

Der Reaktionsort des nephrotoxischen Antikörpers

Elektronenmikroskopischer Antikörpernachweis nach intravenöser Injektion ferritinmarkierter Antirattennierenserum *

ARNOLD VOGT, RUDOLF CAESAR und JOHANNES MÜLLER

Hygiene-Institut der Universität Freiburg i.Br. (Direktor: Prof. Dr. med. R. HAAS)
und Pathologisches Institut der Universität Kiel (Direktor: Prof. Dr. med. K. LENNERT)

Eingegangen am 27. Mai 1966

Als Ursache der nephrotoxischen Nephritis wird allgemein eine in der Niere ablaufende Antigen-Antikörper-Reaktion angesehen. Immunhistologisch ist beim Versuchstier eine Ansammlung des i.v. injizierten heterologen Nierenantikörpers entlang der Glomerulumcapillaren nachzuweisen. Der heterologe Antikörper scheint demnach vorwiegend an die glomeruläre Basalmembran gebunden zu werden. Das beschränkte Auflösungsvermögen des Fluoreszenzmikroskopes läßt jedoch eine exakte Aussage über den genauen Reaktionsort der in vivo ablaufenden Antigen-Antikörper-Reaktion in der Niere nicht zu.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Globulinfractionen von Kaninchen-antirattennierenserum (Ka-ANS) und Entenantirattennierenserum (E-ANS) nach der Methode von SINGER und SCHICK (1961) an Ferritin, ein elektronendichtes Molekül, gekuppelt. Das vom ungebundenen ANS-Globulin gereinigte Ferritin-konjugat wurde Ratten i.v. injiziert und die in der Niere gebundenen ferritinmarkierten Antikörper elektronenmikroskopisch direkt nachgewiesen.

Ferritin enthält bis zu 23 % seines Trockengewichtes Eisen (GRANICK, 1942). Der hohe Eisengehalt ermöglicht eine Darstellung der Ferritinmoleküle im Elektronenmikroskop (FARRANT, 1954). Durch Kupplung von Ferritin an Antikörperglobulin ist es somit möglich, Antigen-Antikörperkomplexe elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen (SINGER und SCHICK, 1961).

Material und Methoden

1. Versuchstiere

Die Versuche wurden an 150 bis 170 g schweren männlichen Wistar-Ratten (Fa. A. Krämer, Köln) durchgeführt. Die gereinigten ferritinmarkierten Enten- und Kaninchenantiseren wurden den Versuchstieren in leichter Äthernarkose stets in einer einmaligen Dosis i.v. in die Schwanzvene injiziert. Kontrollratten erhielten statt des Conjugates gleiche oder höhere Mengen Ferritin oder Ferritin, das an normales Globulin gekuppelt worden war.

2. Ferritin

(zweimal kristallisiertes Ferritin aus Pferdemilz) bezogen wir von der Firma Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland, Ohio. Der Gehalt an Ferritin wurde photometrisch bei 440 m μ bestimmt. Eine O.D. von 1,0 entsprach einem Ferritingehalt von 0,615 mg/ml (durch N-Bestimmung im Mikrokjeldahl ermittelt, wobei der N-Gehalt des Ferritins mit 10 % angenommen wurde).

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Da Ferritinpräparate noch Cadmium enthalten, dialysierten wir das Ferritin zunächst unter öfterem Wechsel der Dialyseflüssigkeit gegen phosphatgepufferte 0,075 m EDTA-Lösung (Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure), um das toxische Cadmium zu entfernen (FARQUHAR u. Mitarb., 1961). Nach einer ausreichenden Dialyse wurde das Ferritin von den Ratten bis zu einer Dosis von 100 mg ohne nennenswerte Nebenwirkungen vertragen.

Bevor wir das Antikörperglobulin an Ferritin kuppelten, trennten wir das freie Apoferritin vom eisenhaltigen Ferritin durch mehrmaliges Ultrazentrifugieren ab (KOPP u. Mitarb., 1964). Ferritinpräparate enthalten gewöhnlich 20 bis 25% eisenfreies Apoferritin, das sich natürlich nicht im Elektronenmikroskop darstellt und daher für die Markierung von Antikörpern nicht geeignet ist.

3. Antiseren

a) *Antirattennierenserum*. Die Herstellung der Antirattennierenserum (ANS) von der Ente und vom Kaninchen durch Immunisierung mit isolierten Rattenglomerula wurde bereits an anderer Stelle näher beschrieben (NAKANON und VOGT, 1965).

b) *Antiferritin*. Kaninchen erhielten zwei- bis dreimal wöchentlich je 5 mg Ferritin i.v. injiziert, insgesamt 100 bis 150 mg pro Tier. Eine Woche nach der letzten Antigeninjektion wurden die Tiere aus der A. carotis entblutet und das Serum ohne Zusätze bis zum Gebrauch bei -20°C aufgehoben.

c) *Antikaninchenglobulin*. Enten erhielten zwei- bis dreimal wöchentlich je 5 mg Kaninchenglobulin i.v. injiziert, insgesamt 150 bis 300 mg pro Tier. Das Antikaninchenglobulin von der Ziege überließ uns freundlicherweise Herr Dr. SCHWICK, Behringwerke, Marburg.

d) *Präparation der Globulinfraktionen*. Die Globulinfraktionen wurden durch drei aufeinanderfolgende Fällungen mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewonnen, wobei einer ersten Fällung bei 50% Ammoniumsulfatsättigung zwei weitere Fällungen bei 40% Sättigung angeschlossen wurden. Nach ausreichender Dialyse gegen physiologische Kochsalzlösung (mit einem Tropfen Toluol in der Dialyseflüssigkeit zur Vermeidung einer stärkeren bakteriellen Verunreinigung) hoben wir die Globulinfraktionen bis zur baldigen Weiterverarbeitung bei 4°C im Kühlraum auf. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte photometrisch bei 280 m μ .

