnitt soll einen kurzen Überblick geben, welche Techniken im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, um diverse Strukturen der Niere zu visualisieren. Dies soll anhand von Abbildung 7 erfolgen.

1.4. Bestimmung dynamischer Parameter der Nierenfunktion mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie

Nach der Platzierung des Versuchstiers auf dem Multiphotonen-Mikroskop und der Adaption des Polyethylen-Tubings an den Druckmessfühler, erfolgte die Durchführung verschiedener Messungen zur Bestimmung der Nierenfunktion. Diese werden im Folgenden beschrieben.

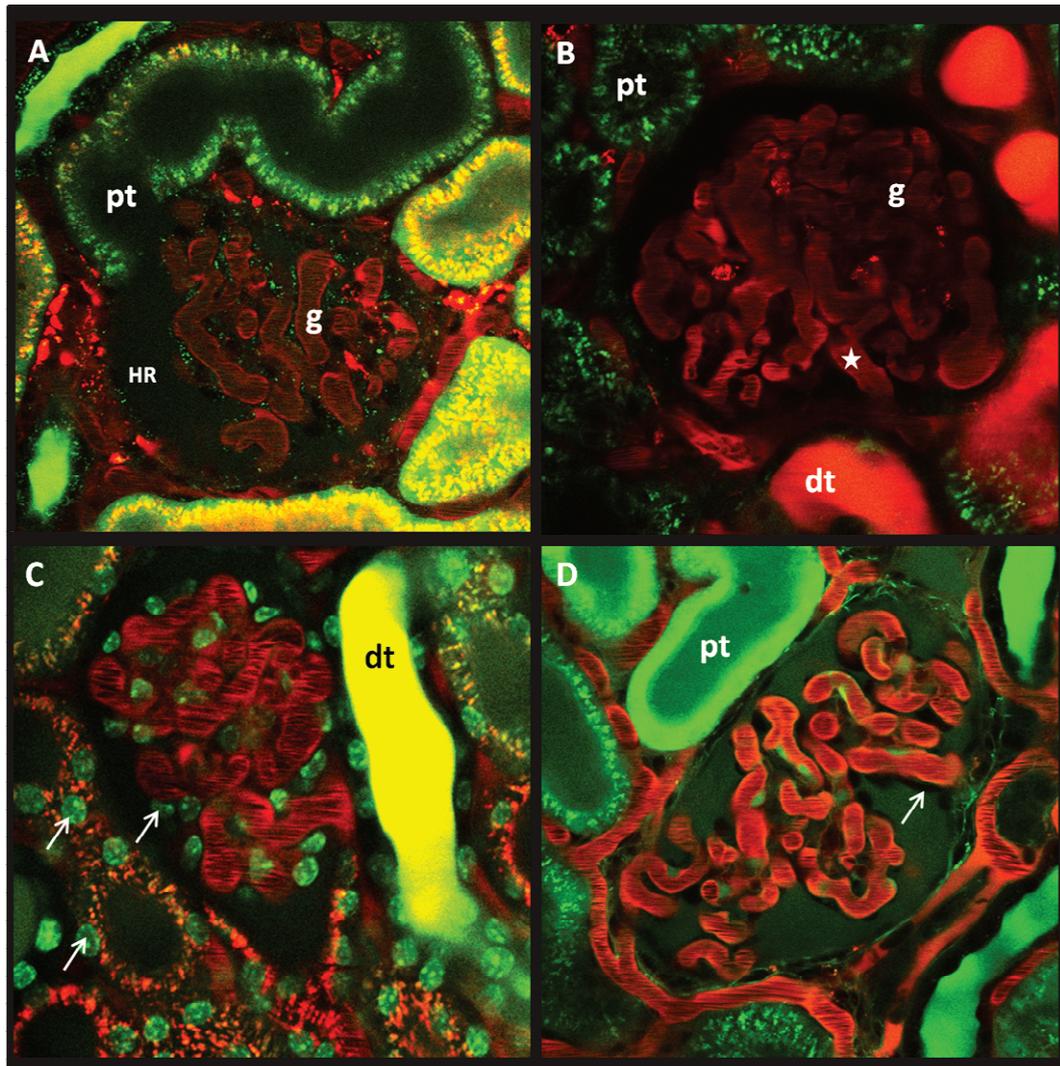


Abbildung 7: Visualisierung von Nierenstrukturen mit Hilfe von Multiphotonen-Mikroskopie. A: Das Bild zeigt die glomerulären Kapillaren (g) und den Harnraum (HR) eines Glomerulus sowie den Beginn des proximalen Tubulus (pt) desselben Nephrons. Die Blutgefäße sind mit Hilfe von Alexa Fluor 594 konjugiert an Albumin (Alexa 594-BSA) angefärbt, das nur minimal in den Harnraum filtriert wird. Die proximalen Tubuli weisen eine Autofluoreszenz auf und sind grün gefärbt. B: zeigt die efferente Arteriole (Stern) und den distalen Tubulusabschnitt (dt) eines Nephrons. Das Lumen des distalen Tubulus ist durch konzentriertes, glomerulär filtriertes Alexa 594-BSA intensiv rot gefärbt. C: Darstellung eines murinen Glomerulus und eines distalen Tubulus (dt). Die Zellkerne (Pfeile) sind durch Höchst 33342 grün gefärbt. D: Die Negativ-Darstellung der Podozyten (Pfeil) in einem Glomerulus der Ratte, erfolgte durch Dauerinfusion des grünen Farbstoffes Lucifer Yellow in den Harnraum. Mesangialzellen nehmen den niedermolekularen Farbstoff auf und weisen eine intensive grüne Färbung auf.

1.4.1. Ermittlung des glomerulären Siebkoeffizienten von Albumin

Der glomeruläre Siebkoeffizient gilt als ein Maß für die Selektivität der glomerulären Filtrationsbarriere. Er ist definiert als die Konzentration einer gegebenen Substanz im Harnraum, dividiert durch die Konzentration dieser Substanz in den glomerulären Kapillaren (Deen 2004).

Der glomeruläre Siebkoeffizient von Albumin (GSC_A) wurde mittels Multiphotonen-Mikroskopie als die Ratio der Fluoreszenzintensitäten eines an

Albumin konjugierten Farbstoffes, Alexa Fluor 594-BSA (Alexa 594-BSA; Invitrogen), im Harnraum sowie in den glomerulären Kapillaren ermittelt.

1.4.1.1. Messeinstellungen für die Bestimmung des GSC_A

Die Messgröße zur Ermittlung des GSC_A ist die Fluoreszenzintensität von Alexa 594-BSA, die im roten Kanal detektiert wurde. Für die Messaufnahmen wurden eine Scangeschwindigkeit von 10 und zur Anregung des Farbstoffes eine Laserpower von 22% (von 3200 mW) gewählt, um eine ausreichende Farbintensität zu gewährleisten. Für die Generierung von Z-Stapeln wurde die Laserpower auf 18% reduziert, um eine mögliche laserinduzierte Gewebeschädigung zu minimieren. Die Detektorverstärkung wurde mit 500 V im mittleren Bereich festgelegt.

Ein Parameter, der das Signal-Rausch-Verhältnis beeinflusst, ist der Detektorschwellenwert. Je größer der Schwellenwert, desto höher das Hintergrundrauschen. Dies führt dazu, dass die gemessene Fluoreszenzintensität höher ist als die reale Intensität. Wird jedoch der Schwellenwert zu niedrig gewählt, kann ein echtes Signal vom Detektor nicht erkannt werden und die gemessene Fluoreszenzintensität ist niedriger als die reale Intensität.

Die optimale Einstellung des Detektorschwellenwertes wurde *in vivo* experimentell ermittelt. Wie unter Kapitel 1.2.1 aufgeführt, wurde eine Ratte anästhesiert und präpariert, wobei jedoch auf die Injektion des Alexa 594-BSA verzichtet wurde. Im Anschluss wurde das Versuchstier auf dem beheizbaren Tischeinsatz des LSM 710 platziert und das Detektorrauschen als Hintergrundintensität für folgende Schwellenwerte in je drei Glomeruli ermittelt: -2500, -2750, -3000, -3200, -3300, -3400, -3500, -3600, -3750, -4000 und -4250.

Im Anschluss wurde die mittlere Hintergrundintensität im Harnraum der drei Glomeruli gegen die Schwellenwerte aufgetragen. Die resultierende Kurve wies zwei Abschnitte auf. Für die niedrigeren Schwellenwerte zeigte die Kurve eine Plateauphase und die gemessenen Hintergrundintensitäten lagen bei null. Für die höheren Schwellenwerte zeigten die gemessenen Hintergrundintensitäten einen linearen Anstieg (Abbildung 8A). Eine optimale Einstellung, welche hinreichende Detektorsensitivität gewährleistet, ohne das Detektorrauschen signifikant zu erhöhen, liegt zu Beginn des linearen Bereichs.

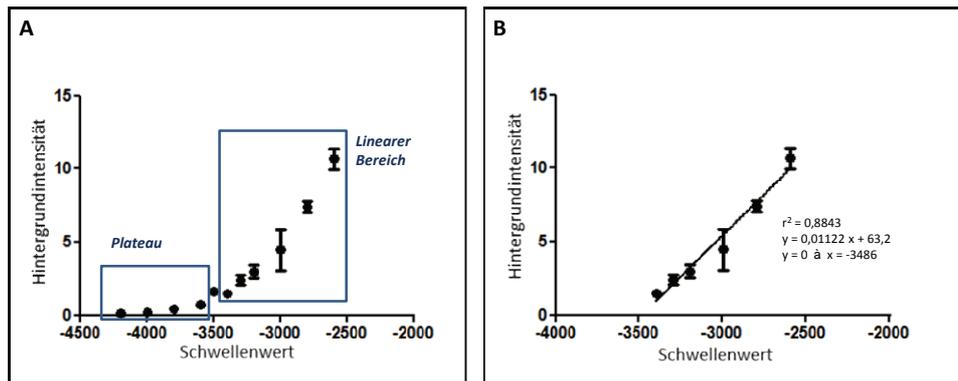


Abbildung 8: Experimentelle Ermittlung des Detektorschwellenwertes für die Bestimmung des GSC_A. A: Für abfallende Detektorschwellenwerte wurde die mittlere Hintergrundintensität gemessen. Beim Auftragen der Hintergrundintensität gegen den Schwellenwert zeigte sich ein linear ansteigender Bereich sowie eine Plateauphase. B: Für ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis wurde der x-Achsenabschnitt der Regressionsgerade mit maximalem Bestimmtheitsmaß als Detektorschwellenwert gewählt.

Um die Einstellung mit dem besten Signal-Rausch-Verhältnis zu ermitteln, wurden zunächst verschiedene Regressionsgeraden von dem Datensatz, bestehend aus den gemessenen Hintergrundintensitäten bei verschiedenen Detektorschwellenwerten, erstellt. Für jede Regressionsgerade wurde das Bestimmtheitsmaß kalkuliert. Dabei wurden beginnend mit der Hintergrundintensität für den Schwellenwert „-4250“ zunehmend mehr Datenpunkte aus dem Bereich des Plateaus für die Berechnung der Regressionsgerade vernachlässigt. Im Anschluss wurde der x-Achsenabschnitt derjenigen Regressionsgeraden ermittelt, die das höchste Bestimmtheitsmaß zeigte (Abbildung 8B). Das Ergebnis dieser Vorgehensweise erbrachte einen x-Achsenabschnitt von -3486. Dieser Wert wurde auf -3500 aufgerundet und als Detektorschwellenwert eingestellt.

1.4.1.2. Aufreinigung und Dosierung des Alexa 594-BSA

Alexa 594-BSA wurde zunächst in einer sterilen PBS-Lösung (Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung) zu einer Konzentration von 5 mg/ml gelöst. Um freie, unkonjugierte Farbstoffmoleküle abzutrennen wurde die Lösung drei Tage in 4 L Kochsalzlösung in einem abgedunkelten, gekühlten Raum dialysiert. Hierfür wurde der Farbstoff in Spectra/Por Float-A-Lyzer Dialysesäulen überführt. Die dialysierte Lösung wurde durch eine einminütige Zentrifugation (40000 g) in 30 kDa Membranreagenzbehältnissen aufkonzentriert, aliquotiert und bei -20°C bis unmittelbar vor Gebrauch gelagert. Von der aufgereinigten Alexa

594-BSA-Lösung wurden 1,3 µl/g Körpergewicht (KGW) für die Bestimmung des GSC_A injiziert.

1.4.1.3. Experimentelle Bestimmung des GSC_A

In der Niere des Versuchstiers wurden zunächst 5-7 oberflächliche Glomeruli mit deutlich ausgeprägtem Harnraum unter der HXP-Fluoreszenzlampe ausgesucht. Die Messungen erfolgten in einer Tiefe von 30 µm unterhalb der Nierenkapsel (identifiziert mittels Second Harmonic Generation), um die Fluoreszenzintensitäten der Messungen untereinander konstant zu halten.

Nach der Injektion von Alexa 594-BSA wurden pro Messung sechs 16-Bit Aufnahmen zu 512x512 Pixel im Abstand von je zehn Sekunden erzeugt, um eine laserinduzierte Schädigung im Gewebe zu minimieren.

Im Harnraum wurde die Fluoreszenzintensität in zwei Messregionen zu je 200 Pixel bestimmt und gemittelt. Um eine falsch hohe Messung der Fluoreszenzintensität zu vermeiden (out-of-focus Fluoreszenz), wurde darauf geachtet, dass die Messregionen, keine glomerulären Kapillaren in unmittelbarer Nähe aufwiesen. Um dies sicherzustellen, erfolgte vor jeder Messung eine dreidimensionale Betrachtung (Z-Stapel) des untersuchten Glomerulus, um die Existenz von Kapillaren in naher Umgebung oberhalb und unterhalb der Messregionen ausschließen zu können. Die Fluoreszenz in den glomerulären Kapillaren wurde in drei Messregionen zu je 200 Pixel bestimmt. Diese wurden an den äußeren Rändern der Kapillaren positioniert, wo die Farbstoffintensität am hellsten war (Abbildung 9A).

Für die Hintergrundkorrektur der Messaufnahmen wurden je vier Glomeruli vor der Farbstoffinjektion unter identischen Einstellungen untersucht. Um die Hintergrundintensität zu ermitteln wurden pro Hintergrundmessung vier Messregionen im Harnraum und zwei Messregionen in den glomerulären Kapillaren zu je 200 Pixeln positioniert (Abbildung 9B).

Der GSC_A wurde nach der Datenerhebung unter Verwendung folgender Formel errechnet:

$$\text{GSC Albumin} = \frac{(\text{Intensität Harnraum} - \text{Hintergrundintensität Harnraum})}{(\text{Intensität glom. Kapillaren} - \text{Hintergrundintensität glom. Kapillaren})}$$

glom. = glomerulär

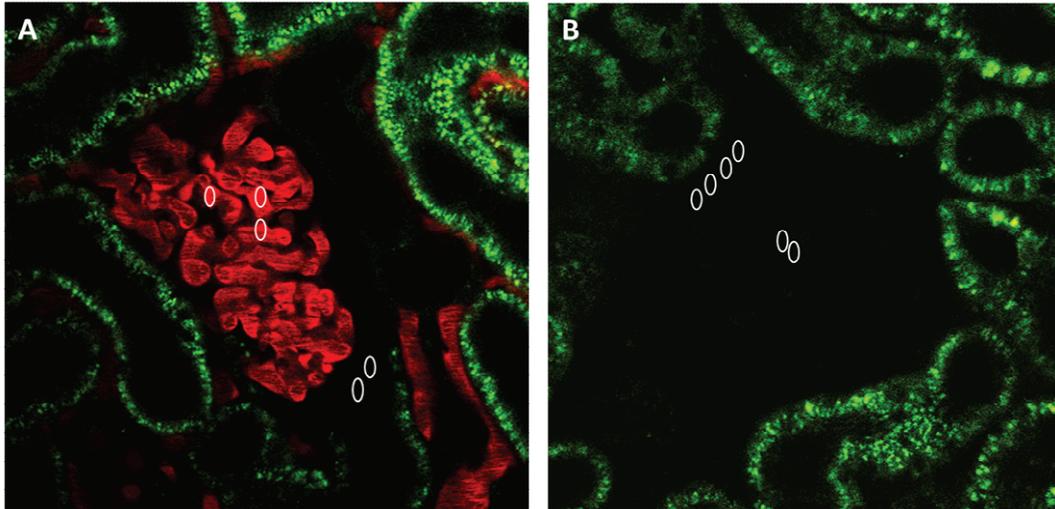


Abbildung 9: Bestimmung des glomerulären Siebkoeffizienten von Albumin. A: Die mittlere Fluoreszenzintensität des Alexa 594-BSA in den glomerulären Kapillaren sowie im Harnraum wurde ermittelt. B: Zur Hintergrundkorrektur wurde die Fluoreszenzintensität in Harnraum und Kapillaren vor der Farbstoffinjektion gemessen.

1.4.1.4. Ermittlung der Nachweisgrenze für die Fluoreszenzintensitäten im Harnraum

Die untere Nachweisgrenze (LLD) ist der niedrigste Wert, den eine Messgröße annehmen kann, ohne dass sie statistisch von der Hintergrundmessung nicht mehr unterschieden werden kann (Anderson 1989). Aufgrund der Tatsache, dass zur Ermittlung der Fluoreszenzintensität im Harnraum Hintergrundwerte abgezogen werden müssen, die zuvor experimentell ermittelt wurden, erhöht sich die Variabilität der Messgröße. Die Variabilität bezieht sich also nicht nur auf die Probe, sondern ebenfalls auf den Hintergrundwert. Gemäß dem „Modell der gepaarten Observationen“ kann eine Missklassifizierung zu 95% ausgeschlossen werden, wenn die Probe sich zum Hintergrund mindestens um einen Faktor unterscheidet, welcher sich wie folgt zusammensetzt: 4,46 multipliziert mit der mittleren Standardabweichung der Hintergrundmessungen (Anderson 1989).

Die untere Nachweisgrenze für die Fluoreszenzintensität im Harnraum wurde für jedes Experiment wie folgt statistisch ermittelt:

Für jede der vier Hintergrundmessungen wurden die mittlere Hintergrundintensität sowie die Standardabweichung kalkuliert. Daraus erfolgte die Berechnung der mittleren Standardabweichung aller vier Hintergrundmessungen, welche dann mit dem statistischen Faktor 4,46 multipliziert wurde. Das Ergebnis dieser Multiplikation ergab den LLD für die

Fluoreszenzintensität im Harnraum. Eine statistische Auswertung der Daten für die GSC_A erfolgte nur unter folgender Bedingung:

Fluoreszenzintensität im Harnraum der Messung

> LLD Fluoreszenzintensität im Harnraum

1.4.2. Bestimmung der proximal-tubulären Rückresorption von Alexa 594-BSA

Der Grad der proximal-tubulären Rückresorption des Alexa 594-BSA wurde als die Zunahme der tubulären Fluoreszenzintensität unter Angiotensin II-Infusion in Prozent ermittelt. Je sieben Aufnahmen wurden unter Basalbedingungen (unmittelbar nach Alexa 594-BSA Injektion) und 45 Minuten nach Beginn der Infusion von Angiotensin II oder physiologischer Kochsalzlösung quantifiziert. Hierfür wurde die Fluoreszenzintensität im roten Kanal in vier Messarealen zu je 400 Pixel pro Bild erfasst und gemittelt. Der proximale Tubulus zeichnet sich durch eine starke Autofluoreszenz aus, die im roten Detektor teilweise miterfasst wird. Aus diesem Grund wurden vor der Farbstoffinjektion Hintergrundaufnahmen generiert, die Autofluoreszenz analog der Messaufnahmen quantifiziert und von den gemittelten tubulären Fluoreszenzintensitäten für Alexa 594-BSA subtrahiert.

1.4.3. Ermittlung der glomerulären Filtrationsrate des Einzelnephrons (Einzelnephron-GFR)

Die Einzelnephron-GFR ist das Gesamtvolumen des Primärharns, das von einem einzigen Glomerulus innerhalb einer definierten Zeiteinheit filtriert wird. Sie wird in nl/min angegeben.

1.4.3.1. Experimentelle Bestimmung der Einzelnephron-GFR

Pro Versuchstier wurden vier oberflächliche Glomeruli ausgesucht, bei denen ein mindestens 60 µm langer Abschnitt des proximalen Tubulus sichtbar war. Die Blutgefäße wurden durch Injektion von Alexa 594-BSA [1,3 µl/g KGW] rot eingefärbt und ein Z-Stapel des Nierenkörperchens generiert, welcher den proximalen Tubulus vollständig erfasste. Anhand dieses Z-Stapels konnte das proximal-tubuläre Volumen des ersten 60 µm langen Abschnittes nach folgender Formel ermittelt werden:

$$\text{Volumen [nl]} = \text{Länge} * \text{Radius}^2 * \pi$$

Pro Messung wurde eine Zeitserie aufgezeichnet, welche die Bolusinjektion von 5 μl einer 2,5 mg/ml Lösung Lucifer Yellow (LY) darstellt. LY ist ein niedermolekularer Fluoreszenzfarbstoff, der nach i.v. Injektion frei in den Harnraum filtriert wird und im Anschluss den proximalen Tubulus passiert. Zur Ermittlung der Geschwindigkeit dieser Passage wurden zwei Messregionen in der Zeitserie positioniert: ROI 1, die direkt am Beginn des proximalen Tubulus platziert war und ROI 2, 60 μm stromabwärts (Abbildung 10A). In diesen beiden Messregionen wurden nun die Fluoreszenzintensitäten des LY im grünen Kanal gemessen, gegen die Zeit aufgetragen und der Zeitunterschied Δt zwischen den Fluoreszenzintensitätsmaxima in ROI 1 und ROI 2 ermittelt (Abbildung 10B).

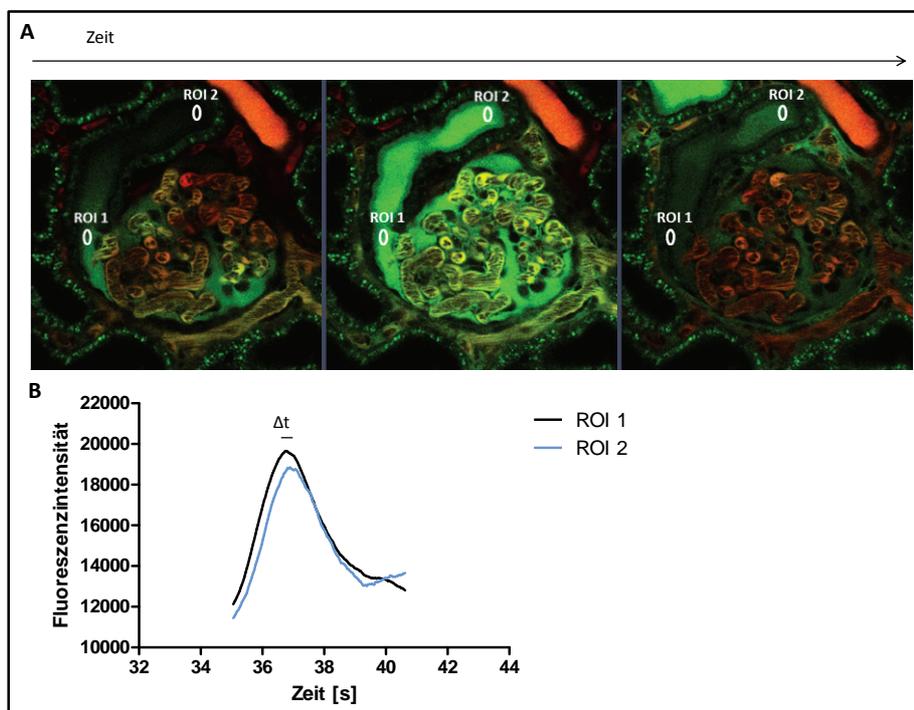


Abbildung 10: Bestimmung der Einzelnephron-GFR. A: Nach einer Bolusinjektion einer Lucifer Yellow Lösung, wird der Fluoreszenzfarbstoff frei filtriert und durchläuft den ersten Abschnitt des proximalen Tubulus (PT). Zu Beginn des PT und 60 μm flussabwärts wurden je eine Messregion (ROI 1 und ROI 2) positioniert, in welcher die Fluoreszenzintensitäten des Farbstoffs erfasst wurden. B: Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der beiden Messregionen wurden gegen die Zeit aufgetragen. Der Zeitunterschied Δt zwischen den Fluoreszenzmaxima in ROI 1 und ROI 2 wurde für die nachfolgende Kalkulation der Einzelnephron-GFR ermittelt.

Die Einzelnephron-GFR konnte im Anschluss basierend auf folgender Formel errechnet werden:

$$\text{snGFR} = \frac{\text{Volumen [nl]}}{\Delta t [\text{s}]}$$

snGFR = Einzelnephron-GFR, Δt = Zeitunterscheid

1.4.3.2. Messeinstellungen für die Bestimmung der Einzelnephron-GFR

Für die Generierung der Z-Stapel wurden eine Laserpower von 10% eingesetzt und Aufnahmen von 512x512 Pixeln erzeugt.

Um die Anzahl der Messaufnahmen pro Zeit zu maximieren, wurden für die Zeitserien während der Bolusinjektion von LY nur 125x125 Pixel große Bilder aufgenommen. Die Laserpower war konstant 10% und die Scangeschwindigkeit maximal. Für den grünen und roten Kanal waren eine Verstärkung von 600 V/500 V und ein Detektorschwellenwert von -4000 / 3300 eingestellt.

1.4.4. Untersuchung und Quantifizierung der podozytären Proteinendozytose

Um das Ausmaß der Proteinendozytose in Podozyten zu charakterisieren und zu quantifizieren, wurde die im Folgenden beschriebene Messmethodik etabliert.

1.4.4.1. Visualisierung von Podozyten

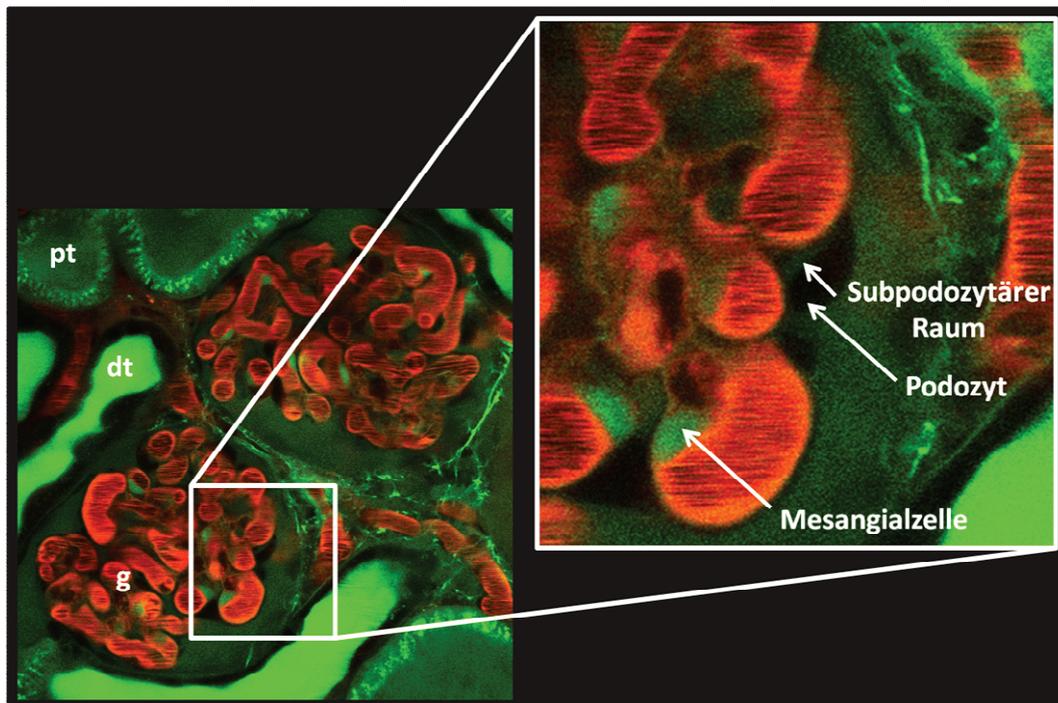


Abbildung 11: Negativ-Darstellung von Podozyten. Unter Dauerinfusion von 5 μ l/min LY färbt sich der Harnraum grün ein, da der niedermolekulare Farbstoff frei filtrierte wird. Im Gegensatz zu Mesangialzellen, welche das LY über die Zeit aufnehmen und eine intensive grüne Färbung annehmen, färben sich die Podozyten nicht. Als nicht gefärbte, schwarze Objekte sind sie an den äußeren Rändern der glomerulären Kapillaren zu erkennen. pt = proximaler Tubulus, dt = distales Konvolut, g = Glomerulus.

Podozyten lassen sich durch Multiphotonen-Mikroskopie ohne Verwendung von Antikörpern oder genetisch veränderten Modellen über sogenanntes „Negativ-Imaging“ darstellen (Kang et al. 2006).

1.4.4.2. Messeinstellungen für die Untersuchung podozytärer Proetinendozytose

Basal sowie unter Infusion von einer Angiotensin II- bzw. Kochsalzlösung wurden Z-Stapel der untersuchten Glomeruli generiert. In Tiefenabständen von je 1 μm erfolgten 1024x1024 Pixel Aufnahmen in 16-Bit mit einer Scangeschwindigkeit von 9 und einer Laserpower von 9%. In Abhängigkeit des verwendeten Gefäßfarbstoffes wurden folgende Detektoreinstellungen gewählt:

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Detektorsettings für die Quantifizierung der podozytären Endozytose.

Fluoreszenzfarbstoff	Rhodamin B 1,25 mg/ml	Alexa 594-BSA
Dosierung	30 μl / Ratte	1,3 μl /g KGW
Verstärkung Roter Kanal	500 V	560 V
Schwellenwert Roter Kanal	-3300	-1500
Verstärkung Grüner Kanal	620 V	620 V
Schwellenwert Grüner Kanal	-4000	-4000

1.4.4.3. Quantifizierung endozytotischer Vesikel

Basal sowie unter Infusion von Angiotensin II bzw. Kochsalzlösung wurden Z-Stapel der untersuchten Glomeruli mit einer Gesamtdicke von 20-30 μm generiert. Pro Z-Stapel wurden je zehn Bilder repräsentativ für den untersuchten Glomerulus ausgewertet und das Gesamtvolumen endozytotischer Vesikeln in μm^3 ermittelt. Die Quantifizierung erfolgte durch Nutzung des 3D-Analyseprogramms Amira 5.4.5. Hierbei wurden die endozytotischen Vesikel durch „Thresholding“ in den jeweiligen Bildaufnahmen markiert. „Thresholding“ bedeutet einzelne Pixel auszuwählen, die sich innerhalb eines definierten Grenzbereiches von erlaubten Graustufen befinden. Aus der bekannten Pixelgröße und dem bekannten Tiefenabstand zwischen den Einzelaufnahmen des Z-Stapels (1 μm) kann das Volumen eines markierten Objekts berechnet werden.

Um zeitabhängige Größenveränderungen podozytärer Endozytosevesikel untersuchen zu können, wurden Zeitserien solcher Z-Stapel über 30 Minuten Gesamtlänge generiert.

2. Quantifizierung des Albumingehalts des Urins

2.1. Uringewinnungsverfahren

Um zu untersuchen, ob die durch Angiotensin II-vermittelten Veränderungen der glomerulären Albuminfiltration durch proximal-tubuläre Rückresorption kompensiert werden können, wurde die Albuminausscheidung im Urin quantifiziert.

2.1.1. Blasenpunktion

Zur Uringewinnung wurde die Blase von fünf anästhesierten MWF Ratten je basal und nach 45-minütiger Infusion von Angiotensin II punktiert und vollständig entleert. Für die Punktion wurde eine 30 G, U-40 Insulinspritze verwendet. Während des gesamten Experiments wurde die Körpertemperatur des Versuchstiers auf 37°C gehalten und der Blutdruck überwacht.

2.1.2. Stoffwechselkäfigexperimente

Um die steigende Proteinurie bei heranwachsenden MWF Ratten im Alter von 9-52 Wochen sowie die Effekte einer mehrwöchigen Therapie mit ACE-Hemmern auf die Urinausscheidung einjähriger MWF Ratten zu untersuchen, wurde Urin in Stoffwechselkäfigen gewonnen.

