

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

**Zentrum für Innere Medizin,
III Medizinische Klinik und Poliklinik
Nephrologie**

Prof. Dr. Ulrich Wenzel

Die Rolle der hepatischen Komplementfaktoren C3 und C5 bei hypertensiven Endorganschäden der Maus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

The Vinh Luu
aus Wilhelmshaven

Hamburg 2024

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:**
03.07.2025

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:
Prof. Dr. Heimo Ehmke

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:
Prof. Dr. Ulrich Wenzel

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassende Darstellung der anteiligen Publikation	1
2	Einleitung	2
2.1	Hypertonie und das Immunsystem	2
2.2	Das Komplementsystem im arteriellen Hypertonus	2
2.3	Arbeitshypothese und Fragestellung	3
3	Material and Methoden	5
3.1	Versuchstiere und Gruppeneinteilung	5
3.2	Blutdruckmodelle	5
3.2.1	Angiotensin II-Modell	6
3.2.2	DOCA-Salz Modell	6
3.3	Anwendung der siRNA	7
3.4	Blutdruckmessung	7
3.5	Albuminurie	8
3.6	Histopathologische Untersuchung	8
3.7	Quantitative Real Time PCR	9
3.8	Plasmauntersuchung	10
3.9	Western-Blot	10
3.10	Bestimmung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR)	11
3.11	Leukozytenisolation für die FACS-Analyse	11
3.12	Statistische Auswertung	12
4	Ergebnisse	13
4.1	C3-siRNA Inhibition im Ang II-Modell	13
4.1.1	Inhibition	13
4.1.2	Auswirkungen der Ang II Infusion	13
4.1.3	Renaler Schaden	15
4.1.4	Kardialer Schaden	19
4.1.5	Ausmaß der Inflammation	21
4.2	C3-siRNA Inhibition im DOCA-Salz Modell	23
4.2.1	Inhibition	23
4.2.2	Auswirkungen des DOCA-Pellets	23
4.2.3	Renale Schäden	25
4.2.4	Kardiale Schäden	29
4.2.5	Ausmaß der Inflammation	30
4.3	C5-siRNA Inhibition im Ang II-Modell	33
4.3.1	Inhibition	33
4.3.2	Auswirkungen der Ang II Infusion	33
4.3.3	Renaler Schaden	34

4.3.4	Kardialer Schaden	39
4.3.5	Ausmaß der Inflammation	40
4.4	C5-siRNA Inhibition im DOCA-Salz Modell	42
4.4.1	Inhibition	42
4.4.2	Auswirkungen des DOCA Pellets.....	42
4.4.3	Renale Schäden.....	44
4.4.4	Kardiale Schäden.....	48
4.4.5	Ausmaß der Inflammation	50
5	Diskussion	52
5.1	Ausblick.....	59
6	Zusammenfassung	60
7	Summary.....	61
8	Erklärung des Eigenanteils	62
9	Abkürzungsverzeichnis	64
10	Literaturverzeichnis	66
11	Abbildungsverzeichnis	71
12	Publikation	73
13	Danksagung	97
14	Lebenslauf	98
15	Eidesstaatliche Erklärung	99

1 Zusammenfassende Darstellung der anteiligen Publikation

Die vorliegende Dissertation beruht in Teilen auf der Publikation „**Complement component C3 as a new target to lower albuminuria in hypertensive kidney disease**“, welche am 12. April 2023 von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Wenzel mit drei Erstautorenschaften (Marlies Bode, Jan Nieklas Diemer, **The Vinh Luu**) veröffentlicht wurde. Die Publikation wurde in einem anerkannten peer-reviewed Journal veröffentlicht („*British Journal of Pharmacology*“, 5-Jahres Einflussfaktor (Impact Factor) 9,47 (2023)), in welchem vor allem translationale Themen mit klinisch-experimentellem und pharmakologischem Kontextbezug publiziert werden.

Inhaltlich kann die methodische Datenerhebung zur Evaluation der Rolle des Komplementfaktors C3 in der Publikation in drei Teile gegliedert werden:

1. Analyse auf C3 in humanen Nierenbiopsien von Patienten mit maligner Nephrosklerose
2. Nutzen von C3^{-/-} Mäuse im Hypertonusmodell
3. **Anwendung von C3 und C5-siRNA Inhibition im Hypertonusmodell**

Die Daten des 3. Teils der Publikation entspringen der vorliegenden Dissertation.

2 Einleitung

2.1 Hypertonie und das Immunsystem

Die arterielle Hypertonie ist einer der häufigsten Todesursachen in der modernen Welt und steht laut epidemiologischen Statistiken der World Health Organisation (WHO) mit 54 % der Schlaganfälle und 47 % aller Herzinfarkte in Verbindung (Lawes, Hoorn & Rodgers, 2008). Darüber hinaus zeigt eine weitere Studie der WHO, dass sich die Inzidenz des arteriellen Hypertonus innerhalb von 20 Jahren (1990 – 2019) verdoppelt hat (Zhou et al., 2021).

Sowohl die Ursachen als auch die Folgen eines primären Hypertonus sind multifaktoriell. Dennoch sind die spezifischen kausalen Pathomechanismen, die zur Entstehung eines primären Hypertonus führen oder die Progression der Endorganschäden bei Hypertonie maßgeblich beeinflussen, noch nicht ausreichend erforscht und analysiert worden. Angesichts der epidemiologischen Daten und den weiterhin unklaren Pathomechanismen der arteriellen Hypertonie ist es von großer Bedeutung, eine Therapie zu finden, die nicht nur symptomatisch den Blutdruck senkt, sondern auch inflammatorische Schäden verhindern kann.

Vor einigen Jahren berichtete eine Studie von der Rolle des Immunsystems im arteriellen Hypertonus, da RAG-1 defiziente Mäuse, Mäuse ohne T- und B-Lymphozyten, einen niedrigeren systolischen Blutdruck und mildere Endorganschäden nach einer Angiotensin II Infusion entwickelten (Guzik et al., 2007). Folgend danach wurden immer mehr Erkenntnisse bezüglich der Funktion des Immunsystems in der Pathogenese des arteriellen Hypertonus gemacht (Wenzel et al., 2016; Drummond et al., 2019). Damit wurde das Forschungsfeld der Immunologie und Inflammation in der Blutdruckforschung etabliert.

2.2 Das Komplementsystem im arteriellen Hypertonus

Das Komplementsystem fungiert als Teil des angeborenen Immunsystems und besteht aus ca. 30 Plasmaproteinen, den Komplementfaktoren und zellgebundenen Rezeptoren. Es dient primär der Abwehr gegenüber Pathogenen („Immunosurveillance“), der Opsonierung und der Verstärkung von proinflammatorischen Reaktionen. Die Opsonierung von Pathogenen erleichtert die Phagozytose durch antigenpräsentierende Zellen, welche wiederum Komplementrezeptoren besitzen. Das Komplementsystem agiert somit einerseits selbstständig und andererseits bildet es die Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Die Komplementaktivierung kann über drei verschiedene Kaskaden erfolgen: Der klassische Weg, der alternative Weg und der Lektin-Weg. Alle drei Wege enden dabei in der Bildung der C3-Konvertase und somit direkt auch in der Bildung der

C5-Konvertase, welche in weiteren Schritten die Bildung des Membranangriffskomplex (MAC) induziert.

Daten der letzten Jahre zeigen, dass die Funktion des Komplementsystems sich nicht nur auf die Rolle im angeborenen Immunsystem beschränkt, sondern eine wichtige Rolle im adaptiven Immunsystem und in Pathomechanismen anderer Erkrankungen spielt. In diesem Sinne hat die steigende Zahl klinischer Zustände, die mit einer Komplementaktivierung assoziiert sind, ein neues Interesse an therapeutischen Optionen durch Modulation des Komplementsystems geweckt (Ricklin et al., 2018; Wenzel, Kemper & Bode, 2021).

Eine der neuen Rollen des Komplementsystems präsentiert sich in der Bluthochdruckforschung. Laut Kohortenstudien ist die Entwicklung eines arteriellen Hypertonus in Patienten mit der Serumkonzentration des Komplementfaktors C3 assoziiert (Engström et al., 2007a; Bao et al., 2017). Diese Erkenntnis ist ebenfalls in Rattenmodellen zu sehen, wo sich in einem Blutdruckmodell vermehrt Ablagerungen und Expression des Komplementfaktors C3 in Niere und glatten Muskelzellen darstellen lassen (Chen et al., 2020a; Fischer et al., 2021). In einem weiteren Schritt demonstrierte Negishi et al., dass C3-defiziente Ratten in einem Hypertonusmodell im Vergleich zur Kontrollgruppe mildere Endorganschäden zeigten.

Mäuse mit einem Doppelknockout (DKO) der beiden Komplementrezeptoren C3aR und C5aR zeigten einen milderen Verlauf im Angiotensin II (Ang II)-Modell als Wildtyp Mäuse (Chen et al., 2018). Diese Beobachtung wird über die Funktion der regulatorischen T-Zellen (Treg) erklärt, da ein Transfer von DKO-Tregs im Gegensatz zu Wildtyp-Tregs zu einer Protektion im Ang II-Modell führte. Eine Inhibition des C5aR in mäuselicher Hypertonie zeigt darüber hinaus eine nephroprotektive Wirkung (Weiss et al., 2016).

Die Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie lässt sich somit nicht unbedingt allein durch die Regulation des Salzwasserhaushaltes und der Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems vollständig erklären (Drummond et al., 2019). Komplementaktivierung stellt einen möglichen Forschungsansatz dar, welcher das Verständnis von Inflammation in hypertensiven Endorganschäden erweitern könnte.

2.3 Arbeitshypothese und Fragestellung

In dieser Arbeit wurde die Rolle der hepatischen Komplementfaktoren C3 und C5 bei hypertensiven Endorganschäden der Maus evaluiert. Dazu wurde die arterielle Hypertonie mit zwei verschiedenen Modellen, dem DOCA-Salz Modell und dem Ang II-Modell, in C57/Bl6 Mäusen induziert. Um die Rolle der hepatischen Komplementfaktoren zu evaluieren, wurden diese mithilfe einer GalNAc (N-Acetylgalactosamin) konjugierten siRNA in den Mäusen inhibiert. Dieser Ansatz ermöglicht im

Gegensatz zur Untersuchung einer Knockout-Maus den Vorteil, dass Störfaktoren wie ein Einfluss des Knockouts auf die embryonale Genese der Maus auszuschließen sind. Darüber hinaus stellt der Ansatz einer siRNA Applikation einen direkteren therapeutischen Versuch dar, weshalb die Translationalität des Versuchs somit eher gewährleistet ist. Die Konjugation mit GalNAc erlaubt durch die spezifische Bindung an Asialoglykoproteinrezeptoren eine spezifische Inhibition der hepatischen Proteine (Springer & Dowdy, 2018). Dies ermöglicht der siRNA den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) zu formen und somit die Proteinbiosynthese zu inhibieren.

In diesem Sinne ist die Hypothese dieser Arbeit, dass eine individuelle Blockade des Komplementfaktors C3 oder C5 in der Leber zu einer Senkung des Blutdrucks und einer milderer Ausprägung hypertensiver Endorganschäden führt.

3 Material and Methoden

3.1 Versuchstiere und Gruppeneinteilung

Die Versuchstiere für die Experimente dieser Arbeit bestanden aus zehn bis zwölf Wochen alten C57/Bl6 Mäusen. Diese wurden in standardisierten Käfigen in Dreier- bis Vierergruppen gehalten. Die Käfige wurden alle drei bis vier Tage ausgewechselt und die Tiere besaßen permanenten Zugang zu Trockenfutterpellets, Trinkwasser oder 0,9-prozentiger Natriumchloridlösung. Zudem wurden die Käfige mit Einstreu auf Holzbasis und Nestmaterial aus Zellstoff ausgestattet.

Ein physiologisch zirkadianer Rhythmus wurde mit Hilfe eines Tag- und Nachtrhythmus sichergestellt. Die Tageszeit wurde mit Licht von 5 Uhr morgens bis 17 Uhr imitiert, während die Nachtzeit mit Rotlicht zwischen 17 und 5 Uhr eingestellt war. Die Raumtemperatur in den Tierräumen wurde konstant bei 20°C bis 24°C gehalten, während die relative Luftfeuchtigkeit bei 60% beibehalten wurde. Der Gesundheitsstatus der Tiere wurde täglich anhand von Aktivität, Aussehen und Nestverhalten überprüft.

Insgesamt wurden vier Gruppen aus Wildtypmäusen in zwei verschiedenen Modellen erfasst: Dem DOCA-Salz Modell und dem Ang II-Modell. Die vier Gruppen bestanden aus einer normotensiven Kontrollgruppe, einer hypertensiven mit Kontroll-siRNA behandelten Gruppe, einer hypertensiven mit C3-siRNA behandelten Gruppe und einer mit C5-siRNA behandelten Gruppe. Bei der Kontroll-siRNA handelt es sich um eine siRNA, welche gegen Luciferase gerichtet ist, ein Enzym, das bei Säugetieren nicht vorhanden ist. Die siRNA wurde jeweils zu bestimmten Zeitpunkten (s. 2.2.1 und 2.2.2) subkutan injiziert. Die Kontroll-, C3-, und C5-siRNA-Proben waren jeweils mit GalNAc konjugiert, sodass dies eine spezifische hepatische Inhibition ermöglicht worden ist.

3.2 Blutdruckmodelle

Um hypertensive Endorganschäden zu induzieren, wurden sowohl Ang II-Modell als auch DOCA-Salz Modell an C57/Bl6 Wildtyp Mäusen angewendet. Im Rahmen beider Versuchsmodelle erhielten die Versuchstiere ab dem ersten präoperativen bis zum ersten postoperativen Tag eine Analgesie. Diese bestand aus einer subkutanen Verabreichung von Buprenorphin in einer Konzentration von 0,1mg/kg sowie der Zugabe von Tramadol zum Trinkwasser mit einer entsprechenden Konzentration von 0,5mg/ml.

3.2.1 Angiotensin II-Modell

Zu Beginn des Modells wurden Mäuse unter einer Isofluran Narkose und einer prä- und postoperativen (dreitägigen) Tramadol Analgesie auf der rechten Seite nephrektomiert. Sieben Tage nach der Nephrektomie wurde das Trinkwasser in den Versuchsgruppen mit 0,9-prozentiger Natriumchloridlösung ausgetauscht, um den renalen Schaden zu aggravierern. Anschließend wurden nach sieben weiteren Tagen eine osmotische Minipumpe subkutan implantiert, welche für zwei Wochen kontinuierlich 1,5ng/g/min Angiotensin II infundiert. Die Organentnahme erfolgte zwei Wochen nach der Implantation der osmotischen Minipumpe. Die siRNA Injektionen erfolgten zweimal im Abstand von zwei Wochen.

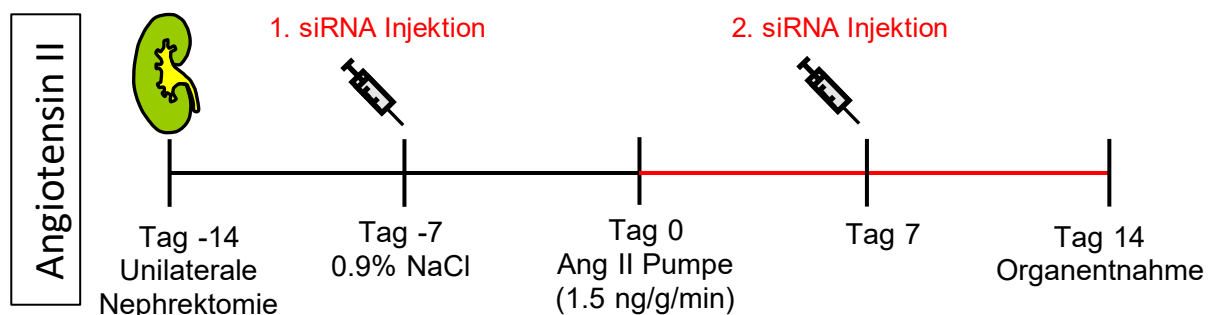


Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf und Übersicht des Ang II-Modells.

3.2.2 DOCA-Salz Modell

Zu Beginn des Modells werden die Mäuse auf der rechten Seite nephrektomiert. Gleichzeitig wird ein 50mg DOCA-Pellet subkutan implantiert. Zusätzlich erhalten die Tiere in den hypertensiven Versuchsgruppen eine 0,9% konzentrierte Natriumchlorid (NaCl) Lösung als Trinkwasser. Drei Wochen nach dem Eingriff wird ein zweites DOCA-Pellet implantiert, um die DOCA-Konzentration auf einem adäquaten Level zu halten, da die Pellets nur 21 Tage lang DOCA abgeben. Die Organentnahme erfolgte in der sechsten Woche. SiRNA-Injektionen wurden in zwei Wochen Abständen gegeben.

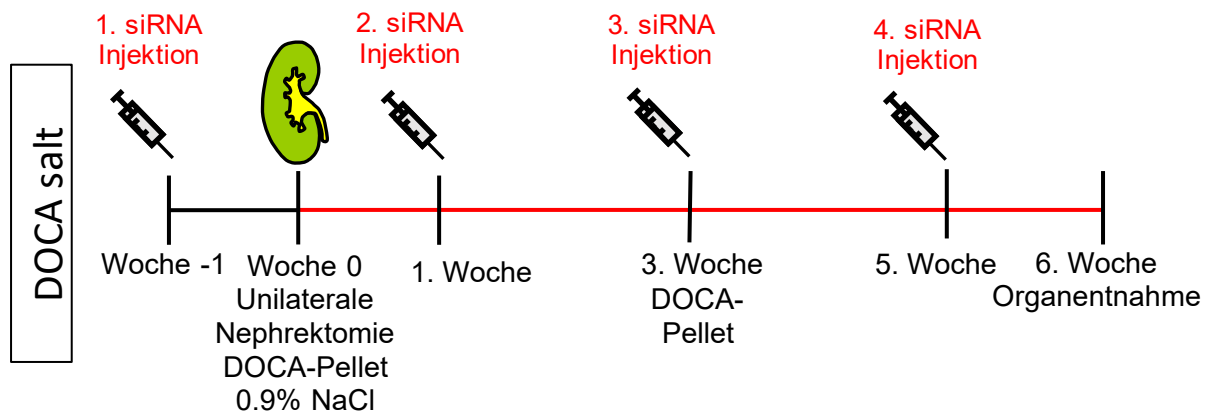


Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf und Übersicht des DOCA-Salz Modells.

3.3 Anwendung der siRNA

C3- und C5-Plasmaspiegel wurden mithilfe der siRNA in Versuchsmäusen herunterreguliert. Dabei wurde eine subkutan-verabreichtete N-Acetylgalactosamin (GalNAc) konjugierte small interfering RNA (siRNA), welche den hepatischen Komplementfaktor C3 (oder C5) anzielt, benutzt. Die Konjugation mit GalNAc ermöglicht es, dass die siRNA an Asialoglykoproteinrezeptoren, welche nur auf Hepatozyten exprimiert sind, binden kann. Dieser Ansatz hemmt somit die jeweilige hepatische C3- oder C5-Produktion, während die extrahepatische C3 oder C5-Produktion unbeeinflusst bleibt. Die Kontroll-siRNA zielte auf das Enzym Luciferase ab.

Die siRNA Proben wurden mit destilliertem Wasser zu einer Konzentration von 1 µl/µg verdünnt und anschließend in 1,5 ml Eppendorf-Tubes aliquotiert. Weiterhin erfolgte die Lagerung in einem -80°C Gefrierschrank. Das Dosiervolumen für die Mäuse wurde abhängig von dem Gewicht der einzelnen Maus errechnet, sodass eine Zielkonzentration von 10 µg siRNA pro 1 g Mausgewicht angestrebt wurde. Das jeweilige Körpergewicht der Mäuse wurde einen Tag vor der siRNA-Injektion gemessen. Die siRNA-Injektion erfolgte dabei subkutan. Die Kontroll-, C3- und C5-siRNA wurden alle von Alnylam Pharmaceuticals Inc. bereitgestellt und wie beschrieben verwendet (Kusner et al., 2019).

3.4 Blutdruckmessung

Der systolische Blutdruck wurde am sechsten und am zwölften Tag im Ang II-Modell gemessen, während im DOCA-Salz Modell dieser in der dritten und sechsten Woche gemessen wurde. Die Messung erfolgte mithilfe einer Schwanzmanschette (MC4000 Blood Pressure Analysis System, Hatteras Instruments, Cary, USA). Vor der Durchführung der Messung wurde ein magnetischer

Maushalter verwendet, um die Mäuse auf einem Tablett zu positionieren. Anschließend wurde die Messung nach fünf bis zehn Minuten durchgeführt, um den Ruheblutdruck zu erreichen.

Während einer Messsitzung bläht sich die Manschette graduell um den Schwanz der Maus herum auf, um schließlich den Blutfluss kurz anzuhalten. Anschließend wird der Druck in der Manschette entlastet, sodass aus der Blutdruckkurve der systolische Blutdruck entnommen werden kann. Druckwellen wurden durch einen Oszillographensensor unter dem Schwanz ermittelt. Eine Messsitzung bestand aus fünf vorläufigen Messzyklen, gefolgt von weiteren zehn Messzyklen. Aus den zehn Zyklen wurde für die statistische Auswertung ein Mittelwert errechnet. Zur Gewöhnung und Vermeidung von Artefakten aufgrund von Bewegung oder Nervosität wurden vier Messsitzungen an vier verschiedenen Tagen zu ähnlichen Zeiten durchgeführt (Weiss et al., 2016; Ahadzadeh et al., 2018).

3.5 Albuminurie

Während der Durchführung der Experimente wurde Urin von den Mäusen am Tag 3, 7 und 13 im Ang II-Versuch und wöchentlich im DOCA-Salz Versuch gesammelt. Dabei wurden die Mäuse maximal sechs Stunden lang auf 96-Well Platten in einem Stoffwechselkäfige platziert. Danach wurden die Mäuse zurück in ihre Käfige gesetzt und der Urin aus den Well-Platten in 1,5 ml Eppendorf-Tubes pipettiert. Die Albuminurie wurde durch Division der Albuminkonzentration durch die Kreatininkonzentration ermittelt. Dabei wurde die Albuminkonzentration über einen ELISA (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) und die Kreatininkonzentration mithilfe des COBAS Integra 400 Plus bestimmt. Um die Konzentration des Albumins in den Urinproben zu beurteilen, da für die ELISA-Bestimmung verdünnte Proben benutzt werden, wurden 9µl jeder Urinprobe auf das Proteinfeld eines Urinteststreifen pipettiert. Folgendes Schema wurde zur Orientierung benutzt, um die Urinproben mit „Sample Conjugat Diluent“ zu verdünnen: 0=1:500; +=1:5000; ++=1:20.000; +++=1:50.000; ++++=100.000. Anschließend wurde ein ELISA nach Protokoll durchgeführt.

3.6 Histopathologische Untersuchung

Nach der Organentnahme wurden Herz- und Nierengewebe für 24 Stunden in vier-prozentiger gepufferter Formalinlösung fixiert. Anschließend wurden die Proben in Paraffin eingebettet und mit einer Dicke von 1,5µm geschnitten. Die Histologien wurden danach entparaffiniert und mit einer Schiffschens Probe für eine reguläre PAS-Färbung gefärbt.

Der glomeruläre Schaden wurde semiquantitativ in einer 40er-Vergrößerung ermittelt. Ein Wert von 0 weist auf keinen Schaden, ein Wert von 1 weist auf milden Schaden in einem Drittel des Glomerulus, ein Wert von 2 weist auf einen Schaden, welcher mindestens die Hälfte des Glomerulus betrifft und ein Wert von 3 zeigt einen schweren Schaden über den gesamten Glomerulus an. Es wurden insgesamt 30 Glomeruli pro Maus analysiert und der entsprechende Durchschnittswert der Scorings für die Auswertung genutzt (Krebs et al., 2014).

Darüber hinaus wurde die Messung der Größe des Glomerulus parallel zum Scoring der Glomeruli computerunterstützt durchgeführt.

Der tubulointerstitielle Schaden wurde ebenfalls semiquantitativ mithilfe einer Skala bestimmt. Ein Wert von 0 indiziert keinen Schaden, 1 milden Schaden, 2 moderaten Schaden und 3 schweren Schaden. Tubulointerstitielle Schaden wurde durch eine Erweiterung des Tubuluslumens, einer Verflachung und Atrophie der Tubuluszellen sowie einer Vergrößerung der Basalmembran und einer Verbreiterung und Vernarbung des Interstitiums definiert.

3.7 Quantitative Real Time PCR

Die RNA wurde aus Herz-, Leber- und Nierengewebe isoliert und nach dem RNA-Isolationsprotokoll mit Trizol durchgeführt. Die quantitative real time PCR erfolgt mit Hilfe des PCR QuantStudio 3 Systems (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA). Dabei wurde ein „Power Up SYBR Green Master Mix“ (Thermo Fischer Scientific) als Reagenz benutzt. Die mRNA-Konzentration wurde zu der Expression von 18S als „Housekeeping-Gen“ normiert.