4. Kupplung von Antikörperglobulin an Ferritin

Die Kupplung der ANS-Globulinfraktionen an Ferritin führten wir nach der Methode von SINGER und SCHICK (1961) mit Toluol-2,4-Diisocyanat (TC) (Fluka A.G., Buchs S.G., Schweiz) durch. Der erste Reaktionsschritt (Umsetzen des TC mit Ferritin bei 4°C im Wasserbad und 25 bis 30 min Rühren je nach Reaktionsvolumen) konnte soweit standardisiert

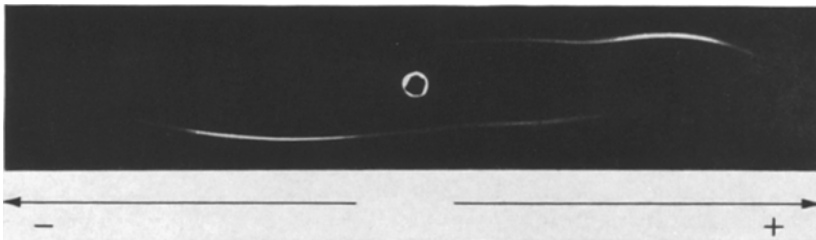


Abb. 1. Immunelektrophorese eines ungereinigten Ferritin-ANS-Globulin-Conjugates. Oben: Darstellung des Ferritins mit einem Antiferritin vom Kaninchen. Unten: Darstellung von Kaninchenglobulin mit einem Antikaninchenglobulin von der Ziege

werden, daß die Ausbeute an gekuppeltem Ferritin stets um 30% des gesamten zugegebenen Ferritins ausmachte. Vergleichende Untersuchungen von Ferritinkupplungsprodukten mit verschiedenen hohen Ausbeuten an Conjugat hatte ergeben, daß hohe Ausbeuten von Nachteil sind, da mit steigendem Ausmaß an gekuppeltem Ferritin ein zunehmender Verlust an Antikörperaktivität verbunden ist (VOGT und KOPP, 1965).

Den Nachweis der gelungenen Kupplung führten wir immunelektrophoretisch (Abb. 1). Der Anteil des gekuppelten Ferritins wurde nach elektrophoretischer Auftrennung des Kupplungsproduktes im Agargel und Anfärben der ferritinhaltigen Komponenten mit der Berliner-

Blau-Reaktion (Abb. 2) densitometrisch (Vitatron-Universal-Photometer UFD) bestimmt. Hieraus ist bei bekanntem Ferritingehalt des Kupplungsproduktes der Anteil des an Ferritin gekuppelten Antikörperglobulins unschwer zu errechnen (VOGT und KOPF, 1964).

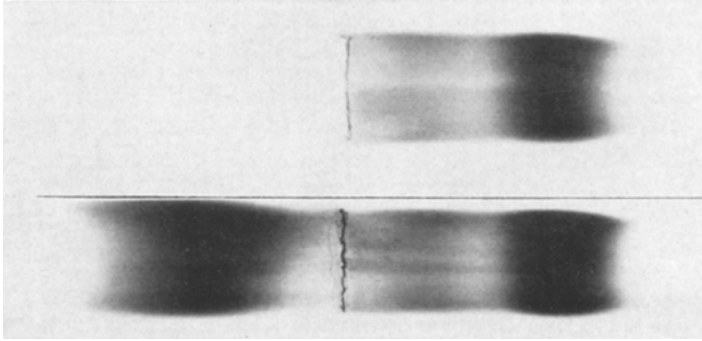


Abb. 2. Agargelelektrophoresen eines ungereinigten Kupplungsproduktes. Oben: Anfärbung mit der Berliner-Blau-Reaktion. Unten: Anfärbung mit Amidoschwarz

5. Reinigung der Ferritin-ANS-Conjugate

Das Kupplungsprodukt enthält je nach Ausbeute an Conjugat einen unterschiedlich großen Anteil an ungebundenem ANS-Globulin (Abb. 2). Das freie ANS-Globulin kann leicht von den beiden ferritinhaltigen Komponenten (dem Ferritin-ANS-Conjugat und dem nicht gekuppelten Ferritin) durch mehrmaliges Zentrifugieren bei 40000 Upm für 2 Std abgetrennt werden (Spinco Ultrazentrifuge, Rotor 40). Das ungebundene ANS-Globulin bleibt zum größten Teil im Überstand und kann durch Dekantieren vom ferritinhaltigen Bodensatz abgetrennt werden. Wir begnügten uns in den vorliegenden Untersuchungen mit einer einmaligen Ultrazentrifugation, wodurch wir den größten Teil des ungebundenen ANS-Globulins, jedoch nicht alles, entfernen konnten.

6. Elektronenmikroskopie

Kleine Stückchen der Nierenrinde wurden sofort nach dem Töten der Tiere (Äther) in gepufferte 1% OsO₄ mit 10% Saccharose bei Zimmertemperatur fixiert und in Vestopal eingebettet. Elektronenmikroskopische Aufnahmen an Dünnschnitten mit einem Siemens-Elmiskop I.

7. Proteinbestimmung im Harn

Die Gesamtproteinausscheidung im Harn wurde, wie an anderer Stelle bereits beschrieben (NAKANOIN und VOGT, 1965), mit der Biuretmethode bestimmt.

8. Immunhistologie

Wir markierten die Globulinfractionen des Antiferritins vom Kaninchen und des Antikaninchenglobulins von der Ente nach den Angaben von NAIRN (1962) mit Fluoresceiniso-thiocyanat (FITC). Zur Entfernung der unspezifischen Fluoreszenz wurden die markierten Globulinfractionen zunächst durch Sephadex G-25 (Pharmacia Uppsala) gelfiltriert. Das markierte Antikaninchenglobulin war danach frei von unspezifischer Fluoreszenz, wir benutzten es ohne weitere Reinigung. Beim Antiferritin schlossen wir nach der Gelfiltration noch eine Chromatographie über DEAE-Cellulose (stufenweise Elution mit 0,02, 0,05 und 0,1 m Phosphatpuffer pH 8,0) an, um die noch vorhandenen unspezifischen Reaktionen des markierten Antiserums vollständig zu beseitigen. Das stufenweise eluierte Antiferritin wurde in Portionen von je 2,0 ml aufgefangen und die optimal markierten Fraktionen (gewöhnlich bis zu einer Elution von 0,05 m) gepoolt.