Stoffwechselkäfige ermöglichen das separate Auffangen von Urin und Kot. Die Versuchstiere standen während einer sechsstündigen Versuchsperiode in den Stoffwechselkäfigen unter Futterrestriktion mit freiem Zugang zu Trinkwasser. Vor der Versuchsdurchführung wurden die Tiere zur Reduktion von Stress aufgrund der sozialen Deprivation eine Woche an die Stoffwechselkäfige gewöhnt.

2.1.3. Quantifizierungsverfahren

Zunächst erfolgte die Ermittlung der Urinosmolalitäten durch Gefrierpunktserniedrigung. Nach 1:6 Verdünnung der Proben wurden diese auf ein 10%-iges SDS-Page-Gel aufgetragen. Ein Albumin BSA-Standard für folgende Konzentrationen wurde hergestellt und ebenfalls auf das Gel

aufgetragen: 0,1/0,25/0,5/1,0/2,0/4,0 mg/ml oder 0,25/0,5/1,0/2,0 mg/ml. Zur Visualisierung und Quantifizierung des Albumingehalts wurde das Gel mit Coomassie gefärbt und im Anschluss mit Image J 1.4.7 densitometrisch analysiert. Die daraus resultierenden Ergebnisse für den Albumingehalt des Urins wurden gegen die ermittelten Urinosmolalitäten normalisiert und in Form des Albumin-Osmolalitäts-Quotient angegeben.

3. Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)

Die glomeruläre Filtrationsrate wurde näherungsweise durch Messung der Kreatinin-Clearance bestimmt. Die hierfür benötigten Plasmaproben wurden durch Inzision der Schwanzvene gewonnen. Dieser Eingriff erfolgte basal sowie nach zweiwöchiger Behandlung mit Enalapril unter Isoflurannarkose. Nach Hämostase durch Kompression erfolgte eine abschließende Wunddesinfektion. Im Anschluss an die vierwöchige Behandlung mit Enalapril wurde die letzte Blutabnahme nach Narkoseeinleitung mit Inaktin unmittelbar vor dem Finalexperiment ausgeführt, um die Belastung für das Versuchstier zu minimieren. Das austretende Blut wurde in heparinisierten 75 µl Kapillaren aufgenommen, welche an einem Ende zur Zentrifugation mit Kit verschlossen wurden. Nach der Zentrifugation wurden die Kapillaren mit Hilfe eines Glasschneiders gebrochen und das Plasma in ein Eppendorf-Cup überführt.

Die Urinproben wurden durch sechsstündige Stoffwechselkäfigexperimente gewonnen und das Urinvolumen gravimetrisch ermittelt. Urin und Plasmaproben wurden zur Quantifizierung des Kreatiningehalts an das veterinärmedizinische Laboratorium Idexx versendet. Die glomeruläre Filtrationsrate wurde dann mittels folgender Formel errechnet:

$$GFR = \frac{C_{\text{Harn}}^{\text{Kreatinin}} * V_{\text{Harn}}}{C_{\text{Plasma}}^{\text{Kreatinin}} * t}$$

C= Konzentration [mg/ml]; V= Volumen [ml]; t= Zeit [min]

4. Versuchsprotokolle

4.1. Ermittlung chronischer Effekte von Angiotensin II auf die Albuminausscheidung

Die Inhibierung des RAAS mit Hilfe von ACE-Hemmern oder AT1-Rezeptor-Inhibitoren ist in der Klinik ein gängiger Ansatz zur Reduktion einer Proteinurie (Ruggenti, Cravedi et al. 2012). Die protektive Wirkung einer Hemmung von Angiotensin II lässt darauf schließen, dass Angiotensin II Langzeiteffekte auf die Albuminausscheidung haben könnte. Der Rattenstamm Munich Wistar Frömter erkrankt im Alter an Glomerulosklerose in Begleitung von Hypertonie und Proteinurie (Remuzzi et al. 1990, Hackbarth et al. 1991). Dabei sind die Symptome bei männlichen MWF Ratten ausgeprägter, als bei weiblichen (Remuzzi et al. 1988). Da bereits positive Effekte einer Inhibierung des RAAS auf das pathologische Erscheinungsbild älterer MWF Ratten beschrieben sind (Remuzzi et al. 1990), eignen sie sich gut als ein Modell, um chronische Effekte von Angiotensin II auf den GSC_A zu studieren.

Um sicherzustellen, dass einjährige MWF Ratten tatsächlich proteinurisch sind, wurde zunächst die Albuminausscheidung im Urin bei den heranwachsenden MWF Ratten unserer Tierhaltung charakterisiert. Hierfür wurde von vier MWF Ratten und zwei Wistar Kontrollratten im Alter von 9, 12, 14, 16, 18, 22, 25 und 52 Wochen Urin in Stoffwechselkäfigen gesammelt und im Anschluss der Albumingehalt quantifiziert.

Um die chronischen Effekte von Angiotensin II auf die Albuminfiltration zu untersuchen, wurde der mittlere basale GSC_A von fünf männlichen MWF Ratten (Alter: zwölf Monate) untersucht und die Werte mit denen von fünf jungen männlichen MWF Ratten (< neun Wochen) zwischen 110 und 160 g KWG verglichen.

Um positive Effekte einer Unterdrückung des RAAS auf das Ausmaß der Albuminfiltration zu untersuchen, wurden sechs elf Monate alte Ratten über vier Wochen mit Enalapril (100 mg/L p.o.) behandelt. Basal und wöchentlich während der Behandlungsperiode wurden Urinproben der Ratten in Stoffwechselkäfigen gewonnen, um den Albumin- und Kreatiningehalt zu quantifizieren. Der Kreatiningehalt im Plasma wurde basal sowie nach zwei und vier wöchiger Behandlungsdauer analysiert. Nach Ablauf der vier Wochen wurde der mittlere

GSC_A dieser Versuchsgruppe ermittelt und mit dem der unbehandelten, gleichaltrigen Versuchstiere verglichen.

4.2. Ermittlung akuter Effekte von Angiotensin II auf den GSC_A

Für die im Folgenden aufgeführten Versuche wurden junge, weibliche Munich Wistar Frömter Ratten zwischen 110 und 160 g KGW untersucht.

Um die akuten Effekte von Angiotensin II auf die glomeruläre Filtration von Albumin zu untersuchen, wurde der GSC_A in sieben Versuchstieren basal und zehn Minuten nach Start einer Angiotensin II-Infusion (10 ng/kg KGW/min, Infusionsrate: 0,09 µl/g KGW/min) ermittelt. Um zeit- und volumenabhängige Veränderungen in der Filtration von Albumin ausschließen zu können, wurden bei vier Versuchsratten Kontrollexperimente unter Infusion von physiologischer Kochsalzlösung derselben Infusionsrate durchgeführt. Die statistische Auswertung beruhte auf unverbundenen Stichproben.

Um den zugrundeliegenden Mechanismus der Angiotensin II-vermittelten Erhöhung der Albuminfiltration aufzuklären, wurden die im Folgenden beschriebenen Protokolle durchgeführt. Es handelte sich jeweils um unverbundene Stichproben.

4.2.1. Ermittlung der Rolle des AT1-Rezeptors

Um die Rolle des AT1-Rezeptors für die Angiotensin II-vermittelte Veränderung der glomerulären Albuminfiltration zu ermitteln, wurden zwei verschiedene Versuchsprotokolle durchgeführt.

Bei fünf Versuchstieren wurde zunächst der GSC_A basal bestimmt, bevor die Tiere nach dem Start der Angiotensin II-Infusion eine i.v. Injektion des AT1-Rezeptor-Antagonisten Losartan (9,9 µg/g KGW) erhielten. Fünf Minuten nach der Injektion wurde der GSC_A erneut bestimmt. Bei vier weiteren Versuchstieren wurden die Losartan-Experimente unter Infusion physiologischer Kochsalzlösung zu Kontrollzwecken wiederholt.

In einem zweiten Protokoll wurde bei zwei Versuchstieren dieselbe Dosis Losartan vor dem Start der Angiotensin II-Infusion injiziert. Der GSC_A wurde basal und nach Injektion von Losartan unter Angiotensin II-Infusion gemessen.

4.2.2. Ermittlung der Rolle des AT₂-Rezeptors

Bei fünf Versuchstieren wurde der GSC_A zunächst basal ermittelt. Kurz vor dem Start der Angiotensin II-Infusion wurden 3 $\mu\text{g/g}$ KGW des AT₂-Rezeptor-Antagonisten PD123319 i.v. appliziert. Zehn Minuten nach Beginn der Angiotensin II-Infusion wurde der GSC_A erneut bestimmt. Im Anschluss wurde zusätzlich Losartan (9,9 $\mu\text{g/g}$ KGW) injiziert, um die AT₁-Rezeptor-unabhängigen Effekte zu untersuchen und der GSC_A nach fünf Minuten wiederholt bestimmt.

Um die Rolle des AT₂-Rezeptors unter endogenen Angiotensin II-Konzentrationen ermitteln zu können, wurden bei vier Tieren Kontrollexperimente unter 0,9%iger Kochsalzinfusion durchgeführt. Nach basaler Ermittlung des GSC_A wurde dieselbe Dosis PD123319 unmittelbar vor Start der Infusion einer physiologischen Kochsalzlösung injiziert und 10 Minuten nach Beginn der Infusion die Messung des GSC_A wiederholt.

4.2.3. Einfluss des mittleren arteriellen Blutdrucks auf den GSC_A

Um die blutdruckunabhängigen Effekte von Angiotensin II auf das Ausmaß der glomerulären Albuminfiltration zu untersuchen, wurde folgender chirurgischer Ansatz gewählt:

Proximal der Abzweigung der renalen Arterie wurde um die Aorta abdominalis eine Fadenschlinge implantiert, welche bei Ausübung eines Zuges den Blutzufluss reduzieren konnte (Abbildung 12). Der mittlere arterielle Blutdruck wurde distal dieser artifiziellen Stenose in der Femoralarterie gemessen. Zusätzlich wurde die Femoralvene zum Einführen von zwei intravenösen Kathetern kanüliert. Nach der Messung der basalen Werte für den GSC_A wurden zwei unterschiedliche Protokolle durchgeführt, in denen verbundene Stichproben untersucht wurden:

Bei drei Versuchstieren wurde zunächst Angiotensin II infundiert, ohne Zug auf die Fadenschlinge auszuüben und der GSC_A unter diesen Bedingungen erneut gemessen. Im Anschluss wurde der renale Perfusionsdruck künstlich durch einen starken Zug an der Fadenschlinge wieder auf das basale Niveau reduziert und die Messung wiederholt.

In einem zweiten Versuchsprotokoll wurde bei jeweils drei Versuchstieren ein Angiotensin II-induzierter Blutdruckanstieg nach Start der Infusion durch eine adäquate Zugerhöhung an der Fadenschlinge vollständig unterbunden, um den

renalen Perfusionsdruck über die Versuchsdauer konstant zu halten. Zehn Minuten nach Beginn der Angiotensin II-Infusion wurde der GSC_A erneut ermittelt und mit den basalen Werten verglichen.

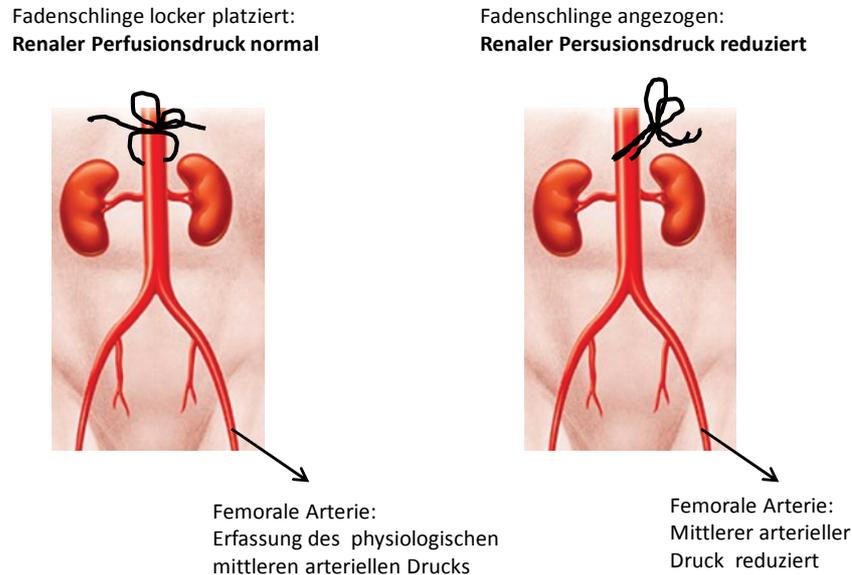


Abbildung 12: Chirurgischer Eingriff zur Manipulation des renalen Perfusionsdrucks. Proximal der A. renalis wurde um die Aorta abdominalis eine Fadenschlinge implantiert, durch welche bei Zugausübung der renale Perfusionsdruck manipuliert werden konnte. Veränderungen des renalen Perfusionsdrucks wurden durch Veränderungen des arteriellen Blutdrucks ermittelt, welcher in der A. femoralis gemessen wurde. (Modifiziert nach: Aortic Stents.com; Medtronic Inc., 2006)

4.3. Ermittlung akuter Effekte von Angiotensin II auf die podozytäre Proteinendozytose

Um die dosisabhängigen Effekte von Angiotensin II auf die podozytäre Endozytose von Plasmaproteinen zu charakterisieren, wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen mit folgenden Angiotensin II-Konzentrationen ermittelt: 0, 10, 30, 60 und 80 ng/kg KGW/min. Die Experimente erfolgten nach i.v. Injektion von Rhodamin B. Da der niedermolekulare Farbstoff an Plasmaproteine bindet, kann er genutzt werden, um diese anzufärben. Bei drei Versuchstieren wurden bis zu fünf Glomeruli basal und im Anschluss unter Infusion aufsteigender Angiotensin II-Konzentrationen auf podozytäre Proteinendozytose untersucht und diese volumetrisch quantifiziert. Um zeit- und volumenabhängige Effekte ausschließen zu können, wurden die Experimente bei zwei weiteren Versuchstieren unter Infusion von physiologischer Kochsalzlösung wiederholt. Es handelte sich um gepaarte Stichproben.

Um akute Effekte von Angiotensin II insbesondere auf die Endozytose des Hauptplasmaproteins Albumin in Podozyten zu charakterisieren, wurden Experimente nach Injektion von Alexa 594-BSA durchgeführt. Bei vier Versuchstieren wurden bis zu fünf Glomeruli unter Infusion von 0, 10, 30, 60 und 80 ng/kg KGW/min Angiotensin II auf das Vorkommen von Proteinendozytose in Podozyten untersucht und diese volumetrisch quantifiziert. Bei drei Versuchstieren wurden Kontrollversuche unter Infusion von physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt, um zeit- und volumenabhängige Effekte ausschließen zu können.

Um mögliche Polaritäts- und Größenveränderungen der Vesikel über die Zeit zu detektieren, wurde bei drei Versuchstieren im Anschluss an die Dosis-Wirkungsexperimente eine 30-minütige Zeitserie von Z-Stapeln unter fortlaufender Infusion von 80 ng/kg KGW/min generiert.

5. Methodische Vorarbeiten – Identifizierung geeigneter Mausstämme für die renale Untersuchung mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie

Beim Einsatz der Multiphotonen-Mikroskopie ist die Reichweite des Anregungslasers aufgrund der größeren Wellenlänge im Vergleich zur normalen Einphotonen-Mikroskopie erhöht (Helmchen und Denk 2005). Trotz dieses Vorteils liegt die Mehrzahl der Glomeruli ausgewachsener Mäuse außerhalb der Reichweite des Multiphotonen-Lasers. Eine Evaluierung der glomerulären Funktion ist somit stark limitiert und erschwert die Nutzung dieser Technologie bei genetisch modifizierten Mausmodellen. Aufgrund der hohen Zahl oberflächlicher Glomeruli wird deswegen in den meisten Studien mit MWF Ratten gearbeitet (Hackbarth et al. 1983). Bei Ratten ist eine genetische Modifizierung jedoch schwierig (Mashimo 2014).

Um auch mit genetisch modifizierten Mausmodellen arbeiten zu können, sollte ein Mausstamm identifiziert werden, der sich aufgrund einer Vielzahl oberflächlicher Glomeruli ähnlich gut für die Nutzung dieser Technologie eignet wie MWF Ratten.

5.1. Versuchstiere

Um einen geeigneten Mausstamm für die renale Untersuchung mit Hilfe von Multiphotonen-Mikroskopie zu finden, wurden folgende Mausstämme im Alter von vier und zehn Wochen auf das Vorhandensein oberflächlicher Glomeruli geprüft:

129 [129S2/SvPas], BL/6 [C57BL/6N], CB6F1 [CB6F1], C3H/N [C3H/HeN], NMRI [NMRI (Han)], SJL [SJL/J], DBA/2 [DBA/2N], BALB/c [BALB/cAnN], FVB/N [FVB/N] sowie CD-1 [CD1(CRI)]

Für die Studie wurden je fünf Versuchstiere pro Altersgruppe und Mausstamm untersucht. Sowohl weibliche als auch männliche Versuchstiere wurden verwendet.

5.2. Histologie und Ermittlung der Tiefe der Glomeruli

Die Versuchstiere wurden nach Anästhesie mit Ketamin/Xylazin (100/10 mg/kg KGW) mit 40 ml einer 3% Paraformaldehydlösung (gelöst in PBS, pH 7,2) unter konstantem Druck von 120 mmHg perfundiert. Nach Einbettung in Paraffin wurden 6 µm dicke Schnitte aus der Mitte der Niere angefertigt und mit Hilfe von Hematoxylin und Eosin (H&E) eingefärbt.

Mit Hilfe von Fiji Image J wurde die Tiefe aller Glomeruli eines Nierenschnittes aus dem Kortex vermessen. Dabei wurde jeweils der geringste Abstand zwischen dem untersuchten Glomerulus und der Nierenkapsel gewählt (Abbildung 13). Pro Nierenschnitt wurden zwischen 89 und 182 Glomeruli vermessen. Mit Hilfe von Microsoft Excel wurden die 30 oberflächlichsten Glomeruli pro Mausstamm und Alter für die weitere statistische Analyse herausgefiltert.

5.3. Statistische Auswertung

Für die Statistik wurde Graph Pad Prism 5 verwendet. Um statistische Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen zu detektieren, wurde ein einseitiger ANOVA Test angewendet. Zur Ermittlung von Unterschieden einzelner Stämme zu einer Vergleichsgruppe (bestehend aus allen anderen Stämmen) wurde der T-Test für ungepaarte Stichproben verwendet.

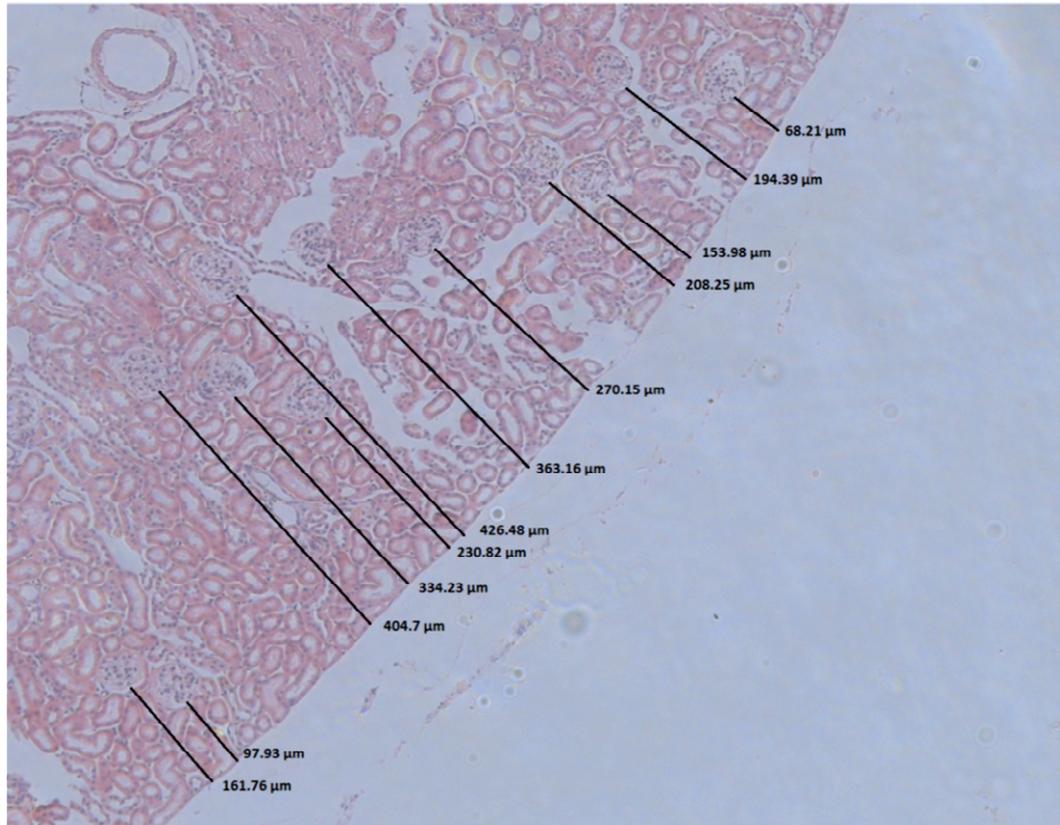


Abbildung 13: Bestimmung der Tiefe der murinen Glomeruli im Nierenkortex. Um die Tiefe der Glomeruli im Kortex zu bestimmen, wurde der kürzeste vertikale Abstand des Glomerulus zur Nierenkapsel vermessen.

5.4. Multiphotonen-Mikroskopie von Niere, Leber und Gehirn der Maus

Die Laserreichweite hängt neben der Frequenz des anregenden Lichts, dem Grad der Gewebefärbung und der numerischen Apertur auch von den Streuungseigenschaften des untersuchten Gewebes ab (Theer und Denk 2006). Um die Streuungseigenschaften der Niere im Vergleich zu Gehirn und Leber zu klassifizieren wurden Aufnahmen mit Multiphotonen-Mikroskopie in allen drei Organen unter identischen Einstellungen generiert.

Die Versuchstiere wurden für die mikroskopische Untersuchung i.p. mit Ketamin/Xylazin (100/10 mg/kg KGW) betäubt. Zur Atemstabilisation wurde ein Trachealtubus aus Polyethylen eingeführt und die Jugularvene wurde für die Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen kanüliert. Für die Untersuchung der Niere wurde diese durch einen schmalen Flankenschnitt entblößt. Die Leber wurde durch einen horizontalen Einschnitt unterhalb des Sternums durch leichten Druck auf das Abdomen freigelegt. Um das murine Gehirn untersuchen zu können,

wurde ein chronisches kraniales Fenster über dem somatosensorischen Kortex präpariert, wie in der Literatur näher beschrieben (Holtmaat et al. 2009).

Für die Generierung der Z-Stapel wurden die unterschiedlichen Gewebe bei 860 nm angeregt und unter Verwendung eines 40 x Vergrößerungsobjektivs 12-Bit 1026x1026 Pixel Aufnahmen generiert. Für die Detektion der Emission wurden interne Detektoren verwendet, deren Lochblende maximal geöffnet war. Folgende Wellenlängen-Einstellungen wurden verwendet: grüner Kanal: 505-590 nm, roter Kanal: 596-695 nm, blauer Kanal: 404- 499 nm. Zur Visualisierung von Kollagen der Nierenkapsel wurde Second Harmonic Generation verwendet und diese bei 430 nm detektiert.

Für die Anfärbung des Plasmas wurde Texas Red 70 kDa Dextran (20 mg/ml) verwendet, welches durch Größenausschlusschromatographie in Sephadex-Säulen aufgereinigt wurde (PD-10 Sephadex G-25 columns, GE Healthcare). Von der aufgereinigten Lösung wurden 50 µl i.v. injiziert. Um die Zellkerne anzufärben wurden 25 µl einer 10 mg/ml Lösung Höchst 33342 injiziert.

Für die Aufnahme von Z-Stapeln wurden die Verstärkung und der Detektorschwellenwert konstant gehalten. Die Laserpower wurde für die oberflächlichsten Bildebenen von Niere, Leber und Gehirn mit 15% optimal eingestellt. Zunächst erfolgte die Aufnahme von Z-Stapeln ohne Anpassung der Laserpower bis zu einer Maximaltiefe von 100, 40 und 300 µm für Niere, Leber und Gehirn. Der Tiefenabstand zwischen den einzelnen Aufnahmen betrug dabei je 1 µm. Für die nachfolgende Generierung der Z-Stapel mit Anpassung der Laserpower wurden Aufnahmen in folgendem Tiefenabstand für die Gewebe Niere, Leber und Gehirn produziert: 0, 30, 40, 50, 70 und 100 µm/ 0, 10, 20, 30 und 40 µm/ 5, 60, 120, 200 und 300 µm. Die Laserpower wurde dabei für jede einzelne Aufnahme entsprechen so erhöht, dass das Bild optimal ausgeleuchtet erschien.

IV. ERGEBNISSE

1. Methodische Vorarbeiten – Identifizierung geeigneter Mausstämme für Untersuchungen der Niere mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie

Für die Untersuchung der Nierenfunktion mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie ist der Einsatz von MWF Ratten sehr vorteilhaft. Grund hierfür ist die hohe Anzahl an oberflächlich gelegenen Glomeruli (Abbildung 14), (Hackbarth et al. 1983). Trotz der erhöhten Laserreichweite bei Verwendung der Multiphotonen-Mikroskopie im Vergleich zur traditionellen Einphotonen-Mikroskopie (Helmchen und Denk 2005) ist die Darstellung muriner Glomeruli aufgrund deren tiefer Lokalisation im Nierenkortex stark limitiert. Dies erschwert die Untersuchung des Glomerulus genetisch modifizierter Mausmodelle mit Multiphotonen-Mikroskopie erheblich. Ziel dieser Studie war daher die Identifizierung eines Mausstammes mit einer hohen Anzahl oberflächlicher Glomeruli im Nierenkortex.

1.1. Untersuchung der Laserpenetration von Niere, Leber und Gehirn der Maus mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie

Die Eindringtiefe des anregenden Lichts eines Lasers in das zu untersuchende Gewebe hängt neben anderen Faktoren stark von den Streuungseigenschaften dieses Gewebes ab (Theer und Denk 2006). Deswegen sollte zunächst die Gewebepenetration der Organe Niere, Leber und Gehirn für den Multiphotonen-Laser untersucht werden, um die Streuungseigenschaften der Niere im Vergleich zu anderen Organen einstufen zu können. Für diesen Zweck wurden Aufnahmen der drei Organe mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie mit und ohne Adaption der eingestreuten Lichtmenge durch den Laser (Erhöhung der Laserpower) generiert.

Alle Aufnahmen wurden unter identischen Aufnahmebedingungen in Bl/6 Mäusen vorgenommen. Zunächst wurde die Helligkeit und die Aufnahmequalität in der Mausniere als Funktion der Distanz von der Nierenkapsel untersucht.

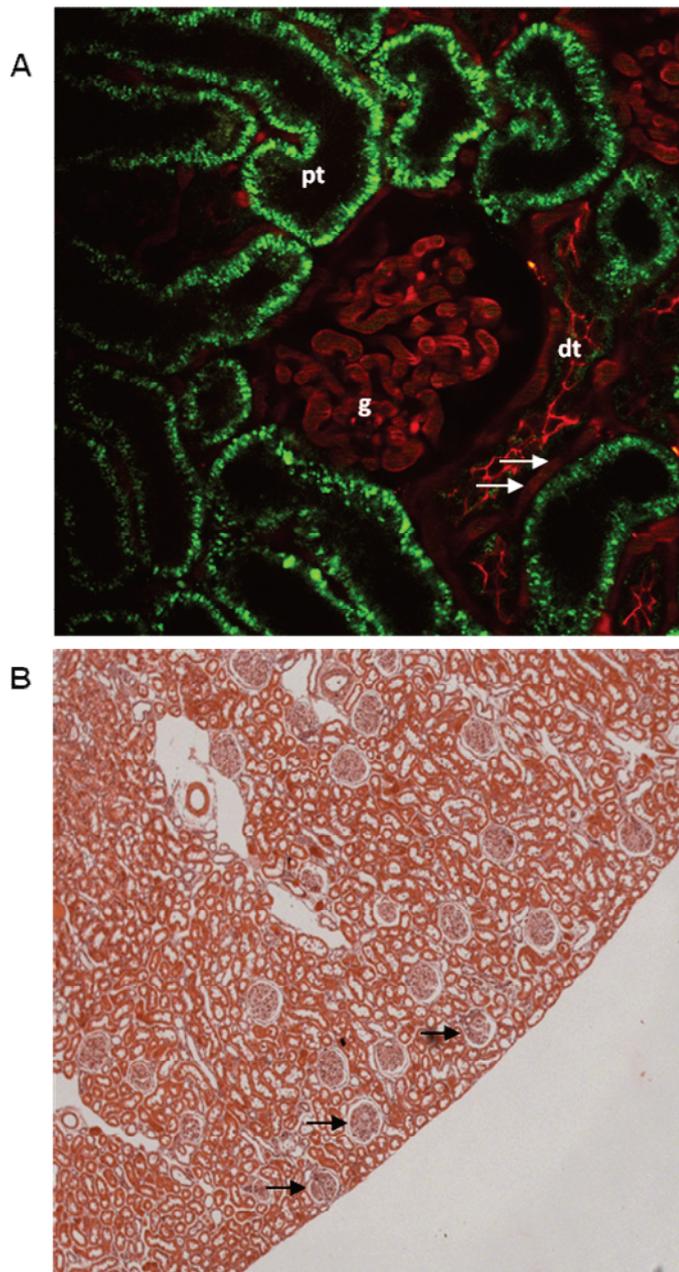


Abbildung 14: *In vivo*-Aufnahmebedingungen der Niere einer MWF Ratte mittels Multiphotonen-Mikroskopie. A: Multiphotonen-Aufnahme eines oberflächlichen Glomerulus (g) und eines distalen Tubulus (dt) in der Niere einer MWF Ratte. Die proximalen Tubuli (pt) zeigen grüne Autofluoreszenz, die intra- und extraglomerulären Kapillaren wurden mit Texas Red 70 kDa Dextran rot eingefärbt (Pfeile). B: Histologie eines Nierenschnitts aus einer MWF Ratte mit zahlreichen oberflächlichen Glomeruli (Pfeile).

Wie in Abbildung 15a ersichtlich, nahm die Aufnahmequalität in der Niere rapide ab, wenn die Laserpower nicht tiefenabhängig adaptiert wurde. Bereits in einer Tiefe von 50 μm unterhalb der Nierenkapsel war die Helligkeit des untersuchten Glomerulus stark reduziert. In einer Tiefe von 70 μm war kein Objekt mehr erkennbar.