Folgende mausspezifische Primer wurden benutzt:

18s Fw	CAC GGC CGG TAC AGT GAA AC
18s Rev	AGA GGA GCG AGC GAC CAA A
C3 Fw	GGA AAC GGT GGT GGA GAA AG
C3 Rev	ATA AGA CAG TGG AGC CAG GG
C5 Fw	GCC GGA CCA GTC AGT AAA GA
C5 Rev	AAG ACA GTC TCC CGT TTG GC
Renin Fw	GCT CTG GAG TCC TTG CAC CTT
Renin Rev	CTT GAG CGG GAT TCG TTC AA

PAI-1 Fw	GGA CAC CCT CAG CAT GTT CA
PAI-1 Rev	TCT GAT GAG TTC AGC ATC CAA GAT
NGAL Fw	ATG TCA CCT CCA TCC TGG TC
NGAL Rev	CCT GGA GCT TGG AAC AAA TG
CCL2 Fw	GGC TCA GCC AGA TGC AGT TAA
CCL2 Rev	CCT ACT CAT TGG GAT CAT CTT GCT
ANP Fw	GTG CGG TGT CCA ACA CAG AT
ANP Rev	GCT TCC TCA GTC TGC TCA CTC A
BNP Fw	CCA GTC TCC AGA GCA ATT CAA
BNP Rev	AGC TGT CTC TGG GCC ATT TC

3.8 Plasmauntersuchung

Plasmaproben wurden bei der Organentnahme am letzten Tag des Versuches über eine Herzpunktion in tiefer Narkose gewonnen. Die jeweiligen Blutröhrchen wurden vor der Herzpunktion zur Konservierung mit Heparin versetzt. Die Harnstoff-N- und Cholesterinkonzentrationen im Plasma wurden über das COBAS Integra 400 plus bestimmt. C3- und C5-Plasma Konzentrationen wurden mit einem ELISA von Abcam (#ab157711) von Alnylam Pharmaceuticals in Boston bestimmt.

3.9 Western-Blot

Die Proteinproben wurden für die Western-Blot-Analyse bereitgestellt, indem T-Per-Puffer (Thermo Fisher Scientific, USA) hinzugefügt und anschließend sonifiziert wurden. Proteine (10 µg) wurden durch Elektrophorese in Precast-Gelen (Bio-Rad, USA), die SDS enthalten, in einer Elektrophoresekammer (Bio-Rad, USA) in Anwesenheit eines Migrationspuffers separiert. Die Proteine wurden dann unter Halbtrockenbedingungen auf eine PVDF-Membran (Millipore), die in Methanol getränkt ist, mit Transblot Turbo (Bio-Rad, USA) bei 25 V konstant für 30 Minuten übertragen. Die Membranen wurden in 3% Trockenmilch mit TBST blockiert und über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit sekundären Antikörpern inkubiert. Als

Primärantikörper wurde der Goat-C3-Antikörper (GeneTex, USA) mit SuperBlock Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific, USA) und Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierten sekundären Antikörpern (Donkey anti-Goat) in 3% Trockenmilch mit TBST verwendet. Die Membranen wurden nach der Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern dreimal für 10 Minuten in TBS-Tween 0,05% gewaschen. Die Detektion wurde mit SuperSignal West Pico Plus Chemilumineszenz-Substrat (Thermo Fisher Scientific, USA) durchgeführt und mit dem Amersham Imager 600 (GE Healthcare, USA) analysiert. Für die Housekeeping-Analyse des Gewebes wurde der Maus β -Actin (Sigma Aldrich, USA) und HRP-konjugierte Donkey anti-Mouse Antikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) verwendet. Plasma-Proben wurden gegen Albumin normalisiert, daher wurde die Membran mit 0,2% Ponceau S-Lösung (Thermo Fisher Scientific, USA) gefärbt und mit dem Imager analysiert. Da es kein geeignetes Housekeeping-Protein in Urinproben gibt, wurde die Urinmenge jeder Bahn durch Normalisierung auf 0,3 μ g Kreatinin für jede Probe angepasst.

3.10 Bestimmung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR)

Die transkutane Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) erfolgte an wachen Mäusen unter Verwendung eines miniaturisierten Geräts mit internem Speicher. Dieses ermöglicht die Erfassung der Eliminationskinetik des fluoreszierenden Nierenmarkers FITC-Sinistrin. Die Messprozedur beginnt mit einer einminütigen Aufnahme des Hintergrundsignals, bevor FITC-Sinistrin durch retrobulbäre Injektion verabreicht wird. Während die Mäuse wach sind und freien Zugang zu Futter und Wasser haben, dauert die Messung insgesamt eine Stunde. Die Berechnung der GFR erfolgt abschließend durch Auswertung der Plasma-Clearance von FITC-Sinistrin mithilfe der "MPD lab"-Software (Schreiber et al., 2012).

3.11 Leukozytenisolation für die FACS-Analyse

Für die Leukozytenisolation wurde während der Organentnahme am letzten Tag des Versuches Nierengewebe mit einem Skalpell zerkleinert und in C-Tubes mit einer Digestionslösung, bestehend aus RPMI 1640 mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% HEPES, inkubiert. Danach wurde das Nierengewebe mit Collagenase D und DNase für 45 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde das Erstellen der Einzelzellsuspension durch Verwendung eines Gentle-MACS ermöglicht. Nach der Verwendung des Gentle-MACS wurden die Proben bei 300g für 8 Minuten bei

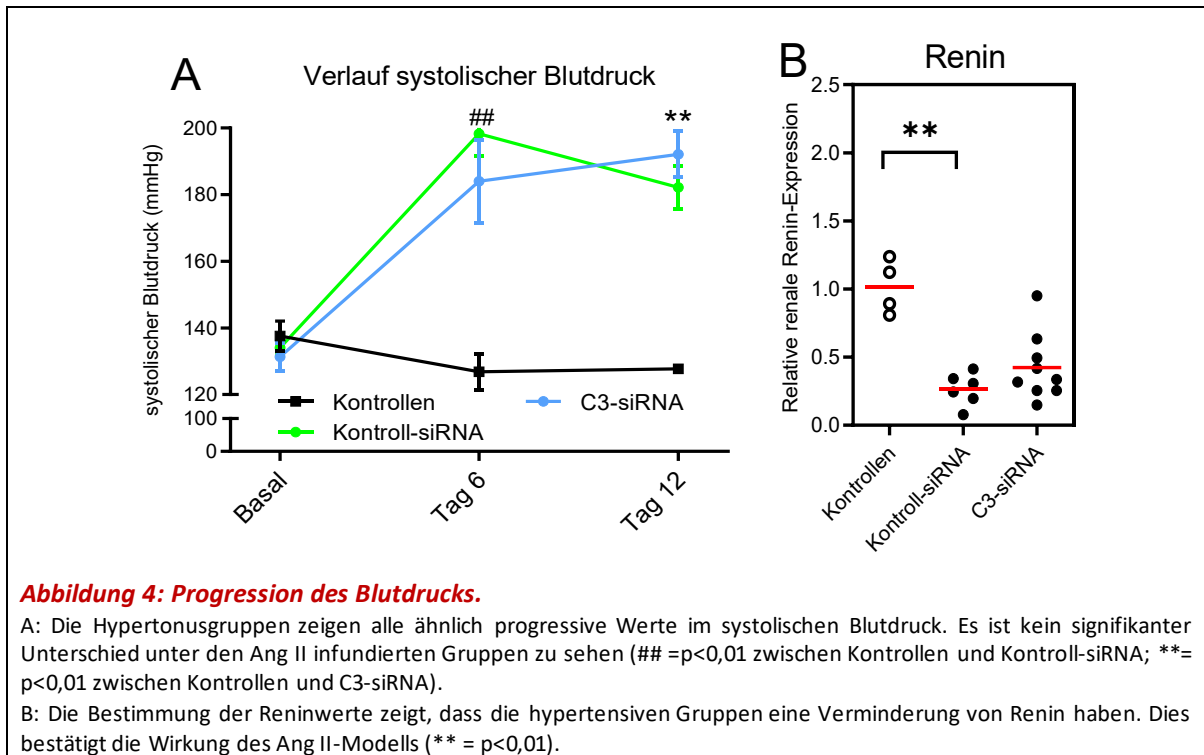
23°C zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde verworfen. Das verbleibende Pellet wurde in 10ml MACS-Puffer resuspendiert und auf ein 70µm² Sieb überführt.

Danach wurde den Proben bei Raumtemperatur 7ml einer 37-prozentigen Percoll-Lösung zugesetzt. Nach einer weiteren Zentrifugation unter 500g und 23°C für 15 Minuten und das Verwerfen des Überstandes wurden 10ml MACS-Puffer zu jeder Probe hinzugefügt. Weiterhin wurden die Proben nach diesem Schritt erneut zentrifugiert (300g, 8min, 4°C) und der resultierende Überstand wurde verworfen. Dann wurde für die Erythrozyten-Lyse 1 ml eines Erythrozyten-Lyse-Puffers auf die Proben gegeben. Diese Reaktion wurde nach 5-7 Minuten durch Zugabe von 14 ml MACS-Puffer gestoppt. Ein weiterer Waschschrift (Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes) wurde durchgeführt. Das verbleibende Pellet wurde in 10ml MACS resuspendiert und auf ein 40 µm² Sieb überführt. Schließlich erfolgte ein letzter Waschschrift, sodass nur ein Pellet zurückbleibt. Dieses Pellet wurde dann auf eine Platte mit 96 Wells überführt und bei 360g und 4°C für 2 Minuten zentrifugiert. Um spezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden 10µl murines Serum zugegeben, welches für 15 Minuten bei 4°C inkubiert wurde. Für die FACS-Analyse wurden Fluorchrom-konjugierte Antikörper verwendet. Zur Zellzählung wurden CD45 (30-F11) Antikörper und Zählperlen verwendet. Die Messung wurde mit einem Becton & Dickinson LSRII System und der dazugehörigen DIVA Software durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte mit der FlowJo-Software (Tree Star, USA).

3.12 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse wurde GraphPad Prism 8.3.0 verwendet. Um eine Normalverteilung der Werte zu testen, wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet. Bei Vorhanden einer Normalverteilung wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Nachverfolgungsanalyse mittels Turkeys multiplen Vergleichstest mit einer einheitlichen Varianz durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Kruskal-Wallis mit einem Dunns multiplen Vergleichstest durchgeführt. Für den Vergleich von zwei Parametern wurde ein unpaariger t-Test bei Vorhandensein von Normalverteilung und der Mann Whitney Test für nicht normalverteilte Daten verwendet. Überlebensprozentwerte wurden nach Kaplan Meier berechnet und Überlebenskurven mittels des Log-Rank-Tests verglichen. Unterschiede wurden bei * p<0,05, **p < 0,01, *** p <0,001 und **** p <0,0001 als statistisch signifikant betrachtet.

Blutdrucks zeigte, erwiesen sich in den Blutdruckmessungen am Tag 6 und Tag 12 keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll-siRNA und der C3-siRNA Gruppe (Abb. 4A). Die renale Renin-Expression zeigte in beiden hypertensiven Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigte Werte, welches auf die erfolgreiche Anwendung des Modells hinweist, da Angiotensin II physiologisch die Renin-Expression hemmt (Abb. 4B).



Über den 14-tägigen Verlauf des Versuches wurden Mortalitätsraten in beiden hypertensiven Gruppen notiert. Es zeigte sich eine durchschnittliche Mortalitätsrate von 45,45 % in der Kontroll-siRNA Gruppe und 18,18 % in der C3-siRNA Gruppe. Dieses Ergebnis ist jedoch nur bedingt zu interpretieren, da sich am ehesten bei geringer n-Zahl beider hypertensiven Versuchsgruppen keine statistische Signifikanz errechnet hat (Abb. 5A).

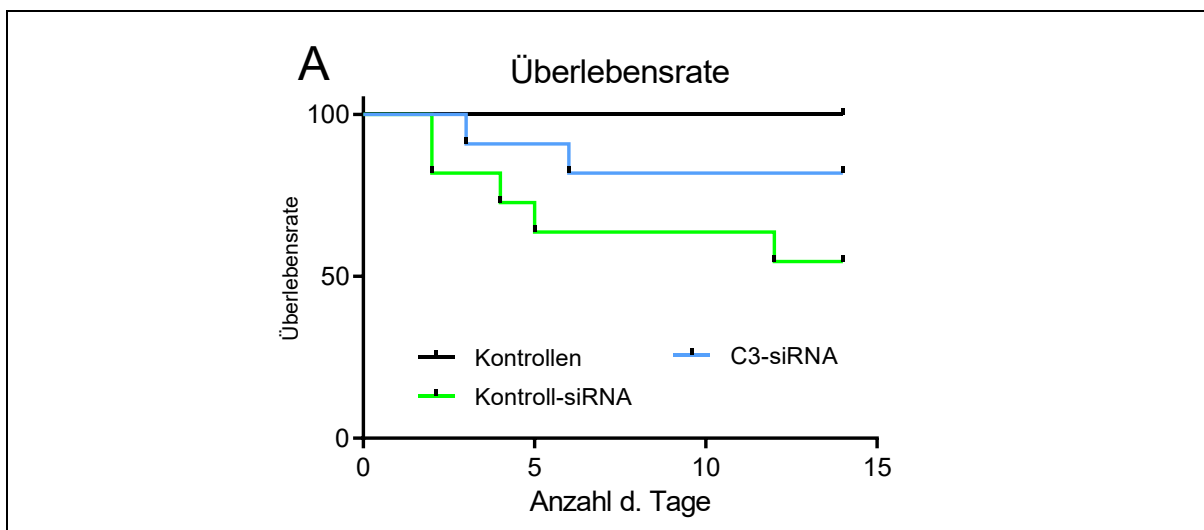


Abbildung 5: 14-tägige Überlebensrate im Ang II-Versuch.

A: Zwar zeigt sich die Kontroll-siRNA Gruppe mit einer Mortalität von 45,45 % betroffener als die C3-siRNA mit 18,18 %, jedoch unterscheiden sich diese Werte statistisch nicht signifikant.

4.1.3 Renaler Schaden

Der renale Schaden wird über die Erfassung der Nierengewichte, der Histologie, der Albuminurie, der GFR und der Serumkonzentration von Harnstoff-N im Plasma und der genetisch-renalen Expression von etablierten Markern renaler Schädigung (NGAL, CCL2, PAI-1) beurteilt.

Das Nierengewicht wurde jeweils durch das Körpergewicht oder der Tibialänge dividiert. Dies zeigte, dass die Werte in Relation zum Körpergewicht und zur Tibialänge in den hypertensiven Gruppen (C3-siRNA und Kontroll-siRNA) im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht waren, jedoch untereinander keine signifikanten Unterschiede zu erkennen waren (Abb. 6A-B).

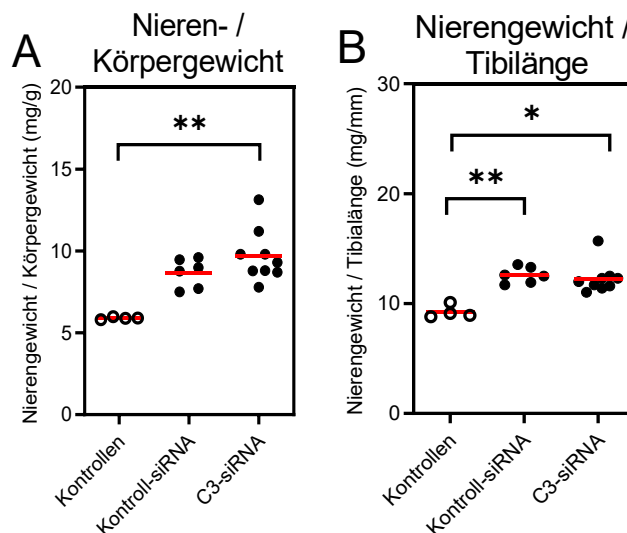


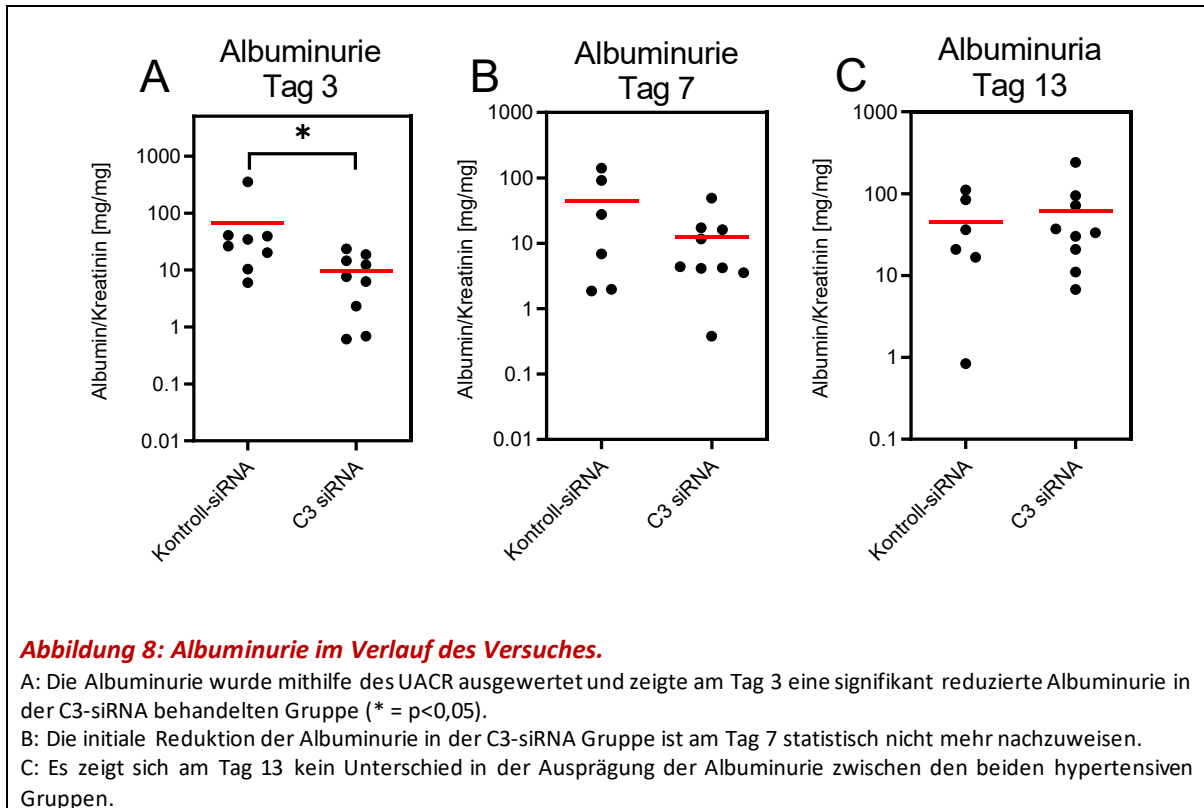
Abbildung 6: Relativiertes Nierengewicht.

A: Die Nierengröße wurde bei der Organentnahme gewogen und in Relation zum Körpergewicht gesetzt. Es liegt kein bemerkbarer Unterschied innerhalb der Vergleichsgruppen bezüglich relativem Nierengewicht vor (**= p<0,01).

B: Die Tibialänge wurde bei der Organentnahme ebenfalls ausgemessen. Hier zeigen sich keine Unterschiede in den Relationen zwischen den hypertensiven Versuchsgruppen (* = p<0,05; ** = p<0,01).

Eine histologische Analyse der PAS-gefärbten Nieren zeigt ähnliche Ausmaße an hypertensiven Schäden in den jeweiligen Histologien beider Gruppen. Nach einem semiquantitativen Scoring der glomerulären Schäden, der glomerulären Größe und der tubulointerstitiellen Schäden zeigten beide hypertensiven Gruppen im Vergleich zur normotensiven Kontrollgruppe erhöhte Werte, jedoch keine signifikanten Unterschiede untereinander (Abb. 7A-C).

Die Ang II-Infusion induzierte eine schwere Albuminurie in beiden betroffenen hypertensiven Gruppen. Dabei zeigte sich initial am Tag 3 eine statistisch signifikante mildere Ausprägung der Albuminurie in der C3-siRNA Gruppe im Vergleich zu der Kontroll-siRNA Gruppe ($p < 0,05$) (Abb. 8A). Im weiteren Verlauf ist zu erkennen, dass am Tag 7 die Tendenz zur milderen Albuminurie noch besteht, jedoch statistisch nicht nachzuweisen ist. Am Tag 13 ist kein relevanter Unterschied in der Ausprägung der Albuminurie mehr zu beobachten (Abb. 8B-C).



Am 11. Tag des Versuchs wurde die GFR gemessen und beurteilt. Die GFR lag in der Kontroll-siRNA Gruppe durchschnittlich bei $0,74 \pm 0,07$ ml/min/100gKG und in der C3-siRNA Gruppe bei $0,79 \pm 10,1$ ml/min/100gKG, sodass kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden hypertensiven Versuchsgruppen bezüglich der Nierenfunktion ermittelt wurde (Abb. 9A). Ähnlicherweise zeigten Plasmakonzentrationen von Cholesterin und Harnstoff-N, dass diese weitestgehend unbeeinflusst von einer C3-siRNA Injektion waren (Abb. 9B-C).

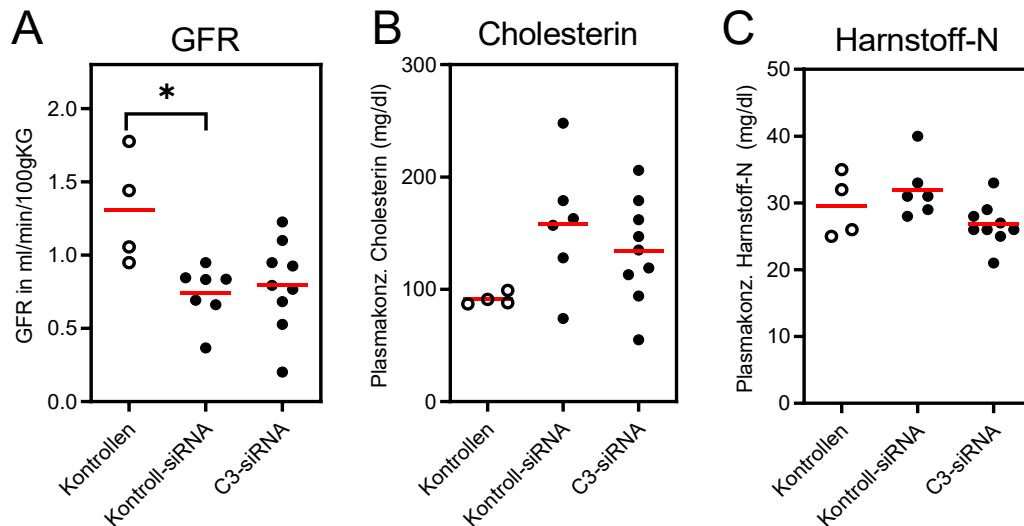


Abbildung 9: Nierenfunktion und Plasmakonzentrationen.

A: Die Ang II-Infusion induzierte eine Senkung der GFR in den hypertensiven Versuchsgruppen. Es zeigte sich jedoch untereinander kein Unterschied (* = $p < 0,05$).

B-C: Die Plasmawerte von Cholesterin und Harnstoff-N zeigen keine signifikanten Unterschiede.