Nativschnitte der Nieren zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung überschichteten wir mit den FITC-markierten Antiseren für 20 min bei Zimmertemperatur.

Ergebnisse

Mit ungereinigten Ferritin-ANS-Conjugaten gelang es uns nicht, eine wahrnehmbare Lokalisation von ferritinmarkierten Antikörpern in der glomerulären Basalmembran zu erreichen. Offensichtlich war die Menge an ferritinmarkierten Antikörpern, die mit der Basalmembran reagierten, zu gering. Eine wesentliche Erhöhung der Injektionsmenge an ferritinmarkiertem ANS-Globulin war erst möglich, nachdem wir das ungebundene ANS-Globulin durch Ultrazentrifugation von den ferritinhaltigen Komponenten des Kupplungsproduktes abtrennten.

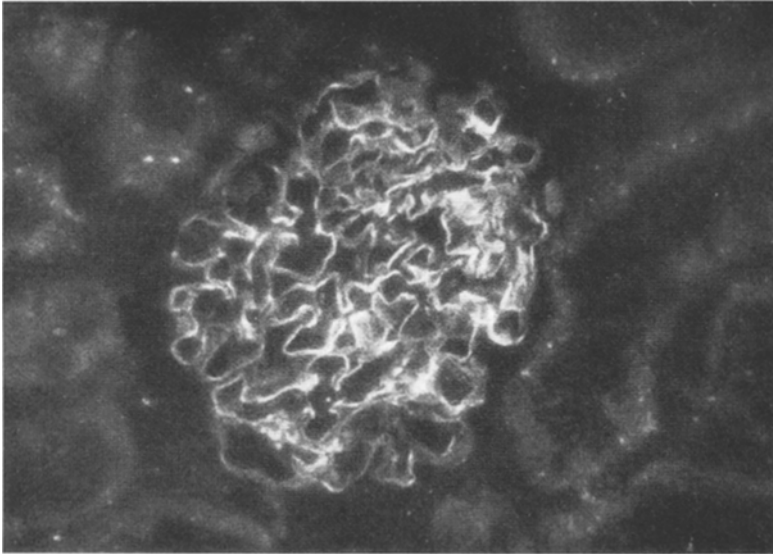


Abb. 3. Immunhistologischer Nachweis von Ferritin 24 Std nach Injektion von ferritinmarkiertem ANS-Globulin im Glomerulum. Vergr. 300fach

Unter den von uns gewählten Kupplungsbedingungen blieb nämlich der weitaus größte Teil des Antikörperglobulins immer ungebunden. Das mag folgende Überlegung veranschaulichen: Ferritin und Antikörperglobulin liegen im Reaktionsgemisch in gleichen Gewichtsmengen vor. Im Ferritin-Antikörperglobulin-Conjugat finden sich Ferritin und Antikörperglobulin im molekularen Verhältnis von 1:1 vor (SRI RAM u. Mitarb., 1963). Da das Molekulargewicht von Ferritin 750000, das von Kaninchen γ -Globulin jedoch nur 160000 beträgt, bedeutet das, daß selbst bei einer Ausbeute von 100 % gekuppeltem Ferritin mehr als 75 % des zugegebenen Antikörperglobulins ungekuppelt bleibt.

Erst als wir nach Abtrennen des ungekuppelten ANS-Globulins die Injektionsmenge an ferritinmarkiertem ANS-Globulin wesentlich erhöhen konnten, gelang es uns, sowohl immunhistologisch als auch elektronenmikroskopisch Ferritinmoleküle in den Glomerula nachzuweisen. Immunhistologisch fand sich das Ferritin entlang den Capillarschlingen der Glomerula, in „capillary pattern“ wie es im anglo-amerikanischen Schrifttum heißt (Abb. 3). Diese Form der Ablagerung ist für die nephrotoxische Nephritis typisch. An gleicher Stelle findet man immunhistologisch auch das Enten- oder Kaninchenglobulin, wenn man unmarkiertes Enten- oder Kaninchen-ANS injiziert. Die Fluoreszenz, die wir mit

FITC-markiertem Antiferritin oder FITC-markiertem Antikaninchenglobulin nach Injektion gereinigter Ferritin-ANS-Conjugate erhielten, war im Vergleich zu der Fluoreszenz, die wir nach Injektion nephritisauslösender ANS-Dosen erhielten, recht schwach.

Wie weiter unten ausgeführt wird, ist das auf einen unterschiedlichen Antikörpergehalt zurückzuführen. Hiermit in Übereinstimmung, gelang es uns bisher auch noch nicht, mit gereinigtem ferritinmarkiertem ANS-Globulin eine Nephritis auszulösen.



Abb. 4a. Ausschnitt aus einer Glomerulumschlinge 24 Std nach Injektion von ferritinmarkiertem Enten-ANS-Globulin (injizierte Ferritinmenge 20 mg). Ferritinablagerung in der endothelialen Seite der Basalmembran (B).
E Endothel, D Deckzellausläufer, K Kapselraum, L Capillarlumen. Vergr. 105 000fach

Wir injizierten einzelnen Ratten gereinigte Conjugate, die bis zu 24 mg Ferritin enthielten. Das entsprach bei der von uns angestrebten Ausbeute von 30 % gekuppeltem Ferritin etwa 8 mg an Globulin gekuppeltem Ferritin. Bei einem molekularen Verhältnis von 1:1 für Ferritin und Antikörperglobulin im Conjugat (SRI RAM u. Mitarb., 1963) waren an diese 8 mg Ferritin etwa 1,7 mg ANS-Globulin gebunden. Das reichte aber nicht aus, um eine Nephritis zu erzeugen. Von den verschiedenen ANS-Globulinfraktionen, die wir zur Kupplung an Ferritin verwandten, benötigten wir 5 bis 25 mg Protein, um eine Nephritis auszulösen. Um also mit ferritinmarkiertem ANS-Globulin eine Nephritis auslösen zu können, hätten wir nach dieser Überlegung mehr als die 5fache Menge an gereinigtem Conjugat injizieren müssen.