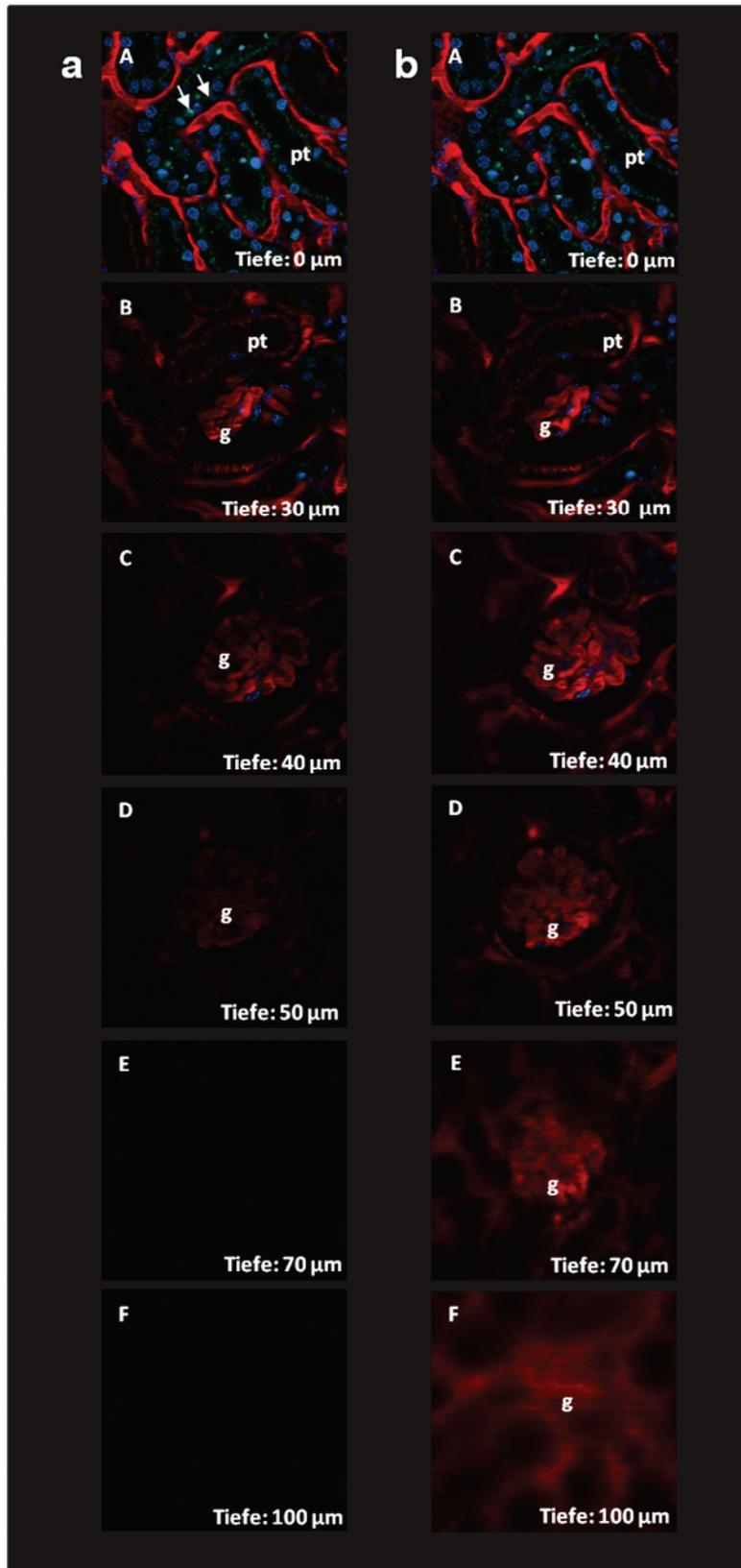


Abbildung 15: Z-Stapel durch eine murine Niere *in vivo*, welcher typische renale Strukturen, wie den Glomerulus (g), proximale Tubuli (pt) und extraglomeruläre Kapillaren (Pfeile) zeigt. Die Aufnahmen wurden mit internen Detektoren generiert. A-F zeigt Nierenschichten in den Tiefen 0, 30, 40, 50, 70 und 100 μm . Blutgefäße wurden mit Texas Red 70 kDa Dextran rot eingefärbt und proximale Tubuli zeigten grüne Autofluoreszenz. (a): Z-Stapel ohne Anpassung der Laserpower. (b): Z-Stapel mit Anpassung der Laserpower.

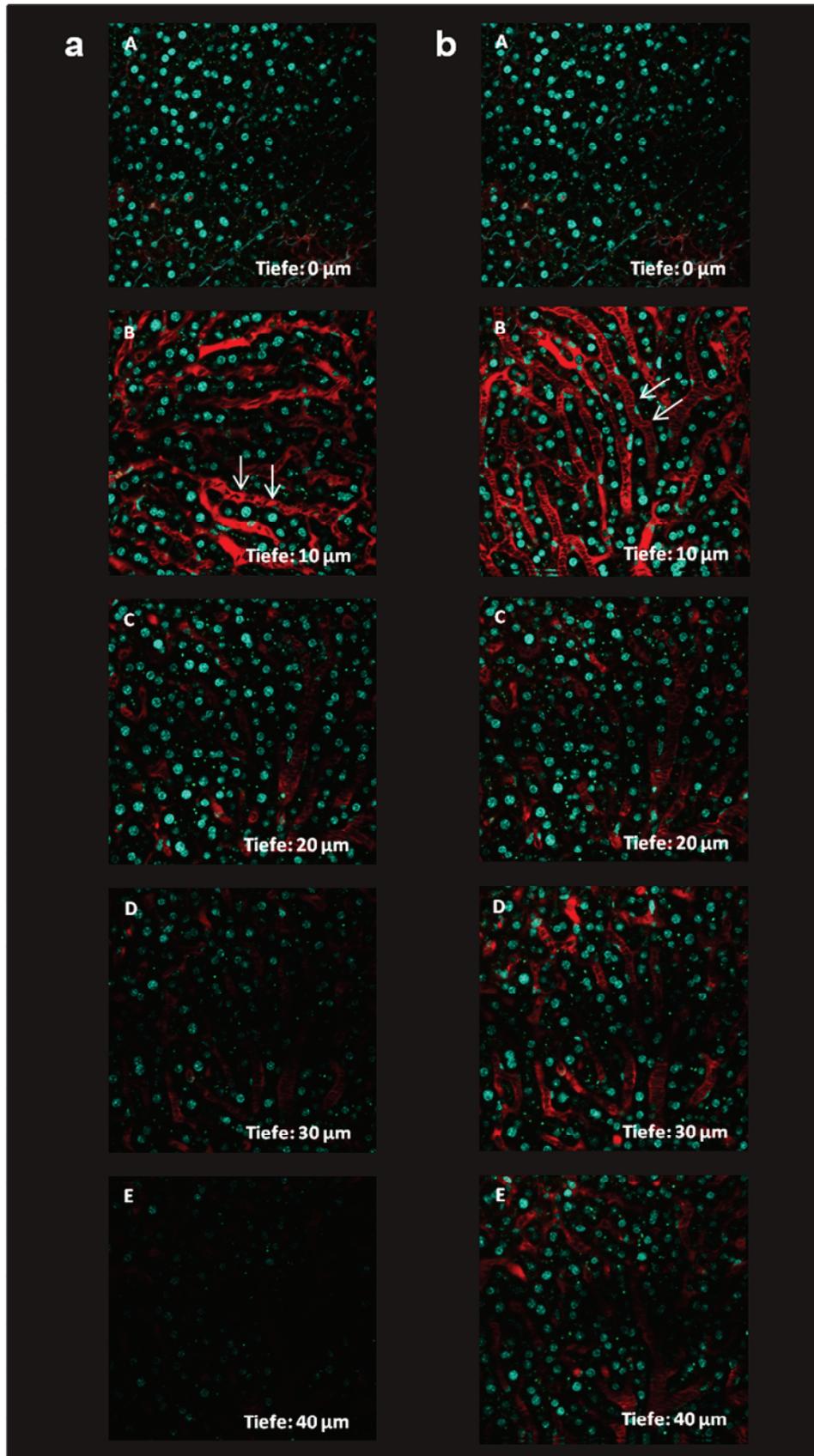


Abbildung 16: Z-Stapel durch eine murine Leber, *in vivo*. Die Aufnahmen wurden mit internen Detektoren generiert. A-E zeigt Leberschichten in den Tiefen 0, 10, 20, 30 und 40 μm . Die Sinusoide sind durch Texas Red 70 kDa Dextran rot, die Zellkerne durch Höchst 33324 türkis gefärbt. (a): Z-Stapel ohne Anpassung der Laserpower. (b): Z-Stapel mit Anpassung der Laserpower.

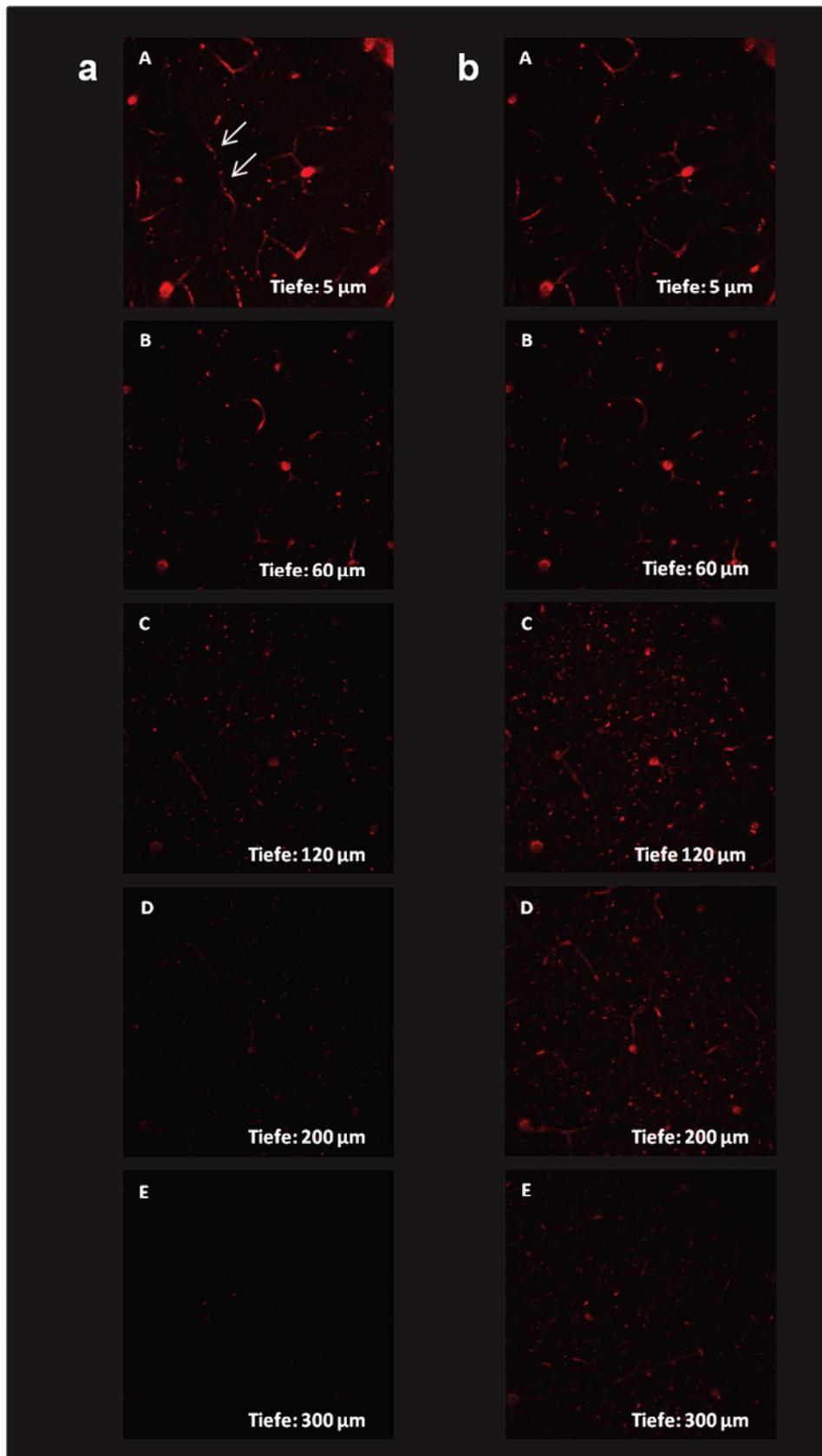


Abbildung 17: Z-Stapel durch den Gyrus postcentralis eines murinen Gehirns, *in vivo*. A-E zeigt Gehirnareale des somatosensorischen Kortex in 5, 60, 120, 200 und 300 μm Tiefe. Die Blutgefäße sind durch Texas Red 70 kDa Dextran angefärbt. (a): Z-Stapel ohne Anpassung der Laserpower. (b): Z-Stapel mit Anpassung der Laserpower. Im Gegensatz zu Niere und Leber ist eine wesentlich tiefere Penetration ins Gewebe möglich.

Durch Erhöhung der Laserpower in tiefer gelegenen Gewebeschichten, konnte die Aufnahmequalität signifikant gesteigert werden und selbst Nierenstrukturen in einer Tiefe von 100 μm visualisiert werden (Abbildung 15b).

Ähnlich wie in der Niere feststellbar, nahm auch die Aufnahmequalität in der Leber mit zunehmender Tiefe ab. Ohne Anpassung der Laserpower war eine Darstellung der hepatischen Sinusoide in einer Tiefe von 40 μm kaum mehr möglich (Abbildung 16a). Insgesamt waren die Tiefenaufnahmebedingungen in der Leber schlechter als in der Niere.

Im starken Kontrast zu diesen Befunden stehen die Ergebnisse der Experimente im somatosensorischen Kortex der Maus. Auch ohne Anpassung der Laserpower waren qualitativ hochwertige Aufnahmen des Gewebes bis zu einer Tiefe von 200 μm möglich (Abbildung 17a). Laut Literatur sind sogar noch tiefer gelegene Hirnareale für die Technologie zugänglich (Kobat et al. 2011).

Zusammenfassend wies die Niere im Vergleich zum Gehirn eher ungünstige Streuungseigenschaften auf. Die Gewebepenetration war stark limitiert, konnte jedoch durch Adaption der Laserpower bis zu einer Tiefe von 100 μm weitgehend kompensiert werden. Bei den Aufnahmen der Leber mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie wurden die ungünstigsten Streuungseigenschaften festgestellt.

1.2. Die Tiefe der Glomeruli in vier Wochen alten Mäusen verschiedener Stämme

Da die Eindringtiefe des Multiphotonen-Lasers in renales Gewebe limitiert ist, sind oberflächlich lokalisierte Glomeruli, wie sie bei MWF Ratten vorhanden sind, eine Voraussetzung zur Untersuchung der glomerulären Funktion mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie. Um einen Mausstamm zu identifizieren, der diesbezüglich vergleichbar gute Voraussetzungen bietet wie MWF Ratten, wurden zehn verschiedene Stämme auf das Vorhandensein oberflächlicher Glomeruli untersucht. Für die Analyse wurden sowohl weibliche, als auch männliche vier Wochen alte Mäuse verwendet, da kein geschlechtsspezifischer Unterschied nachgewiesen werden konnte. Um Mausstämme mit einer hohen Anzahl oberflächlicher Glomeruli identifizieren zu können, wurden zunächst alle Glomeruli eines Nierenschnittes jedes untersuchten Stammes vermessen. Für die statistische Auswertung wurden jedoch nur die 30 oberflächlichsten Glomeruli verwendet. Die mittlere Entfernung der 30 oberflächlichsten Glomeruli von der

Nierenkapsel war $118,4 \pm 3,4 \mu\text{m}$; $123,0 \pm 2,7 \mu\text{m}$; $132,3 \pm 2,6 \mu\text{m}$; $133,6 \pm 3,0 \mu\text{m}$; $141,0 \pm 4,0 \mu\text{m}$; $145,3 \pm 4,3 \mu\text{m}$; $148,9 \pm 4,2 \mu\text{m}$; $151,6 \pm 2,7 \mu\text{m}$; $167,7 \pm 3,9 \mu\text{m}$ und $207,8 \pm 3,2 \mu\text{m}$ für die Stämme C3H/N, BALB/c, BL/6, SJL, DBA/2, CD-1, 129, CB6F1, FVB/N und NMRI.

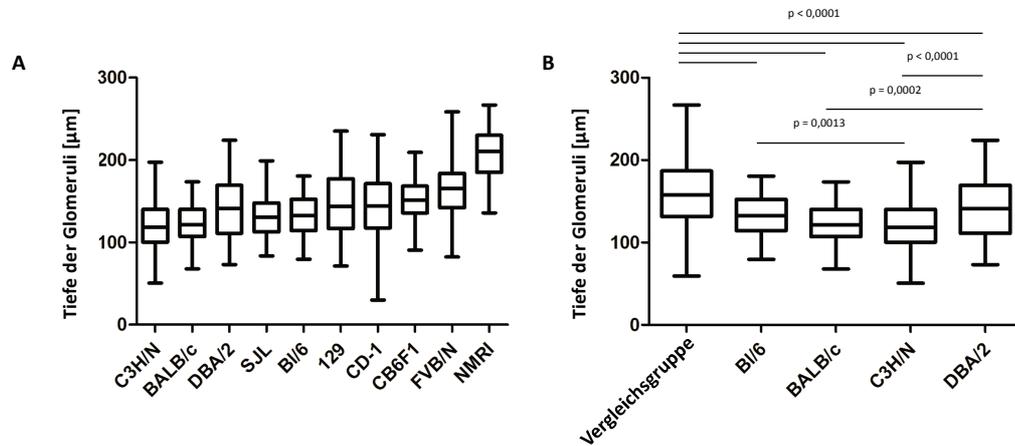


Abbildung 18: Tiefe der Glomeruli in vier Wochen alten Mäusen unterschiedlicher Stämme. Die Verteilung der 30 oberflächlichsten Glomeruli ist in Boxplots angegeben. Diese zeigen den Median \pm 25% in den Boxen sowie die 5%-95% Perzentile in Whiskers. A: Boxplots aller 10 Stämme, sortiert nach 25% Perzentil. B: Boxplots der Vergleichsgruppe (129, CB6F1, NMRI, SJL, FVB, CD-1) sowie der Stämme Bl/6, BALB/c, C3H/N und DBA/2.

Einhergehend mit der mittleren Entfernung von der Nierenkapsel variierte ebenso der 25% Perzentil der 30 oberflächlichsten Glomeruli. Mit einem 25% Perzentil von nur $100,4$ bzw. $107,0 \mu\text{m}$ hatten die Stämme C3H/N und BALB/c die oberflächlichsten Glomeruli. Die Stämme FVB/N und NMRI zeigten mit 25% Perzentilen von $142,1$ und $185,1 \mu\text{m}$ die tiefst gelegenen Glomeruli (Abbildung 18A).

1.3. Die Tiefe der Glomeruli in zehn Wochen alten Mäusen unterschiedlicher Stämme

Die identische Analyse wurde für adulte, zehn Wochen alte Mäuse wiederholt. Das mittlere Nierengewicht der ausgewachsenen, zehn Wochen alten Mäuse war mit $161,2 \pm 2,1 \text{ mg}$ wesentlich schwerer als das der jungen, vier Wochen alten Mäuse mit $112,9 \pm 3,8 \text{ mg}$. Als eine Konsequenz des Nierenwachstums nahm die mittlere Tiefe der Glomeruli in zehn Wochen alten Mäusen mit $170,1 \pm 5,4 \mu\text{m}$ gegenüber $147,0 \pm 4,2 \mu\text{m}$ signifikant zu ($p < 0,001$).

Die mittlere Entfernung der 30 oberflächlichsten Glomeruli von der Nierenkapsel betrug $136,5 \pm 3,8 \mu\text{m}$; $151,9 \pm 3,1 \mu\text{m}$; $162,0 \pm 3,4 \mu\text{m}$; $164,8 \pm 4,1 \mu\text{m}$; $170,0 \pm 4,8$

μm ; $171,0 \pm 3,4 \mu\text{m}$; $171,8 \pm 3,6 \mu\text{m}$; $182,3 \pm 5,8 \mu\text{m}$; $193,0 \pm 5,2 \mu\text{m}$ und $197,3 \pm 3,4 \mu\text{m}$ für die Stämme BL/6, BALB/c, FVB/N, DBA/2, CD-1, SJL, NMRI, 129, C3H/N und CB6F1. Die 25% Perzentile der Mausstämmen nahmen in ähnlicher Reihenfolge zu, wie die mittlere Entfernung von der Nierenkapsel und bewegten sich zwischen den Extremen von $116,7 \mu\text{m}$ in Bl/6 Mäusen und $175,4 \mu\text{m}$ in CB6F1 (Abbildung 19A).

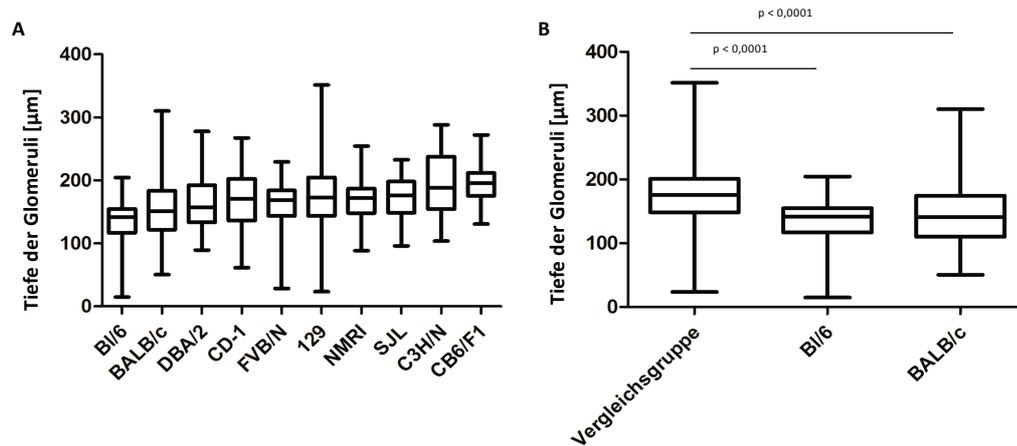


Abbildung 19: Tiefe der Glomeruli in zehn Wochen alten Mäusen unterschiedlicher Stämme. Die Verteilung der 30 oberflächlichsten Glomeruli ist in Boxplots angegeben. Diese zeigen den Median \pm 25% in den Boxen sowie die 5%-95% Perzentile in Whiskers. A: Boxplots aller Stämme, sortiert nach dem 25% Perzentil. B: Boxplots der Vergleichsgruppe (129, CB6F1, NMRI, SJL, FVB, CD-1, C3H/N, DBA/2) sowie der Stämme Bl/6 und BALB/c.

Obwohl der 25% Perzentil der Stämme Bl/6 und BALB/c sich mit über $100 \mu\text{m}$ an der Grenze der Zugänglichkeit für Multiphotonen-Mikroskopie befand, ließen sich in diesen Stämmen doch vereinzelte Glomeruli auffinden, welche sich sehr nah an der Nierenkapsel lokalisiert befanden ($15 \mu\text{m}$ und $50 \mu\text{m}$ für Bl/6 und BALB/c.) Wie in Abbildung 19B dargestellt, zeigten die Stämme Bl/6 und BALB/c signifikant oberflächlichere Glomeruli als die Vergleichsgruppe, welche sich aus den übrig gebliebenen Mausstämmen zusammensetzte ($p < 0,0001$).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Zugänglichkeit muriner Glomeruli mit Hilfe von Multiphotonen-Mikroskopie stark von Alter und Mausstamm abhängt. Die Stämme BALB/c und BL/6 haben die höchste Anzahl oberflächlicher Glomeruli. Diese Stämme sollten bei Untersuchungen der glomerulären Funktion in der Maus bevorzugt verwendet werden. Keiner der untersuchten Mausstämmen wies jedoch vergleichbar gute Abbildungsbedingungen wie die MWF Ratten auf.

2. Chronische Effekte von Angiotensin II auf die Albuminfiltration

Um chronische Effekte von Angiotensin II auf die Albuminfiltration zu untersuchen, wurden Experimente bei einjährigen Munich Wistar Frömter (MWF) Ratten durchgeführt. MWF Ratten eignen sich aufgrund ihrer hohen Anzahl oberflächlicher Glomeruli gut für die mikroskopische Untersuchung renaler Funktion (Hackbarth et al. 1983). Die Tiere leiden jedoch im Alter an Glomerulosklerose mit einhergehender Proteinurie und Hypertonie (Hackbarth et al. 1991). Dabei sind besonders männliche Tiere von den pathologischen Symptomen im Alter betroffen (Remuzzi et al. 1988).

In der Klinik werden Arzneistoffe zur Inhibierung des RAAS, wie ACE-Hemmer oder AT1-Rezeptor-Inhibitoren als gängige Therapie zur Reduktion einer Proteinurie eingesetzt (Ruggenti, Cravedi et al. 2012) und auch für MWF Ratten wurde bereits ein positiver Effekt einer solchen Therapie auf die renale Funktion beschrieben (Remuzzi et al. 1990). Der Erfolg einer solchen Therapie lässt darauf schließen, dass Angiotensin II langfristig die Albuminfiltration steigert und sich negativ auf die Nierenfunktion auswirkt. Somit eignen sich alte MWF Ratten gut als ein pathologisches Modell, um die chronischen Effekte von Angiotensin II auf die Albuminfiltration zu untersuchen.

2.1. Charakterisierung der Albuminausscheidung im Urin von heranwachsenden MWF und Wistar Ratten

Um sicherzustellen, dass einjährige MWF Ratten unserer Zucht tatsächlich proteinurisch waren, wurde die Albuminausscheidung im Urin männlicher, heranwachsender MWF Ratten charakterisiert. In Stoffwechselläufigen wurde Urin in den Lebenswochen 9, 12, 14, 16, 18, 22, 25 und 52 gesammelt und der Albumin-Osmolalitäts-Quotient bestimmt. Zur Kontrolle wurden die Ergebnisse mit dem Albumin-Osmolalitäts-Quotienten des Urins gleichaltriger Wistar Ratten verglichen.

Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse für dieses Experiment. Der Albumin-Osmolalitäts-Quotient des Urins heranwachsender Wistar Ratten veränderte sich mit zunehmendem Alter der Tiere nicht und wies über die acht Untersuchungszeitpunkte gemittelt den Wert $0,00079 \pm 6,5 \cdot 10^{-5}$ [mg/ml]/[mosmol/kg] (n=16) auf. Im Gegensatz dazu stieg der Albumin-

Osmolalitäts-Quotient heranwachsender MWF Ratten über den betrachteten Zeitraum linear von einem basalen Wert von $0,00062 \pm 0,0001$ [mg/ml]/[mosmol/kg] (n=4) auf einen Wert von $0,0054 \pm 0,0003$ [mg/ml]/[mosmol/kg] (n=4) für den Zeitpunkt von 52 Lebenswochen an (Lineare Regression: $p > 0,0001$; $r^2 = 0,5918$). Der Anstieg des Albumin-Osmolalitäts-Quotienten im Alter von 52 Wochen war dabei im Vergleich zum Wert von neun Wochen hochsignifikant ($p > 0,0001$).

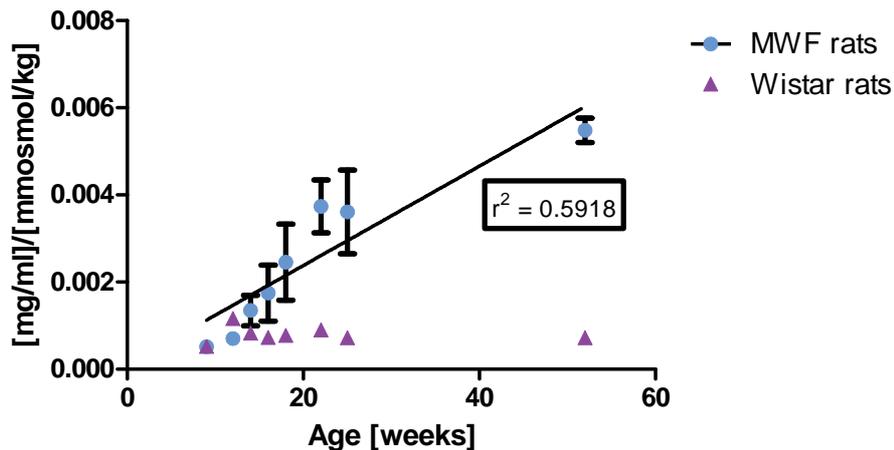


Abbildung 20: Charakterisierung der Albuminausscheidung im Urin bei heranwachsenden MWF und Wistar Ratten. Um das altersbedingte Fortschreiten der Proteinurie in MWF Ratten zu charakterisieren wurde der Albumin-Osmolalitäts-Quotient im Urin der Ratten der Lebenswochen 9, 12, 14, 16, 18, 22, 25 und 52 bestimmt. Als Kontrolle wurde parallel dazu der Albumin-Osmolalitäts-Quotient in gleichaltrigen Wistar Ratten ermittelt.

Im Vergleich zum mittleren Albumin-Osmolalitäts-Quotient der Wistar Ratten konnte bei den MWF Ratten ab einem Lebensalter von 18 Wochen ein signifikant höherer Albumin-Osmolalitäts-Quotient detektiert werden (p-Werte für die Zeitpunkte 18, 22, 25 und 52 Lebenswochen: 0,0189; 0,0001; 0,0015 und $< 0,0001$).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass männliche MWF Ratten unserer Zucht ab einem Lebensalter von 18 Wochen im Vergleich zu männlichen Wistar Ratten eine signifikante Proteinurie aufweisen. Im Alter von 52 Wochen wurde ein hochsignifikanter Anstieg der Albuminausscheidung im Urin festgestellt. Im jungen Alter von neun Wochen hingegen, zeigten die MWF Ratten im Vergleich zu den Wistar Ratten keine Proteinurie. Deswegen eignen sich junge MWF Ratten (< 9 Wochen) um die Albuminausscheidung in einem physiologischen Modell zu untersuchen und zwölf Monate alte MWF Ratten als ein pathologisches Modell der Albuminausscheidung.

2.2. Chronische Effekte von Angiotensin II auf den GSC_A

Um chronische Effekte von Angiotensin II auf die Albuminfiltration zu ermitteln, wurde der mittlere basale GSC_A von fünf alten, männlichen MWF Ratten (Alter: zwölf Monate) untersucht und die Werte mit denen von fünf jungen, männlichen MWF Ratten zwischen 110 und 160 g KWG (Alter < neun Wochen) verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Albuminfiltration in den älteren MWF Ratten mit einem mittleren GSC_A von $0,0027 \pm 0,00036$ (n=36) um nahezu das Fünffache höher war als bei jungen Tieren, bei denen ein mittlerer GSC_A von $0,00057 \pm 4,7 \cdot 10^{-5}$ (n=25) gemessen werden konnte ($p < 0,0001$, Abbildung 21).

In einem zweiten Versuch sollten die Effekte einer RAAS-Inhibierung auf die glomeruläre Albuminfiltration untersucht werden. Sechs elf Monate alte MWF Ratten wurden hierfür unter eine vierwöchige per orale (p.o.) Behandlung mit Enalapril [100 mg/L] gesetzt. Wie in Abbildung 21 gezeigt, konnte die glomeruläre Albuminfiltration in einjährigen MWF Ratten nach einer vierwöchigen Enalapril-Therapie um etwa 50% auf einen mittleren GSC_A von $0,00139 \pm 0,00013$ (n=39; $p = 0,0005$) reduziert werden.

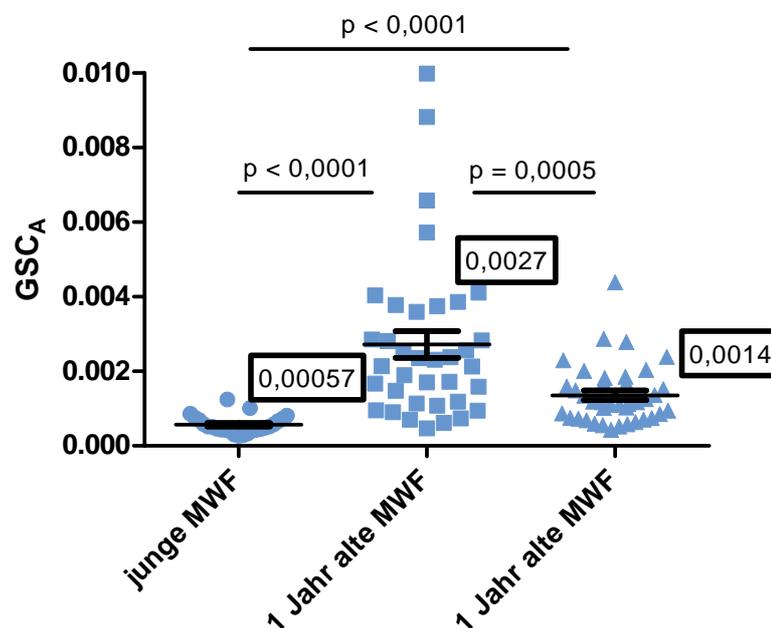


Abbildung 21: Evaluierung der glomerulären Albuminfiltration bei unehandelten, jungen und ein Jahr alten MWF Ratten sowie ein Jahr alten MWF Ratten, die vier Wochen mit Enalapril behandelt wurden. Im Vergleich zu jungen MWF Ratten, stieg die Albuminfiltration in einjährigen Tieren signifikant an. Eine vierwöchige Behandlung mit Enalapril [100 mg/L p.o.] führte zu einer signifikanten Reduktion der Albuminfiltration um ca. 50%.

Während der Messung des GSC_A wurde der mittlere arterielle Blutdruck der Versuchstiere überwacht. Einjährige Ratten unter Anästhesie waren mit $144,6 \pm 6,5$

mmHg (n=5) stark hyperton. Nach vierwöchiger Behandlung mit Enalapril sank der mittlere arterielle Blutdruck auf $110,9 \pm 3,6$ mmHg (n=6, $p=0,0011$), (Abbildung 22).