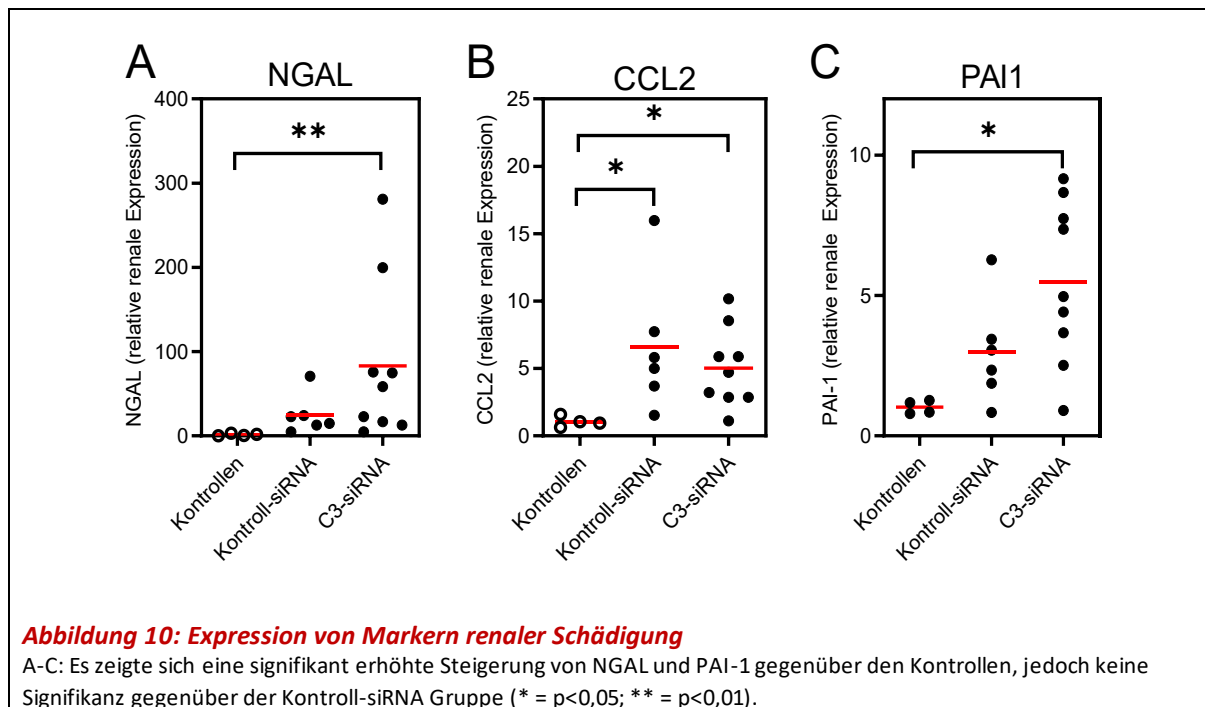
Für die weitere Erfassung renaler Schäden wurden die mRNA-Expressionen von NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin), CCL2 (chemokine ligand 2) und PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) gemessen (Abb. 10A-C).

Die Bestimmung von NGAL ist in der klinischen Anwendung von entscheidender Bedeutung, da es als früher Biomarker für Nierenschäden Informationen über eine mögliche akute Niereninsuffizienz liefert (Bianca et al., 2015). Daher wurde zwecks Bestimmung der hypertensiven Nierenschäden in diesem Modell der Biomarker NGAL bestimmt. Die renale Expression von NGAL zeigte eine leichte Elevation in beiden hypertensiven Gruppen (Abb. 10A). Zwar zeigte die C3-siRNA Gruppe mit einer $83,00 \pm 31,76$ -fach erhöhter Expression im Vergleich zur Kontroll-siRNA Gruppe mit einer $24,98 \pm 9,6$ -fach erhöhten Expression eine leicht erhöhte Tendenz, jedoch war diese statistisch nicht signifikant.

Die Bestimmung des Markers CCL2 dient zur Erfassung von Entzündungsreaktionen, da CCL2 besonders im hypertensiven Rahmen die Leukozyteninfiltration in der Niere fördert (Alsheikh et al., 2020), während die Defizienz von CCL2 als renal protektiv angenommen wird (Kashyap et al., 2018). Die renale CCL2-Expression war bei beiden hypertensiven Gruppen in diesem Versuch gleichermaßen erhöht (Abb. 10B).

Das Enzym PAI-1 ist für die regulatorische Funktion in der Blutgerinnung über die Hemmung vom „Tissue Plasminogen Activator (tPA)“ und „Urokinase Plasminogen Activator (uPA)“ bekannt. Abgesehen von den proteolytischen Eigenschaften ist PAI-1 ebenfalls mit der Entstehung einer Nierenfibrose, Glomerulonephritis und generell Nephropathien assoziiert, weshalb der Marker in diesem Versuch ebenfalls bestimmt wurde (Małgorzewicz, Skrzypczak-Jankun & Jankun, 2013;

Jeong et al., 2016). Die renale PAI-1 Expression zeigte ähnlich zu der NGAL-Expression eine deutliche Erhöhung in der C3-siRNA Gruppe (Abb. 10C) gegenüber der normotensiven Kontrollgruppen, jedoch keinen statistischen Unterschied gegenüber der hypertensiven Kontroll-siRNA Gruppe.



Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse bezüglich renaler hypertensiver Schäden, dass eine C3-siRNA Inhibition zu einer milderen Albuminurie in den Anfangsstadien des Hypertonus führt. Dieser Effekt verschwindet jedoch im weiteren zeitlichen Verlauf des Versuchs. Weiterhin zeigten histologische, Expressions- und laborchemische Daten keinen zusätzlichen Effekt einer C3-Inhibition mittels siRNA.

4.1.4 Kardialer Schaden

Um den kardialen Aspekt der hypertensiven Endorganschäden zu erfassen, wurde das relative Herzgewicht (Abb. 11A-B) und die kardiale Expression des Atrialen Natriuretischen Peptids (ANP) und des B-natriuretischen Peptids (BNP) erfasst (Abb. 12A-B).

Es zeigte sich in beiden hypertensiven Vergleichsgruppen bei signifikanter Erhöhung des Quotienten gegenüber den Kontrollen kein Unterschied in den relativierten Herzgewichten bezogen auf das Körpergewicht und auf die Tibiallänge (Abb. 11A-B).

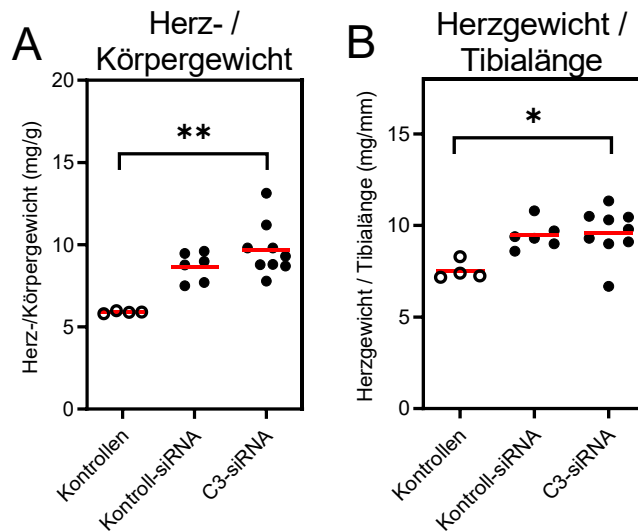


Abbildung 11: Relativierte Herzgewichte.

A-B: Das Herzgewicht wurde nach der Organentnahme erfasst und es wurde mithilfe des Körpergewichts und mit der Tibiallänge relativiert. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den hypertensiven Gruppen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

ANP und BNP sind etablierte kardiale Marker, um den Grad der kardialen Schädigung zu beurteilen. Die Abbildung 12 zeigt die kardiale Expression von ANP und BNP. Hier zeigten beide hypertensiven Gruppen im Vergleich zur normotensiven Kontrollgruppe erhöhte Werte, jedoch keine wesentlichen Unterschiede untereinander.

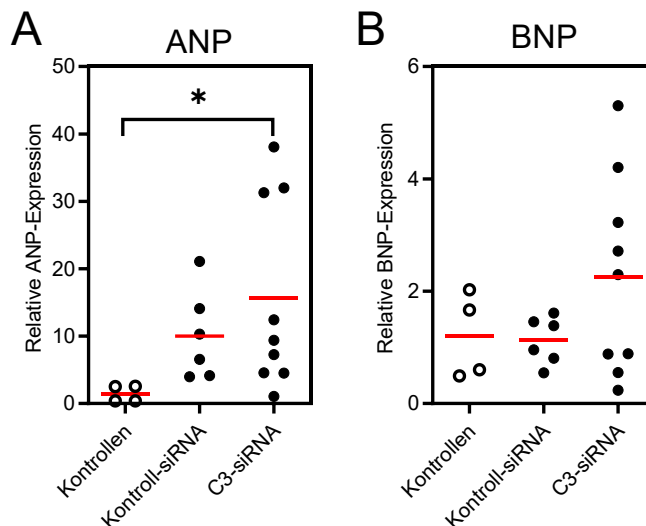


Abbildung 12: Kardialer Schaden anhand Expression von ANP und BNP.

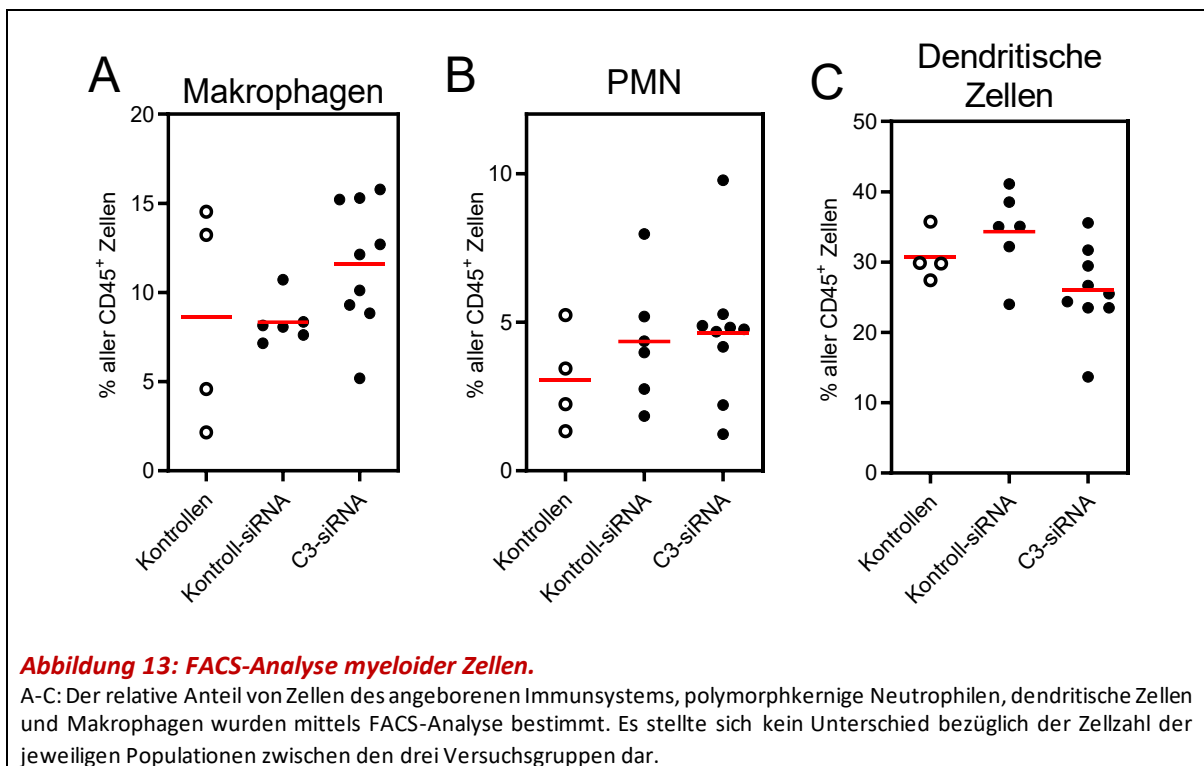
A-B: Die kardiale Expression zeigte sich für ANP und BNP in beiden hypertensiven Gruppen ähnlich gegenüber den Kontrollen erhöht (* = $p < 0,05$).

Zusammenfassend wurde hinsichtlich der kardialen Endorganschäden kein maßgeblicher Einfluss einer C3-siRNA Inhibition anhand des Gewichts und der genetischen Expression der Marker ANP und BNP erfasst.

4.1.5 Ausmaß der Inflammation

Um den Effekt einer Komplementinhibition auf Inflammation zu messen, wurden renale Leukozyten nach Organentnahme isoliert (siehe 2.11) und mittels einer FACS-Analyse untersucht. Dabei wurden für myeloide Zellen die Anzahl von polymorphkernigen Neutrophilen (PMN), dendritischen Zellen (CD11b⁺, CD11c⁺) und Makrophagen (CD11b⁺, CD11c⁻) untersucht (Abb. 13 A-C), während repräsentativ für lymphatische Zellen CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, Foxp3⁺ Tregs, $\gamma\delta$ T-Zellen und Th17 Zellen quantifiziert wurden (Abb. 14A-F).

Dabei zeigte sich die Zellzahl der Makrophagen, PMN und dendritischen Zellen weitestgehend unbeeinflusst von einer C3-siRNA Injektion (Abb. A-C).



Eine leichte Tendenz zur erhöhten Foxp3⁺ Tregs-Anzahl lässt sich in der C3-siRNA Gruppe ($0,39 \pm 0,28\%$) im Vergleich zur Kontroll-siRNA Gruppe ($0,24 \pm 0,12\%$) sehen (Abb. 14D). Allerdings ist diese Tendenz nicht statistisch signifikant. Die statistische Auswertung der hier analysierten Lymphozyten zeigte zwischen den hypertensiven Versuchsgruppen ähnliche Zellzählungen in den beiden hypertensiven Gruppen (Abb. 14A-F).

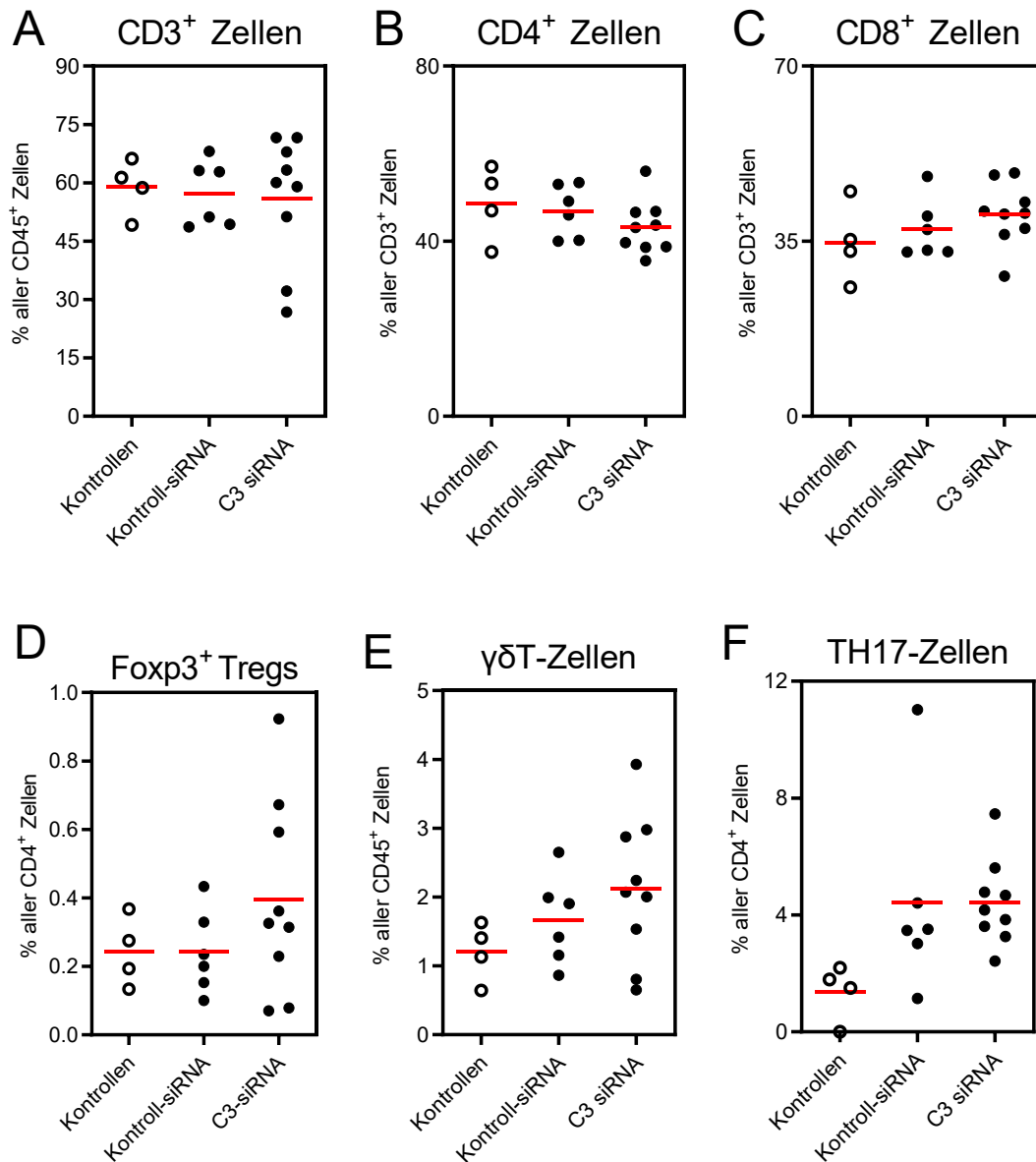


Abbildung 14: FACS-Analyse lymphatischer Zellen.

A-F: Quantifizierung des relativen Anteils von Zellen des adaptiven Immunsystems: CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ - Zellen, FoxP3⁺ Tregs, γδT-Zellen und Th17- Zellen.

Insgesamt zeigten sich wenig Zeichen einer Inflammation bei Zellzählungen von renalen myeloiden und lymphatischen Zellen, welche überwiegend unbeeinflusst von einer C3-siRNA Gabe blieben.

4.2 C3-siRNA Inhibition im DOCA-Salz Modell

4.2.1 Inhibition

In ähnlicher Art zu den Ang II-Versuchen hatte die Injektion von C3-siRNA im DOCA-Salz Versuch zu einer Reduktion der hepatischen C3-Expression von 95% geführt (Abb. 15A). Darüber hinaus erfolgte in einer Subgruppe eine Konzentrationsbestimmung von C3 im Plasma mittels ELISA über das Labor von Alnylam Pharmaceuticals Inc. aus Boston. Diese zeigte mit $120,00 \pm 22,00 \mu\text{g/ml}$ eine zu erwartende Erniedrigung in der C3-siRNA Gruppe im Vergleich zur Kontroll-siRNA Gruppen mit einer C3-Plasmakonzentration von $1671,00 \pm 95,12 \mu\text{g/ml}$ (Abb. 15B). Somit hatte die hepatische Inhibition von C3-siRNA ebenfalls die Plasmakonzentration gesenkt.

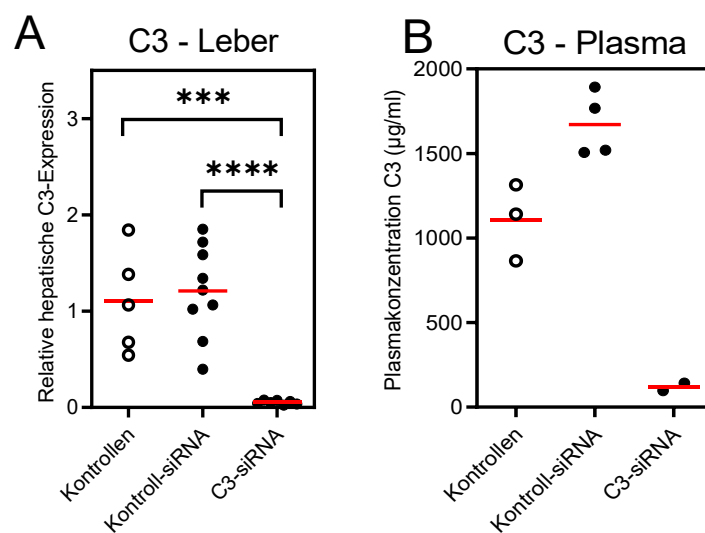


Abbildung 15: Expression und Plasmakonzentration von C3.

In den folgenden Abbildungen werden normotensive Kontrollen mit offenen Kreisen dargestellt. Hypertensive Versuchsgruppen, welche eine DOCA-Pellet Implantation erhalten haben, werden mit schwarz-gefüllten Kreisen dargestellt.

A: Hepatische Expression von C3 wurde durch C3-siRNA Gabe um 94,74% gesenkt (** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,0001$).

B: Plasmakonzentrationen von C3 wurde in einer Subgruppe mithilfe eines ELISA gemessen und zeigte eine Reduktion der Plasmakonzentration von C3 um 89,16% in der C3-siRNA Gruppe.

4.2.2 Auswirkungen des DOCA-Pellets

Der systolische Blutdruck wurde an drei verschiedenen Zeitpunkten gemessen: Basal (Woche 0), Woche 3 und Woche 5. Beide hypertensiven Gruppen zeigten über die Versuchsdauer einen gleichmäßigen Anstieg des systolischen Blutdrucks (Abb. 16A).

Die Bestimmung der renalen Renin-Expression verifiziert eine erfolgreiche Anwendung des DOCA-Salz Modells, da Aldosteron zu einer Reduktion der Reninexpression führt (Abb. 16B). In diesem Sinne konnte eine verminderte Expression von Renin in beiden hypertensiven Gruppen festgestellt werden.

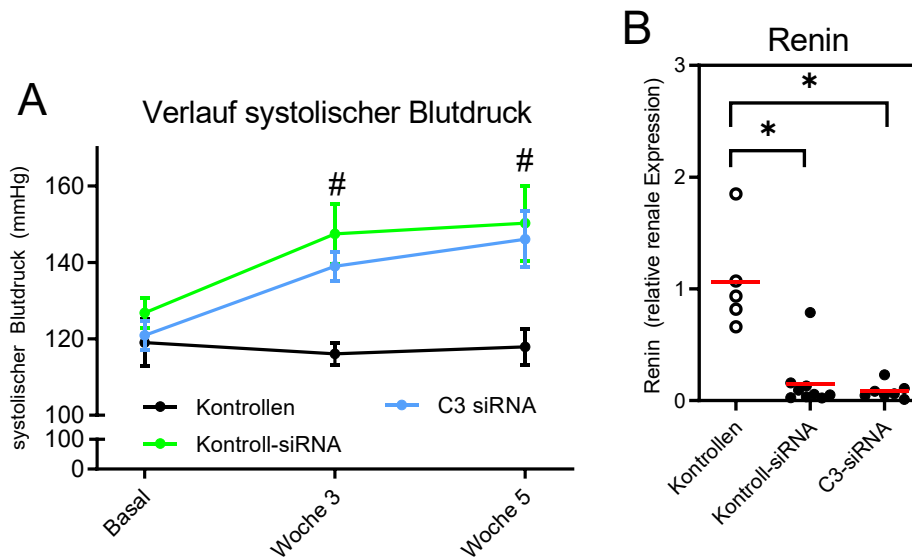


Abbildung 16: Progression des Blutdrucks.

A: Blutdruckprogression über die sechs Wochen (Die Y-Achse wurde für die Übersicht im unteren mmHg Bereich verkürzt). Es zeigte sich eine tendenzielle niedrige Kurve für die C3-siRNA Gruppe, welche jedoch nicht signifikant ist (# = $p < 0,05$ zwischen Kontrollen und Kontroll-siRNA).

B: Renale Renin Expression war in allen beiden hypertensiven Gruppen reduziert (* = $p < 0,05$).

Die Überlebensrate ist in der Abbildung 17 als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Die Mortalität innerhalb der C3-siRNA Gruppe zeigt eine deutliche Zunahme im Zeitraum von Tag 10 bis Tag 24 (8/13 Mäuse versterben in diesem Zeitraum), sodass die Mortalitätsrate auf 67,15% steigt. Im Vergleich dazu beträgt die Mortalitätsrate in der Kontroll-siRNA Gruppe 25%. Dieser Effekt ist numerisch zwar auffällig, lässt sich statistisch jedoch nicht als signifikant ermitteln, sodass keine konkrete Aussage bezüglich einer erhöhten Mortalität in der C3-siRNA Gruppe zu treffen ist.