Berücksichtigt man noch, daß durch die Kupplung an Ferritin ein Teil der Antikörperaktivität verlorengelht (VOGT und KOPP, 1965), so lagen die von uns applizierten Mengen weit unter der Mindestmenge, die eine Nephritis auszulösen imstande war. Wenn wir auch keine Nephritis auslösen konnten, so reichte die applizierte Menge an gereinigtem ferritinmarkiertem ANS-Globulin in vielen Fällen aus, um in der glomerulären Basalmembran fixierte ferritinmarkierte Antikörper und somit auch den Reaktionsort des nephrotoxischen Antikörpers im Elektronenmikroskop darstellen zu können.

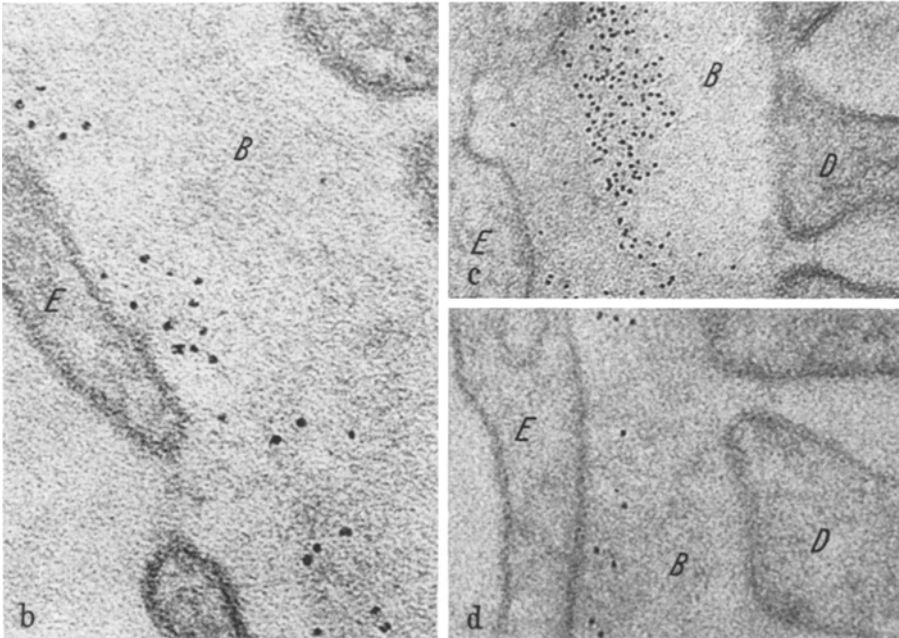


Abb. 4b. Ausschnitt aus einer Glomerulumschlinge, dasselbe Glomerulum wie in Abb. 4a. Angedeutete Ultrastruktur einiger Ferritinmoleküle mit deutlicher Ausbildung der typischen Eckpunkte. Bezeichnung wie in Abb. 4a. Vergr. 140000fach

Abb. 4c. Ausschnitt aus einer Glomerulumschlinge 24 Std nach Applikation von ferritinmarkiertem Kaninchen-ANS-Globulin (injizierte Ferritinmenge 10 mg). Ausgeprägte, jedoch mehr fleckförmige Ferritinablagerung in der Basalmembran mit deutlicher Bevorzugung der endothelialen Seite. Bezeichnung wie in Abb. 4a. Vergr. 105000fach

Abb. 4d. Ausschnitt einer Glomerulumschlinge 16 Tage nach Injektion von ferritinmarkiertem Enten-ANS-Globulin (20 mg injiziertes Ferritin). Immer noch in der endothelialen Basalmembran nachweisbare fixierte Ferritinmoleküle. Bezeichnung wie in Abb. 4a. Vergr. 105000fach

Bei den Tieren, bei denen es uns gelang, immunhistologisch Ferritin in „capillary pattern“, also entlang den glomerulären Capillarschlingen, nachzuweisen, fanden wir auch ausnahmslos bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung Ferritinmoleküle in der Basalmembran lokalisiert (Abb. 4a, b, c und d).

Diese Ferritinmarkierung betraf in allen untersuchten Stadien (24 Std bis 16 Tage nach Applikation) ganz bevorzugt den endothelialen Teil der Basalmembran. Nur selten reichte die Ferritinablagerung bis in die Lamina densa hinein. Die für gewöhnlich zu beobachtende Dreischichtung der Basalmembran ist in unseren Bildbelegen wegen der unterlassenen Kontrastierung nicht zu sehen. Wir vermieden es, unsere Schnitte mit Schwermetallen zu kontrastieren, um Artefakte zu vermeiden.

Die bevorzugte Ablagerung der Ferritinmoleküle auf der endothelialen Seite war in den peripheren Teilen der Schlingenbündel stets unverkennbar. In den mesangiumnahen Abschnitten und an den Umschlagstellen der Basalmembran war diese Art der Lagerung nicht immer so ausgesprochen. In den mesangiumnahen Schlingenanteilen fand sich manchmal eine mehr fleckförmige Anhäufung von Ferritin, während in den übrigen Abschnitten der Glomerula die Ferritinmoleküle eher diffus in der endothelialen Basalmembran verstreut lagen.