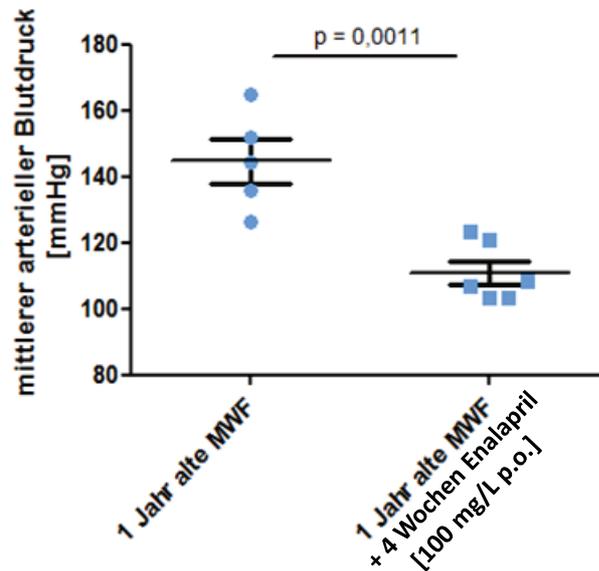


Abbildung 22: Mittlerer arterieller Blutdruck der einjährigen MWF Ratten ohne und mit Enalapril-Behandlung (in Narkose). Die einjährigen MWF Ratten waren unter Anästhesie stark hyperton. Tiere, die eine vierwöchige Behandlung mit Enalapril vor der Untersuchung erhielten, zeigten unter Narkose einen normalen mittleren arteriellen Blutdruck.

Die positiven Effekte von Enalapril auf die Albuminfiltration konnten durch die Quantifizierung der Albuminausscheidung im Urin weiter bestätigt werden. Der Albumingehalt des Urins wurde basal und wöchentlich unter Therapie mit Enalapril untersucht und es konnte eine zu allen Zeitpunkten signifikante Reduktion der Albuminausscheidung festgestellt werden (Abbildung 23). Der Albumin-Osmolalitäts-Quotient sank von einem basalen Level von $0,0051 \pm 0,0002$ [mg/ml]/[mosmol/kg] auf die Werte $0,0023 \pm 0,0004$; $0,0033 \pm 0,0003$; $0,0041 \pm 0,0003$ und $0,0036 \pm 0,0005$ [mg/ml]/[mosmol/kg] für die Wochen 1, 2, 3 und 4 unter Enalapril-Therapie (n=6, $p=0,0002$; $p=0,0056$; $p=0,0304$ und $p=0,0089$).

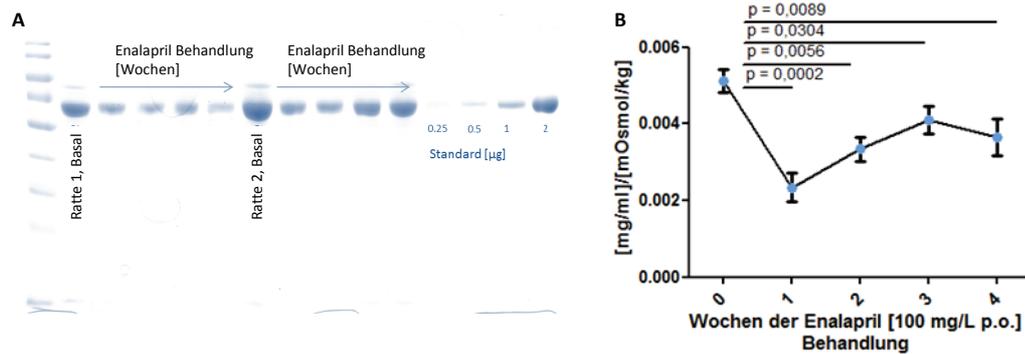


Abbildung 23: Albuminausscheidung in einjährigen MWF Ratten unter Behandlung mit Enalapril [100 mg/l p.o.]. A: SDS-Page-Gel mit den Urinproben von zwei aus insgesamt sechs einjährigen MWF Ratten unter vierwöchiger Behandlung mit Enalapril sowie einem Albumin BSA-Standard in folgenden Konzentrationen: 0,25; 0,5; 1,0 und 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die Albuminbanden wurden durch eine Coomassie Färbung visualisiert und anschließend densitometrisch vermessen. B: Albumin-Osmolalitäts-Quotient des Urins einjähriger MWF Ratten zu den Zeitpunkten: 0, 1, 2, 3 und 4 Wochen der Therapie. Unter Enalapril-Behandlung sank der Albumin-Osmolalitäts-Quotient zu allen Zeitpunkten im Vergleich zu den basalen Werten signifikant ab ($n=6$, verbundene Stichproben).

Da der Grad der Albuminfiltration von der glomerulären Filtrationsrate abhängt (Haraldsson et al. 2008), wurde zu den Zeitpunkten 0, 2 und 4 Wochen unter Enalapril-Therapie die GFR der Versuchstiere über die Bestimmung der Kreatinin-Clearance ermittelt. Die GFR verdoppelte sich bereits nach zweiwöchiger Behandlung von $3,28 \pm 0,6$ ml/min ($n=6$) auf $6,88 \pm 0,3$ ml/min ($n=6$, $p=0,0022$). Nach vierwöchiger Therapie nahm die GFR auf $7,17 \pm 0,7$ ml/min zu ($n=6$, $p=0,0025$ im Vergleich. zu basal, Abbildung 24).

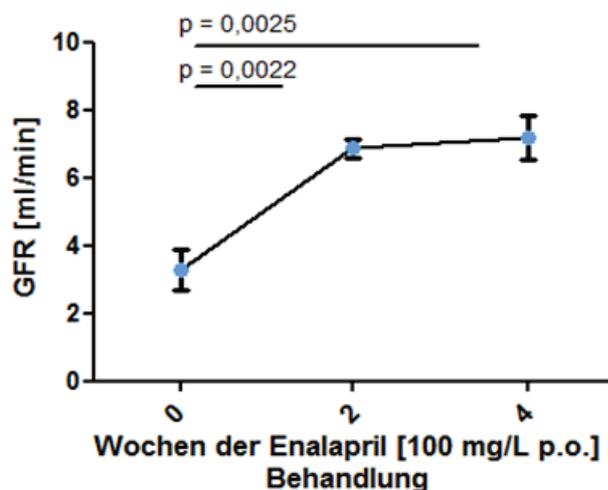


Abbildung 24: Ermittlung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) von einjährigen MWF Ratten unter Enalapril-Behandlung. Die GFR wurde durch Bestimmung der Kreatinin-Clearance zu den Zeitpunkten 0, 2 und 4 Wochen der Behandlung mit Enalapril evaluiert. Unter der Therapie nahm die GFR signifikant zu ($n=6$).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass alte, männliche MWF Ratten einen fünffach höheren GSC_A aufweisen als junge MWF Ratten. Eine vierwöchige Behandlung mit Enalapril verbesserte zum Einen die glomeruläre Albuminfiltration und senkte somit den GSC_A , zum Anderen reduzierte sie den Albumin-Osmolalitäts-Quotienten des Urins, verbesserte darüber hinausgehend die GFR und senkte den mittleren arteriellen Blutdruck.

3. Akute Effekte von Angiotensin II auf die Albuminfiltration

Die Inhibierung des RAAS mit Hilfe von ACE-Hemmern oder AT1-Rezeptor-Antagonisten wird in der Klinik zur Therapie einer Proteinurie eingesetzt. Die vermuteten Mechanismen der antiproteinurischen Wirkweise beruhen dabei wahrscheinlich auf den hämodynamischen und den antientzündlichen Effekten dieser Arzneistoffe (Remuzzi et al. 2005, Ruggenti et al. 2012).

Ziel der Studie war es zu prüfen, ob Angiotensin II darüber hinaus direkte und akute Effekte auf die Albuminfiltration am nicht vorgeschädigten Glomerulus hat. Des Weiteren sollte geklärt werden, über welchen Rezeptor ein solcher Effekt vermittelt wird und welchen Einfluss Änderungen in der Hämodynamik haben.

3.1. Akute Effekte von Angiotensin II auf den GSC_A , die tubuläre Rückresorption von Albumin und die Albuminausscheidung

Um die akuten Effekte von Angiotensin II auf den glomerulären Siebkoeffizienten von Albumin zu bestimmen, wurde dieser basal und unter konstanter Infusion von 10 ng/kg KGW Angiotensin II gemessen. Die basale Filtration von Albumin war mit einem GSC_A von $0,0004 \pm 4,8 \cdot 10^{-5}$ (n=26) niedrig und stieg einhergehend mit der durch Angiotensin II vermittelten Blutdruckerhöhung ($99,5 \pm 5,3$ vs. $137,5 \pm 5,7$ mmHg, $p < 0,0001$) um 325% auf $0,0017 \pm 0,00022$ an (n=22, $p < 0,0001$). Unter Infusion von Angiotensin II unterlag der GSC_A einer hohen Variabilität. Wie in Abbildung 25 A gezeigt, reagierten nicht alle untersuchten Glomeruli gleichermaßen stark mit einer Zunahme der Albuminfiltration.

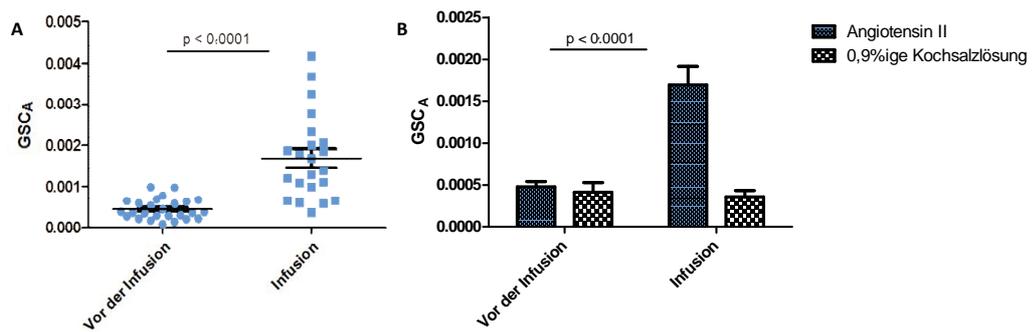


Abbildung 25: Effekte von Angiotensin II auf den glomerulären Siebkoeffizienten von Albumin. A: Einzelne Messdaten des GSC_A basal und unter Infusion von Angiotensin II. B: Durch Kontrollexperimente unter Infusion von physiologischer Kochsalzlösung konnte gezeigt werden, dass der GSC_A keinen zeit- und volumenabhängigen Schwankungen unterliegt.

Um zeit- und volumenabhängige Schwankungen des GSC_A ausschließen zu können, wurden Kontrollexperimente unter Infusion von physiologischer Kochsalzlösung derselben Infusionsrate (0,09 $\mu\text{l/g KGW}/\text{min}$) durchgeführt und der GSC_A innerhalb derselben Zeitintervalle ermittelt. Der mittlere arterielle Blutdruck unterlag während der Versuchszeit keinen signifikanten Schwankungen (105,5 \pm 8,8 vs. 99,9 \pm 7,3 mmHg, n=4). Ebenso konnten für den GSC_A keine Veränderung festgestellt werden (Abbildung 25B).

Der Angiotensin II-vermittelte Anstieg des GSC_A ging ebenso mit einer Zunahme der proximal-tubulären Rückresorption von Albumin einher (Abbildung 26).

Die proximal-tubuläre Rückresorption von Albumin wurde als die Zunahme der basalen Fluoreszenz (Fluoreszenz des proximalen Tubulus unmittelbar nach Injektion des Alexa 594-BSA) in einem Zeitintervall von 45 Minuten nach Start der Infusion quantifiziert. Unter Infusion von Angiotensin II war die proximal-tubuläre Rückresorption von Albumin signifikant höher als unter 0,9%iger Kochsalzinfusion (Anstieg um 518 \pm 29 % vs. 218 \pm 15 % der basalen Fluoreszenz, $p < 0,0001$, n=28). Wenige Minuten nach Beginn der Angiotensin II-Infusion konnte in einigen distal gelegenen proximalen Tubuli eine Einfärbung des Lumens mit filtrierte, rotem Alexa 594-BSA beobachtet werden (Abbildung 27B). Im distalen Konvolut wurde dieser filtrierte Farbstoff aufkonzentriert (Abbildung 27C).

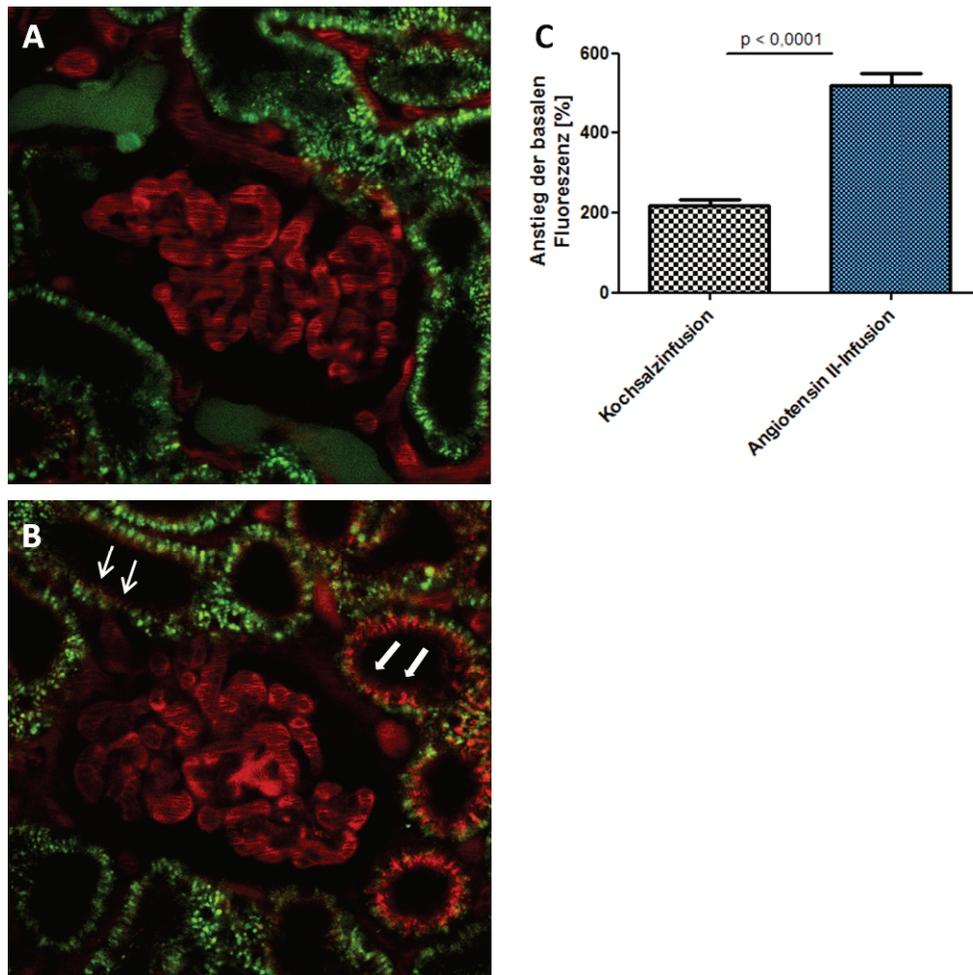


Abbildung 26: Proximal-tubuläre Rückresorption von Albumin während (A) 0,9%iger Kochsalzinfusion und (B) Angiotensin II-Infusion. Infusion von Angiotensin II (B) führte zu einem signifikanten Anstieg der proximal-tubulären Rückresorption von Albumin, die in den früheren Abschnitten des proximalen Tubulus (dicke Pfeile) stärker ausgeprägt war als in den distalen Abschnitten (schmale Pfeile). C: Quantifizierung der proximal-tubulären Rückresorption von Albumin als Anstieg der basalen Fluoreszenz (unmittelbar nach Farbstoff-Injektion) in %.

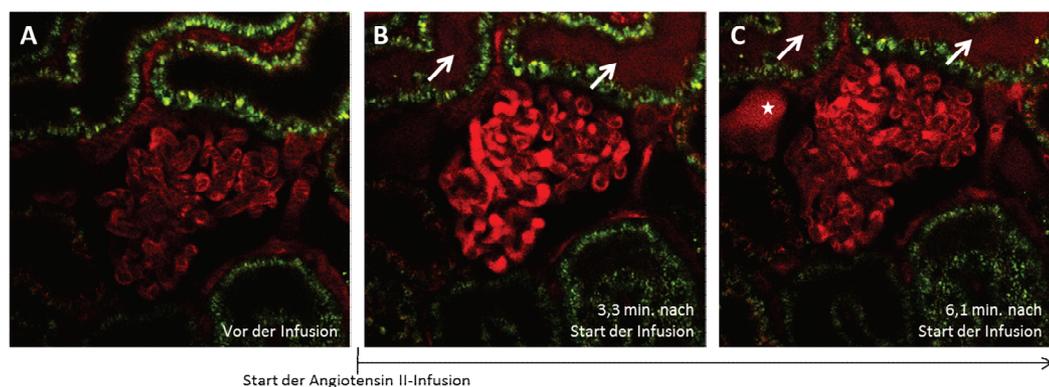


Abbildung 27: Austritt des Alexa 594-BSA in das proximal-tubuläre Lumen unter Infusion von Angiotensin II. A: Glomerulus mit umliegenden proximalen Tubuli vor Beginn der Angiotensin II-Infusion. B: 3,3 Minuten nach Beginn der Infusion färbt sich das Lumen der umliegenden proximalen Tubuli aufgrund des filtrierte Alexa 594-BSA rot (Pfeile). C: Nach sechsminütiger Infusion von Angiotensin II konzentriert sich das filtrierte Alexa 594-BSA im distalen Konvolut auf (Stern).

Um zu überprüfen, ob der signifikante Anstieg des GSC_A durch eine verstärkte proximal-tubuläre Rückresorption des filtrierten Albumins kompensiert werden konnte, wurde die Albuminausscheidung im Urin quantifiziert. Unter Infusion von Angiotensin II erhöhte sich die Urinausscheidung von einem basalen Albumin-Osmolalitäts-Quotient von $0,0013 \pm 0,0003$ auf $0,027 \pm 0,008$ [mg/ml]/[mosmol/kg] um das 20-fache ($p < 0,05$; $n = 5$, Abbildung 28).

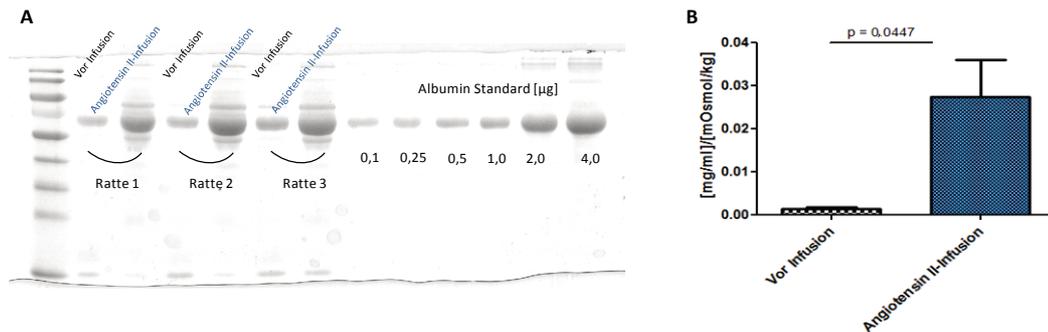


Abbildung 28: Quantifizierung der Albuminausscheidung im Urin. A: SDS-Page-Gel mit den basal und unter Angiotensin II-Infusion gewonnenen Urinproben sowie dem Albumin Standard in folgenden Konzentrationen: 0,1/0,25/0,5/1,0/2,0; und 4,0 µg/µl. Die Albuminbanden wurden durch eine Coomassie Färbung visualisiert und anschließend densitometrisch vermessen. B: Der Albumin-Osmolalitäts-Quotient stieg unter Angiotensin II-Infusion signifikant um das 20-fache an.

Unter Infusion von Angiotensin II nahmen zeit- und volumenunabhängig der GSC_A , die proximal-tubuläre Rückresorption sowie die Albuminausscheidung im Urin zu.

3.2. Akute Effekte von Angiotensin II auf die Einzelnephron-GFR

Da Veränderungen der Einzelnephron-GFR durch Infusion von Angiotensin II das Ausmaß der Albuminfiltration beeinflussen können (Haraldsson et al. 2008), wurde die Einzelnephron-GFR basal und unter Angiotensin II-Infusion ermittelt. Abbildung 29 zeigt die Einzelwerte für die Messungen der glomerulären Filtrationsrate des Einzelnephrons (verbundene Stichproben). Unter Angiotensin II-Infusion reduzierte sich die Einzelnephron-GFR von $17,8 \pm 1,9$ nl/min um 38% auf $11,1 \pm 1,9$ nl/min ($p = 0,008$, $n = 14$).

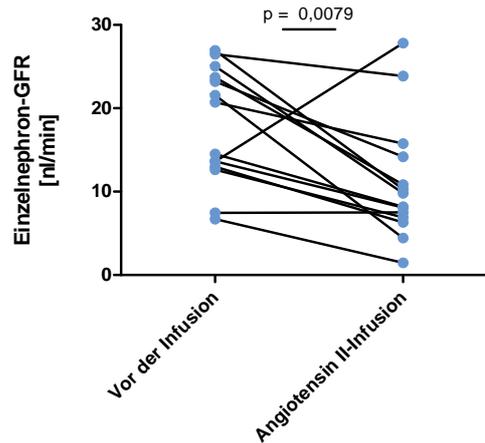


Abbildung 29: Akute Effekte von Angiotensin II auf die Einzelnephron-GFR. Unter Infusion von Angiotensin II sank die Einzelnephron-GFR signifikant ab (gepaarte Beobachtungen).

3.3. Rolle der Angiotensin II-Rezeptoren AT1 und AT2 für den Angiotensin II-vermittelten Anstieg des GSC_A

Da der GSC_A unter Angiotensin II-Infusion zunimmt, sollte in weiteren Experimenten geklärt werden, welche Angiotensin II-Rezeptoren in die Erhöhung der Albuminfiltration involviert sind. Um die Rolle des AT1-Rezeptors zu ermitteln, wurde 25 Minuten nach dem Start der Angiotensin II-Infusion der spezifische AT1-Rezeptor-Antagonist Losartan i.v. appliziert (9,9 $\mu\text{g/g}$ KGW). Die AT1-Blockade führte zu einer signifikanten Reduktion des Blutdrucks (137,5 \pm 5,7 vs. 117,4 \pm 1,9 mmHg nach Applikation von Losartan, $p=0,0206$, $n=5$), senkte diesen jedoch nicht vollständig zurück auf ein basales Level. Die Angiotensin II-vermittelte Erhöhung der Albuminfiltration erholte sich im Gegensatz dazu mit einem GSC_A von 0,00037 \pm 5,8 $\cdot 10^{-5}$ vollständig auf das Ausgangsniveau ($p<0,01$ vs. Angiotensin II, $n=16$, Abbildung 30A).

Die Rolle des AT1-Rezeptors für die glomeruläre Albuminfiltration wurde des Weiteren in Kontrollexperimenten (0,9%iger Kochsalzlösung) unter endogenen Angiotensin II-Konzentrationen untersucht. Nach AT1-Blockade sank der mittlere arterielle Blutdruck von 115 \pm 7,3 mmHg ($n=4$) auf 75 \pm 5 mmHg ($n=4$) ab. Die Ergebnisse für die Untersuchung des GSC_A sind in Abbildung 30A dargestellt. Es konnten keine Änderungen in der Albuminfiltration festgestellt werden ($n=15$).

Um mögliche irreversible Effekte von Angiotensin II auf die Albuminfiltration ausschließen zu können, wurde die Rolle des AT1-Rezeptors in einem zweiten Versuchsansatz untersucht. Nach basaler Ermittlung des GSC_A wurde Losartan (9,9 $\mu\text{g/g}$ KGW) unmittelbar vor dem Start der Angiotensin II-Infusion injiziert.

Nach vorangegangener Blockierung des AT1-Rezeptors, konnten unter Angiotensin II-Infusion keine Änderungen im mittleren arteriellen Blutdruck und im GSC_A festgestellt werden (n=10, Abbildung 30B).

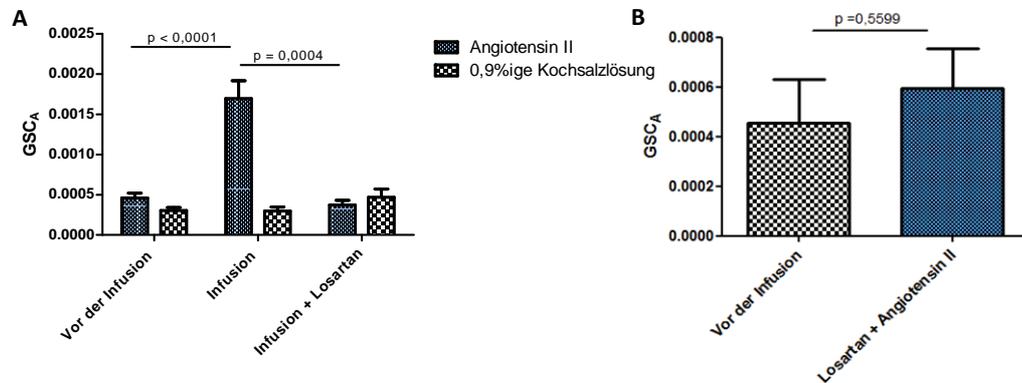


Abbildung 30: Effekte des AT1-Rezeptor-Antagonisten Losartan (0,9 µg/g KGW) auf die Filtration von Albumin. A: Injektion von Losartan nach Start der Angiotensin II-Infusion. Kontrollexperimente wurden unter Infusion von physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. B: Injektion von Losartan vor dem Start der Angiotensin II-Infusion.

Um die Rolle des AT2-Rezeptors in der Angiotensin II-vermittelten Erhöhung der Albuminfiltration zu untersuchen, wurde PD123319, ein spezifischer AT2-Rezeptor-Antagonist, verwendet. Nach basaler Ermittlung des GSC_A wurde PD123319 (3 µg/g KGW) unmittelbar vor dem Start der Angiotensin II-Infusion i.v. appliziert und der GSC_A erneut bestimmt. Während der Infusion von Angiotensin II unter AT2-Blockade konnten keine Unterschiede der Angiotensin II-vermittelten Blutdruckeffekte zu Experimenten ohne PD123319 festgestellt werden (106,4±3,3 mmHg basal vs. 135,9±6,2 mmHg unter Angiotensin II, n=5). Der GSC_A stieg vom Ausgangswert $0,0005±3,3·10^{-5}$ (n=24) auf $0,0018±0,00035$ (n=23, p=0,0004 im Vergleich zu basal). Dieser Befund war vergleichbar mit dem Anstieg des GSC_A in Abwesenheit von PD123319 (Abbildung 31A).

Des Weiteren sollten AT1-Rezeptor-unabhängige Effekte von Angiotensin II auf die Erhöhung der Albuminfiltration aufgedeckt werden. Hierfür wurde im Anschluss an die AT2-Blockade Losartan injiziert. Die Blockade des AT1-Rezeptors unter Anwesenheit von PD123319 führte zu einer Reduktion des GSC_A von $0,0018±0,00035$ (n=23) auf $0,00115±0,00015$ (n=22). Dieser Wert ist signifikant höher als unter AT1-Blockade in Abwesenheit von PD123319. In Abwesenheit von PD123319 erholte sich der GSC_A nach der Injektion von Losartan mit einem Wert von $0,00037±5,8·10^{-5}$ (n=16) auf das Ausgangsniveau. Eine zeitgleiche Blockade des AT2-Rezeptors jedoch konnte die Angiotensin II-

vermittelte Erhöhung der Albuminfiltration lediglich auf einen mittleren GSC_A von $0,00115 \pm 0,0015$ ($n=22$) senken ($p=0,0014$; Abbildung 31A).

In Kontrollexperimenten unter Infusion von physiologischer Kochsalzlösung wurde die Rolle des AT2-Rezeptors für die Albuminfiltration unter endogenen Angiotensin II-Konzentrationen analysiert. Die AT2-Blockade durch PD123313 erfolgte nach basaler Evaluierung des GSC_A unmittelbar vor dem Start der Kochsalzinfusion. Durch Injektion von PD123319 erhöhte sich der GSC_A von $0,00052 \pm 3,6 \cdot 10^{-5}$ ($n=19$) auf $0,00074 \pm 8,2 \cdot 10^{-5}$ ($n=21$, $p=0,021$; Abbildung 31B), bei unverändertem mittleren arteriellen Blutdruck.

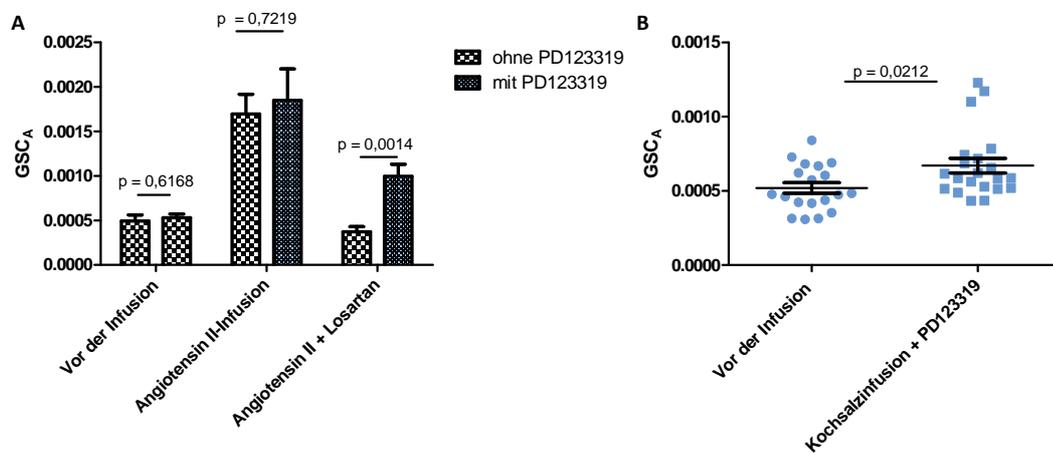


Abbildung 31: Effekte des AT2-Rezeptor-Antagonisten PD123319 (3 $\mu\text{g/g}$ KGW) auf die Filtration von Albumin. A: Messungen des GSC_A basal, unter Infusion von Angiotensin II sowie unter Angiotensin II-Infusion während AT1-Rezeptor-Blockade. Der Graph zeigt die Werte des GSC_A mit und ohne Präsenz von PD123319. B: Effekte einer AT2-Rezeptor-Blockade unter endogenen Angiotensin II-Konzentrationen, während einer Kochsalzinfusion.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die beiden Angiotensin II-Rezeptoren AT1 und AT2 gegenläufige Effekte auf die Filtration von Albumin ausüben. Eine Aktivierung des AT1-Rezeptors führt zu einer Erhöhung des GSC_A , wohingegen eine Aktivierung des AT2-Rezeptors den GSC_A zu senken scheint.

3.4. Rolle des renalen Perfusionsdrucks für den durch Angiotensin II-vermittelten Anstieg der Albuminfiltration

Unter Infusion von Angiotensin II kam es zu einem signifikanten Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks, welcher einen erhöhten renalen Perfusionsdruck nach sich zog. Daher sollte nun die Rolle des arteriellen Drucks für die durch Angiotensin II-vermittelte Erhöhung des GSC_A untersucht werden.

Dies erfolgte zunächst in Form einer Korrelationsstudie. Hierfür wurden die Werte des GSC_A gegen die des mittleren arteriellen Blutdrucks aufgetragen, der zum Zeitpunkt der Messung beim Versuchstier erfasst wurde (Abbildung 32). Nach Berechnung der linearen Regression dieser Datenpunkte konnte eine schwache, jedoch signifikante Korrelation zwischen dem GSC_A und dem Blutdruck festgestellt werden ($r^2=0,2638$, $p<0,001$)

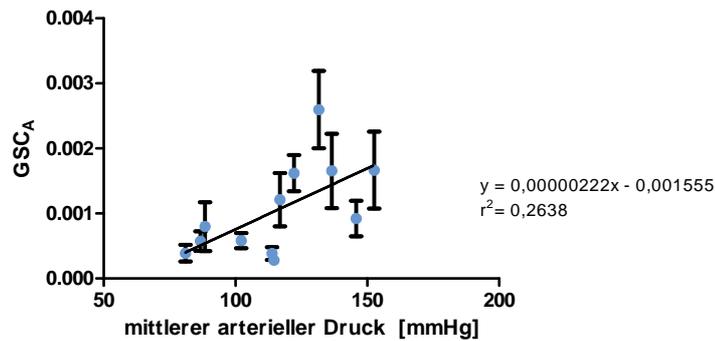


Abbildung 32: Korrelationsstudie des mittleren arteriellen Blutdrucks und des GSC_A . Beim Auftragen der Werte für den GSC_A gegen die korrespondierenden Werte für den mittleren arteriellen Blutdruck, konnte eine schwache, jedoch signifikante Korrelation der beiden Variablen beobachtet werden.