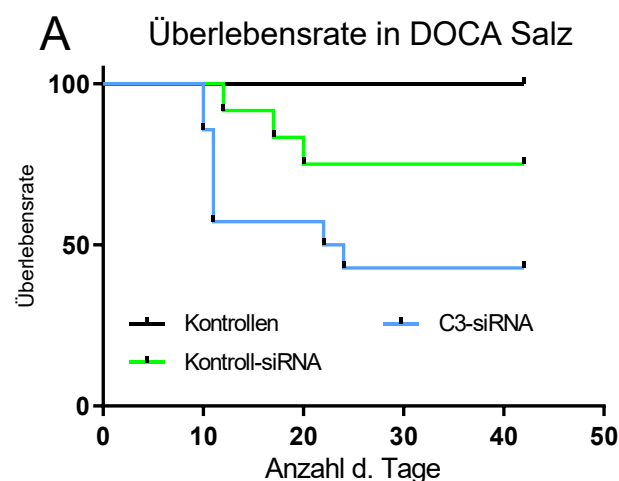


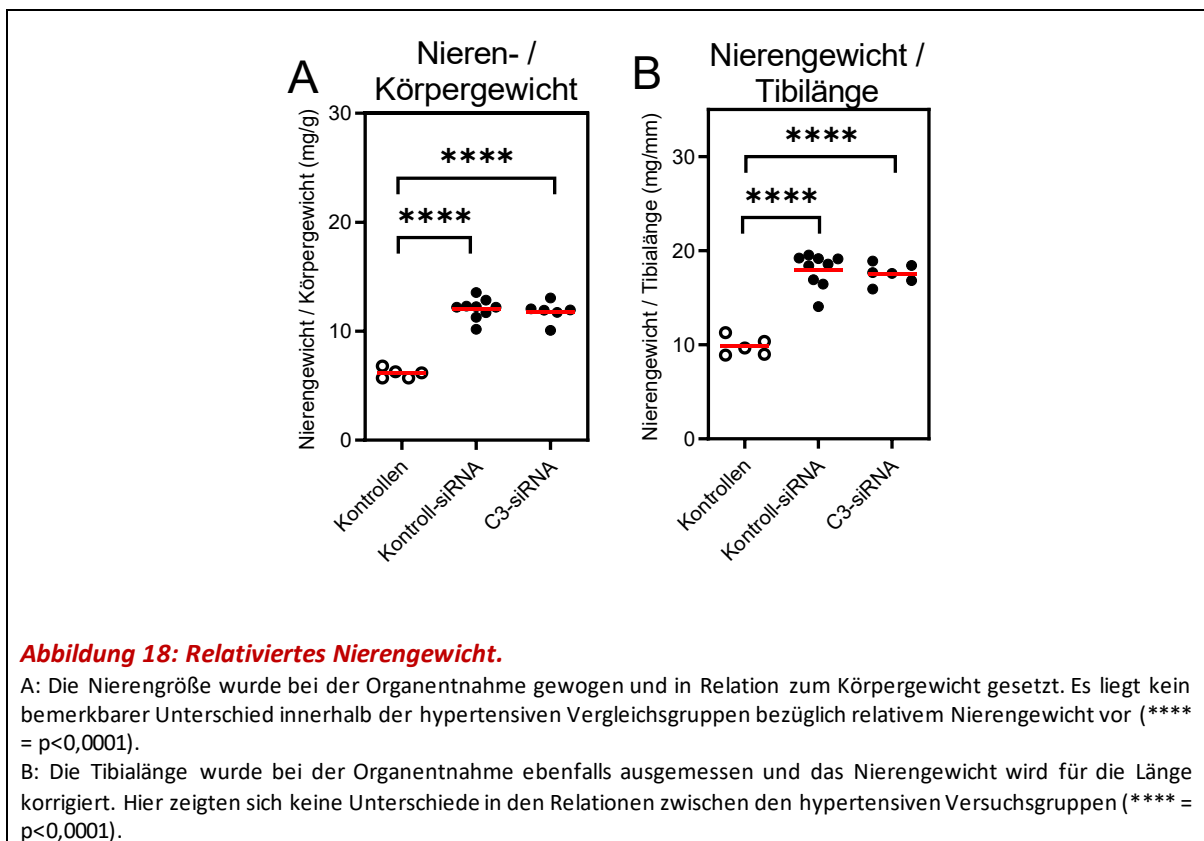
Abbildung 17: Überlebensrate im DOCA-Salz Versuch

A: Überlebensrate über 6 Wochen in einer Kaplan-Meier Kurve dargestellt. Es zeigte sich eine numerisch erhöhte Mortalität in der C3-siRNA Gruppe, welche jedoch nicht signifikant ist.

4.2.3 Renale Schäden

Der renale Schaden wurde durch die Erfassung der relativen Gewichte, der Histologie, der Albuminurie, der Ermittlung der GFR und der Plasmakonzentrationsbestimmung von Harnstoff-N und Cholesterin und der Quantifizierung der Expression von Markern für renale Schädigung beurteilt.

Das relative Nierengewicht wurde wie bereits oben beschrieben mit Hilfe eines Quotienten mit jeweils des Körpergewichts oder der Tibiallänge ermittelt. Es zeigte sich bei generell erhöhten Werten des Nierengewichts kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll-siRNA und C3-siRNA Gruppe bezüglich Hypertrophie der Niere (Abbildung 18A-B).



Um mikrostrukturelle Schäden zu erfassen, wurden Histologien der Niere in PAS-Färbung angefertigt und anschließend hinsichtlich der glomerulären Schäden, der glomerulären Größe und der tubulointerstitiellen Schäden ausgewertet. Diese zeigten ähnlich zu den Ergebnissen des Ang II-Versuches gleichermaßen schwere Schäden bezüglich glomerulären Schaden, während eine signifikante Größenzunahme ($p < 0,01$) in der Kontroll-siRNA Gruppe mit einer durchschnittlichen glomerulären Größe von $5028\mu\text{m}^2 \pm 149$ im Vergleich zur C3-siRNA Gruppe mit $4161\mu\text{m}^2 \pm 220$ zu beobachten ist (Abb. 19B). Ebenfalls war ein tendenziell erhöhter Score für tubulointerstitielle Schäden in der Kontroll-siRNA Gruppe zu erahnen, welche sich statistisch jedoch nicht signifikant darstellen ließen (Abb. 19C).

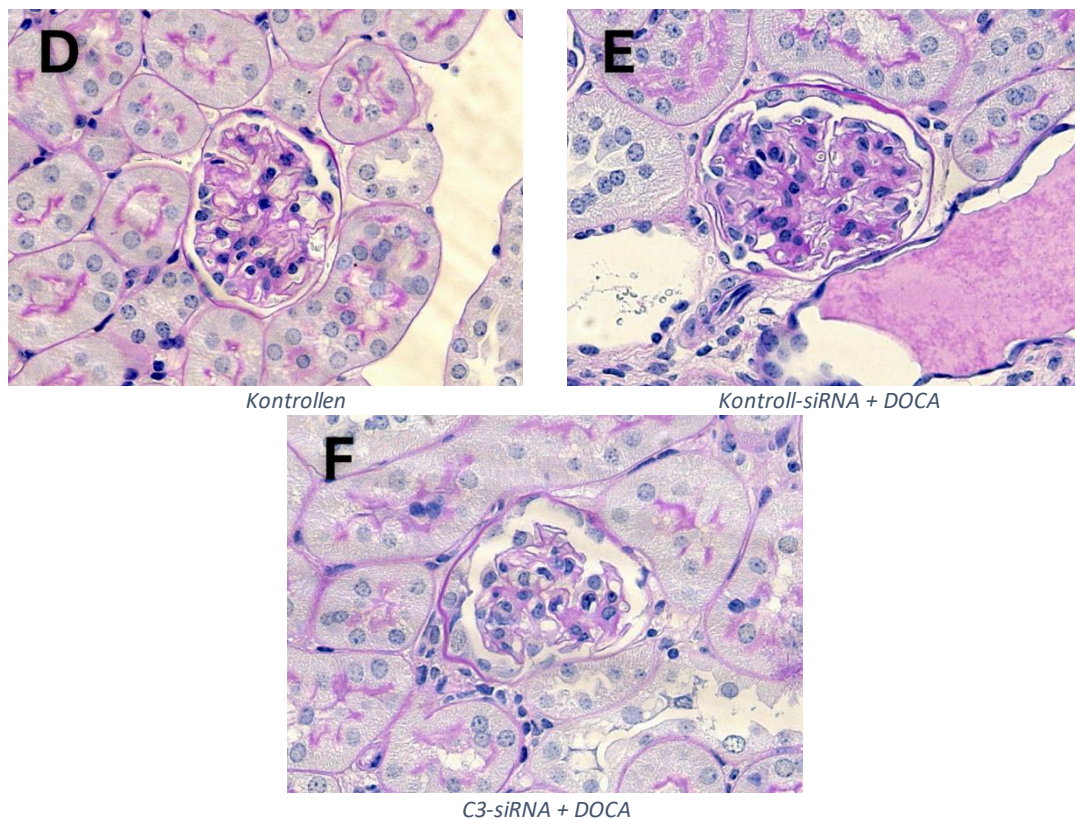
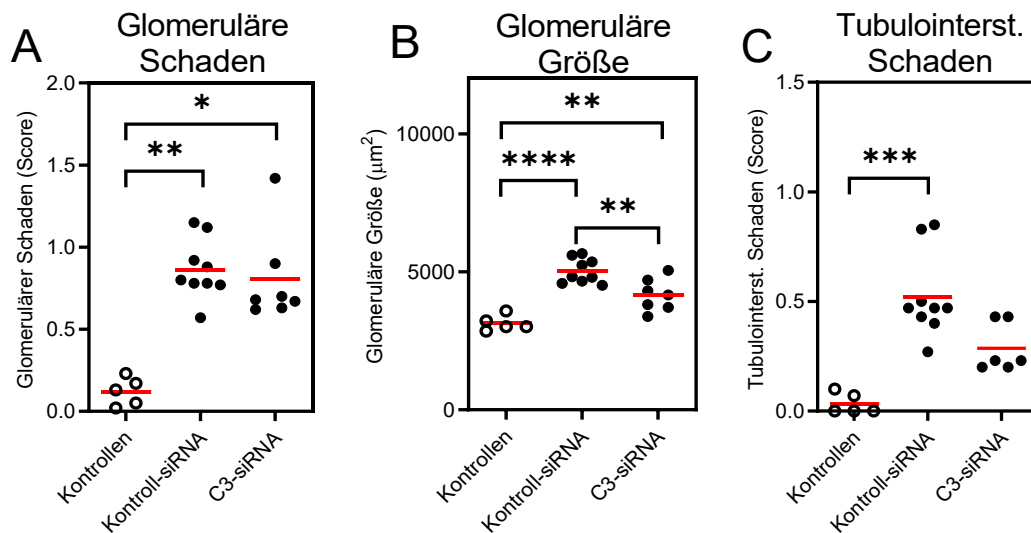


Abbildung 19: Histologische Auswertung.

A: Die histologische Auswertung der glomerulären Schäden zeigte bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen ähnliche hypertensive Veränderungen (** = $p < 0,01$).

B: In der Kontroll-siRNA Gruppe zeigte sich sowohl eine signifikante erhöhte Zunahme der glomerulären Größe als auch ein erhöhter Score für die tubulointerstitiellen Schäden im Vergleich zur C3-siRNA Gruppe (** = $p < 0,01$).

D-E: PAS-Färbung der Nieren zeigte einen leicht erhöhten Schaden in den DOCA-Gruppen.

Durch die Implantation des DOCA-Pellets kam es in beiden hypertensiven Gruppen zu einem Anstieg der Albuminurie, wobei zwischen den hypertensiven Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden (Abb. 20).

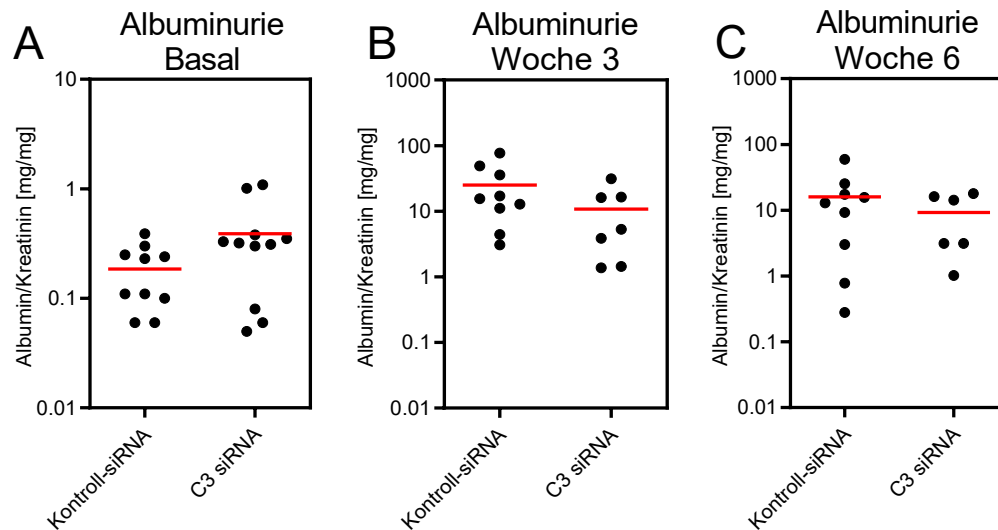


Abbildung 20: Albuminurie im Verlauf des Versuches.

A-C: Die Albuminurie wurde mithilfe des UACR ausgewertet und zeigte im Verlauf eine ähnlich steigende Albuminurie in beiden Gruppen. Zu beachten ist die logarithmische Darstellung der Y-Achse.

In der dritten und in der sechsten Woche wurde die glomeruläre Filtrationsrate der Niere gemessen und beurteilt. Zu sehen ist, dass in der 3. Woche die GFR der Tiere beider hypertensiven Versuchsgruppen mitten im Verlauf des Versuches deutlich erniedrigt waren. Zum Ende des Versuches hin waren die Werte zwar weiterhin erniedrigt, jedoch zeigte sich unter persistierendem DOCA induziertem Hochdruck eine tendenzielle Verbesserung des GFR-Werts. Plasmakonzentrationen von Harnstoff-N und Cholesterin zeigten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der beiden hypertensiven Gruppen (21C-D). Die Harnstoff-N-Plasmawerte der hypertensiven Versuchsgruppen zeigten sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe etwas erniedrigt.

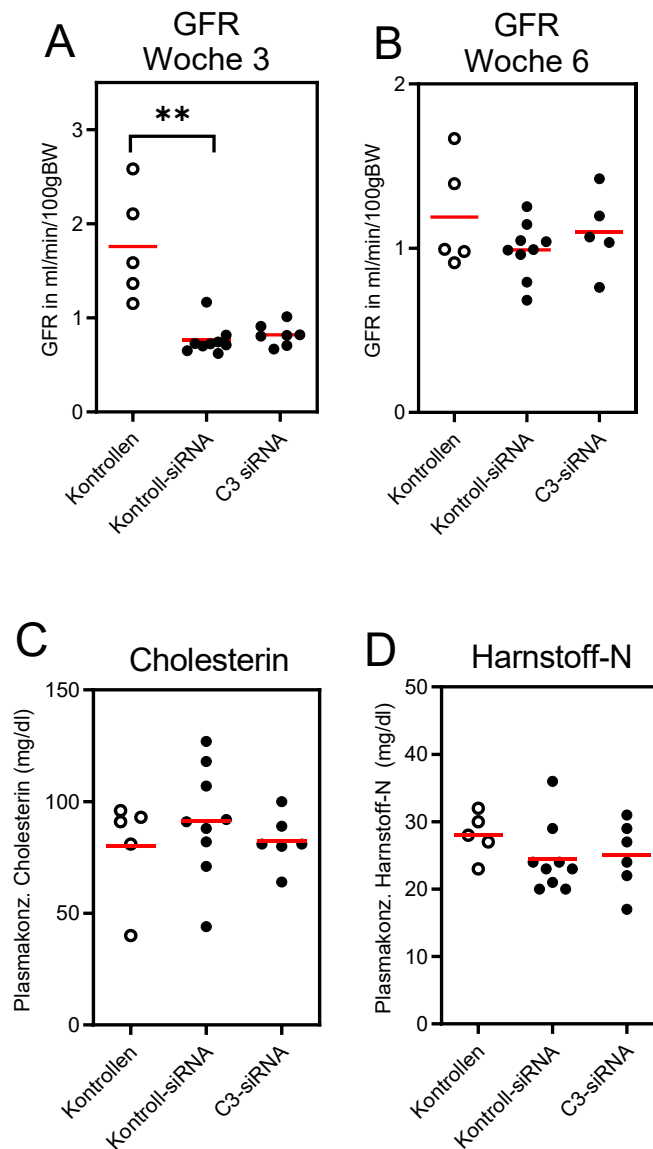


Abbildung 21: Verlauf der Nierenfunktion und Plasmakonzentrationen.

A-B: Die GFR zeigte sich in der 3. Woche in beiden hypertensiven Versuchsgruppen im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen erniedrigt. In der 6. Woche zeigte sie sich weiterhin minimal erniedrigt (** = $p < 0,01$).

B-C: Die Plasmawerte von Cholesterin und Harnstoff-N zeigen sich von der DOCA-Implantation unbeeinflusst.

Die renale Expression von NGAL und PAI-1, Marker von Nierenschädigung (wie bereits in 4.1.3 beschrieben), wurden per rtPCR bestimmt (Abb. 22A, 22C). Beide Werte zeigten sich im Vergleich der hypertensiven gegenüber der normotensiven Versuchsgruppe erhöht.

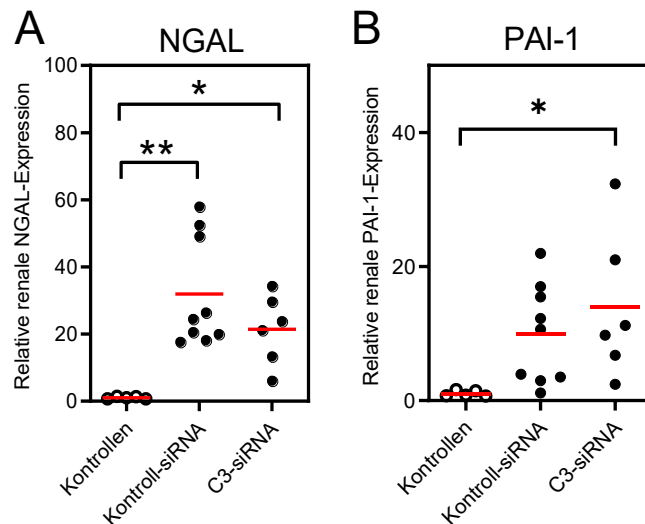


Abbildung 22: Expression von Markern renaler Schädigung.

A-B: Die renale Expression von NGAL und PAI-1 zeigte Erhöhungen in den DOCA-Gruppen, jedoch waren diese zueinander nicht signifikant (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$).

4.2.4 Kardiale Schäden

Relatives Herzgewicht und Expression von ANP und BNP im Herzen wurden für die Einschätzung der kardialen Schäden ermittelt.

Das relative Herzgewicht war zwar in den hypertensiven Gruppen im Vergleich zur normotensiven Kontrollgruppe erhöht, hatte sich unter den hypertensiven Gruppen jedoch nicht unterschieden (Abb. 23A-B).

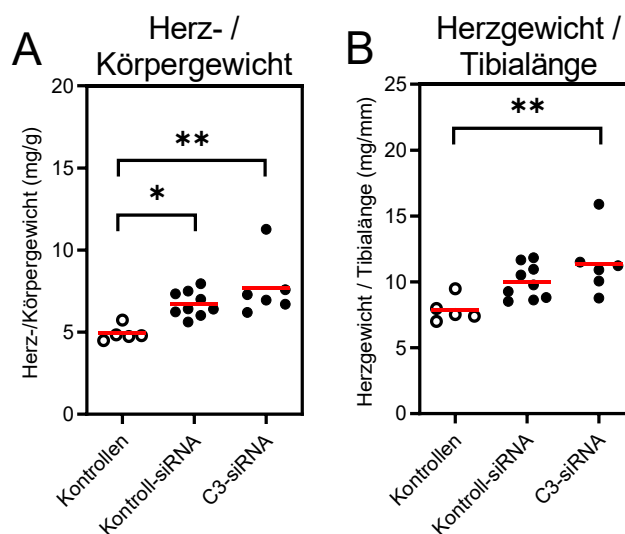
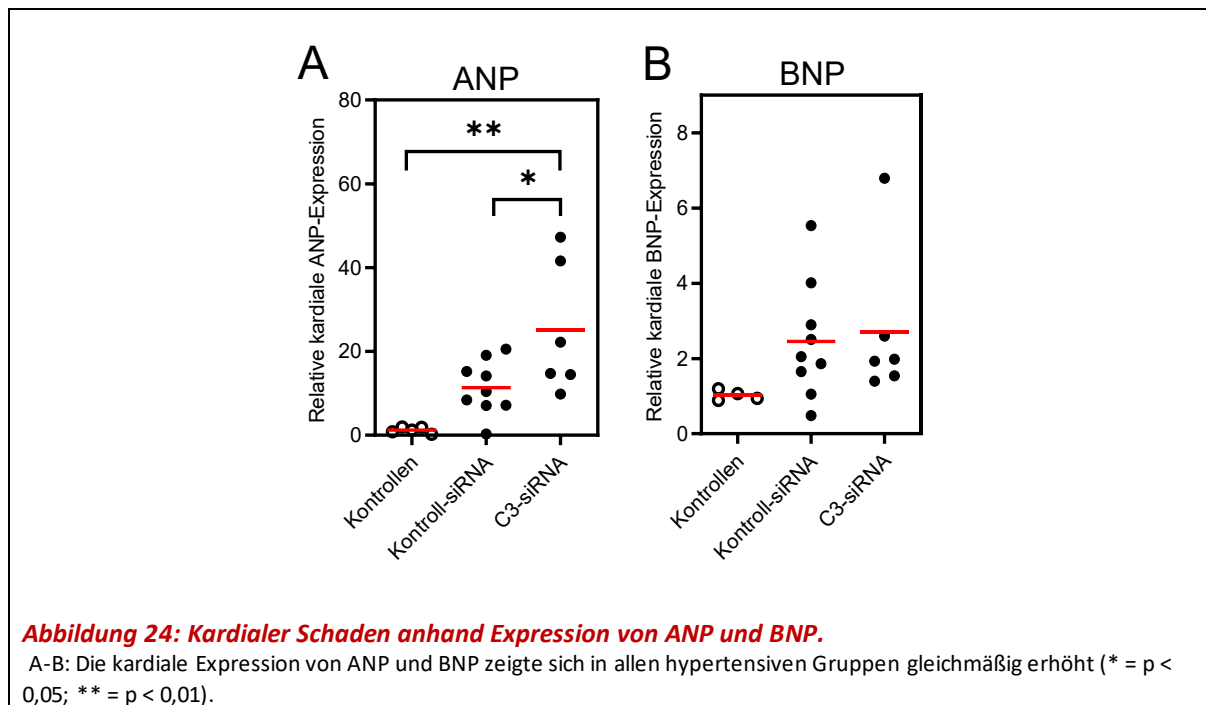


Abbildung 23: Relativierte Herzgewichte.

A-B: Das Herzgewicht wurde nach der Organentnahme erfasst und es wurde ein Quotient mit dem Körpergewicht oder der Tibialänge gebildet. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden hypertensiven Gruppen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Ähnlicherweise zeigte die ANP- und BNP-Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen den hier hypertensiven Gruppen (Abb. 24C-D).



4.2.5 Ausmaß der Inflammation

Kongruent zu den Ang II-Versuchen wurde der Effekt einer Komplementinhibition auf die Inflammation mithilfe einer FACS-Analyse renaler Leukozyten bestimmt.

Unter den myeloiden Zellen zeigte sich kein statistischer Unterschied bezüglich der Quantifizierung von Makrophagen ($CD11b^+$, $CD11c^-$) und polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) (Abb. 25 A-B). Hingegen konnte eine leichte Verminderung der dendritischen Zellen ($CD11b^+$, $CD11c^+$) in der C3-siRNA im Vergleich zur Kontroll-siRNA Gruppe festgestellt werden (Abb. 25C).