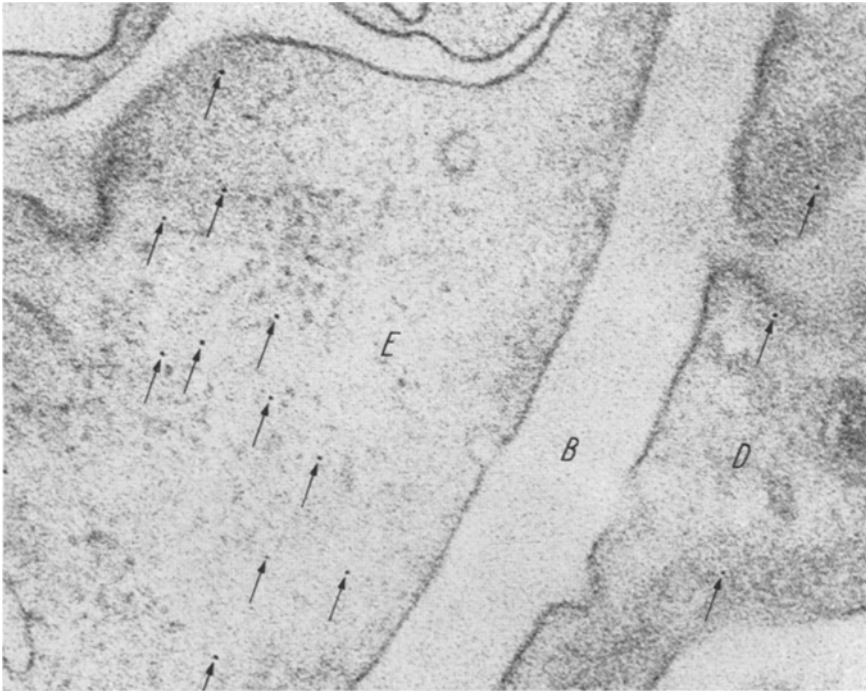


Abb. 5. Ausschnitt aus einer Glomerulumschlinge 14 Tage nach Gabe von 50 mg Ferritin. Frei im Endothel- und Deckzellencytoplasma liegende Ferritinmoleküle (\nearrow). Die Basalmembran frei von Ferritin. Bezeichnung wie in Abb. 4a. Vergr. 105 000fach

Die Lage der in der Basalmembran fixierten Ferritinmoleküle war 16 Tage nach der Injektion von ferritinmarkiertem ANS-Globulin unverändert (Abb. 4d). Eine wesentliche Verringerung der Ferritinmoleküle war nach dieser Versuchsdauer noch nicht festzustellen.

Ferritinmarkiertes ANS vom Kaninchen und von der Ente führten gleichermaßen zu einer Ansammlung von Ferritinmolekülen auf der endothelialen Seite der glomerulären Basalmembran (Abb. 4a und c).

Zu einer Fixierung von Ferritinmolekülen in der Basalmembran kam es dagegen nicht, wenn den Ratten lediglich Ferritin oder an normales Globulin (ohne Antikörperaktivität) gekuppeltes Ferritin injiziert worden war. Gewöhnlich injizierten wir dabei den Kontrolltieren doppelt so hohe Ferritinmengen wie den eigentlichen Versuchstieren. Weite Strecken der Basalmembran waren bei den Kontrollratten stets völlig frei von Ferritinmolekülen. Nur ganz selten fanden wir in der glomerulären Basalmembran einzelne Ferritinmoleküle, offensichtlich

Nachzügler, die beim Passieren der Basalmembran angetroffen wurden. Solche einzelnen Ferritinmoleküle fanden sich in allen Schichten der Basalmembran, eine bevorzugte Lokalisation auf der endothelialen Seite war jedenfalls nicht festzustellen.

Gegenüber der eindeutig spezifischen Fixierung von Ferritin in der endothelialen Basalmembran nach Injektion von ferritinmarkiertem ANS-Globulin waren keine greifbaren Unterschiede in der Ablagerung von Ferritin in cellulären Bestandteilen der Glomerula festzustellen. Sowohl bei den Tieren, denen wir

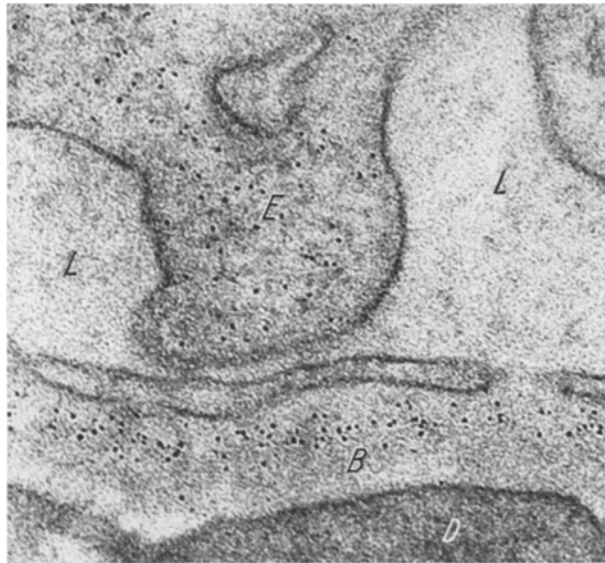


Abb. 6. Ausschnitt aus einer glomerulären Endothelzelle 24 Std nach i.v. Gabe von ferritinmarkiertem Enten-ANS-Globulin (24 mg injiziertes Ferritin). Ferritinablagerung in der Basalmembran und im Cytoplasma einer Endothelzelle. Die Ferritinmoleküle im Cytoplasma sind nicht an Strukturen gebunden. Bezeichnung wie in Abb. 4a. Vergr. 105 000fach

ferritinmarkiertes ANS injiziert hatten, als auch bei den Ratten, die Ferritin oder an normales Globulin gekuppeltes Ferritin injiziert bekommen hatten, fanden sich in allen Stadien Ferritinmoleküle frei im Cytoplasma sowie in Phagosomen von Endothel-, Epithel- und Mesangiumzellen (Abb. 5—7). Bei kurzen Versuchszeiten sah man das Ferritin vorwiegend frei im Cytoplasma, teils in kleinen, dem endoplasmatischen Reticulum zugehörigen Bläschen und Schläuchen, mit zunehmender Versuchsdauer vorwiegend in Phagosomen, d.h. in membranbegrenzten Cytoplasmaeinschlüssen. Die Endothel- und Mesangiumzellen enthielten mehr Ferritin als die Epithelzellen. Viele Zellen waren jedoch stets völlig frei von Ferritin.

Verständlicherweise galt unser Hauptaugenmerk der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Glomerula. Soviel läßt sich jedoch sagen, daß die tubuläre Basalmembran regelmäßig frei von Ferritin war. Im Epithel der gewundenen Harnkanälchen waren wie in den Zellen der Glomerula nach Applikation von Ferritin und von ferritinmarkiertem ANS-Globulin ferritinhaltige Phagosomen anzutreffen.