Aufgrund der nur schwachen Korrelation des GSC_A mit dem mittleren arteriellen Blutdruck wurde vermutet, dass die Zunahme des GSC_A nicht allein auf die Erhöhung des Blutdrucks unter Angiotensin II zurückgeführt werden kann. Um diese Hypothese zu klären, wurde der renale Perfusionsdruck in zwei Versuchsansätzen mechanisch manipuliert.

Proximal der Abzweigung der A. renalis wurde um die Aorta abdominalis eine Fadenschlinge implantiert, welche bei der Ausübung eines Zuges den Blutzufluss proximal stark reduzieren konnte (Abbildung 12). Im ersten Experiment wurde nach der basalen Ermittlung des GSC_A die Angiotensin II-Infusion gestartet und der GSC_A zunächst ohne Manipulation des renalen Perfusionsdrucks erneut bestimmt. Begleitet von einem Anstieg des Blutdrucks, welcher in der Femoralarterie gemessen wurde ($102,3\pm 2,3$ mmHg vs. $135,7\pm 2,1$ mmHg, $n=3$), erhöhte sich der mittlere GSC_A signifikant von $0,00051\pm 7,3\cdot 10^{-5}$ ($n=7$) auf $0,0022\pm 0,00062$, ($p<0,01$, $n=7$) unter Angiotensin II. Im Anschluss wurden die druckunabhängigen Effekte von Angiotensin II auf die Albuminfiltration ermittelt, indem ein Zug auf die Schlinge ausgeübt und der GSC_A erneut gemessen wurde. Der auf die Fadenschlinge ausgeübte Zug reduzierte den mittleren arteriellen Druck auf annähernd Ausgangsniveau ($135,7\pm 2,1$ mmHg vs.

107,5±2,7 mmHg, n=3). Trotz des normalisierten Perfusionsdrucks konnte die Angiotensin II-vermittelte Erhöhung der Albuminfiltration nicht gesenkt werden. Der ermittelte GSC_A von $0,0023\pm 0,00044$ (n=7) befand sich auf demselben Niveau wie vor der stenotischen Reduktion des renalen Perfusionsdrucks unter Angiotensin II (p=0,87, Abbildung 33).

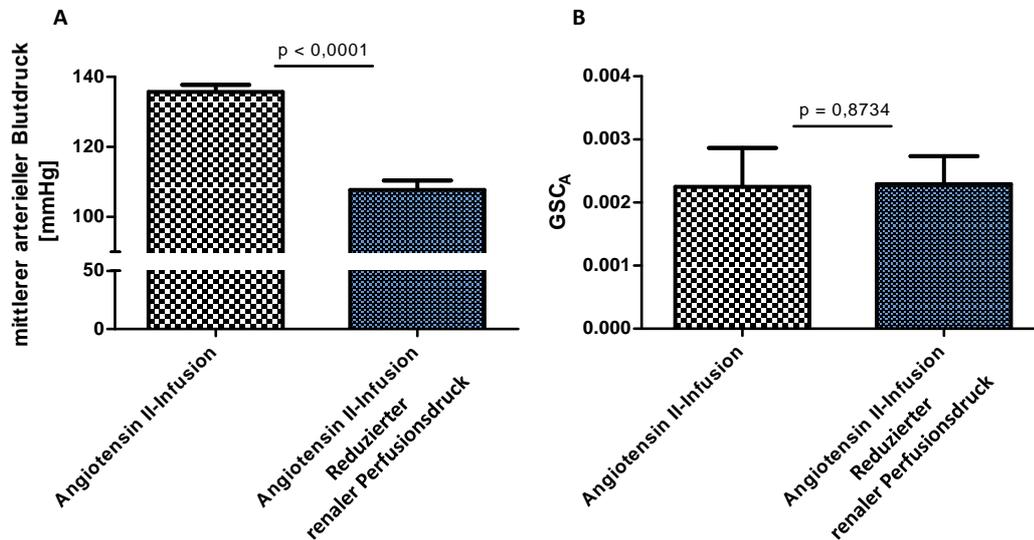


Abbildung 33: Effekte des mechanisch manipulierten renalen Perfusionsdrucks auf den mittleren arteriellen Blutdruck und den GSC_A unter Angiotensin II-Infusion. Nach der Ermittlung des GSC_A und des mittleren arteriellen Blutdrucks unter Angiotensin II-Infusion, wurde der renale Perfusionsdruck durch das Ziehen an der Fadenschlinge mechanisch reduziert. Dies führte zu einer Normalisierung des mittleren arteriellen Blutdrucks auf das Ausgangsniveau zurück (A), wohingegen der GSC_A weiterhin den erhöhten Level aufwies (B).

Um mögliche irreversible Effekte eines zeitweise erhöhten arteriellen Blutdrucks auf die glomeruläre Albuminfiltration ausschließen zu können, wurde ein zweites Versuchsprotokoll evaluiert. Nach basaler Ermittlung des GSC_A wurde zeitgleich mit dem Start der Angiotensin II-Infusion ein zunehmender Zug auf die Fadenschlinge ausgeübt und somit ein Angiotensin II-vermittelter Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks während des gesamten Versuchs vollständig unterbunden. Wie die Abbildung 34A zeigt, konnte der in der Femoralarterie gemessene mittlere arterielle Blutdruck über den Verlauf des Versuchs konstant gehalten werden. Trotz des fehlenden Anstiegs des renalen Perfusionsdrucks nach Angiotensin II-Infusion erhöhte sich jedoch der GSC_A von $0,0007\pm 0,00019$ (n=9) auf $0,0025\pm 0,00063$ (n=9, $p < 0,05$; Abbildung 34B).

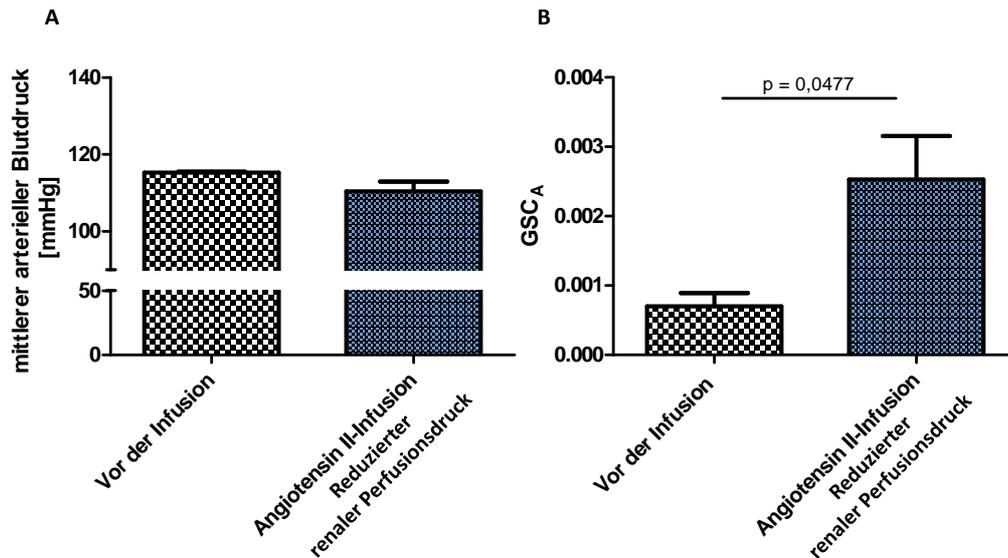


Abbildung 34: Blutdruckunabhängige Effekte von Angiotensin II auf die Albuminfiltration. A: Mittlerer arterieller Blutdruck vor der Infusion sowie während der Angiotensin II-Infusion mit zeitgleicher mechanischer Reduktion des Blutdrucks. Durch Zugausübung an der Aortenschlinge konnte der mittlere arterielle Blutdruck unter Angiotensin II-Infusion konstant gehalten werden. B: Trotz des fehlenden Blutdruckerstiegs unter Angiotensin II-Infusion stieg die glomeruläre Albuminfiltration signifikant an.

Somit erhöht Angiotensin II die Albuminfiltration weitgehend unabhängig vom renalen Perfusionsdruck.

4. Akute Effekte von Angiotensin II auf die podozytäre Proteinendozytose

Die funktionelle Zusammensetzung der glomerulären Filtrationsbarriere beziehungsweise deren Einfluss auf die Größenselektivität, wird in verschiedenen Modellen kontrovers diskutiert. Nach der traditionellen Sichtweise des Tryggvason-Modells besteht die Filtrationsbarriere aus einer Aneinanderreihung einzelner Filter mit zunehmender Größenselektivität und die Filtration von Proteinen wird primär durch die Podozytenfortsätze limitiert (Karnovsky und Ainsworth 1972). Als Konsequenz müsste langfristig der subpodozytäre Raum mit Proteinen verstopfen, die zwar die glomeruläre Basalmembran überwinden konnten, jedoch von den Fußfortsätzen der Podozyten zurückgehalten wurden. Selbst nach einem alternativen Modell von Smithies, das die glomeruläre Basalmembran als den entscheidenden größenselektiven Filter definiert, gelangen dennoch signifikante Mengen an filtrierte Proteinen, wie Albumin, IgG oder Ferritin, in den subpodozytären Raum (Smithies 2003, Huber 2008). Unklar ist weitgehend, wie eine Verstopfung des Filters langfristig verhindert werden kann.

Eine beschriebene Hypothese ist die podozytäre Endozytose dieser filtrierte Proteine (Huber 2008).

Da die glomeruläre Albuminfiltration unter chronischem sowie akutem Einfluss von Angiotensin II zunimmt, wurde die Hypothese geprüft, ob Angiotensin II ebenfalls eine podozytäre Endozytose des filtrierte Proteins stimulieren könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von einer akuten Angiotensin II-Exposition in unterschiedlichen Dosen auf die Endozytose von Proteinen in Podozyten untersucht.

4.1. Akute Effekte von Angiotensin II auf die podozytäre Endozytose von Rhodamin B-gefärbten Plasmaproteinen

Um eine mögliche podozytäre Endozytose von Proteinen unter Infusion von Angiotensin II zu untersuchen, wurde zunächst Rhodamin B verwendet. Der niedermolekulare Farbstoff Rhodamin B bindet an Plasmaproteine und wird somit nur geringfügig filtrierte.

Die akuten Effekte von Angiotensin II auf die podozytäre Endozytose von Rhodamin B-gefärbten Plasmaproteinen wurden zunächst durch die Ermittlung von Dosis-Wirkungsbeziehungen mit den Angiotensin II-Dosen 0, 10, 30, 60 und 80 ng/kg KGW/min bestimmt. Dabei stieg der Blutdruck von $105,8 \pm 4,6$ mmHg ($n=3$) auf $110,9 \pm 5,4$ mmHg ($n=3$, $p=0,0359$); $117,9 \pm 7,7$ mmHg ($n=3$, $p=0,0651$); $129,7 \pm 9,1$ mmHg ($n=3$, $p=0,0432$) und $142,6 \pm 8,3$ mmHg ($n=3$; $p=0,022$) unter Infusion der aufsteigenden Angiotensin II-Dosen an.

In sehr geringen Mengen von nur $3,2 \pm 1,9 \mu\text{m}^3$ pro Glomerulus konnten basal kleine rot-grün-fluoreszierende endozytotische Vesikel in den Podozyten detektiert werden. Zur Negativ-Darstellung der Podozyten wurde Lucifer Yellow, ein grün-fluoreszierender, frei filtrierbarer Farbstoff dauerinfundiert (Abbildung 36). Eine grüne Fluoreszenz in den endozytotischen Vesikeln lässt vermuten, dass neben den endozytierten Plasmaproteinen auch das durch Lucifer Yellow gefärbte Fluid aus dem subpodozytären Raum in die Vesikel aufgenommen wurde. Sie wurden deswegen als „Fluid-haltige Vesikel“ bezeichnet.

Unter Angiotensin II-Infusion konnte für die Dosen 10, 30, 60 und 80 ng/kg KGW/min folgende Volumina für die vorkommenden Endozytosevesikel ermittelt werden: $2,6 \pm 1,8 \mu\text{m}^3$ ($n=13$), $5,4 \pm 3,2 \mu\text{m}^3$ ($n=13$), $31,72 \pm 10,25 \mu\text{m}^3$ ($n=13$, $p=0,018$) und $287,0 \pm 49,1 \mu\text{m}^3$ ($n=13$, $p < 0,0001$). Wie in Abbildung 35 gezeigt,

stieg das Volumen der Fluid-haltigen endozytotischen Vesikel unter Angiotensin II-Infusion von 60 ng/kg KGW/min geringfügig an und erhöhte sich um etwa das Neunzigfache des basalen Wertes unter Infusion von 80 ng/kg KGW/min.

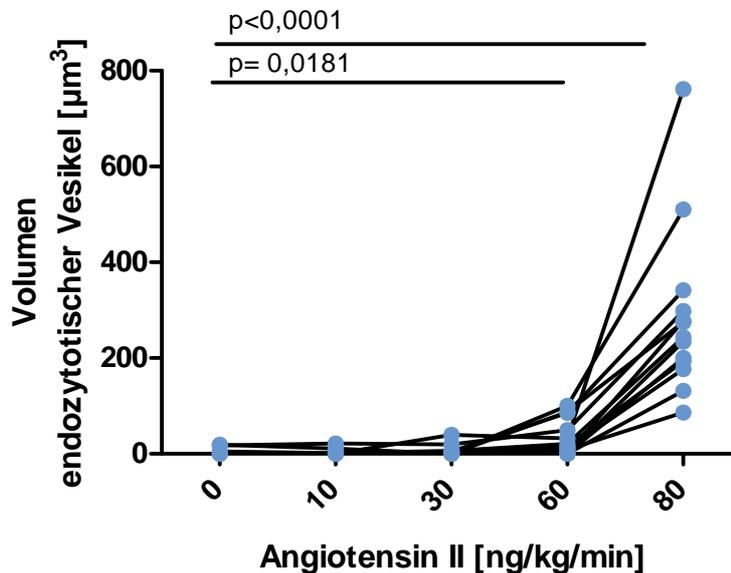


Abbildung 35: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Angiotensin II und dem Ausmaß podozytärer Endozytose von Rhodamin B-gefärbten Plasmaproteinen. Signifikantes Auftreten von Fluid-haltigen Endozytosevesikel konnte ab einer Angiotensin II-Konzentration von 60 ng/kg KGW/min festgestellt werden. Das Auftreten podozytärer Endozytose stieg bei Infusion von 80 ng/kg KGW/min Angiotensin II rapide an.

Um zu überprüfen, ob das Erscheinen von Fluid-haltigen endozytotischen Vesikeln unter Angiotensin II zeit- oder volumenabhängig ist, wurden Kontrollversuche unter Infusion von physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen. Während der Kochsalzinfusion konnten weder Schwankungen des mittleren arteriellen Blutdrucks, noch ein signifikanter Anstieg des Volumens von Fluid-haltigen endozytotischen Vesikeln in Podozyten festgestellt werden. Die Mittelwerte der quantifizierten Volumina für die detektierten endozytotischen Vesikel waren $5,5 \pm 4,5 \mu\text{m}^3$ (n=10); $4,9 \pm 1,9 \mu\text{m}^3$ (n=10); $3,2 \pm 1,7 \mu\text{m}^3$ (n=10); $0,0 \mu\text{m}^3$ (n=10) und $0,0 \mu\text{m}^3$ (n=10) für eine 0,9%ige Kochsalzinfusion entsprechend der Zeitpunkte und Volumina einer Angiotensin II-Infusion von 0, 10, 30, 60 und 80 ng/kg KGW/min.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ab einer Angiotensin II-Infusion von 60 ng/kg KGW/min ein signifikanter Anstieg des Volumens Fluid-haltiger Endozytosevesikel in Podozyten festgestellt werden konnte. Ab einer Infusion von 80 ng/kg KGW/min war ein deutlicher Anstieg des Volumens auf das Neunzigfache des Ausgangswertes sichtbar. Unter Kontrollbedingungen

konnten keine signifikanten Mengen von endozytotischen Vesikeln in Podozyten festgestellt werden.

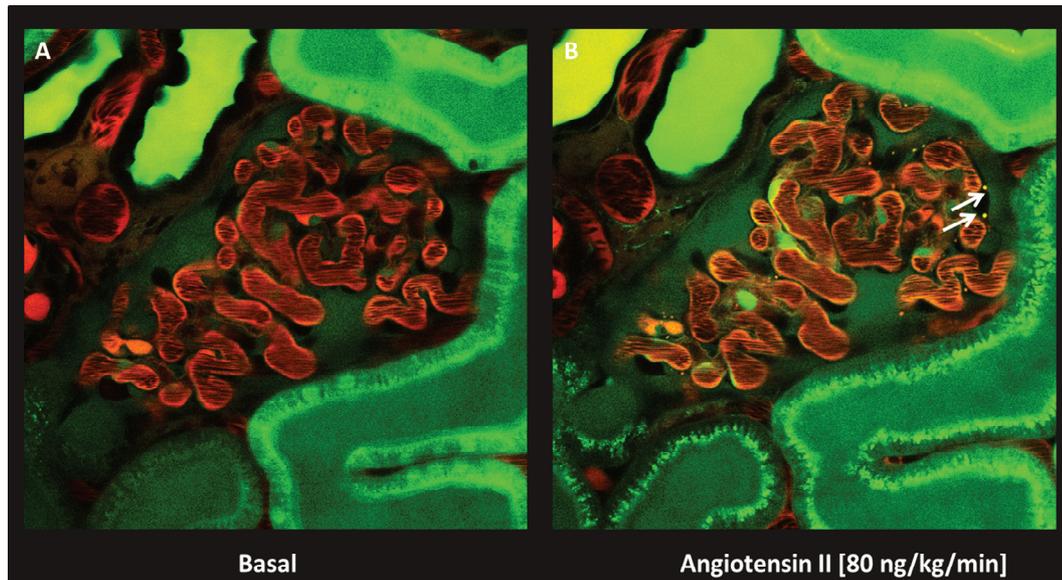


Abbildung 36: Fluid-haltige endozytotische Vesikel in Podozyten mit Rhodamin B-gefärbten Plasmaproteinen. A: Glomerulus vor der Angiotensin II-Infusion. Unter einer Dauerinfusion von Lucifer Yellow wurden die Podozyten durch Negativ-Darstellung visualisiert. Es sind keine endozytotischen Vesikel sichtbar. B: Unter Infusion von 80 ng/kg KGW/min Angiotensin II sind zahlreiche Fluid-gefüllten Vesikel sichtbar (Pfeile).

4.2. Akute Effekte von Angiotensin II auf die podozytäre Endozytose von Albumin

Um die beobachtete Endozytose von Rhodamin B-gefärbten Plasmaproteinen weiter zu charakterisieren, wurden Versuche unter Verwendung von Alexa 594-BSA durchgeführt. Dies bot die Möglichkeit zu untersuchen, ob die beobachtete podozytäre Endozytose von Plasmaproteinen auch Albumin betrifft.

4.2.1. Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Angiotensin II und podozytärer Endozytose von Albumin

Um die akuten Effekte von Angiotensin II auf die Endozytose von Albumin in Podozyten zu untersuchen, wurden die Dosis-Wirkungsbeziehungen für folgende Angiotensin II-Konzentrationen ermittelt: 0, 10, 30, 60 und 80 ng/kg KGW/min. Dabei stieg der mittlere arterielle Blutdruck von $99,1 \pm 5,8$ mmHg ($n=4$) unter Basalbedingungen für die aufsteigenden Angiotensin II-Dosen auf $109,3 \pm 2,9$ mmHg ($n=4$); $116,4 \pm 4,6$ mmHg ($n=4$, $p=0,0385$); $122,2 \pm 6,5$ mmHg ($n=4$, $p=0,0033$) und $135,3 \pm 4,1$ mmHg ($n=4$, $p=0,0056$). Nach Generierung von Z-Stapeln der untersuchten Glomeruli, basal sowie unter Infusion der aufsteigenden

Angiotensin II-Konzentrationen, wurde das Gesamtvolumen der endozytotischen Vesikel aus insgesamt zehn Bildern pro Glomerulus und Zeitpunkt quantifiziert.

Bei der Verwendung von Alexa 594-BSA konnten unter Infusion von Angiotensin II grundsätzlich zwei verschiedene Formen podozytärer Endozytose beobachtet werden. Differenziert wurden die beiden unterschiedlichen Formen anhand des Vorhandenseins von filtriertem Lucifer Yellow in den endozytotischen Vesikeln. Um die Podozyten durch Negativ-Darstellung visualisieren zu können, wurde der grüne Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow als Dauerinfusion infundiert. Die Existenz grüner Fluoreszenz in den Vesikeln ließ darauf schließen, dass die Vesikel in den Podozyten neben Alexa 594-BSA ebenfalls Lucifer Yellow-gefärbtes Fluid aufnahmen, welches aus den Kapillaren in den subpodozytären Raum filtriert wurde. Bei den Experimenten mit Alexa 594-BSA wurden sowohl Fluid-haltige als auch nicht-Fluid-haltige endozytotische Vesikel beobachtet.

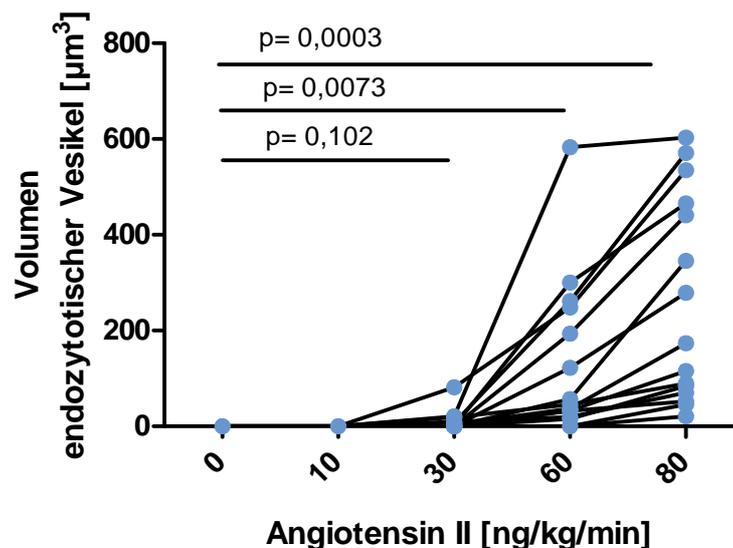


Abbildung 37: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Angiotensin II und dem Ausmaß Fluid-haltiger podozytärer Endozytose von Albumin. Endozytotische Vesikel konnten vereinzelt ab einer Infusion von 30 ng/kg KGW/min und signifikant ab 60 ng/kg KGW/min Angiotensin II festgestellt werden.

Abbildung 37 zeigt die einzelnen Messdatenpunkte der Quantifizierung der Fluid-haltigen Endozytosevesikel in Podozyten. Basal konnten keine Fluid-haltigen endozytotischen Vesikel detektiert werden (n=16). Eine podozytäre Endozytose von Albumin konnte vereinzelt bereits ab einer Dosis von 30 ng/kg KGW/min festgestellt werden. Ab einer Infusionsrate von 60 ng/kg KGW/min stieg das Vorkommnis von Fluid-haltigen endozytotischen Vesikeln signifikant auf

130,0±41,9 μm^3 an (n= 15, p=0,0073). Unter Infusion von 80 ng/kg KGW/min wurde ein weiterer Anstieg auf 259,5±55,3 μm^3 (n=15, p=0,0003) festgestellt.

Abbildung 38 zeigt eines der untersuchten Glomeruli basal und unter Infusion von 80 ng/kg KGW/min Angiotensin II. Basal konnten keine Fluid-haltigen Vesikel detektiert werden. Unter Infusion von Angiotensin II waren deutliche Vesikel in grün-rötlicher Farbe und variierender Größe in zahlreichen Podozyten erkennbar.

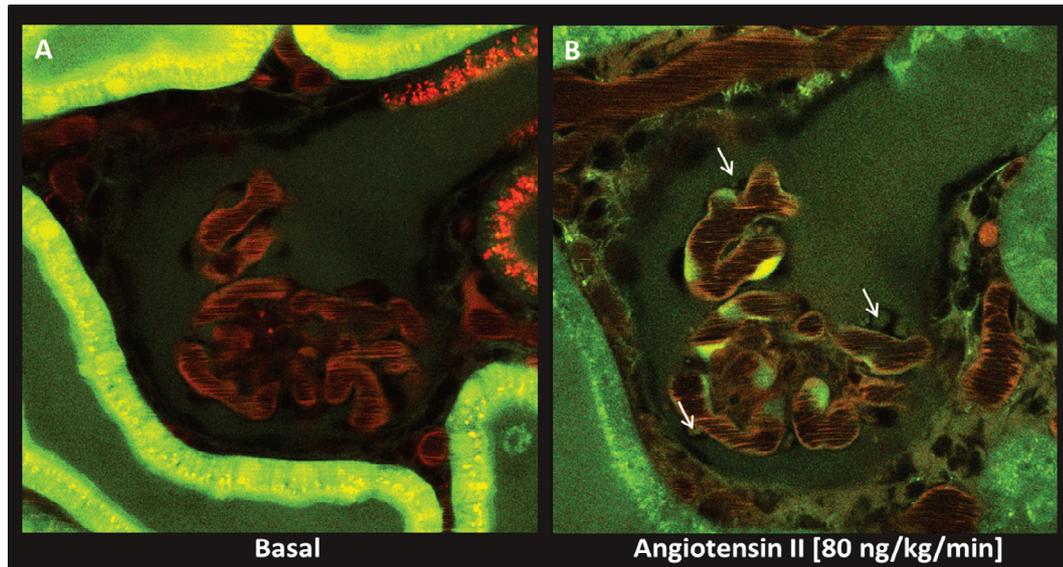


Abbildung 38: Fluid-haltige podozytäre Endozytosevesikel mit Alexa 594-BSA unter Infusion von Angiotensin II. A: Basal konnten keine Fluid-haltigen Endozytosevesikel in den Podozyten festgestellt werden. B: Unter Infusion von 80 ng/kg KGW/min wurden deutlich ausgeprägte endozytotische Vesikel in den Podozyten nachgewiesen (Pfeile).

Um mögliche zeit- und volumenabhängige Effekte zu klären, wurden Kontrollexperimente unter Infusion von physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. Der mittlere arterielle Blutdruck blieb im Laufe des Versuchs konstant und es entstanden keine Fluid-haltigen Vesikel.

Unter Verwendung von Alexa 594-BSA wurde neben den unter Angiotensin II-Infusion ubiquitär auftretenden Fluid-gefüllten Vesikeln, eine zweite Form der Endozytose detektiert. Es handelte sich dabei um rote, endozytotische Vesikel, in denen kein grüner Fluoreszenzfarbstoff detektiert wurde. Diese nicht-Fluid-gefüllten Vesikel waren bereits basal in Form von Nestern in vereinzelt Podozyten nachweisbar (Abbildung 40). Unter Infusion von Angiotensin II stieg das Vesikelvolumen der Nester signifikant von basalen 55,53±19,9 μm^3 (n=16) auf 130,4±37,3 μm^3 (n=16), 166,8±38,5 μm^3 (n=16), 184,9±45,9 μm^3 (n=15) und 216,1±57,2 μm^3 (n=14) für die Dosen 10, 30, 60 und 80 ng/kg KGW/min an (p-Werte: 0,0009; 0,0002; 0,0004 und 0,0011), (Abbildung 39).

In Kontrollversuchen unter Infusion einer physiologischen Kochsalzlösung wurde überprüft, ob die bereits basal vorhandenen Nester nicht-Fluid-gefüllter Vesikel in Abhängigkeit der Zeit einem Angiotensin II-unabhängigen Wachstum ausgesetzt sind. Unter 0,9%iger Kochsalzinfusion nahm das Vesikelvolumen von $17,4 \pm 5,8 \mu\text{m}^3$ (n=14) auf $41,6 \pm 7,6 \mu\text{m}^3$ (n=14), $47,5 \pm 9,2 \mu\text{m}^3$ (n=14), $59,0 \pm 11,5 \mu\text{m}^3$ (n=14) und $66,6 \pm 11,8 \mu\text{m}^3$ (n=13) für die Kochsalzinfusion entsprechend der Zeitpunkte und Volumina für Angiotensin II-Dosen von 10, 30, 60 und 80 ng/kg KGW/min zu (p-Werte: 0,0002; 0,0004; 0,0001 und $<0,0001$; Abbildung 39).

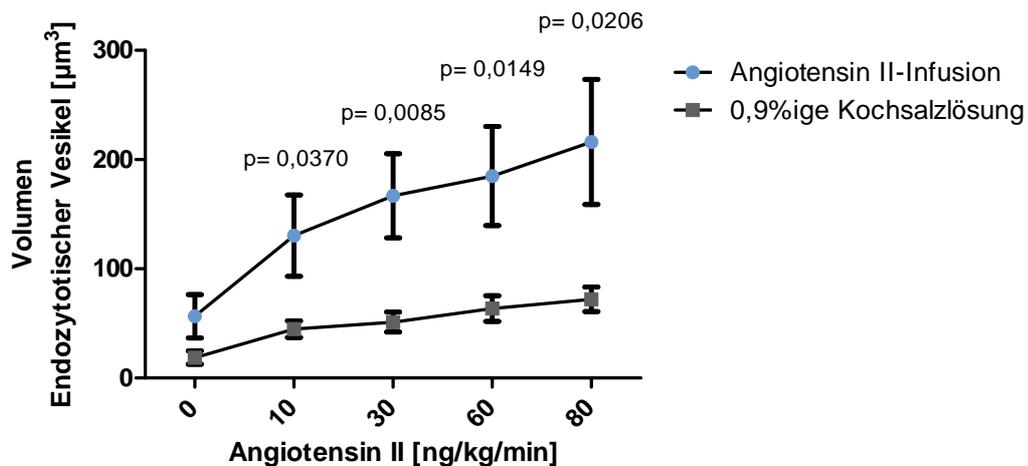


Abbildung 39: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Angiotensin II und dem Auftreten von nicht-Fluid-gefüllten endozytotischen Vesikeln in Podozyten. Während der Infusion von Angiotensin II wurde für alle untersuchten Konzentrationen ein signifikant höheres Vorkommen von Endozytose beobachtet als unter Kontrollbedingungen (p-Werte beziehen sich auf den Unterschied zwischen Kochsalz- und Angiotensin II-Infusion.)

Die zeitabhängige Zunahme des Vesikelvolumens unter Kontrollbedingungen war jedoch zu allen Zeitpunkten signifikant niedriger als die Vesikelvolumina, die unter Infusion von Angiotensin II bestimmt wurden (Abbildung 39).

Zusammenfassend konnten unter Infusion von ansteigenden Angiotensin II-Dosen zwei verschiedene Formen von podozytärer Proteinendozytose festgestellt werden. Zeit- und volumenunabhängig konnte vereinzelt ab einer Konzentration von 30 ng/kg KGW/min das Auftreten Fluid-haltiger Endozytosevesikel in Podozyten beobachtet werden. Ab einer Infusion von 60 ng/kg KGW/min Angiotensin II stieg das Gesamtvolumen der Vesikel in den untersuchten Arealen signifikant an. Die Vesikel waren ubiquitär und in unterschiedlicher Größe in den Podozyten vorhanden und zeigten die grüne Fluoreszenz des aufgenommenen Lucifer Yellow. Daneben konnte eine zweite Form der podozytären Proteinendozytose festgestellt werden. Diese nicht-Fluid-gefüllten

endozytotischen Vesikel zeigten keine grüne Fluoreszenz, nahmen demnach kein Lucifer Yellow auf und waren generell klein (Abbildung 40). Im Gegensatz zu den Fluid-gefüllten endozytotischen Vesikel traten sie nur in vereinzelt Podozyten in Form von Nestern auf und waren bereits unter Basalbedingungen vorhanden. Das Volumen der Vesikelnester nahm unter Angiotensin II-Infusion zu.