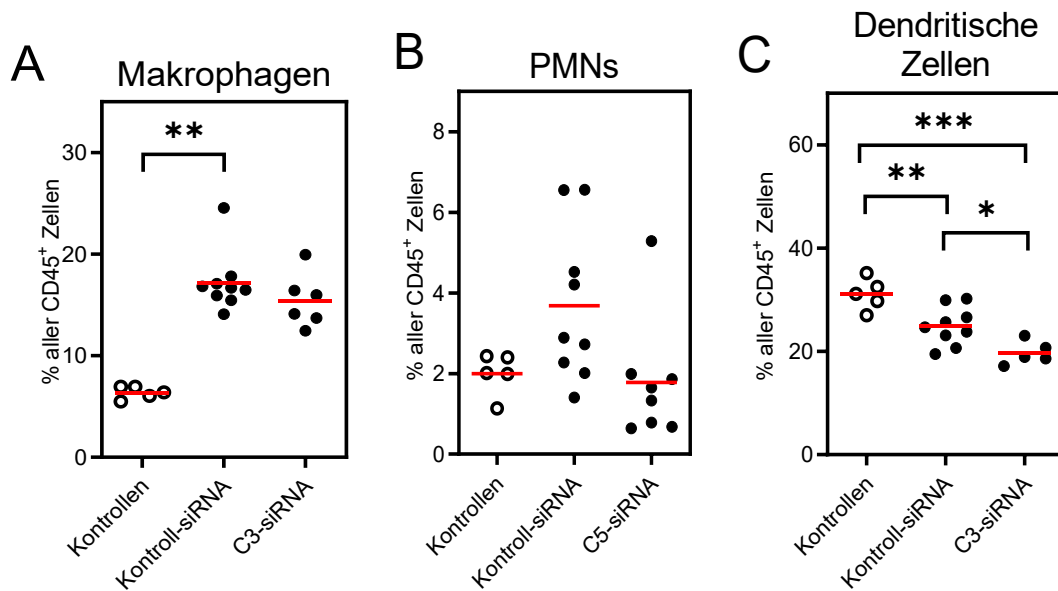
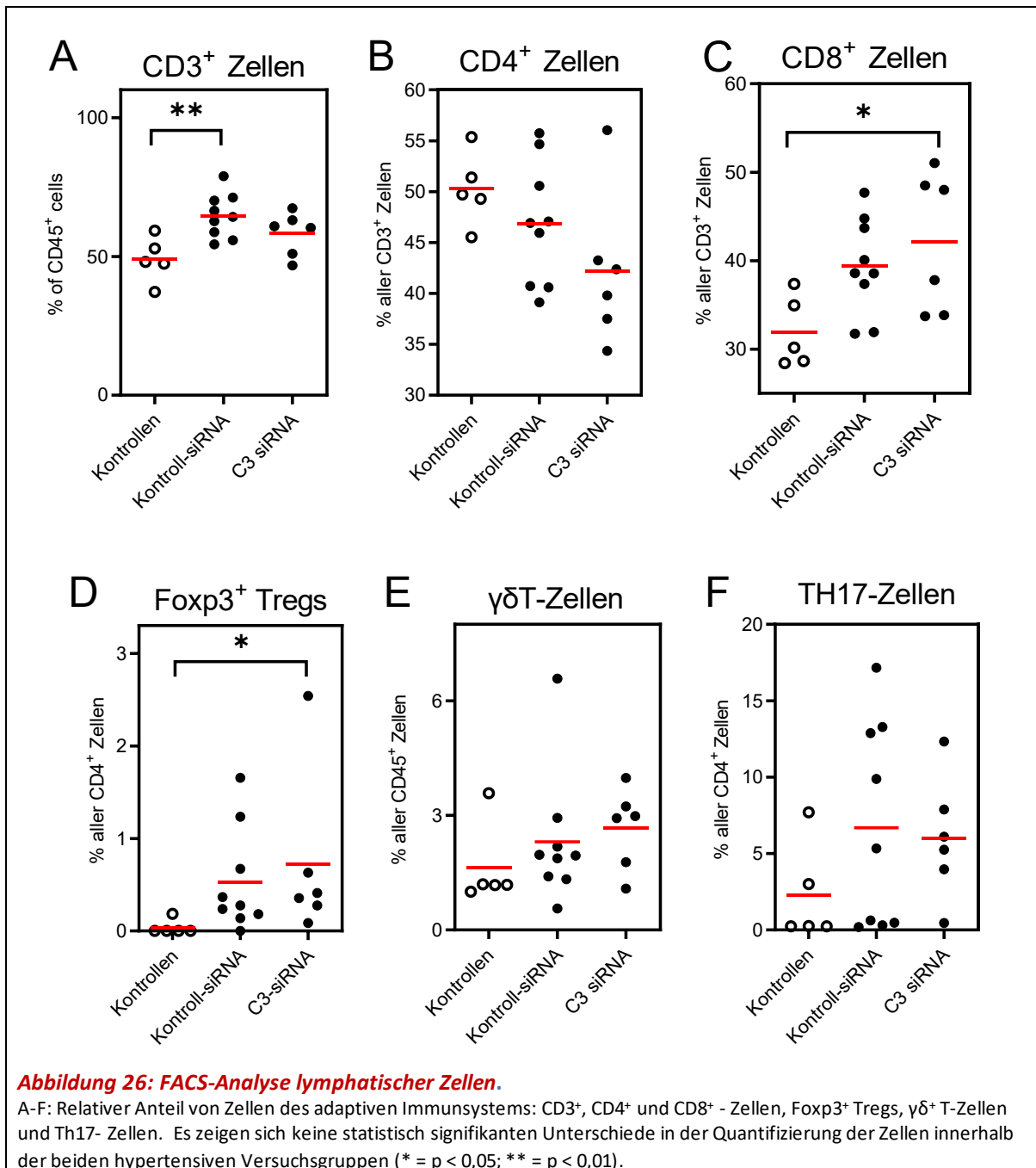


Abbildung 25: FACS-Analyse myeloider Zellen.

A-B: Der relative Anteil von myeloiden Zellen (Makrophagen, PMN, DC) wurden mittels FACS-Analyse bestimmt und quantifiziert. Es zeigte sich außer einer Erhöhung kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen hypertensiven Gruppen für Makrophagen und polymorphkernige Neutrophile (** = $p < 0,01$).

C: Der relative Anteil dendritischer Zellen zeigte sich in der C3-siRNA Gruppe gegenüber der Kontroll-siRNA Gruppe signifikant erniedrigt (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Weiterhin wurden lymphatische Zellen (CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, Foxp3⁺ Tregs, $\gamma\delta$ T-Zellen, und Th17-Zellen) quantifiziert (Abb. 26A-C). Hier zeigten die hypertensiven Versuchsgruppen bezüglich Makrophagen und polymorphkernige Neutrophile ebenfalls ähnliche Tendenzen bezüglich einer Erhöhung, jedoch keinen deutlichen Unterschied in der Ausprägung.

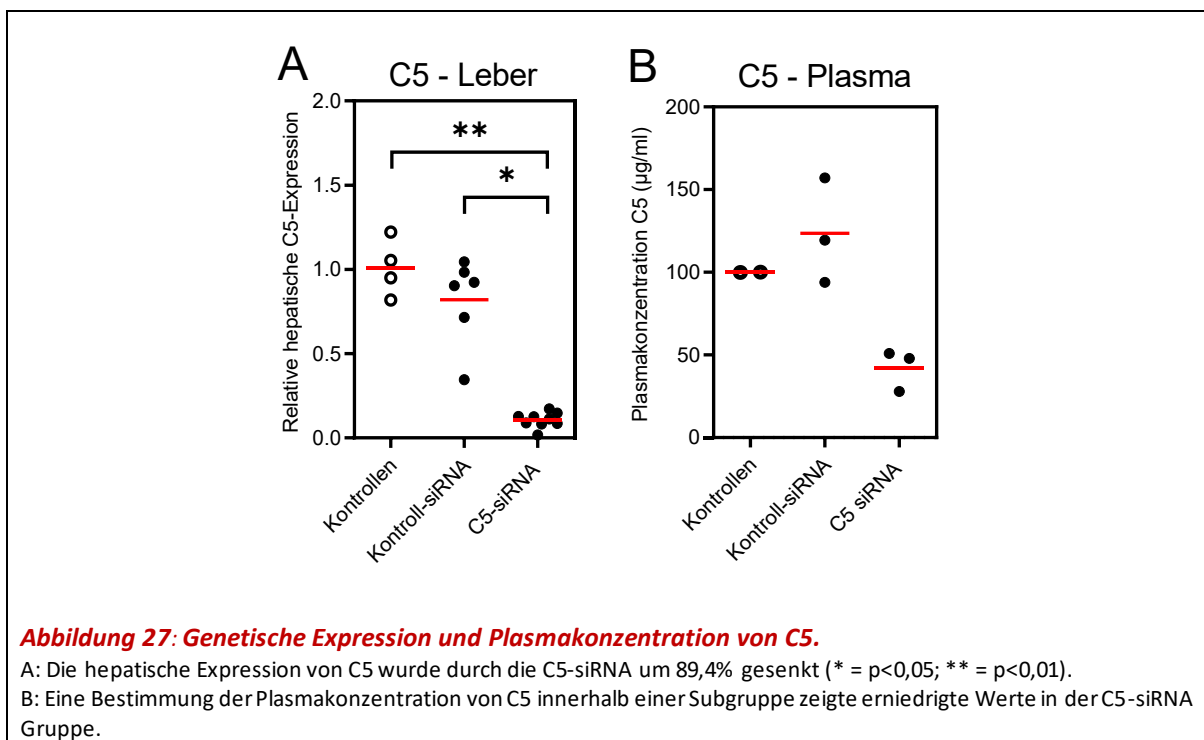


Zusammenfassend konnte ähnlich zu dem analogen C3-siRNA in Ang II Versuch (4.1) keine direkte Implikation der Komplementhemmung auf die Inflammation beobachtet werden, da sowohl myeloide als auch lymphatische Zellzählungen unbeeinflusst sind.

4.3 C5-siRNA Inhibition im Ang II-Modell

4.3.1 Inhibition

Parallel zu den bereits präsentierten C3-siRNA in Ang II-Versuchen erfolgte mit einer weiteren Versuchsgruppe die Behandlung mit einer GalNAc-konjugierter C5-siRNA, um eine Komplementinhibition im umfangreicheren Maße zu evaluieren. Die Anwendung der C5-siRNA zeigte eine durchschnittliche Reduktion der hepatischen C5-Expression von 89% (Abb. 27A). Weiterhin wurde in einer Subgruppe die Plasmakonzentration von C5 bestimmt. Hier zeigte sich in der C5-siRNA Gruppe eine Konzentration von $42,28 \mu\text{g/ml} \pm 7,20$, während die Kontroll-siRNA Gruppe eine Konzentration von $123,50 \mu\text{g/ml} \pm 18,35$ aufzeigte.



4.3.2 Auswirkungen der Ang II Infusion

Der systolische Blutdruck wurde in diesem Versuch an drei Zeitpunkten gemessen: Tag 0 (Basalblutdruck), Tag 6 und Tag 12. Zudem erfolgte kongruent zu den C3-siRNA Versuchen die Bestimmung von Renin, um das indirekte Ausmaß des Angiotensin II-induzierten Hypertonus zu messen.

Zwar zeigte die C5-siRNA Gruppe am Tag 6 einen niedrigeren systolischen Blutdruck, jedoch lässt diese Beobachtung sich statistisch nicht bestätigen (Abb. 28A). Ein Unterschied in den systolischen Blutdrücken am Tag 12 wurde nicht beobachtet. Die Bestimmung der renalen Renin-Expression zeigte, wie zu erwarten ähnlich erniedrigte Werte in beiden hypertensiven Gruppen.

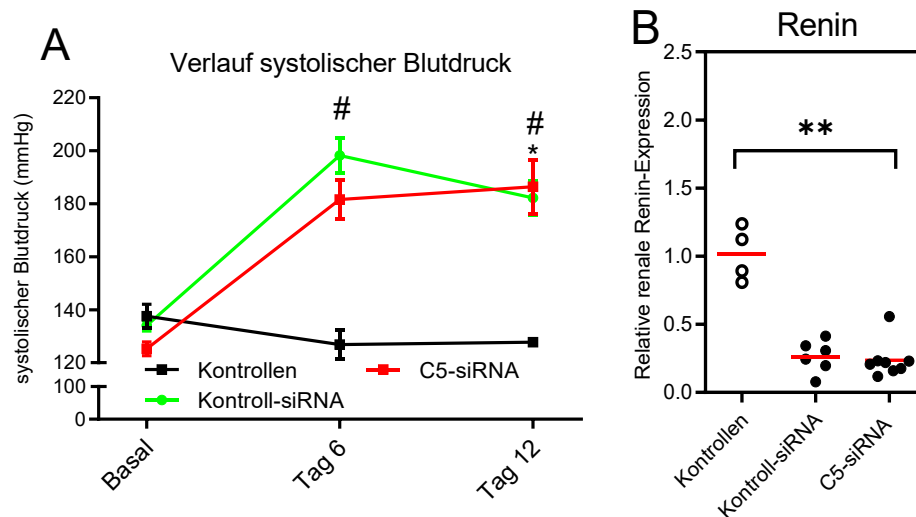


Abbildung 28: Progression des Blutdrucks.

A: Initial ist ein etwas niedriger systolischer Blutdruck in der C5-siRNA Gruppe zu deuten, welcher sich statistisch jedoch nicht als signifikant ergibt. Es ist insgesamt kein signifikanter Unterschied unter den hypertensiven Versuchsgruppen im zeitlichen Verlauf zu sehen. Zu beachten ist, dass die Y-Achse zur Übersicht zwischen 100 und 120 gekürzt ist (# = $p < 0,05$ zwischen Kontrollen und Kontroll-siRNA; * = $p < 0,05$).

B: Relative Renin-Expressionen zeigen ähnlich erniedrigte Werte in beiden hypertensiven Versuchsgruppen (** = $p < 0,01$).

Im Laufe des Versuches, welcher über 14 Tage verlief, wurde die Mortalitätsrate notiert und schließlich in Abb. 29 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass im Durchschnitt eine Mortalitätsrate von 25,0 % in der C5-siRNA beobachtet wurde, während die Kontroll-siRNA Gruppe eine Mortalitätsrate von 45,5 % zeigte. Dieser Unterschied zeigte sich statistisch nicht signifikant.

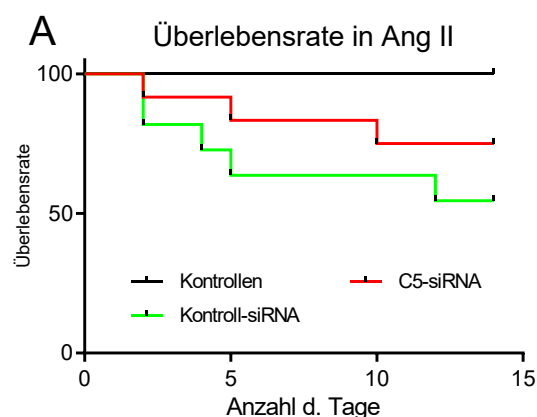


Abbildung 29: 14-tägige Überlebensrate im Ang II-Versuch.

A: Mortalitätsraten zeigten eine stärkere Ausprägung in der Kontroll-siRNA Gruppe, während die C5-siRNA Gruppe mit einer Mortalität von 25,00 % einen statistisch nicht signifikanten milderen Verlauf zeigte.

4.3.3 Renaler Schaden

Der renale Schaden wurde ähnlich den vorherigen Versuchen mit Erfassung der Nierengewichte, der Histologie, der Albuminurie, der GFR und der Serumkonzentration von Harnstoff-N und Cholesterin und der genetischen Expression renaler Marker beurteilt.

Nierengewichte wurden mithilfe des Körpergewichts und jeweils der Tibiallänge relativiert (Abb. 30). Es zeigten sich bei genereller Zunahme des relativierten Nierengewichts keine Zeichen für Unterschiede einer ausgeprägtere Nierenhypertrophie zwischen der C5-siRNA und der Kontroll-siRNA Gruppe.

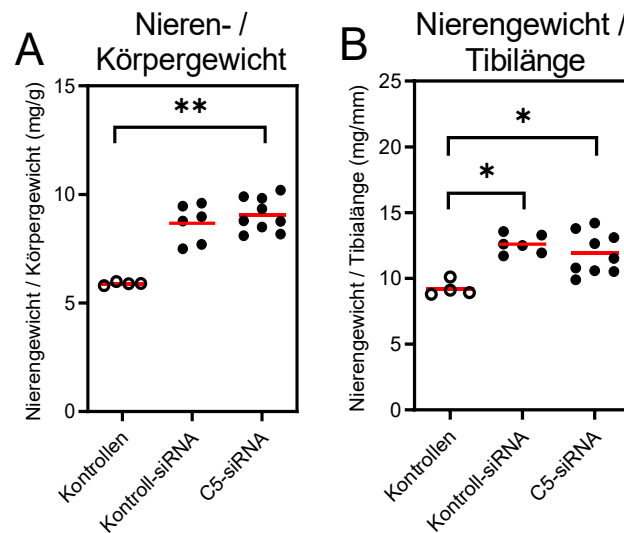


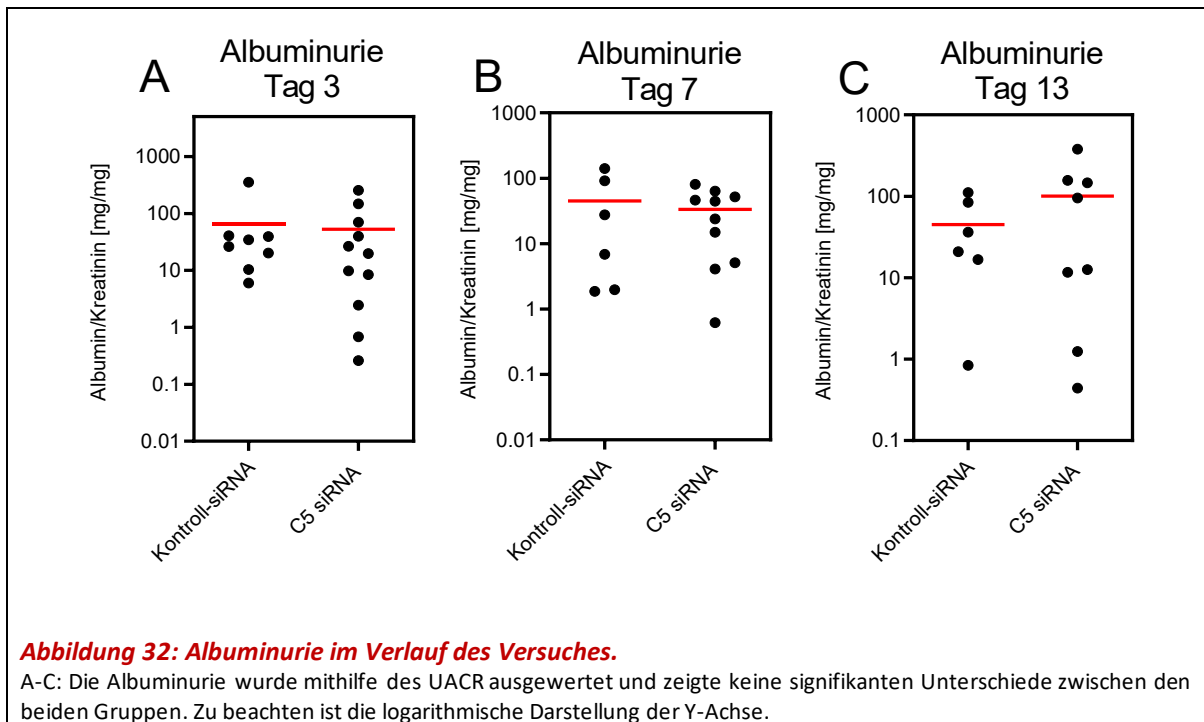
Abbildung 30: Relativiertes Nierengewicht.

A-B: Körpergewicht und Tibialänge wurden am letzten Tag des Versuches bei der Organentnahme quantifiziert und relativieren somit das jeweilige Nierengewicht. Es zeigten sich ähnliche Ausprägungen der Nierenhypertrophie zwischen den beiden hypertensiven Versuchsgruppen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Es erfolgte darüber hinaus eine histologische Analyse, nachdem renale Proben mit PAS gefärbt wurden. Diese zeigte ähnliche mikrostrukturelle Ausmaße der hypertensiven Schäden mit wenig konkreten Unterschieden zwischen den beiden hypertensiven Versuchsgruppen untereinander für glomerulären Schäden, glomerulärer Größe und tubulointerstitiellen Schäden.

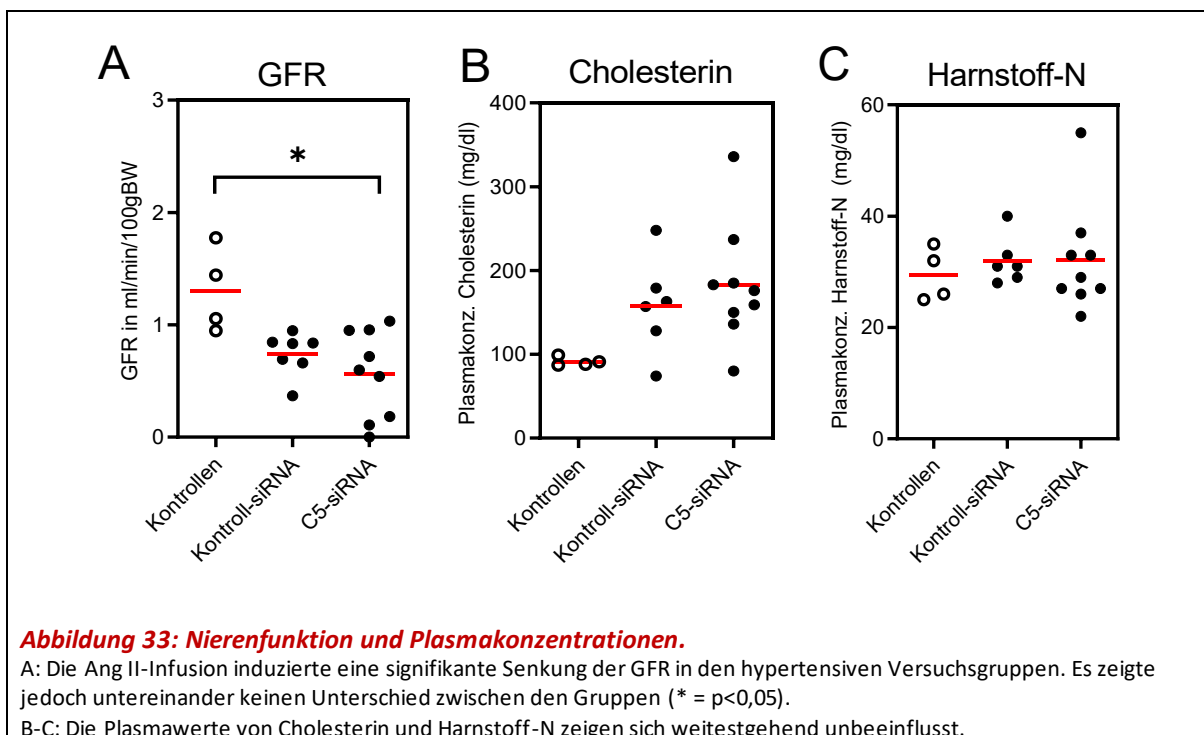
Auf mikrostruktureller Ebene war keine Wirkung der Komplementinhibition von C5 im Ang II-Modell nachzuweisen.

Eine hepatische C5-siRNA Inhibition im Ang II-Modell zeigte im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den C3-siRNA Versuchen keine relevante Auswirkung auf die Albuminurie.



Die GFR wurde am 11. Tag des Versuches gemessen und ausgewertet. Zwar zeigte sich eine Erniedrigung der GFR im Vergleich zur normotensiven Vergleichsgruppe, jedoch zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden hypertensiven Versuchsgruppen (Abb. 33A)

Ähnlicherweise zeigten sich Plasmakonzentration von Cholesterin und Harnstoff-N von einer hepatischen C5-siRNA Injektion weitestgehend unbeeinflusst (Abb. 33B-C).



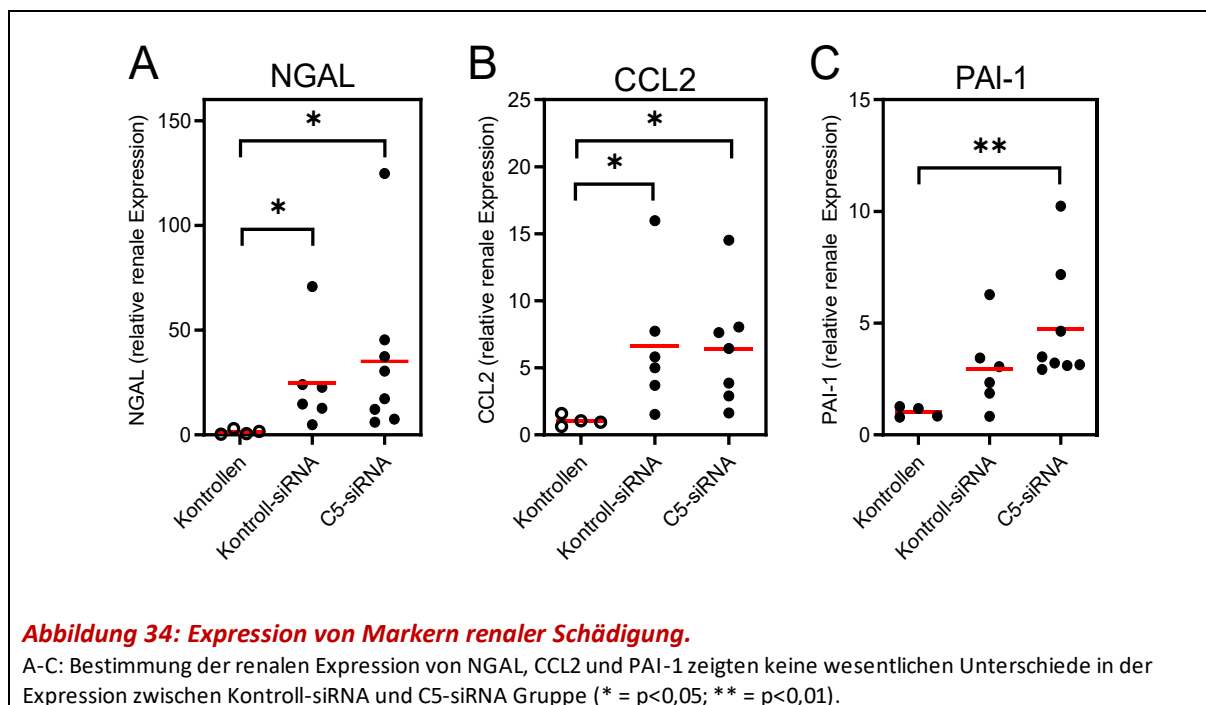
Zur Erfassung der renalen Schäden auf genetischer Ebene erfolgte analog zu den vorherigen Versuchen die Bestimmung der mRNA-Expression von NGAL, CCL2 und PAI-1 mithilfe einer rtPCR (Abb. 33-A-C).