Sowohl bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen als auch bei den elektronenmikroskopischen Beobachtungen zeigten sich in den Glomerula keine Abweichungen von der normalen Struktur, insbesondere fanden sich in den Glomerula keine signifikanten proliferativen Veränderungen am Endothel oder an den Mesangiumzellen, die für eine floride Glomerulonephritis gesprochen hätten. Dementsprechend beobachteten wir bei keinem Tier nach Injektion von ferritinmarkiertem ANS-Globulin eine Proteinurie.

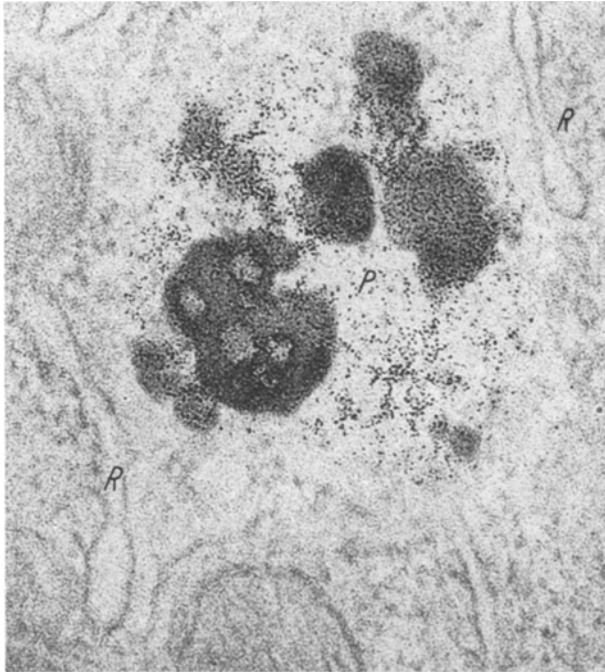


Abb. 7. Ausschnitt einer glomerulären Endothelzelle 24 Std nach i.v. Applikation von 50 mg Ferritin. Ferritinablagerung in Phagosomen (P) und Umgebung. R endoplasmatisches Reticulum. Vergr. 105 000fach

Diskussion

Ferritinmarkierte Antikörper sind zum Nachweis verschiedener Antigene, vor allem von Viren (MORGAN u. Mitarb., 1962), mit Erfolg benutzt worden. Die Anwendung dieser Methode zum Nachweis von Oberflächenantigenen bereitet keine besonderen Schwierigkeiten, da das Antigen hierbei vor der weiteren Verarbeitung für die Elektronenmikroskopie mit den ferritinmarkierten Antikörpern zusammengebracht werden kann.

Anders ist es jedoch, wenn man Antigen-Antikörper-Reaktionen im tierischen Gewebe nachweisen will. Das setzt Fixierungsmethoden voraus, die die Feinstruktur des Gewebes erhalten, ohne die Fähigkeit des Antigens zu vermindern, mit ferritinmarkierten Antikörpern zu reagieren. Da die intakte Zellmembran für den Antikörper nicht durchlässig ist, kann zum Nachweis intracellulär gelegener Antigene auf eine vorherige Fixierung nicht verzichtet werden. Die für elektronenmikroskopische Untersuchungen gebräuchliche Fixierung mit Osmiumsäure ist leider ungeeignet, da hierbei die Antigenität vollständig verlorengeht.

ANDRES u. Mitarb. (1962) benutzten ferritinmarkiertes Antikaninchenglobulin von der Ente zum *in vitro*-Nachweis von intravenös injiziertem unmarkiertem Kaninchen-ANS. Sie halten eine kurze Fixierung kleiner Gewebstückchen in neutralem Formalin für geeignet. Über gute Ergebnisse mit einer kurzen Formalinfixierung berichtet auch METZGER und SMITH (1962). Die Vorfixierung mit gepuffertem Formalin ist aber nach unseren Erfahrungen nicht ohne Problematik. Proteinantigene in Kryostatschnitten und Gewebezellkulturen werden schon innerhalb weniger Minuten auch durch niedrige Formalinkonzentrationen und selbst in der Kälte völlig zerstört. Es empfiehlt sich daher bei diesem Vorgehen, mit fluoresceinmarkierten Antikörpern zu prüfen, ob die Antigenität tatsächlich noch erhalten geblieben ist oder nicht. ARHELGER u. Mitarb. (1963) untersuchten Nieren von Kaninchen, denen sie i.v. ein ANS vom Huhn injiziert hatten, mit ferritinmarkiertem Antihühneryoglobulin vom Kaninchen ebenfalls *in vitro*. Sie zogen es aber vor, unfixierte Stückchen der Niere in dem ferritinmarkierten Antihühneryoglobulin zu suspendieren und schlossen danach sofort eine Osmiumfixierung an.

Beide Arbeitsgruppen fanden bei diesem *in vitro*-Vorgehen Ferritinmoleküle sowohl in der glomerulären Basalmembran, dem erwarteten Reaktionsort, als auch im Cytoplasma der angrenzenden Endo- und Epithelzellen diffus verstreut, wobei die Ferritinmoleküle in der Basalmembran meistens dichter lagen als innerhalb der Zellen. ARHELGER u. Mitarb. (1963) betonen eine bevorzugte Lokalisation der Ferritinmoleküle in den weniger dichten Zonen der Basalmembran beiderseits der Lamina densa. ANDRES u. Mitarb. (1962) beschreiben dagegen eine mehr diffuse Markierung der Basalmembran.

Beide Arbeitsgruppen kommen auf Grund ihrer Befunde zu dem Schluß, daß der nephrotoxische Antikörper nicht nur mit der glomerulären Basalmembran reagiert, sondern sich außerdem spezifisch an Bestandteile des Cytoplasmas der angrenzenden Zellen bindet.

In geringerem Umfang fanden ANDRES u. Mitarb. (1962) sowie auch ARHELGER u. Mitarb. (1963) Ferritin, wie die Autoren annahmen, unspezifisch über die gesamte Niere verteilt. Für diesen Befund haben die Autoren keine Erklärung.