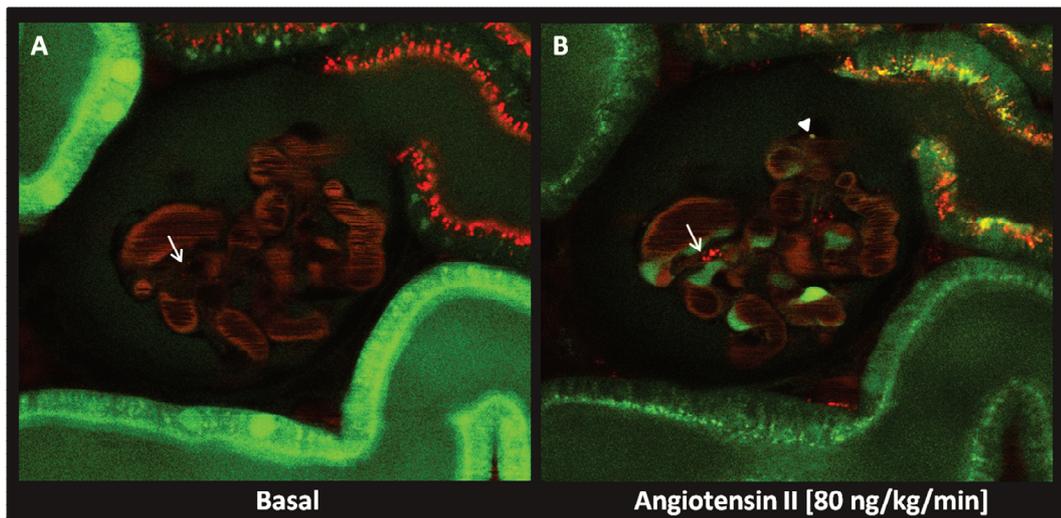


Abbildung 40: Nicht-Fluid-gefüllte podozytäre Endozytose basal und unter Infusion von 80 ng/kg KGW /min Angiotensin II. A: Nicht-Fluid-gefüllte Vesikel waren bereits basal in wenigen Podozyten, jedoch nicht ubiquitär lokalisiert sichtbar (Pfeil). B: Unter Infusion von Angiotensin II nahm die Intensität in den bereits basal vorhandenen Vesikelnestern drastisch zu (Pfeil). Zusätzlich kam es zur Entstehung von Fluid-gefüllten endozytotischen Vesikeln (Dreieck).

4.2.2. Angiotensin II-vermittelte Transzytose von Albumin durch Podozyten

Nachdem die Bildung von Fluid-haltigen endozytotischen Vesikeln während einer Angiotensin II-Infusion in Podozyten detektiert wurde, stellte sich die Frage nach dem Verbleib dieser proteinenthaltenden Vesikel. Aus diesem Grund wurden im Anschluss an die Dosis-Wirkungsexperimente mit Alexa 594-BSA Zeitserien von Z-Stapeln eines Glomerulus generiert, dessen Podozyten endozytotische Vesikel aufwiesen. Somit sollten Größenveränderungen sowie Veränderungen in der Lokalisation der Vesikel über die Zeit verfolgt werden.

Wie in

Abbildung 42 und Abbildung 41 verdeutlicht konnte ein massives Wachstum der Alexa 594-BSA-enthaltenden Vesikel mit einer Veränderung der Lokalisation im Podozyten festgestellt werden. Die Bildung der Vesikel war überwiegend mittig bis nahe des subpodozytären Raums zu beobachten, die Lokalisation der Vesikel

änderte sich jedoch bei gleichzeitiger Größenzunahme. Zu späteren Zeitpunkten fanden sich die podozytären, Fluid-haltigen Vesikel vermehrt auf der Seite des Harnraums. Dort konnte in einigen Fällen eine weitere Vergrößerung der Vesikel unter Vorwölbung in den Harnraum beobachtet werden. Schlussendlich wurde das Alexa 594-BSA enthaltende Fluid der Vesikel unter Angiotensin II-Infusion von 80 ng/kg KGW/min nach $111,4 \pm 4,6$ min. (n=3) durch Exozytose in den Harnraum abgegeben.

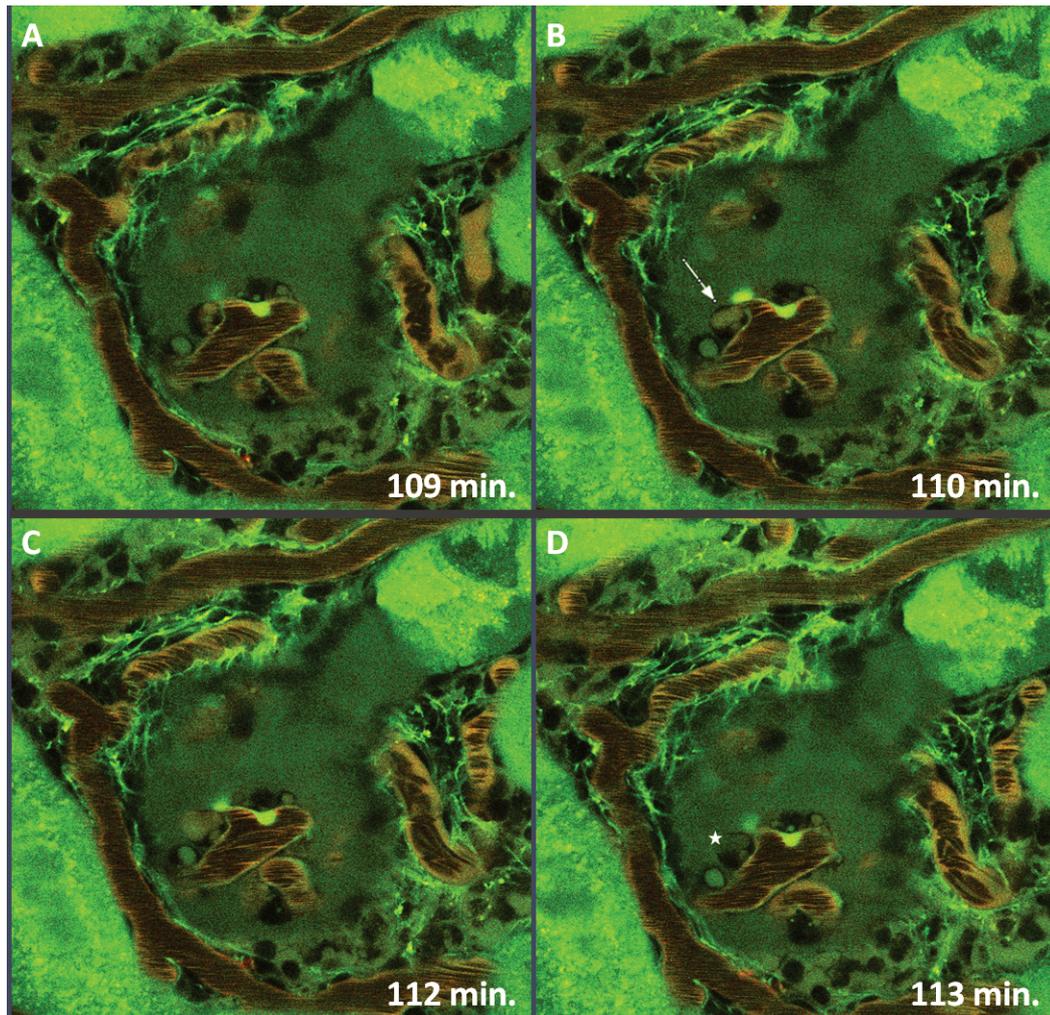


Abbildung 41: Transzytose von Alexa 594-BSA durch Podozyten (D). A-D zeigen Ausschnitte gleicher Tiefenebene aus einer 3D-Zeitserie eines Glomerulus unter Infusion von 80 ng/kg KGW/min Angiotensin II. Die Zeitangaben unten rechts stehen für die Gesamtlänge der Angiotensin II-Exposition zum Zeitpunkt der Bildaufnahme. Alexa 594-BSA enthaltende endozytotische Vesikel wuchsen im Podozyt an (A). Im Podozyt konnte eine Veränderung der Polarität des Vesikels zum an den Harnraum grenzenden Rand der Zelle festgestellt werden (B) und nachfolgend eine Vorwölbung des Vesikels in den Harnraum (C). Schließlich erfolgte die Exozytose (Stern) des vom Podozyten aufgenommenen Alexa 594-BSA aus der Zelle in den Harnraum (D).

Unter Angiotensin II-Infusion konnte zunächst die Endozytose von Alexa 594-BSA beobachtet werden, welches dann unter Wachstum und

Polaritätsveränderung der Vesikel im Podozyten durch Exozytose in den Harnraum abgegeben wurde. In den subpodozytären Raum filtrierte Alexa 594-BSA konnte also über Transzytose durch Podozyten in den Harnraum transportiert werden.

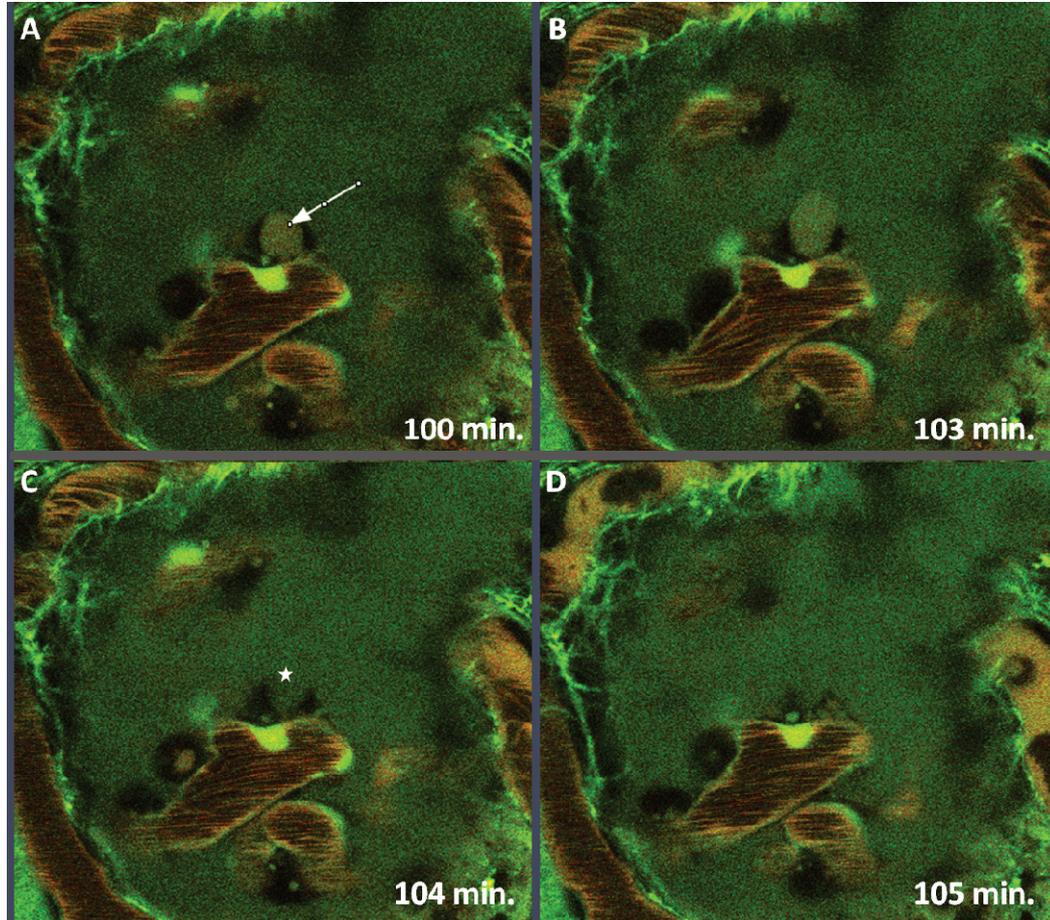


Abbildung 42: Transzytose von Alexa 594-BSA durch Podozyten (II). A-D zeigen Ausschnitte gleicher Tiefenebene aus einer 3D-Zeitserie eines Glomerulus unter Infusion von 80 ng/kg KGW/min Angiotensin II. Die Zeitangaben unten rechts stehen für die Gesamtdauer der Angiotensin II-Exposition zum Zeitpunkt der Bildaufnahme. Alexa 594-BSA enthaltende endozytotische Vesikel wuchsen im Podozyt an (A) und wölbten sich nach außen (B), um das aufgenommene Albumin schließlich durch Exozytose (Stern) aus dem Podozyten in den Harnraum abzugeben (C und D).

V. DISKUSSION

1. Chronische Effekte von Angiotensin II auf die Albuminfiltration

In einem *in vivo*-Modell sollten zunächst die chronischen Effekte von Angiotensin II auf die glomeruläre Albuminfiltration bestimmt werden. Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie. Im Vergleich zu anderen Methoden, wie der Mikropunktion oder den meisten bildgebenden Verfahren, erlaubt diese Technik die Untersuchung der Niere sowohl auf morphologischer als auch auf funktioneller Ebene und ist minimal invasiv. Der Glomerulus ist aufgrund seiner tiefen Lokalisation im Nierenkortex von Mäusen und Ratten nur schwer zugänglich für die funktionelle Untersuchung im intakten, lebendigen Gewebe (Schießl et al. 2013). Aus diesem Grund wurde für die Durchführung dieser Experimente der Rattenstamm „Munic Wistar Frömter“ (MWF) gewählt, der sich durch eine hohe Anzahl an oberflächlich lokalisierten Glomeruli auszeichnet (Hackbarth et al. 1983). Die MWF Ratten entwickeln ab einem bestimmten Alter eine Glomerulosklerose, werden proteinurisch und hyperten (Hackbarth et al. 1991). Dabei sind besonders männliche MWF Ratten betroffen (Remuzzi et al. 1988). Da in der Literatur bereits dokumentiert wurde, dass sich eine Therapie mit RAAS-inhibierenden Arzneistoffen positiv auf die Nierenfunktion in diesen Tieren auswirkt (Remuzzi et al. 1990), hat Angiotensin II wahrscheinlich eine erhebliche Bedeutung für die Pathogenese der MWF Ratten.

MWF Ratten weisen prinzipiell eine hohe Anzahl oberflächlicher Glomeruli auf und im Alter von zwölf Monaten auch ein pathologisches Profil. Daher eignen sich ältere MWF Ratten als ein Modell zur Untersuchung der Proteinurie mit Hilfe von Multiphotonen-Mikroskopie.

1.1. Charakterisierung der Albuminausscheidung im Urin von heranwachsenden MWF und Wistar Ratten

Dieser Teil der Arbeit galt der Etablierung eines Versuchsmodells, in dem MWF Ratten in Abhängigkeit ihres Alters sowohl für physiologische als auch für pathophysiologische Charakterisierungen der Nierenfunktion verwendet werden

können. Hierfür erfolgte die Evaluierung heranwachsender, männlicher MWF Ratten unserer Zucht hinsichtlich ihrer Albuminausscheidung im Urin. Es sollte zum Einen geklärt werden, ab welchem Zeitpunkt die heranwachsenden Tiere eine Proteinurie entwickeln und zum Anderen, ob sich junge MWF Ratten für Untersuchungen eines nicht vorgeschädigten Glomerulus eignen. Die Albuminausscheidung im Urin der Versuchstiere wurde hierfür mit der von gleichaltrigen Wistar Ratten verglichen, die zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung eine Proteinurie aufwiesen.

Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigte, dass zwölf Monate alte MWF Ratten im Vergleich zu gleichaltrigen Wistar Kontrollratten sowie zu neun Wochen alten MWF Ratten eine hochsignifikante Proteinurie aufwiesen. MWF Ratten im Alter von zwölf Monaten eignen sich also gut als ein Modell zur Untersuchung der Proteinurie. Die jungen MWF Ratten zeigten im Vergleich zu den Wistar Ratten keine erhöhte Proteinausscheidung im Urin. Daher eignen sich die Tiere dieses Rattenstamms im jungen Alter (< neun Wochen) als ein physiologisches Modell zur Untersuchung der Nierenfunktion mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie.

1.2. Das physiologische Ausmaß der glomerulären Albuminfiltration

Um die glomeruläre Filtration von Albumin unter physiologischen Bedingungen zu bestimmen, wurde der glomeruläre Siebkoeffizient von Albumin in jungen, gesunden MWF Ratten untersucht. Der ermittelte GSC_A der jungen MWF Ratten ist mit 0,00057 niedrig und entspricht der klassischen Vorstellung, dass Albumin in der gesunden Niere nur in sehr geringem Maß glomerulär filtriert wird (Haraldsson et al. 2008). Die Ergebnisse dieser Experimente stimmen zudem mit den Befunden von anderen Studien überein, die den GSC_A mit Hilfe der Mikropunktion ermittelten ($GSC_A=0,0003-0,0006$), (Oken und Flamenbaum 1971, Stolte et al. 1979, Tojo und Endou 1992).

Zur Frage, in welchem Ausmaß Albumin in der gesunden Niere glomerulär filtriert wird, herrscht bis dato Unstimmigkeit. Seit über zehn Jahren wird das klassische Verständnis der glomerulären Albuminfiltration bereits kontrovers diskutiert (Russo et al. 2002). Grundlage hierfür sind folgende Befunde, die die klassische Annahme einer für Proteine weitgehend dichten Filtrationsbarriere in Frage stellen:

1. Die glomeruläre Basalmembran verfügt über keine ladungsselektiven Eigenschaften (Russo et al. 2002).
2. Der glomeruläre Siebkoeffizient von Albumin ist hoch und liegt zwischen 0,034 (Russo et al. 2007) und 0,074 (Osicka et al. 1996).
3. Das glomerulär filtrierte Albumin wird in der gesunden Niere durch proximal-tubulären transepithelialen Transport intakt ins Blut abgegeben (Eppel et al. 1999). Der Mechanismus der Rückresorption verläuft über den Megalin-Cubilin-Komplex (Russo et al. 2002).

Zu 1.: Comper und Kollegen kritisieren unter anderem Versuche zur Bestimmung der Ladungsselektivität, die mit Hilfe von Dextransulfat durchgeführt wurden. Sie argumentieren, dass die Bindung des negativ geladenen Dextrans an Plasmaproteine oder an die glomeruläre Filtrationsbarriere zu einer Missinterpretation der Ergebnisse führen könnte (Comper et al. 1994). In diesem Zusammenhang konnte tatsächlich gezeigt werden, dass Dextransulfat an Fibronectin binden kann (Ogamo et al. 1985) sowie in Abhängigkeit vom Molekulargewicht ebenfalls an Plasmaproteine (Guasch et al. 1993). Bei der Bindung von Dextransulfat an Plasmaproteine handelt es sich jedoch um einen sättigbaren Prozess. Im „Steady State“, wenn also die Bindung von Dextransulfat an die Plasmaproteine vollständig erfolgt ist, wird die Dextransulfat-Ausscheidung im Urin nicht weiter durch die Plasmabindung beeinflusst (Haraldsson et al. 2008). Unter Berücksichtigung dieser Kenntnis wurden die Versuche mit Dextransulfat zur Untersuchung der Ladungsselektivität der Filtrationsbarriere erneut durchgeführt. Das Ergebnis dieser Experimente war, dass die glomeruläre Filtrationsbarriere ladungsselektive Eigenschaften besitzt (Guasch et al. 1993). Die bestehende Datenlage zur Ladungsselektivität der glomerulären Filtrationsbarriere basiert zudem nicht nur auf Experimenten mit Dextransulfat. An der isoliert-perfundierten-Niere wurden Experimente mit zahlreichen anderen anionischen Molekülen zur Untersuchung der Ladungsselektivität des Filters vorgenommen. Dabei wurde unter Hemmung der proximal-tubulären Zellfunktion die Ausscheidung anionischer Moleküle mit der von ähnlich großen, neutralen Ficoll-Molekülen verglichen und festgestellt, dass die Ficoll-Moleküle vermehrt im Urin ausgeschieden wurden (Sorensson et al. 2001).

Zu 2.: Der glomeruläre Siebkoeffizient von Albumin wurde in zahlreichen Laboren mit Hilfe von unterschiedlichen Methoden untersucht (siehe Kapitel: I.3.1.2), die alle zu ähnlichen Ergebnissen führten: Die glomeruläre Albuminfiltration ist physiologisch niedrig und liegt zwischen 0,00008 und 0,002 (Oken und Flamenbaum 1971, Stolte et al. 1979, Tojo und Endou 1992, Ohlson et al. 2000, Norden et al. 2001, Christensen et al. 2007, Peti-Peterdi 2009). Der höchste publizierte Wert für den GSC_A von Comper und Kollegen liegt dagegen bei 0,074 (Osicka et al. 1996). Dieser hohe Wert wurde durch Experimente an der isoliert-perfundierten-Niere ermittelt, indem die proximal-tubuläre Funktion durch den Einsatz mehrerer Toxine gehemmt wurde (siehe Kapitel I.3.1.3) Ohlson et al. konnten jedoch zeigen, dass die verwendeten Toxine wahrscheinlich ebenfalls zu einer Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere führen, wodurch sich die hohen GSC_A -Werte erklären würden (Ohlson et al. 2000). Die hohen Werte für die glomeruläre Albuminfiltration, die von Comper und Kollegen postuliert werden, sind außerdem aus physiologischen Aspekten schwer zu rechtfertigen. Bei einer GFR von 180 L/Tag und einer Serumkonzentration von 40 g/L Albumin entspräche ein Siebkoeffizient von 0,074 einer täglichen glomerulären Albuminfiltration von über 500 g (Haraldsson et al. 2008). Bei einem GSC_A von 0,034 (Russo et al. 2007) wären dies noch immer fast 250 g Albumin/Tag. In jedem Fall überschreiten diese Werte den Gesamtalbumingehalt des Plasmas (~125 g) erheblich (Christensen et al. 2007) und es ist unklar, wie dieser Albuminverlust kompensiert werden könnte (Haraldsson und Sorensson 2004).

Zu 3.: Der Mechanismus der Rückresorption von filtrierte Albumin in den proximalen Tubuli ist weitgehend geklärt und ist von Megalin und Cubilin abhängig (Christensen und Birn 2001). Allerdings wird filtriertes Albumin über diesen Mechanismus nicht im intakten Zustand wieder zurück ins Blut transportiert. Vielmehr wird Albumin luminal in den proximalen Tubulus aufgenommen, lysosomal zersetzt und in Form von einzelner Aminosäuren basolateral wieder abgegeben (Christensen und Birn 2001). Es ist also unwahrscheinlich, dass glomerulär filtriertes Albumin über diesen Weg in intaktem Zustand wieder zurück ins Blut transportiert wird. Darüber hinaus liegen *in vivo*-Daten vor, die besagen, dass eine erhöhte Proteinfiltration (induziert durch eine proteinreiche Diät) zur Akkumulation von proteinhaltigen Lysosomen im proximalen Tubulus führt und nach mehreren Wochen Schädigungen des

proximalen Tubulus verursacht (Bertani et al. 1989). Diese Befunde wurden durch *in vitro*-Versuche bestätigt, in denen proximale Tubuluszellen nach Albuminexposition mit einer erhöhten Zytokinausschüttung reagierten (Abbate et al. 1999). Aufgrund dieser Datenlage ist es fraglich, wie die proximalen Tubuli unter physiologischen Bedingungen täglich Proteinmengen von mehreren hundert Gramm recyceln sollen, ohne durch die toxischen Effekte der Proteinexposition Schaden zu nehmen.

1.3. Chronische Effekte von Angiotensin II auf den GSC_A

Um die chronischen Effekte von Angiotensin II auf die glomeruläre Albuminfiltration zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit der GSC_A in zwölf Monate alten, männlichen MWF Ratten bestimmt, die im Vergleich zu jungen MWF Ratten proteinurisch waren. In diesem pathologischen Modell konnte eine fünffach höhere glomeruläre Albuminfiltration als in gesunden MWF Ratten, die jünger als neun Wochen waren, festgestellt werden.

Die Ursache einer Proteinurie wird klassisch durch eine erhöhte glomeruläre Filtration der Plasmaproteine erklärt. Comper und Kollegen vertreten hingegen die Theorie, dass bereits in der gesunden Niere nephrotische Mengen Albumin glomerulär filtriert werden (Russo et al. 2002). Die Ursache einer Proteinurie müsste demnach vielmehr eine mangelhafte proximal-tubuläre Rückresorption sein (Dickson et al. 2014).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in alternden MWF Ratten parallel zur steigenden Albuminausscheidung im Urin auch die glomeruläre Filtration von Albumin zunimmt. Es ist daher naheliegend, dass die Proteinurie in diesem Modell durch eine erhöhte glomeruläre Filtration der Plasmaproteine induziert wird und nicht durch eine mangelhafte proximal-tubuläre Rückresorption von filtrierten Proteinen.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss einer ACE-Hemmer-Therapie auf die glomeruläre Albuminfiltration in zwölf Monate alten MWF Ratten untersucht. Die pathologisch erhöhte glomeruläre Albuminfiltration konnte durch eine vierwöchige Therapie mit Enalapril signifikant gesenkt werden. Derselbe therapeutische Effekt konnte auch für die Albuminausscheidung im Urin beobachtet werden.

Die Therapie mit Enalapril verbesserte zudem die Hämodynamik der Versuchstiere. MWF Ratten entwickeln mit zunehmendem Alter eine ausgeprägte Hypertonie (Hackbarth et al. 1991). Der mittlere arterielle Blutdruck der zwölf Monate alten MWF Ratten war mit 144 mmHg unter Narkose im stark hypertonen Bereich und konnte durch eine vierwöchige Behandlung mit Enalapril auf einen normalen Level von 110,9 mmHg gesenkt werden. Die Therapie mit Enalapril hatte zudem eine signifikante Auswirkung auf die glomeruläre Filtrationsrate der Versuchstiere. Bereits nach zwei Wochen konnte eine Verdopplung der GFR festgestellt werden. Das Auftreten einer Proteinurie korreliert in Patienten signifikant mit einer Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (Remuzzi et al. 2005, Currie und Delles 2013). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einhergehend mit der Reduktion der Proteinurie ebenfalls eine Verbesserung der glomerulären Filtrationsrate.

Einjährige MWF Ratten eignen sich als ein Modell der Proteinurie. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass die Ursache der Proteinurie bei diesen Tieren nicht auf einer mangelhaften proximal-tubulären Rückresorption von filtrierte Protein, sondern auf einer vermehrten glomerulären Filtration der Plasmaproteine basiert. Die pathologischen Mechanismen der Proteinurie stehen wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer chronischen Einwirkung von Angiotensin II auf die Filtrationsbarriere, da durch die Therapie mit ACE-Hemmern die Proteinurie reduziert und die Nierenfunktion verbessert werden konnte.

2. Akute Effekte von Angiotensin II auf die Albuminfiltration

ACE-Hemmer und AT1-Rezeptor-Antagonisten gehören zur Standardtherapie einer Proteinurie (Barnett 2005). Die genauen Wirkmechanismen der Therapie sind nicht vollständig geklärt. Jedoch wird vermutet, dass die Blockade des RAAS sowohl den hämodynamischen als auch den nicht-hämodynamischen Effekten von Angiotensin II entgegenwirkt (Taal und Brenner 2000, Remuzzi et al. 2005). Mögliche akute Effekte von Angiotensin II auf die glomeruläre Albuminfiltration sind weitgehend unerforscht. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, die dynamische Veränderung der glomerulären Albuminfiltration *in vivo* unter akuter Angiotensin II-Infusion zu untersuchen.

Ein Kardinalbefund dieser Untersuchungen ist, dass Angiotensin II über den AT1-Rezeptor einen akuten und rapiden Anstieg der glomerulären Albuminfiltration von 0,0004 auf 0,0017 induziert. Die verstärkte glomeruläre Filtration von Albumin kann durch proximal-tubuläre Rückresorption nicht kompensiert werden und führt folglich zu einer erhöhten Albuminausscheidung im Urin. Die Einwirkungen von Angiotensin II auf die Permeabilität der glomerulären Filtrationsbarriere erfolgen akut und ohne vorherige Schädigung des Glomerulus. Dieser Befund stimmt zudem mit den Ergebnissen einer anderen Studie überein, die die Ausscheidung von Ficoll-Molekülen im Urin von Ratten unter Infusion von Angiotensin II untersuchte (Axelsson et al. 2012).

2.1. Akute Effekte von Angiotensin II auf die Einzelnephron-GFR

Es ist bekannt, dass der glomeruläre Siebkoeffizient von Albumin durch Veränderungen der Einzelnephron-GFR beeinflusst werden kann (Haraldsson et al. 2008). Über das Ausmaß dieses Einflusses wird jedoch kontrovers diskutiert: Lund et al. untersuchten die Filtration verschiedener Makromoleküle in Abhängigkeit der GFR und berichteten einen Anstieg des GSC_A unter einer Verringerung der GFR. Bei einer abnehmenden glomerulären Filtrationsrate erhöht sich der Beitrag der Diffusion am Transport von Albumin über die Filtrationsbarriere (Lund et al. 2003). In Untersuchungen an der isoliert-perfundierten-Niere wurde hingegen mit der Zunahme der GFR auch ein erhöhter GSC_A gemessen (Ohlson et al. 2001). Grund hierfür könnte der erhöhte glomerulär-kapillare Druck sein, durch den es laut dem „zwei-Poren-Modell“ zur vermehrten Entstehung größerer Poren kommt, durch die Albumin die Filtrationsbarriere überwinden kann (Johnsson et al. 1994, Rippe und Haraldsson 1994).

In der vorliegenden Arbeit ging der unter Angiotensin II festgestellte Anstieg der glomerulären Albuminfiltration um 325% mit einem moderaten Abfall der Einzelnephron-GFR einher. Nach den Befunden von Lund et al. könnte die beobachtete Reduktion der Einzelnephron-GFR um etwa 40% folglich zum Anstieg des GSC_A beitragen. Jedoch ist bei einer Erhöhung des GSC_A von 325% unwahrscheinlich, dass dieser Effekt allein durch GFR-abhängige Effekte zu Stande kommt. Laut Johnsson et al. könnte eine Erhöhung der GFR die Filtration von Albumin sogar begünstigen. Dies würde im Umkehrschluss bedeuten, dass

die Reduktion der GFR, die unter Angiotensin II beobachtet wurde, der Zunahme der glomerulären Albuminfiltration entgegenwirkt.

2.2. Rolle der Angiotensin II-Rezeptoren AT1 und AT2 für den durch Angiotensin II-vermittelten Anstieg des GSC_A

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Erhöhung der glomerulären Albuminfiltration unter Angiotensin II-Infusion durch den AT1-Rezeptor vermittelt wird. Der akute Anstieg des GSC_A konnte nämlich durch Applikation des AT1-Rezeptor-Antagonisten Losartan vollständig unterdrückt werden. Zudem führte die Injektion von Losartan im Anschluss an die Angiotensin II-Infusion wieder zu einer Normalisierung des GSC_A . Angiotensin II scheint den GSC_A jedoch zusätzlich auch durch die Aktivierung des AT2-Rezeptors zu regulieren. Dabei führt die Stimulation der beiden Rezeptoren zu konträren Effekten auf die glomeruläre Albuminfiltration.

Die Applikation des selektiven AT2-Rezeptor-Antagonisten PD123319 führte in Gegenwart endogener Angiotensin II-Konzentrationen zu einem Anstieg des GSC_A . Unter Angiotensin II-Infusion stieg bei gleichzeitiger AT1-Rezeptor-Blockade (Losartan) die glomeruläre Albuminfiltration durch eine Therapie mit PD123319 stärker an als in Versuchen ohne PD123319. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die positiven Effekte der Aktivierung des AT2-Rezeptors durch die dominierenden Effekte des AT1-Rezeptors unterdrückt sein könnten.

Unter Angiotensin II-Infusion ohne parallele AT1-Blockade stieg die glomeruläre Albuminfiltration im Vergleich zu Versuchen ohne PD123319 geringfügig an. Diese Befunde waren jedoch nicht signifikant. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die eingesetzte Angiotensin II-Dosis bereits eine Sättigung in der maximalen Zunahme der Albuminpermeabilität erzielte.