Die renale Expression von NGAL zeigte zwar eine generelle Erhöhung der Expression durch das bedingte Hypertonusmodell, jedoch keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Kontroll-siRNA und C5-siRNA Gruppe.

Ebenfalls zeigten sich ähnlich erhöhte Werte für die Expression von CCL2 bei wenigen Unterschieden zwischen den beiden hypertensiven Gruppen.

Die PAI-1 Expression in der C5-siRNA war zwar deutlich erhöht, zeigte sich im Vergleich zur Kontroll-siRNA Gruppe jedoch nicht statistisch signifikant.

Zusammenfassend wurde kein Unterschied in der Expression der Nierenmarker zwischen Kontroll-siRNA und C5-siRNA Gabe erfasst.



Zusammenfassend zeigte die Gabe von C5-siRNA zur Inhibition der hepatischen C5-Produktion keine wesentlichen Einflüsse auf renale Endorganschäden im Ang II induzierten Hypertonusmodell in Nierengewicht, Histologie, Albuminurie, GFR, Harnstoff-N- und Cholesterinserumkonzentration und genetischer Expression.

4.3.4 Kardialer Schaden

Zur Erfassung der kardialen Endorganschäden wurde das Herzgewicht gewogen und zum Körpergewicht und der Tibiallänge relativiert (Abb. 35). Zudem erfolgte die Bestimmung der kardialen Expression von ANP und BNP (Abb. 36).

Es zeigte sich in beiden hypertensiven Vergleichsgruppen bei signifikanter Erhöhung des mit der Körpergröße relativierten Herzgewichts gegenüber den Kontrollen keine relevanten Unterschiede der Herzhypertrophie zwischen den beiden hypertensiven Gruppen.

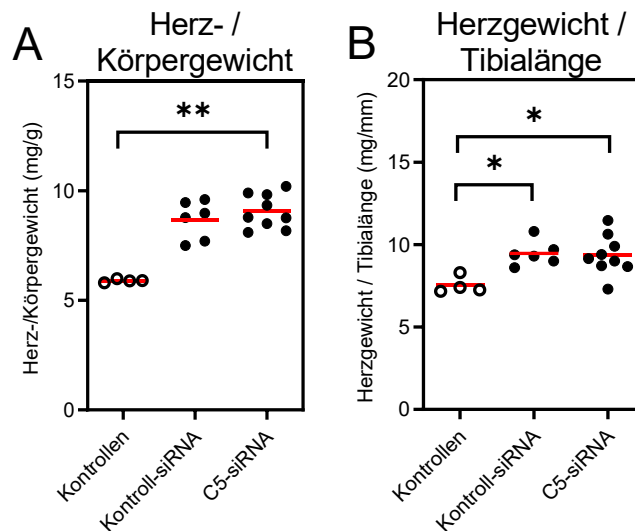


Abbildung 35: Relativiertes Herzgewicht.

A-B: Das Herzgewicht wurde nach der Organentnahme erfasst und es wurde mithilfe des Körpergewichts und in einer weiteren Grafik mit der Tibiallänge relativiert. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den hypertensiven Gruppen.

Die Abbildung 36 zeigt die genetische Expression von ANP und BNP. Hier zeigten sich ähnlich zu den Versuchsreihen mit der C3-siRNA eine Erhöhung der Expression in den hypertensiven Gruppen ohne statistische signifikante Unterschiede zueinander (Abb. 36).

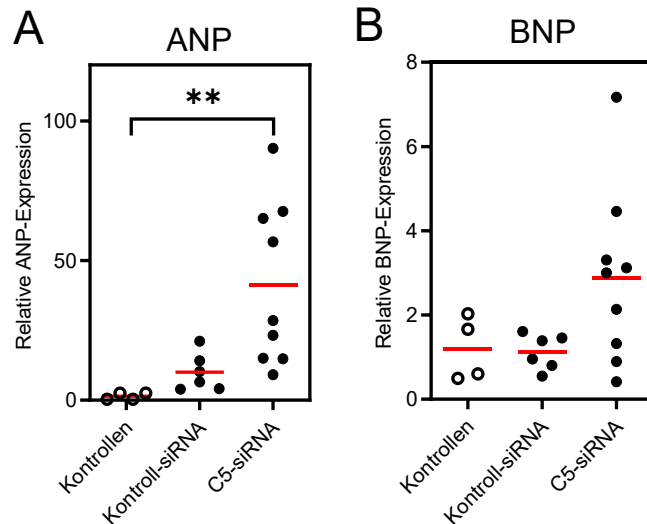


Abbildung 36: Kardialer Schaden anhand Expression von ANP und BNP.

A-B: Kein statistisch signifikanter Unterschied konnte zwischen den beiden Gruppen für die ANP und BNP-Expression beschrieben werden (* = $p < 0,05$).

In Zusammenfassung lässt sich feststellen, dass bei den hypertensiven Gruppen eine vergleichbare Zunahme der Herzgewichte und eine vergleichbare gesteigerten Expression von ANP und BNP durch das Versuchsmodell induziert wurde.

4.3.5 Ausmaß der Inflammation

Analog zu den vorherigen Versuchen wurden renale myeloide und lymphatische Zellen per FACS-Analyse quantifiziert. Unter den myeloiden Zellen zeigte sich kein genereller Unterschied zwischen Kontrollen und hypertensiven Gruppen (Abb. 37).

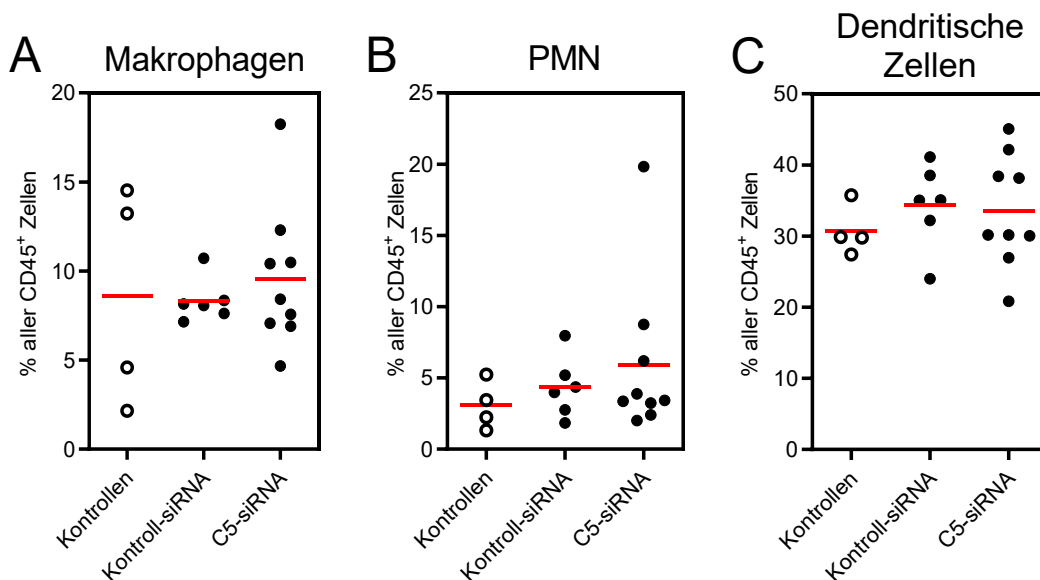
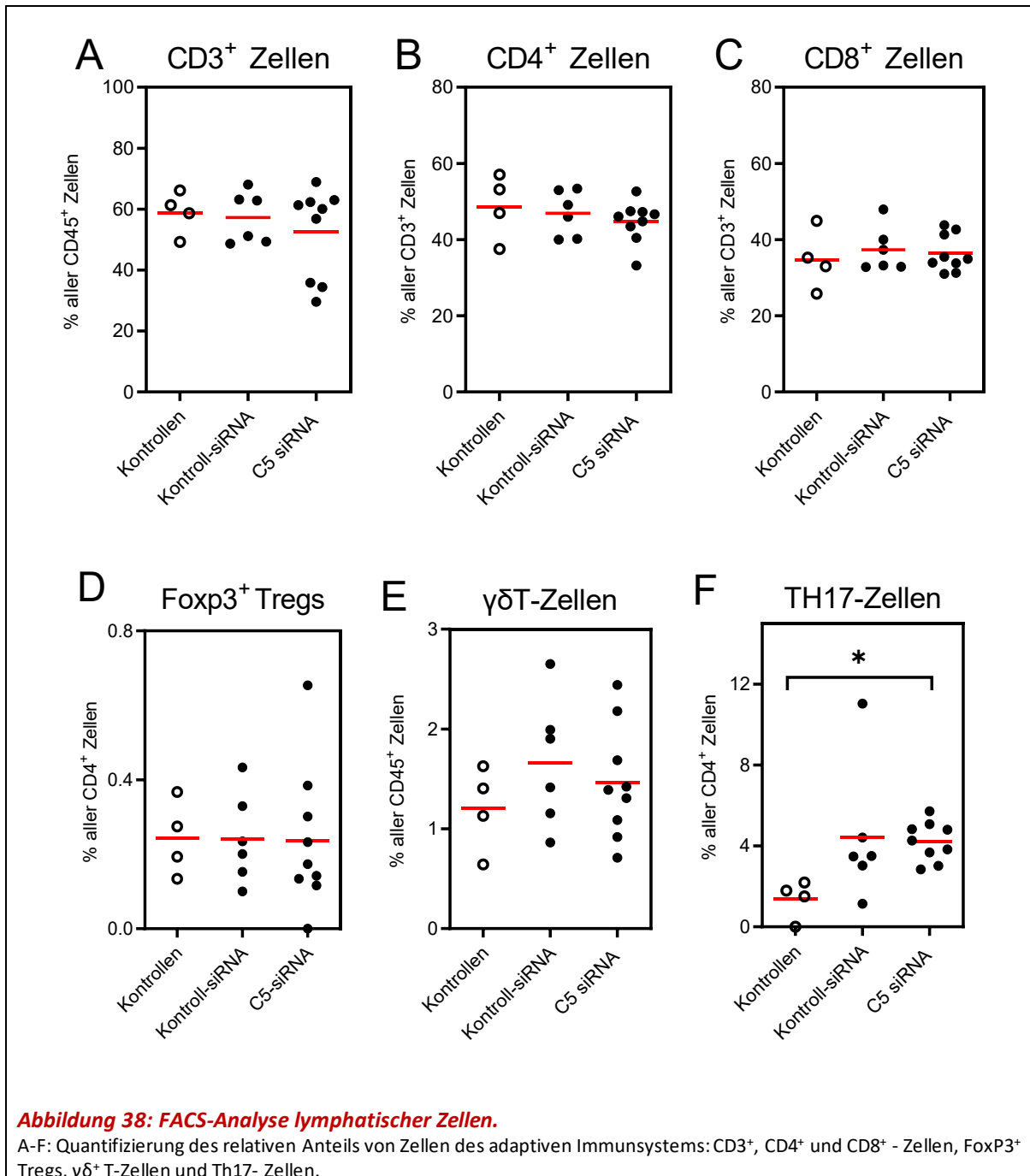


Abbildung 37: FACS-Analyse myeloider Zellen.

A-C: Polymorphkernige Neutrophile, dendritische Zellen und Makrophagen wurden mittels FACS-Analyse quantifiziert. Es stellte sich kein Unterschied bezüglich der Zellzahl der jeweiligen Populationen zwischen den hypertensiven Versuchsgruppen dar.

Die statistische Auswertung der analysierten Lymphozyten zeigte ebenfalls unter den hypertensiven Versuchsgruppen ähnliche Zellzählungen in den beiden hypertensiven Gruppen mit wenig Unterschieden zur generellen Kontrollgruppe (Abb. 38A).



Insgesamt zeigte die Gabe von C5-siRNA im Ang II-Modell keine maßgeblichen Veränderungen in der Zellzählung myeloider und lymphatischer Zellen im Vergleich zur Kontroll-siRNA Gruppe, sodass

sich am ehesten herleiten lässt, dass eine hepatische Komplementinhibition über C5 im Ang II-Modell am ehesten wenig Auswirkung auf renale Inflammation hat.

4.4 C5-siRNA Inhibition im DOCA-Salz Modell

4.4.1 Inhibition

Im folgenden Versuch wurde analog zu den vorherigen Experimenten die Injektion von C5-siRNA im DOCA-Salz Versuch durchgeführt. Diese zeigte eine Reduktion der hepatischen C5 Expression um 78% (Abb. 39A). Eine Bestimmung der C5-Plasmakonzentration innerhalb einer Subgruppe zeigte eine Reduktion auf $1,48 \mu\text{g/ml} \pm 0,59$, während die C5-Plasmakonzentration in der Kontroll-siRNA Gruppe $18,43 \mu\text{g/ml} \pm 9,19$ betrug (Abb. 39B). Somit zeigte sich ein möglicher Einfluss der hepatischen C5-siRNA auf die Plasmakonzentration von C5.

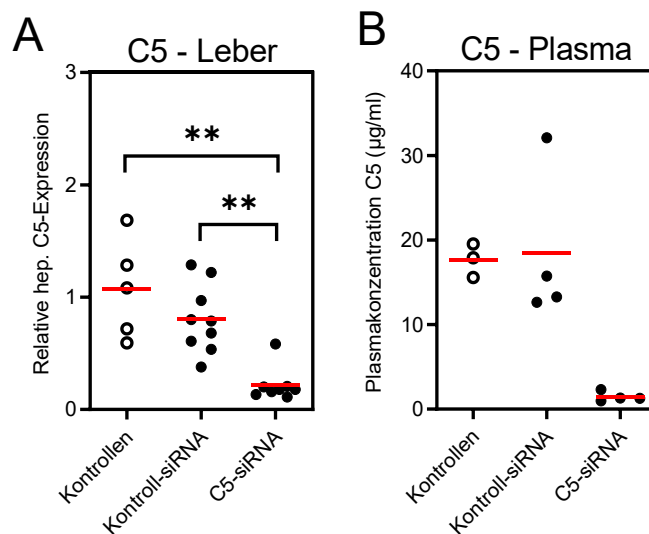


Abbildung 39: Genetische Expression und Plasmakonzentration von C5.

A: Die hepatische C5-Expression wurde durch C5-siRNA Gabe signifikant um 78,2 % gesenkt (** = $p < 0,01$).

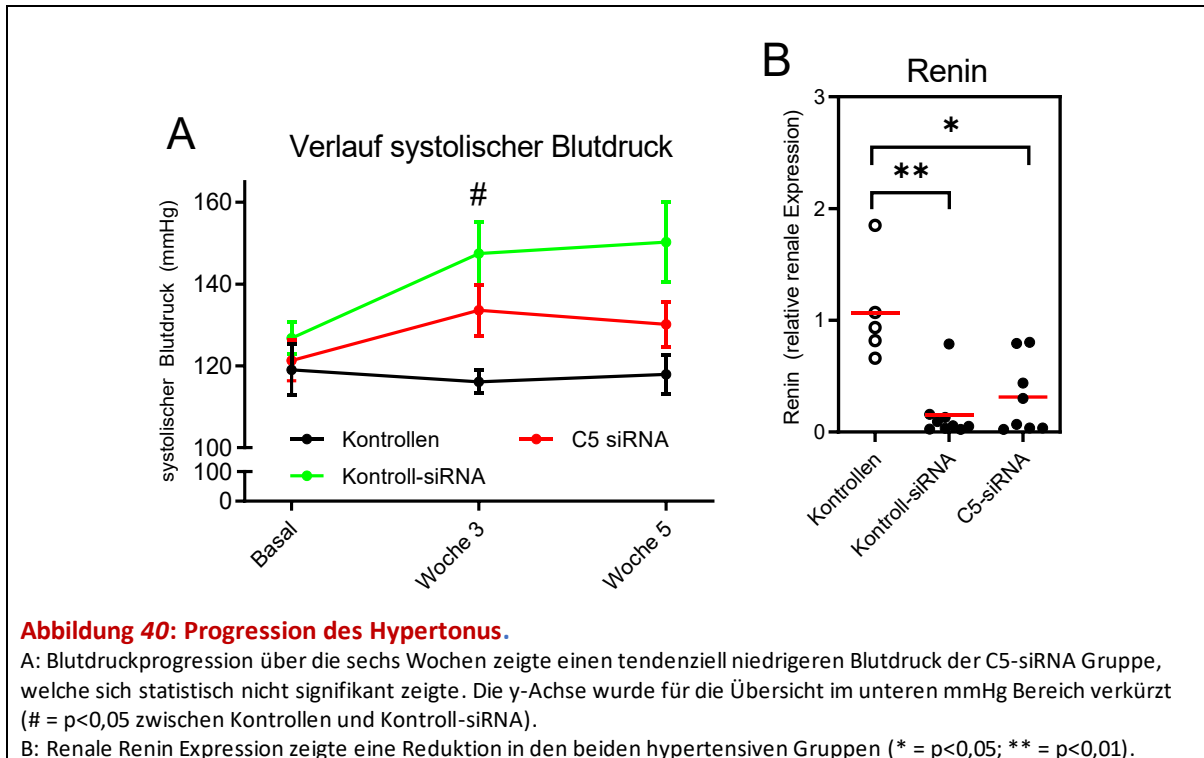
B: Die Plasmakonzentrationen von C5 wurde in einer Subgruppe durchgeführt und zeigte eine Reduktion der Plasmakonzentration von C5 auf $1,48 \pm 0,59 \mu\text{g/ml}$ in der C5-siRNA Gruppe.

4.4.2 Auswirkungen des DOCA-Pellets

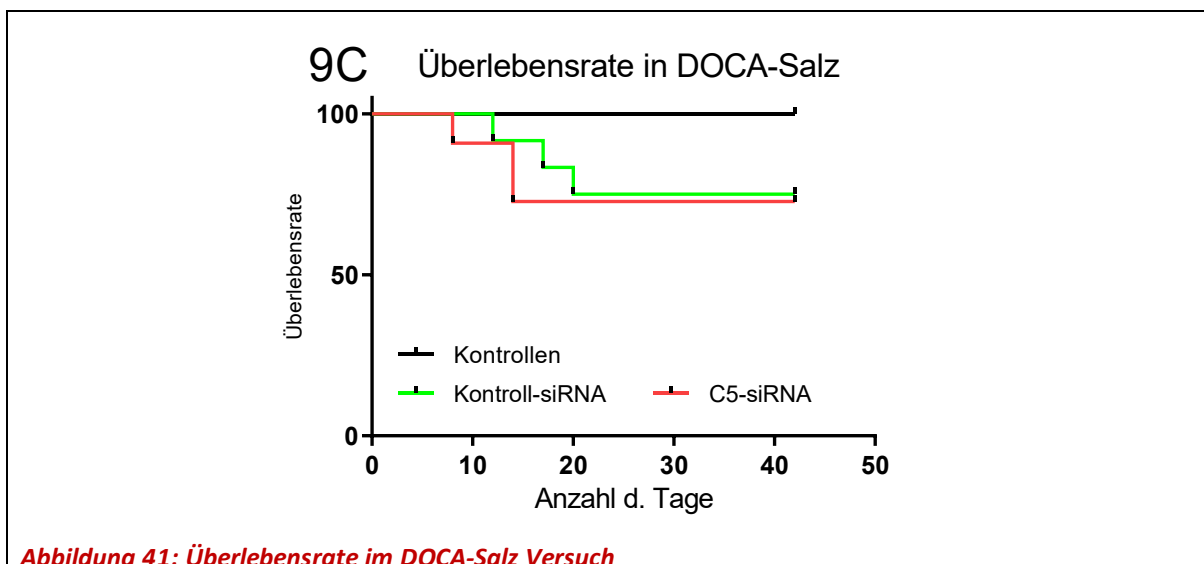
Der systolische Blutdruck wurde an drei verschiedenen Zeitpunkten gemessen: Basal (Woche 0), Woche 3 und Woche 5. Beide hypertensiven Gruppen zeigten über die Versuchsdauer einen gleichmäßigen Anstieg des systolischen Blutdrucks (Abb. 40A). Auffällig war, dass in der C5-siRNA Gruppe zwischen der dritten und sechsten Woche der systolische Blutdruck nicht mehr ansteigt und eine leichte Reduktion zu beobachten ist. Dadurch scheint insgesamt ein etwas milderer Anstieg des systolischen Blutdrucks über die 6 Wochen in der C5-siRNA Gruppe vorhanden zu sein,

welcher statistisch jedoch nicht nachweisbar war, weshalb die Aussagekraft nur bedingt zu interpretieren ist.

Die Bestimmung der renalen Renin-Expression verifiziert eine erfolgreiche Anwendung des DOCA-Salz Modells, da Aldosteron zu einer Reduktion der Reninexpression führte (Abb. 40B).



Die Überlebensrate ist in der Abbildung 41A als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Die Mortalität innerhalb der C5-siRNA Gruppe zeigte initial eine erhöhte Mortalität im Vergleich zur Kontroll-siRNA Gruppe. Diese Beobachtung zeigte sich im weiteren Verlauf jedoch regredient, da sich die beiden Mortalitätsraten ab dem 20. Tag mit 27,27 % in der C5-siRNA Gruppe und 25,00% in der Kontroll-siRNA bis zum Ende des Versuches angeglichen hatten.



A: Überlebensrate über 6 Wochen in einer Kaplan-Meier Kurve dargestellt. Es zeigte sich zum Ende des Versuches ähnliche Mortalitätsraten zwischen den beiden hypertensiven Gruppen.

4.4.3 Renale Schäden

Analog zu vorherigen Versuchen wurde der renale Schaden anhand relativierten Gewichts, Ausmaß mikrostruktureller Schäden in der Histologie, Albuminurie, GFR, Serumkonzentration von Harnstoff-N und Cholesterin und Expression von renalen Markern erfasst.

Das relative Nierengewicht zeigte in beiden Relationen (Körpergewicht und Tibialänge) eine deutliche Hypertrophie im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch keinen deutlichen Unterschied zwischen den beiden hypertensiven Vergleichsgruppen (Abbildung 42A-B).

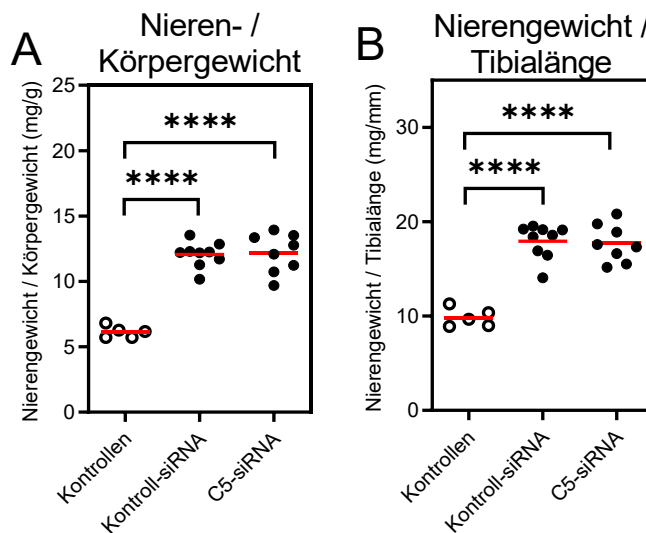


Abbildung 42: Relativiertes Nierengewicht.

A-B: Nierengewicht wurde mit Körpergewicht und Tibialänge relativiert. Bei deutlich erhöhtem relativiertem Nierengewicht in beiden hypertensiven Gruppen zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen der Kontroll-siRNA und der C5-siRNA Gruppe (**** = $p < 0,0001$).

Zur Erfassung der mikrostrukturellen Schäden erfolgte die Anfertigungen von Histologien in PAS-Färbung. Die Auswertung konzentrierte sich auch hier auf den glomerulären Schäden, der glomerulären Größe und des tubuloinsteritiellen Schadens. In allen drei Parametern wiesen die hypertensiven Gruppen im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte Werte auf. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der mit Kontroll-siRNA und der mit C5-siRNA behandelten Gruppe konnte jedoch nicht festgestellt werden.