Bei der *in vitro*-Versuchsanordnung scheint die Gefahr der unspezifischen Anlagerung von Ferritin sehr groß zu sein (RYSER, 1962). Wir zogen es deshalb vor, den ferritinmarkierten Antikörper intravenös zu injizieren. ARHELGER u. Mitarb. (1963) erwähnen übrigens in ihrer Arbeit, daß es ihnen nicht gelang, eine spezifische Lokalisation nach i.v. Injektion von ferritinmarkiertem ANS-Globulin zu erhalten, obwohl sie ihrer Meinung nach große Mengen verabfolgten.

Der *in vivo*-Nachweis des nephrotoxischen Antikörpers ist jedoch elektronenmikroskopisch möglich, wie wir zeigen konnten. Voraussetzung ist die Applikation einer genügend großen ferritinmarkierten Antikörpermenge. Ungekuppeltes Ferritin stört den Nachweis nicht, da es schnell durch die Nieren ausgeschieden wird. Intravenös injiziertes natives Ferritin hat schon nach wenigen Stunden die glomeruläre Basalmembran passiert. Das trifft sowohl für die normale als auch für die aminonucleosidnephrotische Ratte zu (FARQUHAR u. Mitarb., 1961; FARQUHAR und PALADE, 1961; MILLER und PALADE, 1964). Wohl kommt es vorübergehend zu einem gewissen Aufstau vor der endothelialen Seite der Basalmembran, da der Durchtritt durch die dichtere Basalmembransubstanz eine

gewisse Zeit in Anspruch nimmt, zu einer Fixierung von Ferritinmolekülen in der glomerulären Basalmembran kommt es aber nicht. Auch Ferritin, das an serologisch inaktives γ -Globulin gekuppelt worden ist, wird durch die Niere ausgeschieden, ohne in der Basalmembran hängen zu bleiben. Dabei ist erwähnenswert, daß ein geringer Teil des Ferritins und ferritinmarkierten Globulins nicht direkt auf die Basalmembran trifft, sondern von Endothelzellen durch Pinocytose aufgenommen wird. Ferritin wird, wie jedes heterologe Protein, das durch die Niere ausgeschieden wird, im Cytoplasma von Endo-, Epithel- und vor allem von Mesangiumzellen in Phagosomen angereichert (FARQUHAR u. Mitarb., 1961; MILLER und PALADE, 1964). Nach unseren Befunden bleiben auch Ferritinmoleküle in einzelnen Zellen über längere Zeit im Cytoplasma verstreut liegen. Zwischen den Versuchstieren und den Kontrolltieren war dabei weder ein quantitativer noch ein qualitativer Unterschied im Ferritingehalt der Zellen im Glomerulum zu erkennen. Mit den spezifischen Reaktionsorten des nephrotoxischen Antikörpers hat die Ferritinansammlung innerhalb von Zellen daher wahrscheinlich nichts zu tun. Am ehesten muß man diese Ablagerung wohl mit Resorptionsvorgängen in Zusammenhang bringen. Da im übrigen viele Endo- und Epithelzellen völlig frei von Ferritin bleiben, sind die elektronenmikroskopischen Verhältnisse nach intravenöser Injektion des ferritinmarkierten ANS-Globulins viel übersichtlicher als bei einer *in vitro*-Versuchsanordnung. So ist es auch nicht verwunderlich, daß unsere Ergebnisse von den *in vitro* erhobenen Befunden etwas abweichen. Entgegen der Vorstellung von ANDRES u. Mitarb. (1962) sowie von ARHELGER u. Mitarb. (1963) machen unsere Ergebnisse eine spezifische Reaktion des nephrotoxischen Antikörpers mit Cytoplasmabestandteilen der an die glomeruläre Basalmembran angrenzenden Zellen sehr unwahrscheinlich. Alleiniger Reaktionsort scheint die glomeruläre Basalmembran zu sein. Der nephrotoxische Antikörper wird dabei anscheinend weder diffus in der gesamten Basalmembran abgelagert, noch findet er sich beiderseits der Lamina densa angereichert (ARHELGER u. Mitarb., 1963), sondern er wird ganz eindeutig bevorzugt an der endothelialen Seite der Basalmembran fixiert. Die bevorzugte Bindung des nephrotoxischen Antikörpers auf der endothelialen Seite der glomerulären Basalmembran ist verständlich, wenn man sich einmal überlegt, welchen Weg ein heterologes Protein nimmt, das durch die Nieren ausgeschieden wird. Der i.v. injizierte ferritinmarkierte Antikörper trifft vom Lumen der Glomerumcapillaren kommend, normalerweise durch die Endothelporen auf die glomeruläre Basalmembran. Sobald der markierte Antikörper nun in der Basalmembran auf eine korrespondierende antigene Determinante trifft, wird er daran spezifisch gebunden und so an dieser Stelle fixiert bleiben. Es leuchtet ein, daß dies mit größter Wahrscheinlichkeit zunächst an der endothelialen Seite der glomerulären Basalmembran eintritt. Erst wenn hier alle Reaktionsplätze besetzt sind, werden nachfolgende Antikörpermoleküle weiter in die Basalmembran eindringen, bis sie auf noch unbesetzte determinante Gruppen treffen.

Wie weit die glomeruläre Basalmembran von Antikörpern besetzt sein muß, damit es zu einer Nephritis kommt, können wir aus unseren Befunden nicht schließen, da wir nur eine relativ geringe Menge an Antikörpern applizieren konnten. Wie wir schon ausführten, waren die verabfolgten Mengen von ferritinmarkiertem ANS-Globulin weder in der Lage, eine Proteinurie herbeizuführen,

noch vermochten sie erkennbare morphologische Veränderungen im Glomerulum hervorzurufen.

Da die Reinigung der ferritinmarkierten Globulinfraktionen unvollständig war, können die elektronenmikroskopischen Befunde auch kein zutreffendes Bild über die Anzahl und Dichte der Reaktionsplätze des nephrotoxischen Antikörpers innerhalb der glomerulären Basalmembran geben. Möglicherweise waren in unseren Versuchen nur jedes zweite Antikörpermolekül oder noch weniger an Ferritin gekuppelt. Nur die an Ferritin gekuppelten Antikörper lassen sich im Elektronenmikroskop indirekt darstellen. Wie dicht die Antikörper in der glomerulären Basalmembran in Wirklichkeit liegen und wieviel antigene Determinanten pro Flächeneinheit in der Basalmembran vorhanden sind, kann daher erst entschieden werden, wenn ferritinmarkiertes ANS-Globulin verwendet werden kann, das keine ungebundenen Antikörper mehr enthält.