Die Regulierung der glomerulären Filtration von Albumin durch Angiotensin II erfolgt also über die beiden Rezeptoren AT1 und AT2. In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die Stimulation des AT1-Rezeptors den GSC_A erhöht, wobei eine Stimulation des AT2-Rezeptors diesem Effekt entgegenwirkt. Eine gezielte Aktivierung des AT2-Rezeptors hat also eine protektive Wirkung auf die Regulierung der Albuminfiltration. Dies konnte zudem durch die Versuchsergebnisse eines weiteren Labors bestätigt werden. Benndorf et al. untersuchten die Proteinurie und die Überlebensrate in AT2-Rezeptor-KO-

Mäusen und ihren Wurfgeschwistern in Folge einer renalen Ablation (Entfernung von zwei Dritteln der linken Niere). Die AT₂-Rezeptor-Defizienz führte zu einem signifikanten Anstieg der Proteinurie und verschlechterte die Überlebensrate der Versuchstiere (Benndorf et al. 2009).

2.2.1. Protektive Effekte des AT₂-Rezeptors auf die Integrität der Filtrationsbarriere

Die Befunde dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Stimulation des AT₂-Rezeptors einen wesentlichen Beitrag zu der durch Angiotensin II-vermittelten Regulierung der glomerulären Albuminfiltration leistet. So wirkt der AT₂-Rezeptor der AT₁-Rezeptor-induzierten Erhöhung des GSC_A entgegen.

Die Bedeutung des AT₂-Rezeptors ist nicht abschließend geklärt, jedoch wird vermutet, dass seine Aktivierung der AT₁-Rezeptor-Aktivierung gegenläufige Effekte vermittelt (Castrop et al. 2010). Es wurde, neben einer direkten inhibierenden Interaktion durch Heterodimerisierung mit dem AT₁-Rezeptor (AbdAlla et al. 2001), auch eine vasodilatatorische (Tsutsumi et al. 1999), entzündungshemmende (Abdel-Rahman et al. 2008) und natriuretische (Siragy et al. 1999) Wirkung des AT₂-Rezeptors beschrieben. Aufgrund der präklinischen Datenlage wird seit längerem eine protektive Wirkung des AT₂-Rezeptors auf die Nierenfunktion vermutet (Siragy 2009). Somit könnte die therapeutische Wirkung von AT₁-Rezeptor-Antagonisten der von ACE-Hemmern überlegen sein, da die Patienten von den positiven Effekten der AT₂-Stimulation profitieren könnten (Siragy 2009). Die Vorteile einer AT₂-Rezeptor-Aktivierung konnten jedoch in humanklinischen Studien bisher nicht bestätigt werden (Barnett 2005).

Im Zusammenhang mit der unklaren Datenlage zu den positiven Wirkungen des AT₂-Rezeptors leisten die Befunde dieser Arbeit einen wichtigen Beitrag, da eine antiproteinurische Wirkung des AT₂-Rezeptors etabliert werden konnte.

2.3. Rolle des renalen Perfusionsdrucks für den durch Angiotensin II-vermittelten Anstieg der Albuminfiltration

Die renoprotektiven Effekte der RAAS-inhibierenden Arzneistoffe werden unter anderem durch eine Modulation der hämodynamischen Wirkung von Angiotensin II erklärt (Ruggenenti et al. 2012).

In dieser Studie wurde unter akuter Angiotensin II-Infusion ein signifikanter Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks beobachtet, der mit einem erhöhten renalen Perfusionsdruck einherging. Um zu klären, ob die durch Angiotensin II-induzierte Steigerung der glomerulären Albuminfiltration von Änderungen des renalen Perfusionsdrucks abhängt, wurde dieser mechanisch moduliert. Durch die Applikation einer variablen Ligatur der Aorta abdominalis konnte der renale Perfusionsdruck unter paralleler Angiotensin II-Infusion reduziert werden. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass der GSC_A unter Angiotensin II-Infusion unabhängig vom renalen Perfusionsdruck ansteigt. Diese Befunde stimmen zudem mit *in vitro*-Versuchen am Modell der isoliert-perfundierten-Niere überein, die ebenfalls eine vom renalen Perfusionsdruck unabhängige Regulierung des GSC_A durch Angiotensin II zeigen konnten (Lapinski et al. 1996).

Angiotensin II reguliert somit die glomeruläre Albuminfiltration, zumindest teilweise, unabhängig von Änderungen des renalen Perfusionsdrucks. Diese Feststellung deutet auf eine direkte Einwirkung von Angiotensin II auf die glomeruläre Filtrationsbarriere hin.

2.4. Mögliche direkte Effekte von Angiotensin II auf die Filtrationsbarriere

Sowohl der AT1- als auch der AT2-Rezeptor werden in Podozyten exprimiert, wobei die Expression des AT1-Rezeptors überwiegt (Verhältnis AT1 zu AT2 = 3 zu 1), (Wang et al. 2003). Podozyten depolarisieren nach einer Aktivierung des AT1-Rezeptors, was zur Aktivierung spannungsabhängiger Kalzium-Kanäle und demnach zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Spiegel führt. Dies konnte durch *in vitro*-Versuche an kultivierten Podozyten sowie an isolierten Glomeruli gezeigt werden (Gloy et al. 1997, Nitschke et al. 2000, Sharma et al. 2001). Die Signalkaskade nach einer Stimulation des AT2-Rezeptors in Podozyten ist nicht vollständig geklärt, es wird jedoch vermutet, dass AT2-Rezeptoren ebenfalls zur Regulation der Kalzium-Spiegel in Podozyten beitragen (Sharma et al. 2001).

Zudem kann es nach einer Aktivierung des AT1-Rezeptors zu einer Kontraktion des Zytoskeletts kommen und somit die Permeabilität der Filtrationsbarriere für Makromoleküle reguliert werden (Kriz 2004, Greka und Mundel 2012).

Aufgrund der *in vitro*-Datenlage wären somit direkte und akute Effekte von Angiotensin II auf die Filtrationsbarriere auch *in vivo* denkbar. Bekannt ist ebenfalls, dass der AT2-Rezeptor die Effekte des AT1-Rezeptors sowohl durch Heterodimerisierung mit dem AT1-Rezeptor (AbdAlla et al. 2001) als auch durch den direkten Eingriff in dessen Signalkaskade reduziert (Munzenmaier und Greene 1996). Dies wäre eine mögliche Erklärung für den beobachteten Anstieg der glomerulären Albuminfiltration unter Hemmung des AT2-Rezeptors (unter endogenen Angiotensin II-Konzentrationen). Unter Angiotensin II-Infusion wurde jedoch durch die Hemmung des AT2-Rezeptors bei zeitgleicher Blockade des AT1-Rezeptors durch Losartan eine höhere glomeruläre Albuminfiltration gemessen als in Versuchen ohne Hemmung des AT2-Rezeptors. Der GSC_A stieg dabei durch die Hemmung des AT2-Rezeptors an, obwohl der AT1-Rezeptor zeitgleich durch Losartan geblockt wurde. Es ist daher naheliegend, dass eine Stimulation des AT2-Rezeptors den GSC_A nicht nur durch die Reduktion der AT1-Rezeptor-Wirkung reguliert. Vielmehr ist auch hier ein direkter Effekt der AT2-Rezeptor-Aktivierung auf die glomeruläre Filtrationsbarriere wahrscheinlich. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch weitgehend unklar.

Neben den Podozyten werden der AT1- und der AT2-Rezeptor auch in Mesangialzellen exprimiert (Miyata et al. 1999). *In vitro*-Versuche zeigten auch für Mesangialzellen eine durch Angiotensin II-induzierte Kontraktion (Stockand und Sansom 1998). Es wird vermutet, dass Mesangialzellen durch Kontraktion wesentlich an der Regulierung des Filtrationsdrucks beteiligt sind (Stockand und Sansom 1997). Über diesen Mechanismus könnte die Einzelnephron-GFR durch Angiotensin II reduziert werden. Das wiederum könnte den Beitrag der Diffusion zum Transport von Makromolekülen über die Filtrationsbarriere erhöhen und somit Veränderungen der glomerulären Albuminfiltration zur Folge haben (Lund et al. 2003).

Zusammenfassend führt die akute Infusion von Angiotensin II *in vivo*, im nicht vorgeschädigten Glomerulus, zu einem rapiden Anstieg der glomerulären Albuminfiltration, der weitgehend unabhängig von Veränderungen des renalen Perfusionsdrucks ist. Dieser Effekt wird durch Stimulation des AT1-Rezeptors vermittelt und eine Stimulation des AT2-Rezeptors wirkt diesem Effekt entgegen.

3. Akute Effekte von Angiotensin II auf die podozytäre Endozytose von Proteinen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Podozyten unter einer Infusion von Angiotensin II Proteine endozytieren. Dieses Phänomen konnte für durch Rhodamin B-gefärbte Plasmaproteine sowie spezifisch für Albumin beobachtet werden.

Dabei wurde für Albumin die Bildung von Fluid-haltigen und nicht-Fluid-haltigen endozytotischen Vesikeln dokumentiert. Nicht-Fluid-haltige Endozytosevesikel traten bereits unter Kontrollbedingungen in Form von Nestern in einzelnen Podozyten auf. Unter Angiotensin II-Infusion nahm die Größe dieser Nester zu.

Die Bildung von Fluid-haltigen Vesikeln dagegen konnte fast ausschließlich unter Angiotensin II-Infusion beobachtet werden und trat ubiquitär in allen Podozyten auf. Nach längerer Angiotensin II-Exposition kam es vereinzelt zur Vergrößerung und schließlich zur Exozytose des Vesikelinhalts in den Harnraum.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Podozyten Albumin unter Angiotensin II-Infusion durch Transzytose in den Harnraum abgeben können. Multiphotonen-Mikroskopie ist eine leistungsstarke Technik, welche die Visualisierung von Podozyten sowie die Entstehung und Migration von podozytären Vesikeln erlaubt. Die vorliegende Arbeit ist die erste, die eine Proteintranszytose durch Podozyten unter Nutzung der Multiphotonen-Mikroskopie live und in Echtzeit dokumentiert.

Podozyten exprimieren verschiedene Rezeptoren, durch die eine Endozytose von Albumin vermittelt sein könnte. So ist der FcRn an der podozytären Transzytose von IgG aus dem subpodozytären Raum in den Harnraum beteiligt (Akilesh et al. 2008). Dieser Rezeptor kommt auch in humanen Podozyten vor (Haymann et al. 2000) und könnte unter pathologischen Bedingungen auch für die Transzytose von Albumin in den Harnraum verantwortlich sein. So konnte durch die Behandlung von PAN-Ratten mit einem FcRn-Antikörper die Albuminausscheidung reduziert werden (Kinugasa et al. 2011).

Die proximal-tubuläre Endozytose von Albumin verläuft über den Megalin-Cubilin-Komplex (Christensen und Birn 2001). Dieser Multiliganden-Rezeptor ist in den Podozyten der Ratte und wahrscheinlich auch in denen des Menschen exprimiert (Prabakaran et al. 2011, Prabakaran et al. 2012). Aus diesem Grund

könnte auch der Megalin-Cubilin-Komplex für die podozytäre Endozytose von Albumin eine Rolle spielen.

Die Endozytose von Proteinen durch Podozyten könnte eine physiologische Bedeutung haben oder ein rein pathophysiologisches Geschehen darstellen (Akilesh et al. 2008, Tojo und Kinugasa 2012).

3.1. Durch Angiotensin II-induzierte podozytäre Proteinendozytose: Physiologisches Konzept

Die glomeruläre Filtrationsbarriere besteht aus drei verschiedenen Schichten, die die Filtration von Albumin weitgehend unterbinden (Haraldsson et al. 2008). Das Zusammenspiel der einzelnen Schichten des glomerulären Filters hinsichtlich seiner Größenselektivität wird kontrovers diskutiert (Huber 2008). So könnte die Filtrationsrestriktion von Proteinen primär durch die podozytäre Schlitzmembran der Podozyten (Tryggvason-Modell), (Tryggvason 1999) oder durch die glomeruläre Basalmembran erfolgen (Smithies-Modell), (Smithies 2003). Selbst wenn die glomeruläre Basalmembran den größten Teil der Plasmaproteine von der Filtration in den Harnraum zurückhält, gelangen trotzdem signifikante Mengen filtrierter Proteine in den subpodozytären Raum (Smithies 2003, Huber 2008). Diese Proteine würden unter der podozytären Schlitzmembran akkumulieren und langfristig den Filter verstopfen (Huber 2008). Daher wird vermutet, dass Podozyten diese Proteine durch Transzytose aus dem subpodozytären Raum in den Harnraum abgeben können (Akilesh et al. 2008, Huber 2008).

Nach den erhobenen Daten dieser Arbeit erhöht Angiotensin II akut die glomeruläre Filtration von Albumin. Weiter konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II auch die Endozytose von Albumin durch Podozyten sowie die Transzytose des Albumins in den Harnraum induziert. Dieses Phänomen könnte einen wesentlichen Beitrag dazu leisten, den glomerulären Filter zu säubern. Insbesondere könnte dies in Situationen erhöhter Angiotensin II-Spiegel und damit vermehrter glomerulärer Albuminfiltration von Bedeutung sein.

3.2. Durch Angiotensin II-induzierte podozytäre Proteinendozytose: Pathophysiologisches Konzept

Bei Patienten mit Proteinurie ohne sklerotische Veränderungen des Glomerulus, wie beispielsweise bei der Minimal-Change-Glomerulonephritis, erklärt man die erhöhte glomeruläre Filtration von Proteinen durch die Entstehung lokaler

interzellulärer Lücken zwischen den Podozyten (Pricam et al. 1975). Die Ursache für dieses Phänomen ist wahrscheinlich eine verminderte Expression des Schitzmembranproteins Nephrin (Lahdenkari et al. 2004).

In Tiermodellen der Minimal-Change-Glomerulonephritis, wie dem PAN-Modell (Tojo et al. 2008), wurde die podozytäre Albumintranszytose kürzlich als ein alternativer Weg der Albuminfiltration beschrieben (Tojo et al. 2008, Kinugasa et al. 2011). Die Autoren vermuteten, dass dieser Vorgang durch den Rezeptor FcRn erfolgt und mit einer Stimulation von NADPH-Oxidasen einhergeht (Kinugasa et al. 2011).

Die vorliegende Arbeit zeigt in einem *in vivo*-Modell, dass eine akute Infusion von Angiotensin II im nicht vorgeschädigten Glomerulus zu einer erhöhten Filtration von Albumin führt und zudem die podozytäre Endozytose von Albumin stimuliert. Die beobachtete podozytäre Transzytose von Proteinen, unter dem pathologischen Einfluss von Angiotensin II könnte auch einen alternativen Weg der Albuminfiltration darstellen.

Proteinhaltendes Ultrafiltrat hat eine toxische Wirkung auf das Tubulussystem (Remuzzi und Bertani 1998). Während der proximal-tubulären Endozytose des glomerulär filtrierte Albumins kommt es zu einer Akkumulation der albuminhaltigen Lysosomen im proximalen Tubulus (Bertani et al. 1989). Dies führt zu einer inflammatorischen Reaktion und zur Apoptose der betroffenen Tubuluszellen (Abbate et al. 1999).

Albumin kann auch eine ähnliche Wirkung auf Podozyten ausüben. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führte die Albuminexposition von Podozyten zur podozytären Endozytose und anschließend zu einer Stimulation von Zytokinen (TNF, IL-1 β) sowie zur Apoptose dieser Zellen (Okamura et al. 2013). Angiotensin II erhöht nicht nur die glomeruläre Albuminfiltration, sondern ist zudem ein potenter Stimulator der NADPH-Oxidase (Jaimés et al. 1998, Asaba et al. 2005), deren Aktivität die podozytäre Albuminendozytose im PAN-Modell erhöhte (Kinugasa et al. 2011).

Angiotensin II stimuliert somit akut die glomeruläre Filtration und die podozytäre Endozytose von Albumin im gesunden Glomerulus. Aufgrund der oben genannten Befunde wäre es denkbar, dass Angiotensin II über diesen Mechanismus chronisch eine Schädigung der Podozyten auslöst. Das dadurch bedingte

Fortschreiten der Proteinurie würde letztendlich in einen *circulus vitiosus* aus Proteinurie und podozytärer Proteinendozytose münden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere ist eine essentielle Voraussetzung für eine normale Nierenfunktion. Läsionen der Filtrationsbarriere unterschiedlicher Genese werden primär durch eine vermehrte Filtration von Plasmaproteinen wie Albumin augenscheinlich. Dabei scheint die Proteinurie nicht nur ein Ausdruck einer Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere *per se* zu sein, sondern auch die Progression einer Verschlechterung der Nierenfunktion zu beschleunigen. Ein gängiger therapeutischer Ansatz, um eine Proteinurie unterschiedlicher Genese zu reduzieren oder ihre Progression zu verlangsamen, ist die Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Dabei ist unklar, ob der antiproteinurische Effekt von z.B. ACE-Inhibitoren primär einer Reduktion des arteriellen Drucks und damit des renalen Perfusionsdrucks zuzuschreiben ist, oder ob Angiotensin II auch direkte Effekte auf die Filtrationsbarriere ausübt.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher die akuten und chronischen Effekte von Angiotensin II auf die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere geklärt werden.

Klassischerweise wird die Struktur und die Funktion der Filtrationsbarriere an fixiertem Material (z.B. licht- oder elektronenmikroskopisch) oder invasiv mit Hilfe von Mikropunktionsverfahren untersucht. Beide Verfahren erlauben jedoch keine zeitgleichen Untersuchungen von Struktur und Funktion *in vivo*.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher zur *in vivo*-Untersuchung des Glomerulus die Multiphotonen-Mikroskopie etabliert, ein bildgebendes Verfahren, das Untersuchungen in Echtzeit am lebenden Tier erlaubt.

Untersuchungen mittels Multiphotonen-Mikroskopie sind durch die maximale Eindringtiefe des Exzitationslasers limitiert. Somit lassen sich in der Niere Strukturen bis zu einer Tiefe von etwa 100 μm mit adäquater Bildqualität darstellen. Die Versuche wurden daher an Munich Wistar Frömter Ratten durchgeführt, einem Rattenstamm, der aufgrund seiner Vielzahl oberflächlich lokalisierter Glomeruli zur intravitalmikroskopischen Untersuchung besonders geeignet ist. Weiter wurde im Rahmen von Vorarbeiten die Lage oberflächlicher

Glomeruli in verschiedenen Mausstämmen analysiert und BALB/c und C57BL/6 als für die Untersuchungen bevorzugte Stämme identifiziert.

Als Kardinalbefund konnte *in vivo* gezeigt werden, dass Angiotensin II – im Wesentlichen unabhängig von einer Beeinflussung der Hämodynamik – durch direkte Effekte auf die Filtrationsbarriere die Permeabilität für Albumin akut erhöht. Dieses Phänomen wurde durch AT1-Rezeptoren vermittelt und partiell durch eine simultane Aktivierung von AT2-Rezeptoren gehemmt. Die durch eine Angiotensin II-Infusion ausgelöste substantielle Erhöhung der Albuminfiltration war von einer vermehrten proximal-tubulären Albuminreabsorption und einer vermehrten Ausscheidung im Endharn begleitet. Im Sinne eines antiproteinurischen Effekts konnte daher ein therapeutischer Vorteil von AT1-Rezeptor-Antagonisten gegenüber ACE-Inhibitoren postuliert werden.

Eine übermäßige glomeruläre Proteinfiltration birgt prinzipiell die Gefahr einer Akkumulation von Proteinen innerhalb der Filtrationsbarriere. In diesem Zusammenhang konnte hier erstmals *in vivo* und in Echtzeit gezeigt werden, dass Podozyten zur Transzytose von Albumin befähigt sind und somit eine Reinigungsfunktion für die Filtrationsbarriere ausüben könnten. Die durch Endozytose entstehenden proteinhaltigen Vesikel translozieren innerhalb der Podozyten von der Seite der Basalmembran zur Seite des Harnraums, um dort wiederum sezerniert zu werden.

Eine Albuminexposition kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine inflammatorische Reaktion und eine vermehrte Apoptose von Podozyten hervorrufen. Unter diesem Gesichtspunkt könnte die vermehrte glomeruläre Filtration und anschließende podozytäre Endozytose von Albumin einen Mechanismus der chronischen Schädigung von Podozyten durch Angiotensin II darstellen.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit sollten die Zellkörper der Podozyten als eine neue, aktive Komponente der Filtrationsbarriere betrachtet werden, die eine potentielle pathologische Bedeutung für eine Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere aufweisen könnten.

VII. APPENDIX

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von Angiotensin II auf die Permeabilität der Filtrationsbarriere sowie auf die glomeruläre Filtration mittels Multiphotonen-Mikroskopie untersucht.

Die glomeruläre Filtration wird durch multiple systemische Faktoren (wie z.B. die Konzentration von Angiotensin II in der Zirkulation) kontrolliert. Unabhängig davon steht die GFR unter einer lokalen Kontrolle durch das tubuläre System. Dieser als tubuloglomerulärer Feedback bezeichnete Mechanismus moduliert den Tonus der afferenten Arteriole und damit die GFR in Abhängigkeit von der tubulären Chloridkonzentration im Bereich der Macula densa Zellen. Diese spezialisierten epithelialen Zellen der Pars recta des distalen Tubulus detektieren über die Transportaktivität des Na/K/2Cl Cotransporters, NKCC2, die tubuläre Chloridkonzentration. Die hierdurch initiierte parakrine Signalkaskade führt bei einem Anstieg der tubulären Chloridkonzentration im Bereich der Macula densa letztendlich zu einer Konstriktion der afferenten Arteriole und damit zu einer kompensatorischen Abnahme der *sn*GFR ((Bell et al. 2003, Castrop et al. 2010). Die Macula densa Zellen exprimieren zur Detektion der tubulären Chloridkonzentration zwei unterschiedliche Spleiß-Isoformen des NKCC2: NKCC2B und NKCC2A. Diese beiden Isoformen unterscheiden sich substantiell in ihren Ionenaffinitäten und Transportcharakteristika (Plata et al. 2002).

In einem Nebenprojekt zur vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass Angiotensin II die GFR auch indirekt über den tubuloglomerulären Feedback kontrollieren könnte, indem es die Sensitivität der Macula densa Zellen für Chlorid moduliert. Konkret wurde daher der Effekt von Angiotensin II auf die Expression der NKCC2 Isoformen untersucht.

Es konnte anhand von *in vivo*-Experimenten gezeigt werden, dass eine reduzierte orale Salzaufnahme zu einer Verschiebung der Expression der einzelnen NKCC2 Isoformen führt, wobei sich das Expressionsmuster im renalen Cortex von NKCC2A (geringe Affinität für das den Transport limitierende Chlorid) zu NKCC2B (hohe Affinität für Chlorid) verschob. Dieser Effekt wurde partiell durch Angiotensin II und partiell durch die Transportaktivität des NKCC2 vermittelt. Die *in vivo* erhobenen Befunde konnten auch anhand superfundierter Nierenschnitte *in vitro* bestätigt werden. Eine Modulation des Expressionsmusters

der NKCC2 Isoformen könnte damit an der Adaptation des tubuloglomerulären Feedback Mechanismus an Bedingungen chronisch reduzierter oder gesteigerter tubulärer Chloridkonzentration beteiligt sein. Dieses Phänomen ist als *resetting* des tubuloglomerulären Feedbacks beschrieben worden (Thomson et al. 1996), die zugrundeliegenden Mechanismen sind aber nicht abschließend geklärt.

VIII. EIGENE PUBLIKATIONEN

Schießl, I. M. and H. Castrop (2013). "Angiotensin II AT2 receptor activation attenuates AT1 receptor-induced increases in the glomerular filtration of albumin: a multiphoton microscopy study." *Am J Physiol Renal Physiol* 305(8): F1189-1200. **[Editorial focus]**

Schießl, I. M., S. Bardehle and H. Castrop (2013). "Superficial nephrons in BALB/c and C57BL/6 mice facilitate in vivo multiphoton microscopy of the kidney." *PLoS One* 8(1): e52499.

Schießl, I. M., A. Rosenauer, V. Kattler, W. W. Minuth, M. Oppermann and H. Castrop (2013). "Dietary salt intake modulates differential splicing of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2." *Am J Physiol Renal Physiol* 305(8): F1139-1148.

Oppermann, M., I. Carota, I. M. Schießl, C. Eisner, H. Castrop and J. Schnermann (2013). "Direct assessment of tubuloglomerular feedback responsiveness in connexin 40-deficient mice." *Am J Physiol Renal Physiol* 304(9): F1181-1186.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Abadir, P. M., R. M. Carey and H. M. Siragy (2003). "Angiotensin AT2 receptors directly stimulate renal nitric oxide in bradykinin B2-receptor-null mice." Hypertension **42**(4): 600-604.

Abbate, M., A. Benigni, T. Bertani and G. Remuzzi (1999). "Nephrotoxicity of increased glomerular protein traffic." Nephrol Dial Transplant **14**(2): 304-312.

AbdAlla, S., H. Lothar, A. M. Abdel-tawab and U. Quitterer (2001). "The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist." J Biol Chem **276**(43): 39721-39726.

Abdel-Rahman, E. M., P. M. Abadir and H. M. Siragy (2008). "Regulation of renal 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid in diabetes by angiotensin AT1 and AT2 receptors." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **295**(5): R1473-1478.

Aguilera, G. (1992). "Role of angiotensin II receptor subtypes on the regulation of aldosterone secretion in the adrenal glomerulosa zone in the rat." Mol Cell Endocrinol **90**(1): 53-60.

Akilesh, S., T. B. Huber, H. Wu, G. Wang, B. Hartleben, J. B. Kopp, J. H. Miner, D. C. Roopenian, E. R. Unanue and A. S. Shaw (2008). "Podocytes use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(3): 967-972.

Anderson, D. J. (1989). "Determination of the lower limit of detection." Clin Chem **35**(10): 2152-2153.

Asaba, K., A. Tojo, M. L. Onozato, A. Goto, M. T. Quinn, T. Fujita and C. S. Wilcox (2005). "Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy." Kidney Int **67**(5): 1890-1898.

Atlas, S. A. (2007). "The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition." J Manag Care Pharm **13**(8 Suppl B): 9-20.

Axelsson, J., A. Rippe, C. M. Oberg and B. Rippe (2012). "Rapid, dynamic changes in glomerular permeability to macromolecules during systemic angiotensin II (ANG II) infusion in rats." Am J Physiol Renal Physiol **303**(6): F790-799.

Barker, D. F., S. L. Hostikka, J. Zhou, L. T. Chow, A. R. Oliphant, S. C. Gerken, M. C. Gregory, M. H. Skolnick, C. L. Atkin and K. Tryggvason (1990). "Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome." Science **248**(4960): 1224-1227.

Barnett, A. H. (2005). "Preventing renal complications in diabetic patients: the Diabetics Exposed to Telmisartan And enalapril (DETAIL) study." Acta Diabetol **42 Suppl 1**: S42-49.

Barnett, A. H., S. C. Bain, P. Bouter, B. Karlberg, S. Madsbad, J. Jervell, J. Mustonen, T. Diabetics Exposed to and G. Enalapril Study (2004). "Angiotensin-receptor blockade versus converting-enzyme inhibition in type 2 diabetes and nephropathy." N Engl J Med **351**(19): 1952-1961.

Bell, P. D., J. Y. Lapointe, R. Sabirov, S. Hayashi, J. Peti-Peterdi, K. Manabe, G. Kovacs and Y. Okada (2003). "Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 4322-4327.

Benndorf, R. A., C. Krebs, B. Hirsch-Hoffmann, E. Schwedhelm, G. Cieslar, R. Schmidt-Haupt, O. M. Steinmetz, C. Meyer-Schwesinger, F. Thaiss, M. Haddad, S. Fehr, A. Heilmann, U. Helmchen, L. Hein, H. Ehmke, R. A. Stahl, R. H. Boger and U. O. Wenzel (2009). "Angiotensin II type 2 receptor deficiency aggravates renal injury and reduces survival in chronic kidney disease in mice." Kidney Int **75**(10): 1039-1049.

Berns, M. W. (1976). "A possible two-photon effect in vitro using a focused laser beam." Biophys J **16**(8): 973-977.

Bertani, T., C. Zoja, M. Abbate, M. Rossini and G. Remuzzi (1989). "Age-related nephropathy and proteinuria in rats with intact kidneys exposed to diets with different protein content." Lab Invest **60**(2): 196-204.

Bohman, S. O., G. Jaremko, A. B. Bohlin and U. Berg (1984). "Foot process fusion and glomerular filtration rate in minimal change nephrotic syndrome." Kidney Int **25**(4): 696-700.

Brown, C. P., M. A. Houle, K. Popov, M. Nicklaus, C. A. Couture, M. Laliberte, T. Brabec, A. Ruediger, A. J. Carr, A. J. Price, H. S. Gill, L. Ramunno and F. Legare (2013). "Imaging and modeling collagen architecture from the nano to micro scale." Biomed Opt Express **5**(1): 233-243.

Cadnapaphornchai, M. A., O. Tkachenko, D. Shchekochikhin and R. W. Schrier (2013). "The nephrotic syndrome: pathogenesis and treatment of edema formation and secondary complications." Pediatr Nephrol.

Carey, R. M., N. L. Howell, X. H. Jin and H. M. Siragy (2001). "Angiotensin type 2 receptor-mediated hypotension in angiotensin type-1 receptor-blocked rats." Hypertension **38**(6): 1272-1277.

Castrop, H. (2013). "Angiotensin receptor-associated proteins: local modulators of the renin-angiotensin system." Pflugers Arch **465**(1): 111-119.

Castrop, H., K. Hocherl, A. Kurtz, F. Schweda, V. Todorov and C. Wagner (2010). "Physiology of kidney renin." Physiol Rev **90**(2): 607-673.

Chang, R. L., W. M. Deen, C. R. Robertson and B. M. Brenner (1975). "Permeability of the glomerular capillary wall: III. Restricted transport of polyanions." Kidney Int **8**(4): 212-218.

Christensen, E. I. and H. Birn (2001). "Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule." Am J Physiol Renal Physiol **280**(4): F562-573.

Christensen, E. I., H. Birn, B. Rippe and A. B. Maunsbach (2007). "Controversies in nephrology: renal albumin handling, facts, and artifacts!" Kidney Int **72**(10): 1192-1194.

Comper, W. D., M. Tay, X. Wells and J. Dawes (1994). "Desulphation of dextran sulphate during kidney ultrafiltration." Biochem J **297** (Pt 1): 31-34.

Currie, G. and C. Delles (2013). "Proteinuria and its relation to cardiovascular disease." Int J Nephrol Renovasc Dis **7**: 13-24.

Daugherty, A., M. W. Manning and L. A. Cassis (2001). "Antagonism of AT2 receptors augments angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms and atherosclerosis." Br J Pharmacol **134**(4): 865-870.

De Paolis, P., A. Porcellini, B. Gigante, R. Giliberti, A. Lombardi, C. Savoia, S. Rubattu and M. Volpe (1999). "Modulation of the AT2 subtype receptor gene activation and expression by the AT1 receptor in endothelial cells." J Hypertens **17**(12 Pt 2): 1873-1877.

Deen, W. M. (2004). "What determines glomerular capillary permeability?" J Clin Invest **114**(10): 1412-1414.

Deen, W. M., M. J. Lazzara and B. D. Myers (2001). "Structural determinants of glomerular permeability." Am J Physiol Renal Physiol **281**(4): F579-596.

Diaspro, A., P. Bianchini, G. Vicidomini, M. Faretta, P. Ramoino and C. Usai (2006). "Multi-photon excitation microscopy." Biomed Eng Online **5**: 36.

Dickson, L. E., M. C. Wagner, R. M. Sandoval and B. A. Molitoris (2014). "The

Proximal Tubule and Albuminuria: Really!" J Am Soc Nephrol.

Dunn, K. W., T. A. Sutton and R. M. Sandoval (2007). "Live-animal imaging of renal function by multiphoton microscopy." Curr Protoc Cytom **Chapter 12**: Unit12 19.

Eisenbach, G. M., J. B. Liew, J. W. Boylan, N. Manz and P. Muir (1975). "Effect of angiotensin on the filtration of protein in the rat kidney: a micropuncture study." Kidney Int **8**(2): 80-87.

Eppel, G. A., T. M. Osicka, L. M. Pratt, P. Jablonski, B. O. Howden, E. F. Glasgow and W. D. Comper (1999). "The return of glomerular-filtered albumin to the rat renal vein." Kidney Int **55**(5): 1861-1870.

Epstein, M. (2003). "Aldosterone receptor blockade and the role of eplerenone: evolving perspectives." Nephrol Dial Transplant **18**(10): 1984-1992.