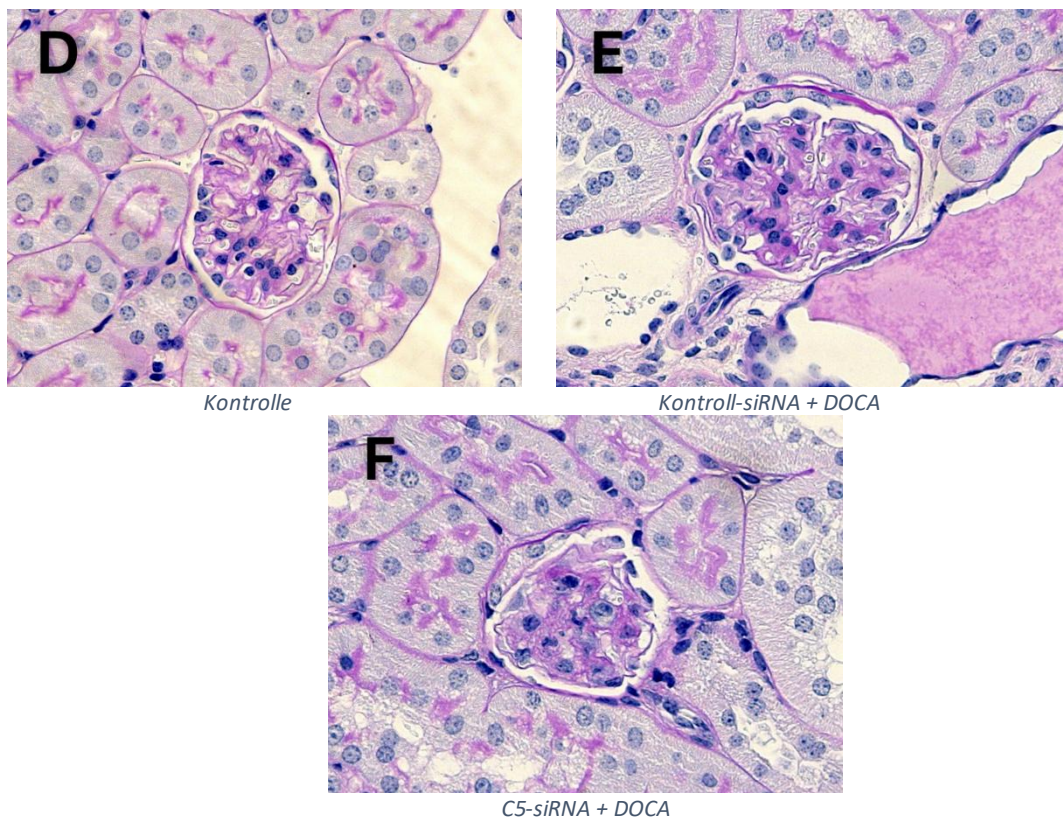
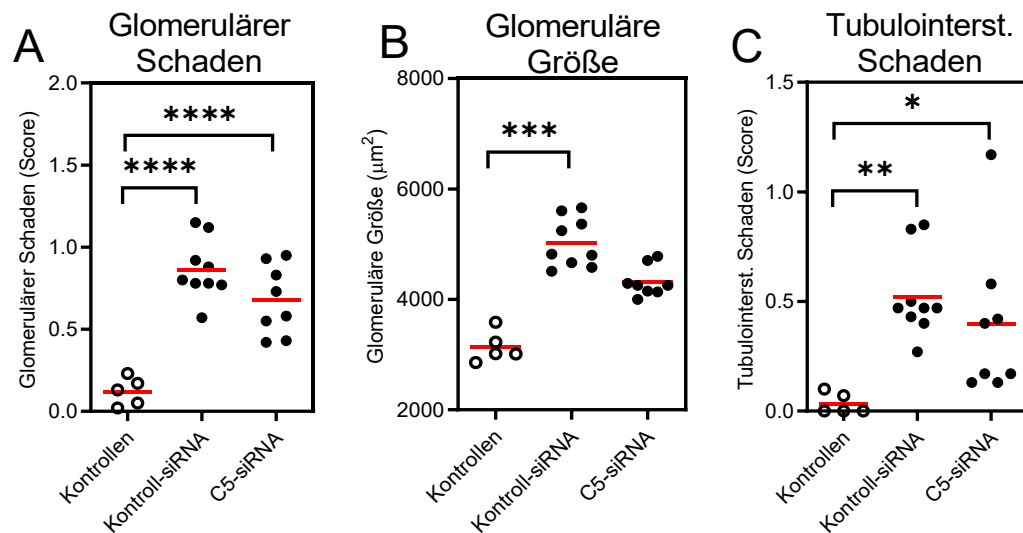


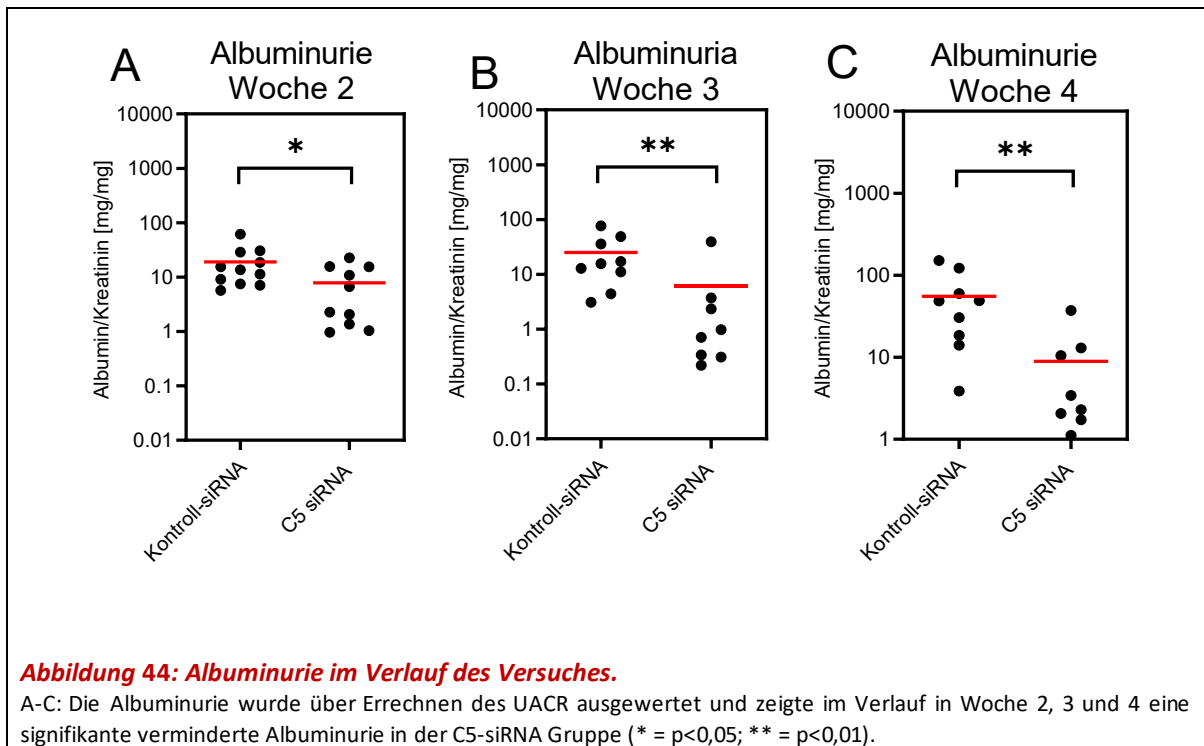
Abbildung 43: Histologische Auswertung.

A-C: Die histologische Auswertung der glomerulären Schäden, Größen und des tubulointerstitiellen Schaden zeigte bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen ähnliche hypertensive Veränderungen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

D-E: PAS-Färbung der Nieren eine tendenziell erhöhte Größe der Glomeruli in der Kontroll-siRNA Gruppe.

Die Progression der Albuminurie zeigt bei Beginn des Versuches eine zu erwartende starke Steigerung der Albuminurie in beiden Gruppen. Ab der zweiten Woche zeigte sich der Verlauf in der C5-siRNA Gruppe im Vergleich zur Kontroll-siRNA Gruppe jedoch milder, da zwischen Woche 2 und Woche 4 eine statistisch signifikant erniedrigte Albuminurie nachzuweisen war ($p < 0,01$). Dieser

Effekt der initialen niedrigeren Albuminurie in der C5-siRNA Gruppe lässt sich in der 5. und 6. Woche zwar noch beobachten, konnte jedoch statistisch nicht mehr nachgewiesen werden.



Im Verlauf des Versuches wurden weiterhin in der dritten und in der sechsten Woche die GFR gemessen. Ähnlich zu dem C3-siRNA Versuch im DOCA-Salz Modell, ist zu sehen, dass in der dritten Woche die GFR in beiden hypertensiven Gruppen deutlich erniedrigt ist, während sich diese bis zur sechsten Woche bei weiterhin erniedrigten Werten etwas verbessert. Einen relevanten Unterschied zwischen beiden hypertensiven Versuchsgruppen konnte nicht festgestellt werden (Abb. 45 A-B). Ebenso zeigte sich kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen in der Plasmakonzentration von Harnstoff-N und Cholesterin (Abb. 45C-D).

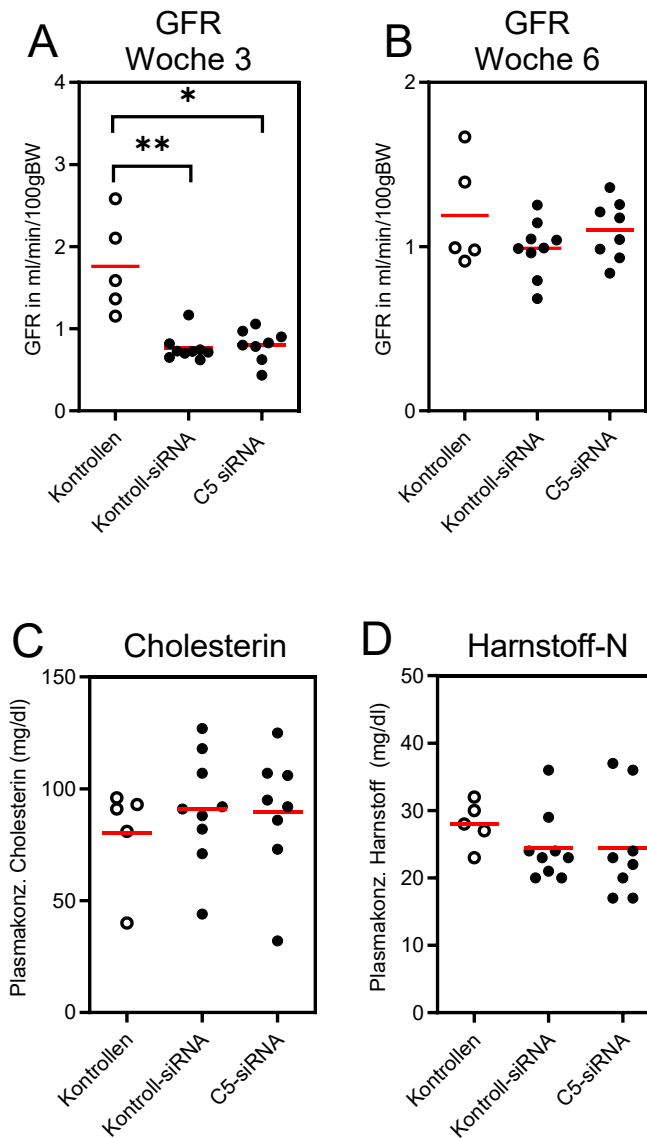
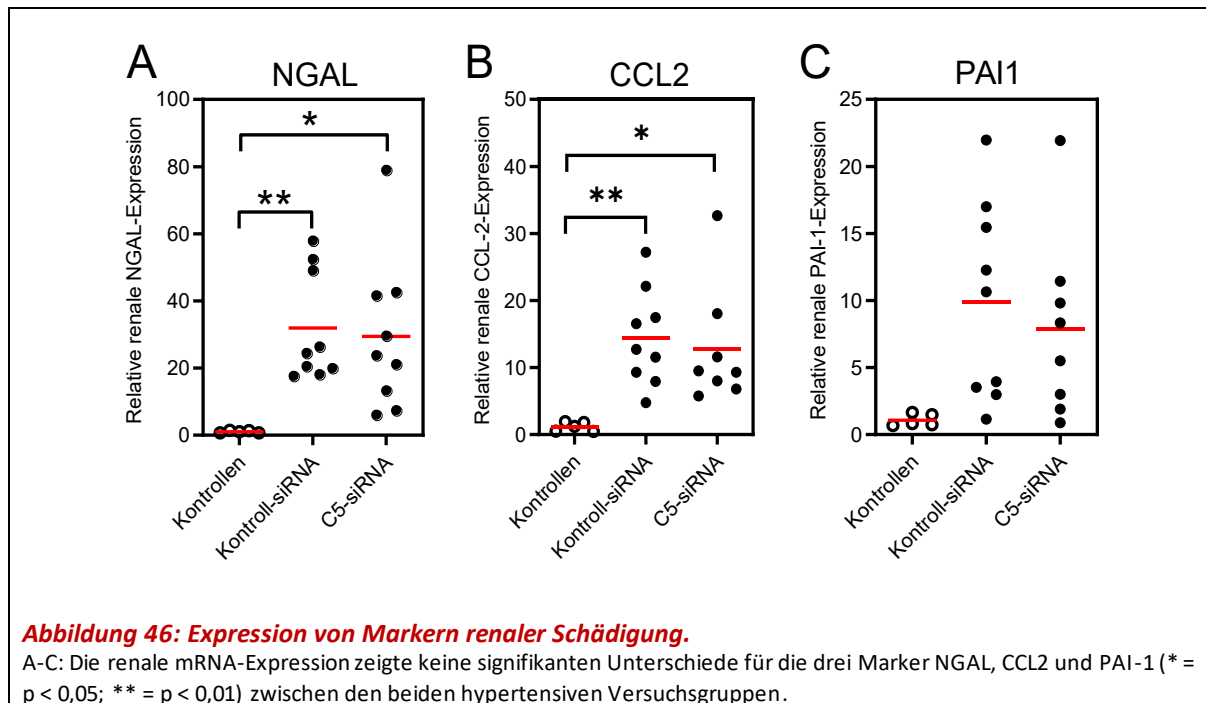


Abbildung 45: Verlauf der Nierenfunktion und Plasmakonzentrationen.

A-B: Die GFR zeigte sich in der 3. Woche in beiden hypertensiven Versuchsgruppen im Vergleich zu normotensiven Kontrollen erniedrigt. In der 6. Woche zeigte sie sich bei leichter Besserung weiterhin erniedrigt (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

B-C: Die Plasmawerte von Cholesterin und Harnstoff-N zeigen sich in beiden hypertensiven Gruppen unbeeinflusst.

Letztlich wurde auch in diesem Versuch mittels rtPCR die Expression von den renalen Markern NGAL, CCL2 und PAI-1 untersucht (Abb. 46A-C). Hier zeigte sich bei generell erhöhten Werten für die Expression kein deutlicher Unterschied zwischen Kontroll-siRNA und C5-siRNA Gruppe in allen drei Parametern.



Insgesamt zeigte sich im DOCA-Salz Versuch unter C5-siRNA Gabe eine mildere Ausprägung der glomerulären Größe und eine initial mildere Ausprägung der Albuminurie. Diese Ergebnisse ähneln somit zwar nicht dem analogen Ang II-Versuch, jedoch den Beobachtungen aus dem C3-siRNA bei Ang II-Versuch.

4.4.4 Kardiale Schäden

Die kardialen Schäden wurden über die Ermittlung des relativierten Herzgewichts und der kardialen Expression von ANP und BNP erfasst. Bei den Herzgewichten ist zu beobachten, dass die C5-siRNA Gruppe tendenziell in beiden Relationen eine erhöhte Neigung zu höherem Herzgewicht hat (Abb. 47A-B). Diese Beobachtung ist aufgrund der Stichprobengröße nicht als statistisch signifikant zu bewerten, weshalb kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellbar ist.

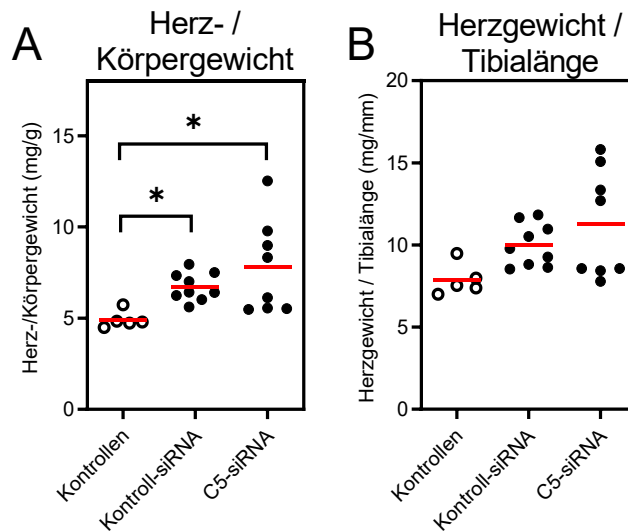


Abbildung 47: Relativierte Herzgewichte.

A-B: Das Herzgewicht wurde nach der Organentnahme erfasst und es wurde ein Quotient mit dem Körpergewicht oder der Tibiallänge zum Relativieren gebildet. Es zeigte sich bei erhöhter Tendenz in der C5-siRNA Gruppe kein Unterschied zwischen den hypertensiven Gruppen (* = $p < 0,05$).

In ähnlicher Weise zeigte die Bestimmung der kardialen ANP- und BNP-Expression bei leicht hochregulierter Expression in den hypertensiven Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede untereinander (Abb. 48A-B).

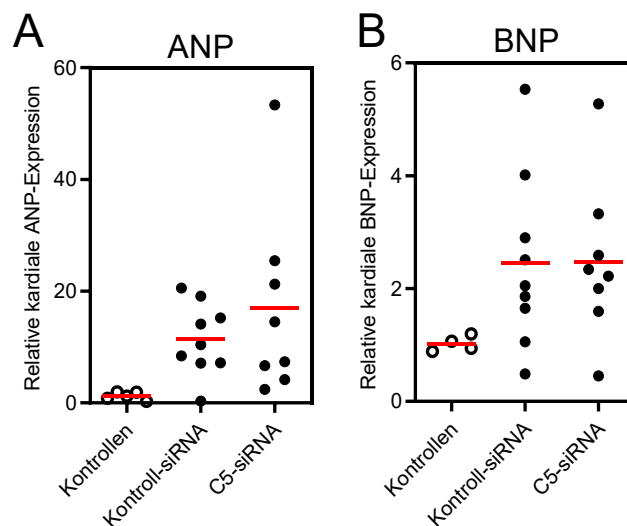


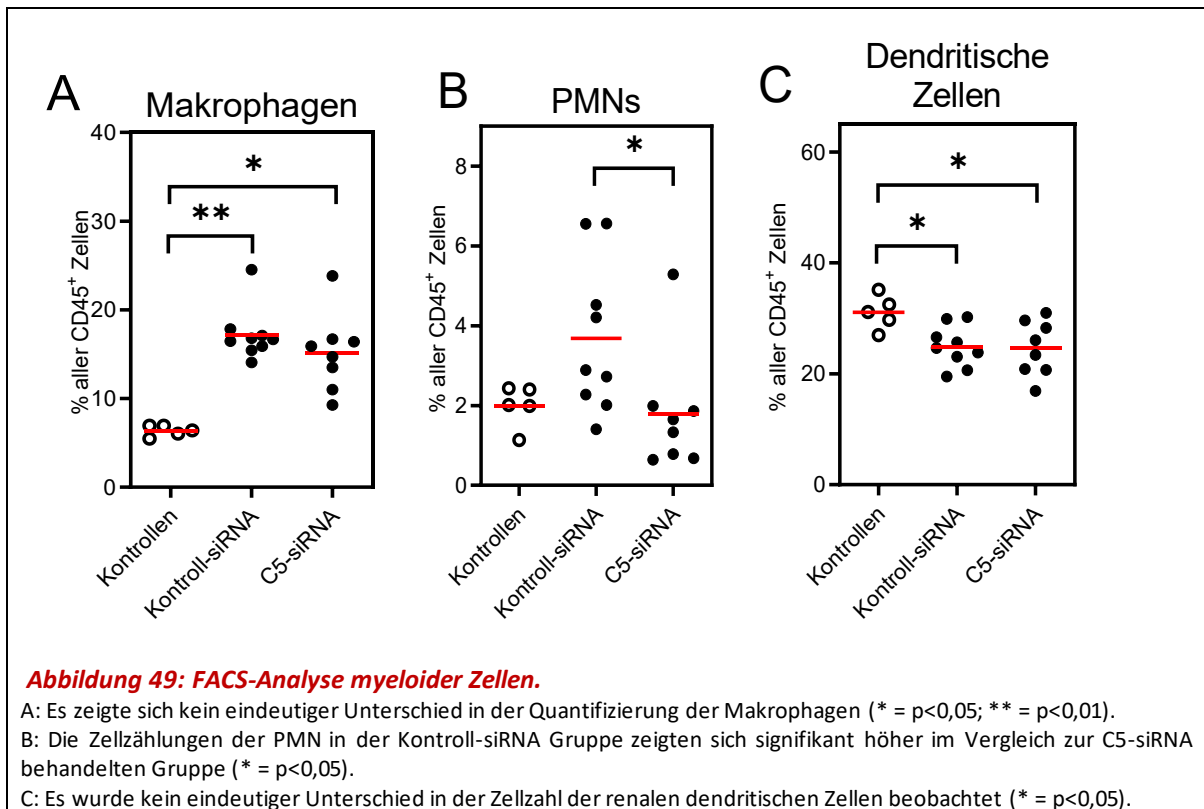
Abbildung 48: Kardialer Schaden anhand Expression von ANP und BNP.

A-B: Die kardiale Expression von ANP und BNP zeigte sich in allen hypertensiven Gruppen gleichmäßig erhöht.

Schließlich zeigte sich somit kein maßgeblicher Einfluss einer C5-siRNA Gabe im DOCA-Salz Versuch auf hypertensive kardiale Organschäden bezüglich des relativierten Herzgewichts und der kardialen Expression von ANP und BNP.

4.4.5 Ausmaß der Inflammation

Der Effekt der C5-siRNA Inhibition auf die Inflammation wurde über eine FACS-Analyse renaler Leukozyten ermittelt und quantifiziert. Die Quantifizierung der myeloiden Zellen zeigte keinen statistischen Unterschied innerhalb Makrophagen ($CD11b^+$, $CD11c^-$) und dendritischen Zellen ($CD11b^+$, $CD11c^+$) (Abb. 49A, C). Bei der Quantifizierung der polymorphkernigen Neutrophile zeigte diese, dass die C5-siRNA Gruppe mit einem relativen Anteil von $1,78 \% \pm 0,54$ signifikant niedrigere Zellzählungen nachwies als die Kontroll-siRNA Gruppe mit $3,68 \% \pm 0,63$, was auf eine möglich milderes Inflamationsgeschehen sprechen könnte (Abb. 49B).



Die Quantifizierung der lymphatischen Zellen ($CD3^+$, $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen, $Foxp3^+$ Tregs, $\gamma\delta T$ -Zellen, und Th17 Zellen) zeigte bei $Foxp3^+$ Tregs und Th17-Zellen ähnlicherweise erhöhte Neigungen in der Kontroll-siRNA Gruppe, welche jedoch nicht statistisch gestützt werden können. Die weiteren Auswertungen zeigten wenig bis keine Unterschiede zwischen Kontroll-siRNA und C5-siRNA Gruppe.

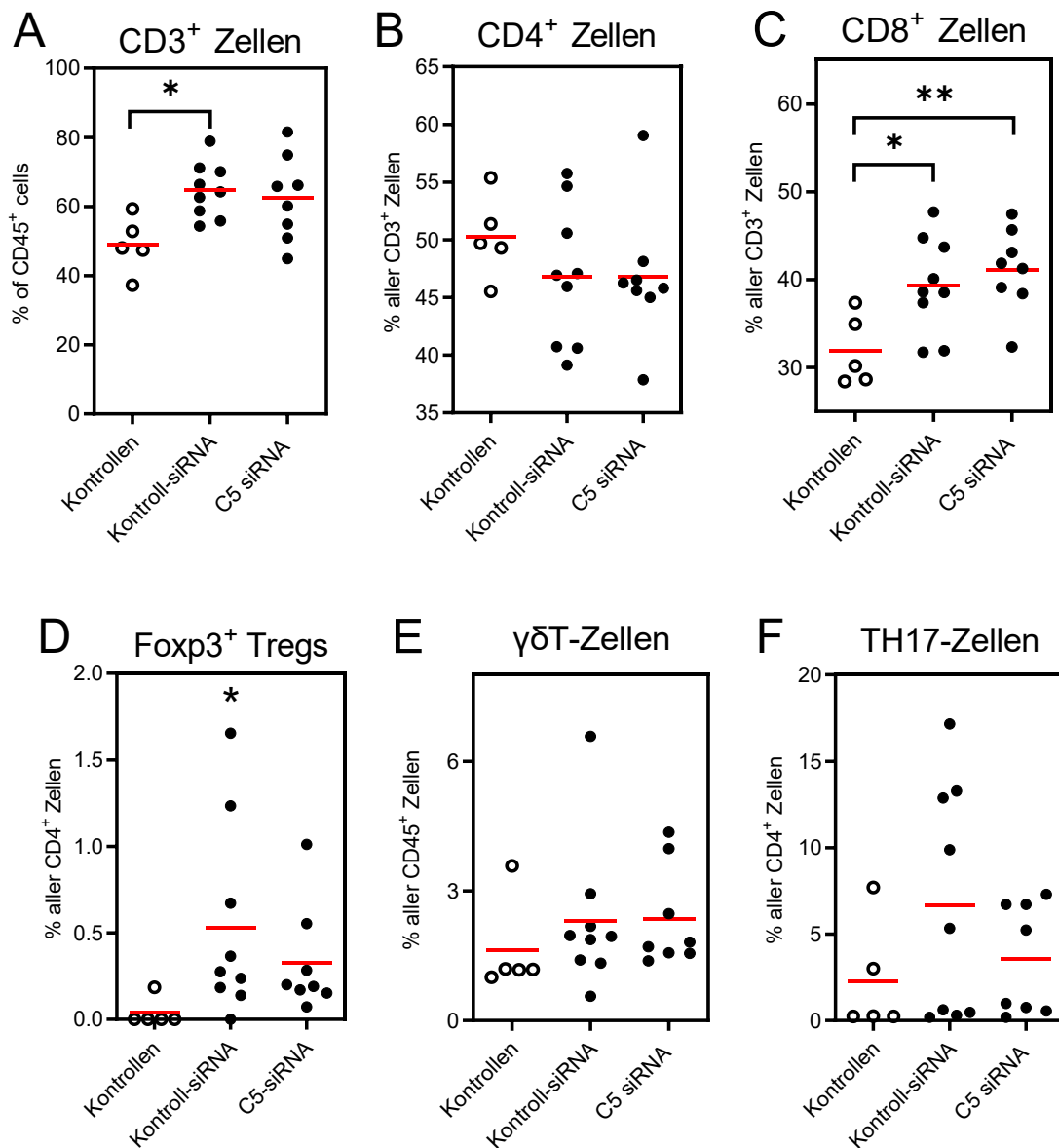


Abbildung 50: FACS-Analyse lymphatischer Zellen.