Zusammenfassung

Globulinfraktionen von Antirattennierenserum (ANS) von der Ente und vom Kaninchen wurden nach der Methode von SINGER und SCHICK (1961) mit Toluol-2,4-Diisocyanat an Ferritin gekuppelt. Das ungekuppelt gebliebene ANS-Globulin wurde durch Ultrazentrifugation abgetrennt und die ferritinhaltigen Komponenten, das Conjugat enthaltend, Ratten intravenös injiziert.

Ferritinmoleküle fanden sich unter diesen Versuchsbedingungen auf der endothelialen Seite der glomerulären Basalmembran angereichert und waren dort länger als 16 Tage nach der Injektion unverändert nachzuweisen. Reaktionsort des nephrotoxischen Antikörpers scheint folglich allein die glomeruläre Basalmembran zu sein. Ein Unterschied in der Lokalisation zwischen Enten- und Kaninchenantikörper war nicht zu erkennen. Eine spezifische Bindung des Antikörpers an Bestandteile angrenzender Zellen war nicht nachzuweisen.

The Site of Reaction of the Nephrotoxic Antibody Electron Microscopic Localization of the Antibody after Intravenous Injection of Ferritin-Conjugated Anti-Rat-Kidney Sera

Summary

The globulin fractions of anti-rat-kidney sera (ARK) from duck and rabbit were conjugated to ferritin with toluene-2,4-diisocyanate after the method of SINGER and SCHICK. The remaining unconjugated portions of ARK-globulin were separated by ultracentrifugation. The components containing the ferritin conjugate were injected intravenously into rats. Under these test conditions the ferritin molecules accumulated on the endothelial side of the glomerular basement membrane and remained there unchanged for more than 16 days. Thus, the site of reaction of the nephrotoxic antibody seemed to be the basement membrane alone. There was no difference in the localization between the duck antibody and that of the rabbit. A specific fixation of the antibodies on the constituents of the adjoining cells could not be demonstrated.

Literatur

- ANDRES, G. A., C. MORGAN, K. C. HSU, R. A. RIFKIND, and B. C. SEEGAL: Electron microscopic studies of experimental nephritis with ferritin-conjugated antibody. *J. exp. Med.* 115, 929—936 (1962).

- ARHELGER, R. B., J. A. GRONVALL, O. B. CARR jr., and J. G. BRUNSON: Electron microscopic localization of nephrotoxic serum in rabbit glomeruli with ferritin-conjugated antibody. *Lab. Invest.* **12**, 33—37 (1963).
- FARQUHAR, M. G., and G. E. PALADE: Glomerular permeability. II. Ferritin transfer across the glomerular capillary wall in nephritic rats. *J. exp. Med.* **114**, 699—716 (1961).
- S. L. WISSIG, and G. E. PALADE: Glomerular permeability. I. Ferritin transfer across the normal glomerular capillary wall. *J. exp. Med.* **113**, 47—66 (1961).
- FARRANT, J. L.: An electron microscopic study of ferritin. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **13**, 569—576 (1954).
- GRANICK, S.: Ferritin, I. Physical and chemical properties of horse spleen ferritin. *J. biol. Chem.* **146**, 451—461 (1942).
- KOPP, R., A. VOGT, and G. MAASS: "Free" apoferritin and apoferritin obtained by reduction of iron-containing ferritin. *Nature (Lond.)* **202**, 1211—1212 (1964).
- METZGER, J. F., and CH. W. SMITH: The application of immune electron microscopy to the demonstration of antigenic sites in biologic systems. *Lab. Invest.* **11**, 902—911 (1962).
- MILLER, F., and G. E. PALADE: Lytic activities in renal protein absorption droplets. An electron microscopical cytochemical study. *J. Cell Biol.* **23**, 519—552 (1964).
- MORGAN, C., R. A. RIFKIND, and H. M. ROSE: The use of ferritin-conjugated antibodies in electron microscopic studies of influenza and vaccinia viruses. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **27**, 57—65 (1962).
- NAIRN, R. C.: Fluorescent protein tracing. Edinburgh and London: E. and S. Livingstone Ltd. 1962.
- NAKANON, K., u. A. VOGT: Speziesbedingte Unterschiede im Ablauf der experimentellen Nephritis der Ratte nach Injektion von Kaninchen- und Enten-Antrattennierenserum. *Virchows Arch. path. Anat.* **340**, 177—184 (1965).
- RYSER, H., J. B. CAULFIELD, and J. C. AUB: Studies on protein uptake by isolated tumor cells. I. Electron microscopic evidence of ferritin uptake by Ehrlich ascites tumor cells. *J. Cell Biol.* **14**, 255—268 (1962).
- SINGER, S. J., and A. F. SCHICK: The properties of specific stains for electron microscopy prepared by the conjugation of antibody molecules with ferritin. *J. biophys. biochem. Cytol.* **9**, 519—537 (1961).
- SRI RAM, J., S. S. TAWDE, G. B. PIERCE jr., and A. R. MIDGLEY jr.: Preparation of antibody-ferritin conjugates for immuno-electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 673—675 (1963).
- VOGT, A., and R. KOPP: Loss of specific agglutinating activity of purified ferritin-conjugated antibodies. *Nature (Lond.)* **202**, 1350—1351 (1964).
- — Über die spezifische Aktivität ferritinmarkierter Antikörper. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **198**, 270—274 (1965).
- WIEME, R. J.: Studies on agar gel electrophoresis. Brussels: Arsacia Uitgaven N.Y. 1959.

Doz. Dr. med. ARNOLD VOGT und
Dr. rer. nat. JOHANNES MÜLLER
Hygiene-Institut der Universität
Freiburg i. Br., Hermann-Herder-Str. 11

Doz. Dr. med. RUDOLF CAESAR
Pathologisches Institut der Universität Kiel
Kiel, Hospitalstraße 42