Eyre, J., K. Ioannou, B. D. Grubb, M. A. Saleem, P. W. Mathieson, N. J. Brunskill, E. I. Christensen and P. S. Topham (2007). "Statin-sensitive endocytosis of albumin by glomerular podocytes." Am J Physiol Renal Physiol **292**(2): F674-681.

Fogo, A. B. (2001). "Minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis." Nephrol Dial Transplant **16 Suppl 6**: 74-76.

Gekle, M. (2007). "Renal albumin handling: a look at the dark side of the filter." Kidney Int **71**(6): 479-481.

Gloy, J., A. Henger, K. G. Fischer, R. Nitschke, P. Mundel, M. Bleich, P. Schollmeyer, R. Greger and H. Pavenstadt (1997). "Angiotensin II depolarizes podocytes in the intact glomerulus of the Rat." J Clin Invest **99**(11): 2772-2781.

Goeppert-Mayer, M. (1931). "Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen."

Ann Phys **9**: 273-295.

Greene, E. L., S. Kren and T. H. Hostetter (1996). "Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat." J Clin Invest **98**(4): 1063-1068.

Greka, A. and P. Mundel (2012). "Calcium regulates podocyte actin dynamics." Semin Nephrol **32**(4): 319-326.

Greten, H., F. Rinninger and T. Greten (2010). Innere Medizin, Georg Thieme Verlag

Grishman, E. and J. Churg (1975). "Focal glomerular sclerosis in nephrotic patients: an electron microscopic study of glomerular podocytes." Kidney Int **7**(2): 111-122.

Guasch, A., W. M. Deen and B. D. Myers (1993). "Charge selectivity of the glomerular filtration barrier in healthy and nephrotic humans." J Clin Invest **92**(5): 2274-2282.

Gunther, S., M. A. Gimbrone, Jr. and R. W. Alexander (1980). "Regulation by angiotensin II of its receptors in resistance blood vessels." Nature **287**(5779): 230-232.

Hackbarth, H., D. Buttner, D. Jarck, M. Pothmann, C. Messow and K. Gartner (1983). "Distribution of glomeruli in the renal cortex of Munich Wistar Fromter (MWF) rats." Ren Physiol **6**(2): 63-71.

Hackbarth, H., W. Gwinner, J. M. Alt, I. Hagemann, A. Thiemann and B. Finke (1991). "The Munich Wistar Fromter rat: proteinuria and blood pressure in correlation to the number of superficial glomeruli." Ren Physiol Biochem **14**(6): 246-252.

Hackenthal, E., M. Paul, D. Ganten and R. Taugner (1990). "Morphology,

physiology, and molecular biology of renin secretion." Physiol Rev **70**(4): 1067-1116.

Haraldsson, B., J. Nystrom and W. M. Deen (2008). "Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria." Physiol Rev **88**(2): 451-487.

Haraldsson, B. and J. Sorensson (2004). "Why do we not all have proteinuria? An update of our current understanding of the glomerular barrier." News Physiol Sci **19**: 7-10.

Hassell, J. R., P. G. Robey, H. J. Barrach, J. Wilczek, S. I. Rennard and G. R. Martin (1980). "Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(8): 4494-4498.

Haymann, J. P., J. P. Levraud, S. Bouet, V. Kappes, J. Hagege, G. Nguyen, Y. Xu, E. Rondeau and J. D. Sraer (2000). "Characterization and localization of the neonatal Fc receptor in adult human kidney." J Am Soc Nephrol **11**(4): 632-639.

Helmchen, F. and W. Denk (2005). "Deep tissue two-photon microscopy." Nat Methods **2**(12): 932-940.

Helmy, M. and M. D. Siragy (2009). "Angiotensin II Subtype 2 Receptor: Potential Therapy." J Clin Hypertens (Greenwich) **11**: 26-29.

Holtmaat, A., T. Bonhoeffer, D. K. Chow, J. Chuckowree, V. De Paola, S. B. Hofer, M. Hubener, T. Keck, G. Knott, W. C. Lee, R. Mostany, T. D. Mrsic-Flogel, E. Nedivi, C. Portera-Cailliau, K. Svoboda, J. T. Trachtenberg and L. Wilbrecht (2009). "Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window." Nat Protoc **4**(8): 1128-1144.

Huber, T. B. (2008). "[Molecular pathogenesis of proteinuria]." Dtsch Med Wochenschr **133**(18): 954-958.

Huber, T. B., M. Simons, B. Hartleben, L. Sernetz, M. Schmidts, E. Gundlach, M. A. Saleem, G. Walz and T. Benzing (2003). "Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains." Hum Mol Genet **12**(24): 3397-3405.

Jaimes, E. A., J. M. Galceran and L. Raij (1998). "Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells." Kidney Int **54**(3): 775-784.

Jensen, J. S., B. Feldt-Rasmussen, S. Strandgaard, M. Schroll and K. Borch-Johnsen (2000). "Arterial hypertension, microalbuminuria, and risk of ischemic heart disease." Hypertension **35**(4): 898-903.

Jin, X. Q., N. Fukuda, J. Z. Su, Y. M. Lai, R. Suzuki, Y. Tahira, H. Takagi, Y. Ikeda, K. Kanmatsuse and H. Miyazaki (2002). "Angiotensin II type 2 receptor gene transfer downregulates angiotensin II type 1a receptor in vascular smooth muscle cells." Hypertension **39**(5): 1021-1027.

Johnsson, E., B. Rippe and B. Haraldsson (1994). "Reduced permselectivity in isolated perfused rat kidneys following small elevations of glomerular capillary pressure." Acta Physiol Scand **150**(2): 201-209.

Kang, J. J., I. Toma, A. Sipos, F. McCulloch and J. Peti-Peterdi (2006). "Quantitative imaging of basic functions in renal (patho)physiology." Am J Physiol Renal Physiol **291**(2): F495-502.

Karnovsky, M. J. and S. K. Ainsworth (1972). "The structural basis of glomerular filtration." Adv Nephrol Necker Hosp **2**: 35-60.

Kawachi, H., H. Koike, H. Kurihara, E. Yaoita, M. Orikasa, M. A. Shia, T. Sakai, T. Yamamoto, D. J. Salant and F. Shimizu (2000). "Cloning of rat nephrin: expression in developing glomeruli and in proteinuric states." Kidney Int **57**(5): 1949-1961.

Keith, D. S., G. A. Nichols, C. M. Gullion, J. B. Brown and D. H. Smith (2004). "Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization." Arch Intern Med **164**(6): 659-663.

Kestila, M., U. Lenkkeri, M. Mannikko, J. Lamerdin, P. McCready, H. Putaala, V. Ruotsalainen, T. Morita, M. Nissinen, R. Herva, C. E. Kashtan, L. Peltonen, C. Holmberg, A. Olsen and K. Tryggvason (1998). "Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome." Mol Cell **1**(4): 575-582.

Kinugasa, S., A. Tojo, T. Sakai, H. Tsumura, M. Takahashi, Y. Hirata and T. Fujita (2011). "Selective albuminuria via podocyte albumin transport in puromycin nephrotic rats is attenuated by an inhibitor of NADPH oxidase." Kidney Int **80**(12): 1328-1338.

Klinke, R. S., S. (2001). Lehrbuch der Physiologie.

Kobat, D., N. G. Horton and C. Xu (2011). "In vivo two-photon microscopy to 1.6-mm depth in mouse cortex." J Biomed Opt **16**(10): 106014.

Kriz, W. (2004). "Podocytes as a target for treatment with ACE inhibitors and/or angiotensin-receptor blockers." Kidney Int **65**(1): 333-334.

Lahdenkari, A. T., K. Lounatmaa, J. Patrakka, C. Holmberg, J. Wartiovaara, M. Kestila, O. Koskimies and H. Jalanko (2004). "Podocytes are firmly attached to glomerular basement membrane in kidneys with heavy proteinuria." J Am Soc Nephrol **15**(10): 2611-2618.

Lapinski, R., N. Perico, A. Remuzzi, F. Sangalli, A. Benigni and G. Remuzzi (1996). "Angiotensin II modulates glomerular capillary permselectivity in rat isolated perfused kidney." J Am Soc Nephrol **7**(5): 653-660.

Lee, M., J. L. Saver, K. H. Chang, H. W. Liao, S. C. Chang and B. Ovbiagele

(2010). "Impact of microalbuminuria on incident stroke: a meta-analysis." Stroke **41**(11): 2625-2631.

Lewis, E. J., L. G. Hunsicker, R. P. Bain and R. D. Rohde (1993). "The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group." N Engl J Med **329**(20): 1456-1462.

Lizakowski, S., L. Tylicki, M. Renke, P. Rutkowski, Z. Heleniak, M. Slawinska-Morawska, E. Aleksandrowicz, W. Lysiak-Szydłowska and B. Rutkowski (2012). "Effect of aliskiren on proteinuria in non-diabetic chronic kidney disease: a double-blind, crossover, randomised, controlled trial." Int Urol Nephrol **44**(6): 1763-1770.

Lopez-Sendon, J., K. Swedberg, J. McMurray, J. Tamargo, A. P. Maggioni, H. Dargie, M. Tendera, F. Waagstein, J. Kjeksus, P. Lechat, C. Torp-Pedersen, S. G. Priori, M. A. Alonso Garcia, J. J. Blanc, A. Budaj, M. Cowie, V. Dean, J. Deckers, E. Fernandez Burgos, J. Lekakis, B. Lindahl, G. Mazzotta, K. McGregor, J. Morais, A. Oto, O. A. Smiseth, D. Ardissino, C. Avendano, C. Blomstrom-Lundqvist, D. Clement, H. Drexler, R. Ferrari, K. A. Fox, D. Julian, P. Kearney, W. Klein, L. Kober, G. Mancina, M. Nieminen, W. Ruzillo, M. Simoons, K. Thygesen, G. Tognoni, I. Tritto, L. Wallentin, A. C. E. i. o. t. E. S. o. C. Task Force on and E. S. C. p. l. e. d. l. G. d. P. C. Comite de la (2004). "[Expert Consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors in cardiovascular disease]." Rev Esp Cardiol **57**(12): 1213-1232.

Lund, U., A. Rippe, D. Venturoli, O. Tenstad, A. Grubb and B. Rippe (2003). "Glomerular filtration rate dependence of sieving of albumin and some neutral proteins in rat kidneys." Am J Physiol Renal Physiol **284**(6): F1226-1234.

Mann, J. F., H. C. Gerstein, J. Pogue, J. Bosch and S. Yusuf (2001). "Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril: the HOPE randomized trial." Ann Intern Med **134**(8): 629-636.

Mashimo, T. (2014). "Gene targeting technologies in rats: Zinc finger nucleases,

transcription activator-like effector nucleases, and clustered regularly interspaced short palindromic repeats." Dev Growth Differ **56**(1): 46-52.

Mehta, P. K. and K. K. Griendling (2007). "Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system." Am J Physiol Cell Physiol **292**(1): C82-97.

Miyata, N., F. Park, X. F. Li and A. W. Cowley, Jr. (1999). "Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney." Am J Physiol **277**(3 Pt 2): F437-446.

Mooyaart, A. L. (2013). "Genetic associations in diabetic nephropathy." Clin Exp Nephrol.

Munzenmaier, D. H. and A. S. Greene (1996). "Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure." Hypertension **27**(3 Pt 2): 760-765.

Nitschke, R., A. Henger, S. Ricken, J. Gloy, V. Muller, R. Greger and H. Pavenstadt (2000). "Angiotensin II increases the intracellular calcium activity in podocytes of the intact glomerulus." Kidney Int **57**(1): 41-49.

Norden, A. G., M. Lapsley, P. J. Lee, C. D. Pusey, S. J. Scheinman, F. W. Tam, R. V. Thakker, R. J. Unwin and O. Wrong (2001). "Glomerular protein sieving and implications for renal failure in Fanconi syndrome." Kidney Int **60**(5): 1885-1892.

Ogamo, A., A. Nagai and K. Nagasawa (1985). "Binding of heparin fractions and other polysulfated polysaccharides to plasma fibronectin: effects of molecular size and degree of sulfation of polysaccharides." Biochim Biophys Acta **841**(1): 30-41.

Oheim, M., D. J. Michael, M. Geisbauer, D. Madsen and R. H. Chow (2006). "Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear

imaging approaches." Adv Drug Deliv Rev **58**(7): 788-808.

Ohlson, M., J. Sorensson and B. Haraldsson (2000). "Glomerular size and charge selectivity in the rat as revealed by FITC-ficoll and albumin." Am J Physiol Renal Physiol **279**(1): F84-91.

Ohlson, M., J. Sorensson, K. Lindstrom, A. M. Blom, E. Fries and B. Haraldsson (2001). "Effects of filtration rate on the glomerular barrier and clearance of four differently shaped molecules." Am J Physiol Renal Physiol **281**(1): F103-113.

Okamura, K., P. Dummer, J. Kopp, L. Qiu, M. Levi, S. Faubel and J. Blaine (2013). "Endocytosis of albumin by podocytes elicits an inflammatory response and induces apoptotic cell death." PLoS One **8**(1): e54817.

Oken, D. E. and W. Flamenbaum (1971). "Micropuncture studies of proximal tubule albumin concentrations in normal and nephrotic rats." J Clin Invest **50**(7): 1498-1505.

Osicka, T. M., L. M. Pratt and W. D. Comper (1996). "Glomerular capillary wall permeability to albumin and horseradish peroxidase." Nephrology **2**(3): 199-212.

Padia, S. H., N. L. Howell, H. M. Siragy and R. M. Carey (2006). "Renal angiotensin type 2 receptors mediate natriuresis via angiotensin III in the angiotensin II type 1 receptor-blocked rat." Hypertension **47**(3): 537-544.

Pavenstadt, H., W. Kriz and M. Kretzler (2003). "Cell biology of the glomerular podocyte." Physiol Rev **83**(1): 253-307.

Peti-Peterdi, J. (2009). "Independent two-photon measurements of albumin GSC give low values." Am J Physiol Renal Physiol **296**(6): F1255-1257.

Peti-Peterdi, J., J. L. Burford and M. J. Hackl (2012). "The first decade of using multiphoton microscopy for high-power kidney imaging." Am J Physiol Renal

Physiol **302**(2): F227-233.

Plata, C., P. Meade, N. Vazquez, S. C. Hebert and G. Gamba (2002). "Functional properties of the apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter isoforms." J Biol Chem **277**(13): 11004-11012.

Pool, J. L. (2007). "Direct renin inhibition: focus on aliskiren." J Manag Care Pharm **13**(8 Suppl B): 21-33.

Prabakaran, T., E. I. Christensen, R. Nielsen and P. J. Verroust (2012). "Cubilin is expressed in rat and human glomerular podocytes." Nephrol Dial Transplant **27**(8): 3156-3159.

Prabakaran, T., R. Nielsen, J. V. Larsen, S. S. Sorensen, U. Feldt-Rasmussen, M. A. Saleem, C. M. Petersen, P. J. Verroust and E. I. Christensen (2011). "Receptor-mediated endocytosis of alpha-galactosidase A in human podocytes in Fabry disease." PLoS One **6**(9): e25065.

Pricam, C., F. Humbert, A. Perrelet, M. Amherdt and L. Orci (1975). "Intercellular junctions in podocytes of the nephrotic glomerulus as seen with freeze-fracture." Lab Invest **33**(3): 209-218.

Rajagopalan, S., S. Kurz, T. Munzel, M. Tarpey, B. A. Freeman, K. K. Griendling and D. G. Harrison (1996). "Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone." J Clin Invest **97**(8): 1916-1923.

Remuzzi, A., S. Puntorieri, C. Battaglia, T. Bertani and G. Remuzzi (1990). "Angiotensin converting enzyme inhibition ameliorates glomerular filtration of macromolecules and water and lessens glomerular injury in the rat." J Clin Invest **85**(2): 541-549.

Remuzzi, A., S. Puntorieri, A. Mazzoleni and G. Remuzzi (1988). "Sex related differences in glomerular ultrafiltration and proteinuria in Munich-Wistar rats." Kidney Int **34**(4): 481-486.

Remuzzi, G. and T. Bertani (1998). "Pathophysiology of progressive nephropathies." N Engl J Med **339**(20): 1448-1456.

Remuzzi, G., N. Perico, M. Macia and P. Ruggenti (2005). "The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease." Kidney Int Suppl(99): S57-65.

Rippe, B. and B. Haraldsson (1994). "Transport of macromolecules across microvascular walls: the two-pore theory." Physiol Rev **74**(1): 163-219.

Ruggenti, P., P. Cravedi and G. Remuzzi (2012). "Mechanisms and treatment of CKD." J Am Soc Nephrol **23**(12): 1917-1928.

Ruiz-Ortega, M., O. Lorenzo, Y. Suzuki, M. Ruperez and J. Egido (2001). "Proinflammatory actions of angiotensins." Curr Opin Nephrol Hypertens **10**(3): 321-329.

Ruotsalainen, V., P. Ljungberg, J. Wartiovaara, U. Lenkkeri, M. Kestila, H. Jalanko, C. Holmberg and K. Tryggvason (1999). "Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7962-7967.

Russo, L. M., G. L. Bakris and W. D. Comper (2002). "Renal handling of albumin: a critical review of basic concepts and perspective." Am J Kidney Dis **39**(5): 899-919.

Russo, L. M., R. M. Sandoval, M. McKee, T. M. Osicka, A. B. Collins, D. Brown, B. A. Molitoris and W. D. Comper (2007). "The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in

nephrotic states." Kidney Int **71**(6): 504-513.

Ryan, G. B. and M. J. Karnovsky (1975). "An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis." Kidney Int **8**(4): 219-232.

Schießl, I. M., S. Bardehle and H. Castrop (2013). "Superficial nephrons in BALB/c and C57BL/6 mice facilitate in vivo multiphoton microscopy of the kidney." PLoS One **8**(1): e52499.

Schmidt, R. F., F. Lang and G. Thews (2005). Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, Springer Medizin Verlag Heidelberg.

Sharma, M., R. Sharma, A. S. Greene, E. T. McCarthy and V. J. Savin (1998). "Documentation of angiotensin II receptors in glomerular epithelial cells." Am J Physiol **274**(3 Pt 2): F623-627.

Sharma, R., M. Sharma, S. Vamos, V. J. Savin and T. B. Wiegmann (2001). "Both subtype 1 and 2 receptors of angiotensin II participate in regulation of intracellular calcium in glomerular epithelial cells." J Lab Clin Med **138**(1): 40-49.

Simionescu, M. and F. Antohe (2006). "Functional ultrastructure of the vascular endothelium: changes in various pathologies." Handb Exp Pharmacol(176 Pt 1): 41-69.

Siragy, H. M. (2009). "Angiotensin II Subtype 2 Receptor: Potential Therapy." J Clin Hypertens (Greenwich). **11**: 26-29.

Siragy, H. M. and R. M. Carey (1996). "The subtype-2 (AT2) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and AT1 receptor-mediated prostaglandin E2 production in conscious rats." J Clin Invest **97**(8): 1978-1982.

Siragy, H. M., T. Inagami, T. Ichiki and R. M. Carey (1999). "Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT₂) angiotensin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6506-6510.

Siragy, H. M., C. Xue, P. Abadir and R. M. Carey (2005). "Angiotensin subtype-2 receptors inhibit renin biosynthesis and angiotensin II formation." Hypertension **45**(1): 133-137.

Smithies, O. (2003). "Why the kidney glomerulus does not clog: a gel permeation/diffusion hypothesis of renal function." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 4108-4113.

Sorensson, J., M. Ohlson and B. Haraldsson (2001). "A quantitative analysis of the glomerular charge barrier in the rat." Am J Physiol Renal Physiol **280**(4): F646-656.

Stenvinkel, P., M. Ketteler, R. J. Johnson, B. Lindholm, R. Pecoits-Filho, M. Riella, O. Heimbürger, T. Cederholm and M. Girndt (2005). "IL-10, IL-6, and TNF- α : central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly." Kidney Int **67**(4): 1216-1233.

Stockand, J. D. and S. C. Sansom (1997). "Regulation of filtration rate by glomerular mesangial cells in health and diabetic renal disease." Am J Kidney Dis **29**(6): 971-981.

Stockand, J. D. and S. C. Sansom (1998). "Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction." Physiol Rev **78**(3): 723-744.

Stolte, H., H. J. Schurek and J. M. Alt (1979). "Glomerular albumin filtration: a comparison of micropuncture studies in the isolated perfused rat kidney with in vivo experimental conditions." Kidney Int **16**(3): 377-384.

Strasser, R. H., J. G. Puig, C. Farsang, M. Croket, J. Li and H. van Ingen (2007).

"A comparison of the tolerability of the direct renin inhibitor aliskiren and lisinopril in patients with severe hypertension." J Hum Hypertens **21**(10): 780-787.

Taal, M. W. and B. M. Brenner (2000). "Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists." Kidney Int **57**(5): 1803-1817.

Tanner, G. A. (2009). "Glomerular sieving coefficient of serum albumin in the rat: a two-photon microscopy study." Am J Physiol Renal Physiol **296**(6): F1258-1265.

Theer, P. and W. Denk (2006). "On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy." J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis **23**(12): 3139-3149.

Thomson, S. C., R. C. Blantz and V. Vallon (1996). "Increased tubular flow induces resetting of tubuloglomerular feedback in euvolemic rats." Am J Physiol **270**(3 Pt 2): F461-468.

Timmermans, P. B., P. C. Wong, A. T. Chiu, W. F. Herblin and R. D. Smith (1993). "New perspectives in angiotensin system control." J Hum Hypertens **7 Suppl 2**: S19-31.

Tisher, C. C. (1978). "Functional anatomy of the kidney." Hosp Pract **13**(5): UNKNOWN.

Tojo, A. and H. Endou (1992). "Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique." Am J Physiol **263**(4 Pt 2): F601-606.

Tojo, A. and S. Kinugasa (2012). "Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption." Int J Nephrol **2012**: 481520.

Tojo, A., M. L. Onozato, C. Kitiyakara, S. Kinugasa, S. Fukuda, T. Sakai and T.

Fujita (2008). "Glomerular albumin filtration through podocyte cell body in puromycin aminonucleoside nephrotic rat." Med Mol Morphol **41**(2): 92-98.

Toth, T. and S. Takebayashi (1992). "Glomerular podocyte vacuolation in idiopathic membranous glomerulonephritis." Nephron **61**(1): 16-20.

Tryggvason, K. (1999). "Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm." J Am Soc Nephrol **10**(11): 2440-2445.

Tsutsumi, Y., H. Matsubara, H. Masaki, H. Kurihara, S. Murasawa, S. Takai, M. Miyazaki, Y. Nozawa, R. Ozono, K. Nakagawa, T. Miwa, N. Kawada, Y. Mori, Y. Shibasaki, Y. Tanaka, S. Fujiyama, Y. Koyama, A. Fujiyama, H. Takahashi and T. Iwasaka (1999). "Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation." J Clin Invest **104**(7): 925-935.

Tylicki, L., S. Lizakowski and B. Rutkowski (2012). "Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for nephroprotection: current evidence and future directions." J Nephrol **25**(6): 900-910.

Ushio-Fukai, M., R. W. Alexander, M. Akers, P. R. Lyons, B. Lassegue and K. K. Griendling (1999). "Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells." Mol Pharmacol **55**(1): 142-149.

Wagner, D. K., T. Harris and J. H. Madans (1994). "Proteinuria as a biomarker: risk of subsequent morbidity and mortality." Environ Res **66**(2): 160-172.

Wang, L., P. J. Flannery and R. F. Spurney (2003). "Characterization of angiotensin II-receptor subtypes in podocytes." J Lab Clin Med **142**(5): 313-321.

Weir, M. R. and V. J. Dzau (1999). "The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management." Am J Hypertens **12**(12 Pt 3): 205S-

213S.

Wong, J., R. A. Patel and K. P.R. (2004). "The clinical use of angiotensin-converting enzyme inhibitors." Prog Cardiovasc Dis. **47**: 116-130

Yoshikawa, N., H. Ito, R. Akamatsu, H. Hazikano, S. Okada and T. Matsuo (1986). "Glomerular podocyte vacuolation in focal segmental glomerulosclerosis." Arch Pathol Lab Med **110**(5): 394-398.

Yoshioka, T., H. G. Rennke, D. J. Salant, W. M. Deen and I. Ichikawa (1987). "Role of abnormally high transmural pressure in the permselectivity defect of glomerular capillary wall: a study in early passive Heymann nephritis." Circ Res **61**(4): 531-538.

Zoja, C., X. H. Liu, M. Abbate, D. Corna, E. L. Schiffrin, G. Remuzzi and A. Benigni (1998). "Angiotensin II blockade limits tubular protein overreabsorption and the consequent upregulation of endothelin 1 gene in experimental membranous nephropathy." Exp Nephrol **6**(2): 121-131.

X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Das Nephron - Vereinfachter Überblick des Aufbaus und der Funktionen (Klinke 2001). Modifiziert nach „Nephron diagram gallery“ (http://gal9.piclab.us/key/nephron%20diagram#).....</i>	<i>2</i>
<i>Abbildung 2: Schematischer Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere.....</i>	<i>3</i>
<i>Abbildung 3: Vereinfachtes Schema des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS).</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 4: Eingriffsmöglichkeiten zur Hemmung des RAAS.</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 5: Vereinfachtes Perrin-Jablonski Fluoreszenz-Diagramm für die 1-, 2- und 3-Photonen-Absorption. Modifiziert nach (Diaspro et al. 2006).</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 6: Platzierung des Versuchstiers auf dem Multiphotonen-Mikroskop zur Untersuchung der Nierenfunktion.</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 7: Visualisierung von Nierenstrukturen mit Hilfe von Multiphotonen-Mikroskopie.....</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 8: Experimentelle Ermittlung des Detektorschwellenwertes für die Bestimmung des GSC_A.....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 9: Bestimmung des glomerulären Siebkoeffizienten von Albumin.....</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 10: Bestimmung der Einzelnephron-GFR.....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 11: Negativ-Darstellung von Podozyten.....</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 12: Chirurgischer Eingriff zur Manipulation des renalen Perfusionsdrucks. (Modifiziert nach: Aortic Stents.com; Medtronic Inc., 2006)</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 13: Bestimmung der Tiefe der murinen Glomeruli im Nierenkortex.</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 14: In vivo-Aufnahmebedingungen der Niere einer MWF Ratte mittels Multiphotonen-Mikroskopie.....</i>	<i>57</i>

<i>Abbildung 15: Z-Stapel durch eine murine Niere in vivo, welcher typische renale Strukturen, wie den Glomerulus (g), proximale Tubuli (pt) und extraglomeruläre Kapillaren (Pfeile) zeigt.....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 16: Z-Stapel durch eine murine Leber, in vivo.</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 17: Z-Stapel durch den Gyrus postcentralis eines murinen Gehirns, in vivo.....</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 18: Tiefe der Glomeruli in vier Wochen alten Mäusen unterschiedlicher Stämme.</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 19: Tiefe der Glomeruli in zehn Wochen alten Mäusen unterschiedlicher Stämme.....</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 20: Charakterisierung der Albuminausscheidung im Urin bei heranwachsenden MWF und Wistar Ratten.</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 21: Evaluierung der glomerulären Albuminfiltration bei unbehandelten, jungen und ein Jahr alten MWF Ratten sowie ein Jahr alten MWF Ratten, die vier Wochen mit Enalapril behandelt wurden.</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 22: Mittlerer arterieller Blutdruck der einjährigen MWF Ratten ohne und mit Enalapril-Behandlung (in Narkose).....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 23: Albuminausscheidung in einjährigen MWF Ratten unter Behandlung mit Enalapril [100 mg/l p.o.].....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 24: Ermittlung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) von einjährigen MWF Ratten unter Enalapril-Behandlung.</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 25: Effekte von Angiotensin II auf den glomerulären Siebkoeffizienten von Albumin. ..</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 26: Proximal-tubuläre Rückresorption von Albumin während (A) 0,9%iger Kochsalzinfusion und (B) Angiotensin II-Infusion.....</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 27: Austritt des Alexa 594-BSA in das proximal-tubuläre Lumen unter Infusion von Angiotensin II.....</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 28: Quantifizierung der Albuminausscheidung im Urin.....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 29: Akute Effekte von Angiotensin II auf die Einzelnephron-GFR.</i>	<i>73</i>

<i>Abbildung 30: Effekte des AT1-Rezeptor-Antagonisten Losartan (0,9 µg/g KGW) auf die Filtration von Albumin.</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 31: Effekte des AT2-Rezeptor-Antagonisten PD123319 (3 µg/g KGW) auf die Filtration von Albumin.</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 32: Korrelationsstudie des mittleren arteriellen Blutdrucks und des GSC_A.....</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 33: Effekte des mechanisch manipulierten renalen Perfusionsdrucks auf den mittleren arteriellen Blutdruck und den GSC_A unter Angiotensin II-Infusion.....</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 34: Blutdruckunabhängige Effekte von Angiotensin II auf die Albuminfiltration.....</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 35: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Angiotensin II und dem Ausmaß podozytärer Endozytose von Rhodamin B-gefärbten Plasmaprotein.....</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 36: Fluid-haltige endozytotische Vesikel in Podozyten mit Rhodamin B-gefärbten Plasmaproteinen.</i>	<i>81</i>
<i>Abbildung 37: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Angiotensin II und dem Ausmaß Fluid-haltiger podozytärer Endozytose von Albumin.....</i>	<i>82</i>
<i>Abbildung 38: Fluid-haltige podozytäre Endozytosevesikel mit Alexa 594-BSA unter Infusion von Angiotensin II.....</i>	<i>83</i>
<i>Abbildung 39: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Angiotensin II und dem Auftreten von nicht-Fluid-gefüllten endozytotischen Vesikeln in Podozyten.....</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 40: Nicht-Fluid-gefüllte podozytäre Endozytose basal und unter Infusion von 80 ng/kg KGW /min Angiotensin II.....</i>	<i>85</i>
<i>Abbildung 41: Transzytose von Alexa 594-BSA durch Podozyten (I).</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 42: Transzytose von Alexa 594-BSA durch Podozyten (II).</i>	<i>87</i>
Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Detektorsettings für die Quantifizierung der podozytären Endozytose.....	45

XI. DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Hayo Castrop. Als mein Doktorvater überließ er mir nicht nur das Thema für diese Arbeit, sondern unterstützte und förderte mich in meiner Zeit als Doktorandin weit über die Norm hinaus. Ich möchte mich an dieser Stelle dafür bedanken, dass ich im Ausland eine faszinierende Methode erlernen durfte, meine Arbeit auf nationalen und internationalen Kongressen vorzustellen konnte sowie dafür, dass ich von ihm stets konstruktive Kritik und eine sowohl fachlich als auch zwischenmenschlich ausgezeichnete Betreuung erhielt.

Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. Frank Schweda, für die vielen Ratschläge und die Unterstützung, die er mir als mein Mentor in der Zeit meiner Promotion stets entgegenbrachte.

Ein großer Dank geht an Herrn Professor Dr. Janos Peti-Peterdi, für die großzügige Option für mehrere Monate in seinem Labor zu arbeiten und die Nutzung der Multiphotonen-Mikroskopie für die Untersuchung der Nierenfunktion zu erlernen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch herzlich bei Herrn James Buford und Herrn Dr. Matthias Hackl bedanken, die mir während meines Aufenthaltes in Los Angeles eine überaus geduldige und kompetente Anleitung beim Erlernen der Multiphotonen-Mikroskopie gewährten.

Herrn Professor Dr. Klaus Höcherl möchte ich meinen Dank für seine große Unterstützung in Form von fachlichen Ratschlägen und der großzügigen Bereitstellung von Labor-Equipment, aussprechen.

Ich möchte mich hier auch gerne bei den Kolleginnen und Kollegen des Instituts, insbesondere denen meiner Arbeitsgruppe, für die freundschaftliche und kollegiale Atmosphäre bedanken. Einen besonderen Dank möchte ich dabei an Frau Veronika Kattler, für ihre Mitarbeit an zahlreichen Projekten, Herrn Uwe de Vries, für die kompetente Einführung am LSM 710 und Frau Dr. Katharina Ebert, für ihre Hilfe bei der Erlernung neuer Methoden, aussprechen.

Von Herzen danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Großeltern, die mich mein ganzes Leben lang unterstützt haben und für mich da waren, ebenso wie meinen einzigartigen Freunden.

Zu guter Letzt, danke ich meinem Freund Florian Gietl für seine Liebe und seine außergewöhnliche Art die Welt zu betrachten, die auch mir immer wieder hilft meinen Blickwinkel zu verändern.