A-F: Relativer Anteil von Zellen des adaptiven Immunsystems CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ - Zellen, Foxp3⁺ Tregs, γδ⁺ T-Zellen und Th17- Zellen. Hier zeigte sich lediglich eine Tendenz zu erhöhten relativen Zellzählungen bei Foxp3⁺ Tregs und Th17-Zellen, welche statistisch jedoch nicht signifikant sind. Darüber hinaus sind keine definitiven Unterschiede zwischen den beiden hypertensiven Versuchsgruppen zu ermitteln (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Zusammengefasst zeigte die C5-siRNA Inhibition eine geringe Auswirkung auf inflammatorische Prozesse im DOCA-Salz Modell, da es unter C5-siRNA Injektion zu einer niedrigen Zellzählung von polymorphkernigen Zellen gekommen ist. Bei uneindeutigen Ergebnissen der anderen myeloiden Zellen ist diese Beobachtung jedoch nur beschränkt zu verwenden und zu interpretieren. Es zeigte sich kein relevanter Einfluss einer C5-siRNA Gabe auf lymphoide Zellen.

5 Diskussion

Der gegenwärtige Forschungsstand bezüglich der Rolle des Komplementsystems im Hypertonus legt nahe, dass erhöhte C3-Plasmaspiegel mit kardiometabolischen Volkskrankheiten wie Diabetes mellitus und Arteriosklerose assoziiert sind (Hertle, van Greevenbroek & Stehouwer, 2012; Ohsawa et al., 2010; Garcia-Arguinonis et al., 2021).

Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass C3-Plasmaspiegel nicht nur mit der Entstehung und den Auswirkungen einer arteriellen Hypertonie assoziiert sind, sondern auch als prädiktiver Marker für diese Erkrankung dienen könnten (Harrison, Coffman & Wilcox, 2021; Engström et al., 2007b). Die Arbeitsgruppe um Magen et al. stellt fest, dass erhöhte C3-Plasmaspiegel eher mit therapieresistentem Bluthochdruck, also Patienten, bei denen die Nutzung von mindestens drei verschiedenen Antihypertensiva frustrane Ergebnisse zeigten, assoziiert ist. Eine Erhöhung des Anaphylatoxins C5a wird ebenfalls bei hypertensiven Patienten beobachtet (Zhang et al., 2014a). Zudem sind erhöhte C5-Plasmaspiegel mit vaskulären Krankheiten wie Atherosklerose und Venenthrombosen positiv assoziiert (Martínez-López et al., 2020; Skjeflo et al., 2021). Darüber hinaus deuten einige Versuche darauf hin, dass die Inhibition der jeweiligen Komplementrezeptoren oder auch der Komplementfaktoren C3 und C5 potenziellen therapeutischen Wert besitzen, da in Maus- und Rattenmodellen eine signifikante Verbesserung der hypertensiven Schäden mithilfe einer Inhibition und eines Komplementknockouts erzielt werden konnte (Chen et al., 2018; Negishi et al., 2018).

In der aktuellen Arbeit wurde Hypertonus in C57/Bl6 Mäusen mithilfe zwei verschiedener Modelle induziert, um anschließend mit therapeutischer Intention die jeweilige hepatische C3- oder C5 Expression zu inhibieren. Die beiden Modelle Ang II und DOCA-Salz sind etablierte Modelle in unserem Labor mit unterschiedlicher Pathophysiologie (Krebs et al., 2014; Weiss et al., 2016).

Die Anwendung der siRNA stellt einen interventionellen Ansatz dar, um die Funktion eines Proteins zu untersuchen, ohne eine genveränderte Knockout-Linie zu verwenden. Dies bietet gegenüber eines Knockoutversuches diverse methodische und translationale Vorteile. Möglicherweise wird eine geringere Abweichung der Ergebnisse geboten, da die Intervention gleichzeitig die direkte klinische Implikation ist, da Patienten in der Klinik nicht bei Geburt, sondern nach Manifestation des Hypertonus behandelt werden. Zudem ist bekannt, dass niedrige Konzentrationen von Komplementfaktoren oder eine Komplementfaktordefizienz ungünstige Schwangerschaftsereignisse und die neuronale Entwicklung maßgeblich beeinflussen, sodass C3- oder C5-Knockout-Daten auch aus diesem Grund eine geringe Translationalität aufgrund systemischer Komplikationen aufweisen könnten (Chow et al., 2009; Gorelik et al., 2018).

Der therapeutische Einsatz von siRNA hat sich in den letzten Jahren immer mehr etabliert (Levin, 2019a). So gibt es mittlerweile erste vielversprechende siRNA-basierte Medikamente, welche bei Hypercholesterinämie, Morbus Duchenne, Myasthenia Gravis oder spinalen Muskelatrophien Anwendung finden können (Kusner et al., 2019; Levin, 2019b; Ray et al., 2020). Die aktuelle Arbeit nutzt dementsprechend den methodischen Aspekt der siRNA und evaluiert gleichzeitig das therapeutische Potenzial einer C3- oder C5-Hemmung in hypertensiven C57black6 Mäusen.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde die hepatische Genexpression von den Komplementfaktoren C3 und C5 bei hypertensiven Tieren im Ang II-Versuch durchschnittlich um jeweils 95,6% für C3 und 89,4% für C5 und im DOCA-Salz Versuch um jeweils 94,6% für C3 und 78,2% für C5 mithilfe der GalNAc-konjugierten siRNA reduziert. Ebenfalls zeigt ein C3 und C5 ELISA bei einer kleinen Subgruppe der Versuchsmäuse, dass auch auf Proteinebene die Konzentrationen gesenkt wurden.

Nach der aktuellen Studienlage ist bekannt, dass nicht nur eine erhöhte C3-Plasmakonzentration im Hypertonus zu beobachten ist, sondern Rattenmodelle wie das SHR-Modell (Spontaneously Hypertensive Rat) und das SNX-Modell (Subtotal Nephrectomy) ebenfalls eine erhöhte C3-Expression in glatten Muskelzellen und C3-Ablagerung in der Niere nachweisen konnten (Bao et al., 2017; Chen et al., 2020b; Fischer et al., 2021). In einem SHR-Modell wurden Entwicklungen und Folgen eines Hypertonus unter Berücksichtigung eines hohen Salzkonsums und eines C3-Knockouts (C3KO) ermittelt (Negishi et al., 2018). Die Untersuchungen an C3KO-Ratten ergaben verminderte Ausprägungen der Hypertonie bei einem C3-Mangel, was darauf hinweist, dass eine C3-Defizienz eine potenzielle blutdrucksenkende Wirkung haben könnte. Ebenfalls waren in der C3KO-Gruppe die Proliferation und Anzahl von mesangialen Zellen, glomeruläre Schäden in der Histologie und die UACR verringert. Dies deutet auf eine mögliche kausale Assoziation zwischen dem Komplementfaktor C3 und hypertensiven Nierenschäden hin.

Auffälligerweise war der Blutdruckunterschied zwischen den C3KO und SHR-Gruppen ohne erhöhten Salzkonsum in derselben Studie nicht zu beobachten, was möglicherweise auf eine hervorstechende Rolle von C3 bei aggravierten Hypertonus-Stadien andeutet. Die bedeutende Rolle von C3 in fortgeschrittenen Stadien des Hypertonus wird somit durch präklinische als auch klinischen Studien untermauert, da die bereits erwähnte Studie von Magen et al. ebenfalls eine Assoziation der C3-Plasmaspiegel mit therapieresistenten Hypertonuspatienten zeigte.

Ruan et al., 2015 zeigte, dass Knochenmarkstransplantationen von Wildtypmäusen in C3KO-Mäusen den vorher beobachteten, protektiv-vaskulären Effekt im DOCA-Salz Modell schwächt. Dies liege möglicherweise an einem veränderten Verhältnis zugunsten von M1 Makrophagen zwischen M1

und M2 Makrophagen. Zudem waren nach der Knochenmarkstransplantation histologisch die hypertonusbedingten Fibrosen und Gefäßhypertrophien wieder hergestellt. Bei einer Knochenmarkstransplantation zwischen C3KO Mäusen blieb der vaskulär-protective Effekt hingegen jedoch erhalten.

Bei weitestgehend übereinstimmenden Daten aus Knockoutversuchen, welche eine protective Wirkung als Folge einer C3-Defizienz zeigten, evaluiert die vorliegende Arbeit die protective Effekte bei Blockade des Komplementfaktors C3 mithilfe von hepatischer siRNA. Dabei zeigten sich unter C3-Inhibition deutlich niedrigere Albuminurie Werte im Vergleich zur Kontroll-siRNA Gruppe im Ang II-Versuch ($p < 0,05$). Ebenso ergaben die histologischen Untersuchungen in den DOCA-Salz-Versuchen, dass die Größe der Glomeruli in der C3-siRNA-Gruppe geringer war als in der Kontroll-siRNA-Gruppe ($p < 0,01$). Darüber hinaus ließen sich keine klaren Unterschiede hinsichtlich der Progression des Hypertonus, der kardialen Endorganschäden oder der antiinflammatorischen Effekte feststellen. Folglich kann, abgesehen von einer reduzierten initialen Albuminurie und einer verminderten glomerulären Größe, keine weitere Wirkung der C3-siRNA erfasst werden. Der vaskuläre Schaden wurde in dieser Arbeit nicht erfasst, sodass hier keine Aussage hergeleitet werden kann.

Während die Inhibition des Komplementfaktors C5 im Kontext von Hypertonus und hypertensiven Endorganschäden bisher noch wenig erforscht wurde und aktuell keine aktuellen Daten einer konkreten siRNA-Blockade in hypertensiven Mäusen vorhanden sind, gibt es vermehrt Daten zur Anwendung von C5-Inhibitoren in Form von Antikörpern bei anderen Krankheiten wie beispielsweise dem atypischen hämolytischen urämischen Syndrom oder der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (Rondeau et al., 2020; Fattizzo & Motta, 2023).

Darüber hinaus gibt es bisher mehrere Erkenntnisse bezüglich der Inhibition des Rezeptors von C5a, dem C5aR. Einheitlich wird von einem nephroprotectiven Effekt in hypertensiven C5aR-defizienten Mäusen in Ang II-Versuchen berichtet, welcher auch mittels pharmakologischer Inhibition in hypertensiven Wildtyp Mäusen reproduziert werden kann. Die Ergebnisse der Studien zeigen jedoch eine paradoxe Wirkung bezüglich des kardialen Einfluss der C5a/C5aR Achse, da Weiss et al. einerseits einen aggravierten Schaden in C5aR defizienten Mäusen beobachteten, während Zhang et al. gegenteilig ein vermindertes kardiales Remodelling beschreiben. Wieso genau es zu einer möglichen inversen Beziehung bezüglich renalen und kardialen Schaden in der C5a/C5aR Achse kommen könnte, ist noch nicht genau geklärt (Wenzel et al., 2017). Unabhängig von den renalen und kardialen Schäden berichten beide Studien jedoch, dass eine C5aR Defizienz keinen direkten Einfluss auf die Progression des systolischen Blutdrucks habe. Deshalb wird aktuell angenommen,

dass eine Inhibition des Rezeptors C5aR potenziellen therapeutischen Nutzen für Nierenschäden aufweist, während der Einfluss auf das Herz noch keine eindeutige Datenlage zeigt. Diese C5aR-Daten könnten analog zum Einfluss von C5 interpretiert werden. Die Rolle des Rezeptors C5aR2 im Hypertonus ist hingegen bisher ungeklärt.

Die hepatische C5 Genexpression wurde in dieser Arbeit im Ang II-Versuch mittels GalNAc-konjugierter siRNA durchschnittlich um 89% und im DOCA-Salz Versuch um 78% reduziert. Analog zu den C3-siRNA bei Ang II-Versuch konnte hier im C5-siRNA bei DOCA-Salz Versuch ebenfalls eine initiale erniedrigte Albuminurie, sowie eine mildere Ausprägung der glomerulären Größe erfasst werden. Diese deutet möglicherweise auf einen protektiven Effekt, einer C5 Blockade, einer Komplementinhibition hin. Andere renale, kardiale und inflammatorische Parameter haben keine wesentlichen Unterschiede aufgezeigt.

Dem Mosaik-Modell zufolge spielen mehrere unterschiedliche Risikofaktoren in die Progression des Hypertonus und die Entstehung der hypertensiven Endorganschäden. Dabei stehen die Salzzufuhr und die Inflammation im Zentrum des Modells, da sie unmittelbar alle anderen Risikofaktoren beeinflussen (Hengel, Benitah & Wenzel, 2022). In der aktuellen Arbeit wurden repräsentativ für die Inflammation im Hypertonus in diesem Versuch renale Leukozyten isoliert und per FACS-Analyse gezählt.

Die Anzahl von Neutrophilen Granulozyten in Relation zu der Lymphozytenanzahl wird als Marker für systemische Inflammation benutzt und zeigt in Patienten ebenfalls eine Korrelation zur Progression des Hypertonus (Liu et al., 2015). Ebenfalls zeigte eine Studie mit SHR eine signifikante Assoziation zwischen Aktivität von neutrophilen Leukozyten und Bluthochdruck (Zhang et al., 2018). Im DOCA-Salz Versuch dieser Arbeit ist eine erhöhte Anzahl von polymorphnukleären Neutrophile in der Kontroll-siRNA Gruppe ($3,68\% \pm 0,63$) gegenüber der C5-siRNA Gruppe ($1,78\% \pm 0,54$) zu sehen ($p < 0,05$). Diese Erhöhung wird jedoch nicht im Ang II-Versuch gespiegelt und daher ist eine protektive Wirkung durch die C5-siRNA-Gabe nicht sicher herzuleiten.

Ob im Hypertonus die Anzahl an Tregs vermindert oder erhöht ist, wird bisher in der Literatur unterschiedlich beschrieben (Krebs et al., 2014; Chen et al., 2018; Bode et al., 2024). Barhoumi et al. zeigte in seiner Arbeit, dass ein Transfer von Tregs in hypertensive Mäuse teilweise über ihre antiinflammatorischen Eigenschaften zu milderen hypertensiven Endorganschäden führt.

Weiterhin konnte man den Einfluss von Komplementfaktorrezeptoren in Tregs spezifizieren. Offenbar modulieren C3aR und C5aR gemeinsam die Foxp3 Expression in Tregs und beeinflussen Tregs dadurch maßgeblich in ihrer immunsuppressiven Wirkung in hypertensiven Mäusen (Chen et al., 2018). Ein Doubleknockout beider Rezeptoren bei Mäusen in einem Ang-II Versuch verhinderte sowohl eine rapide Steigerung des systolischen Blutdrucks durch Angiotensin II als auch die

Entstehung von hypertensiven Endorganschäden. Eine Arbeit aus unserem Labor kann die Daten jedoch nicht reproduzieren (Bode et al., 2024).

Die aktuelle Arbeit zeigte weder im Ang II-Versuch noch im DOCA-Salz Versuch nach einer Hemmung der hepatischen Komplementfaktoren C3 und C5 eine statistisch signifikante Auswirkung auf die Anzahl an Tregs. Dies spricht jedoch nicht direkt gegen die von Chen et al. beschriebenen Ergebnisse. Zum einen wurde in der Arbeit von Chen et al. die Rolle der Rezeptoren und nicht die Rolle von hepatischen Komplementfaktoren beschrieben, zum anderen wird ebenfalls erwähnt, dass ein singulärer Knockout von C3aR oder C5aR alleine in Mäusen die hypertensiven Schäden durch Ang II nicht abmildern konnte. Dies ist dementsprechend analog zur aktuellen Arbeit zu sehen, da in der aktuellen Arbeit eine singuläre Inhibition der Komplementfaktoren C3 und C5 keinen maßgeblichen Einfluss auf die hypertensive Progression hatte.

Eine „Doppelinhibition“ mittels siRNA wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt, könnte jedoch möglicherweise neue Erkenntnisse bringen und Resultate von Chen et al. unterstützen.

Insgesamt wurde in dieser Arbeit durch die hepatische C3 und C5 siRNA-Inhibition bis auf eine Verminderung der initialen Albuminurie keine weiteren protektiven Effekte einer Komplementinhibition durch Fehlen verminderter hypertensiven Endorganschäden erfasst.

Dies scheint auf den ersten Blick etwas konträr zu den bereits genannten Studien, welche ein therapeutisches Nutzen aus C3-, C5-, C3aR- oder C5aR-Knockout Versuchen herleiten (Negishi et al., 2018; Chen et al., 2018; Zhang et al., 2014a; Weiss et al., 2016). Diese Beobachtung hat mehrere mögliche Erklärungsansätze und Schlussfolgerungen.

Einerseits könnten die beobachteten Ergebnisse aus dieser Arbeit so erklärt werden, dass eine siRNA Inhibition die Expression von C3 und C5 keine suffiziente Inhibition der jeweiligen Proteine darstellt, um Ergebnisse eines genetischen Knockouts zu reproduzieren. Bei einer Studie mit Knockout-Mäusen beträgt die Inhibition 100%, was ein Wert ist, welcher nur nicht mit Inhibitoren zu erreichen ist. In dieser Arbeit zeigten die real-time PCR-Ergebnisse zusammengefasst eine Inhibition von durchschnittlich 96% für C3-siRNA und 83% für C5-siRNA behandelte Mäuse. Von einer kompensierten vermehrten extrahepatischen Expression ist weitestgehend nicht auszugehen, da die Konzentration der Komplementfaktoren im Plasma bestimmt wurde und diese ebenfalls, ähnlich zur hepatischen Genexpression, eindrücklich vermindert waren. Ob nun ein Knockoutversuch mehr translationalen Wert als ein siRNA Versuch hat, lässt sich nicht genau sagen. Folglich ist einerseits eine geringe Konzentration von hepatischen Komplementfaktoren möglicherweise bereits ausreichend, um die hypertensiven Endorganschäden zu induzieren, weshalb eine stärkere Komplementinhibition protektive Wirkungen aufdecken könnte.

Andererseits könnte es sein, dass die hepatische Inhibition von C3 und C5 wenig Wirkung zeigt, falls extrahepatische Komplementfaktoren die eigentliche Rolle bei der Entstehung und Progression von Hypertonus einnehmen. Komplementfaktoren, welche von extrahepatischen Zellen wie Fibroblasten, epitheliale Zellen, Astrozyten oder myoepitheliale Zellen produziert werden, wurden in dieser Arbeit nicht erfasst (Chen et al., 2020b). Extrahepatisches Komplement wäre bei einem genetischen Knockout ebenfalls herunterreguliert, weshalb ein anderer Effekt zur aktuellen Arbeit zu beobachten ist, was möglicherweise die Diskrepanz zwischen den Studien erklärt. Daher spielen möglicherweise extrahepatische Komplementfaktoren eine deutlich wichtigere Rolle als hepatische Komplementfaktoren bei der Entstehung von hypertensiven Schäden.

Eine erwähnenswerte Beobachtung wurde in der aktuellen Arbeit in den DOCA-Salz Versuchen in der C3-siRNA Gruppe gemacht. In den zusammengefassten DOCA-Salz Versuchen betrug die Mortalität innerhalb der C3-siRNA Gruppe 57,1%, sodass sich zum Ende des Versuchs die n-Zahl innerhalb der C3-siRNA Gruppe sich im Vergleich halbiert hat, während die Mortalität in der Kontroll-siRNA Gruppe 25,0% und in der C5-siRNA 27,3% betrug. Obwohl die erhöhte Sterblichkeit nicht signifikant war, so war der Effekt eindeutig. Aus praktischen Gründen konnten histologische Auswertungen oder Genexpressionsdaten von verstorbenen Mäusen nicht in die Endergebnisse dieser Arbeit inkludiert, analysiert oder ausgewertet werden. Eine mögliche Konsequenz ist, dass durch die fehlenden Daten der verstorbenen Mäuse in der C3 siRNA Gruppe aggravierte Endorganschäden möglicherweise maskiert wurden („Survival of the fittest“). Dies würde, konträr zu der Literatur, möglicherweise auf eine Aggravierung des Hypertonus durch die hepatische Inhibition von C3 deuten. Bisher sind zum aktuellen Stand noch keine konkreten Daten bezüglich der Mortalität in DOCA-Salz Modellen mit Komplementfaktoringhibition zu finden.

Die hier präsentierten Daten zeigen, dass eine Blockade von C3 und C5 die frühe Albuminurie senkt, jedoch keinen Effekt auf den systolischen Blutdruck und dessen Endorganschäden hat. Vermehrte Studien können einen protektiven Effekt eines C3-Knockout Versuchs an anderen Rattenarten oder in Mausversuchen nicht reproduzieren und keinen eindeutigen Effekt bestätigen. Komplementfaktoren könnten demnach eher eine begleitende Kofaktoren-Rolle anstatt einer aktiv kausalen Rolle in der Pathophysiologie des Hypertonus sein (Coles et al., 2007; Regal et al., 2018). Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die Diskrepanz der Beobachtungen zwischen dieser Arbeit und anderer Studien bezüglich der Korrelation zwischen den Komplementfaktoren und der Progression des Hypertonus in Mäusen wäre, dass die aktuellen in vivo Hypertonus Modelle nur limitiert vergleichbar sind. Beispielsweise wurde die grundlegende Annahme, dass Rag defiziente Mäuse keinen Hypertonus entwickeln vor einigen Jahren hinterfragt, da der Versuch mit

identischen Bedingungen nicht reproduziert werden konnte (Seniuk et al., 2020). Ein möglicher Hauptgrund für die begrenzte Reproduzierbarkeit der Experimente innerhalb einer Mauslinie, wie im Fall der C57Bl/6J, könnte darin liegen, dass im Laufe der Zeit einzelne Mutationen den Phänotyp der Mäuse abhängig von den spezifischen Laborbedingungen der Versuchstiere verändert haben. Darüber hinaus gab es bis zum Erstellungszeitpunkt dieser Arbeit keine Studien bezüglich eines C3 oder C5 Knockouts oder hepatischen Komplementfaktoreninhibition in Mäusen in einem Hochdruckmodell, da die meisten Erkenntnisse bisher aus verschiedenen Rattenmodellen wie z.B. „Dahl salt-sensitive rat“ (Dahl/SS Rat), SNX oder SHR entnommen sind.

In der folgenden Arbeit ist die n-Zahl der einzelnen Versuche zum Teil ebenfalls klein, wobei die Ergebnisse aber eindeutig sind und ebenfalls mit vorläufigen Versuchsergebnissen bei C3KO Mäusen in denselben Modellen aus unserem Labor übereinstimmen. In diesen Versuchen wird eine ähnliche initial verminderte Albuminurie und eine erhöhte Mortalität im DOCA-Salz Modell beobachtet. Anzumerken ist, dass die erhöhte Mortalität nur in Verwendung eines 50mg DOCA-Pellets beobachtet wurde, während die Nutzung eines 25mg DOCA-Pellet keine vergleichbaren Mortalitätsraten aufgewiesen hat (Bode et al., 2023). Auch aus Gründen des Tierschutzes (3R) ist eine Wiederholung des Versuches zum alleinigen Zweck die n-Zahl zu erhöhen, nicht sinnvoll.

Die Daten dieser Arbeit bestätigen nicht, dass eine Inhibition von C3 oder C5 zu einer wesentlichen Verbesserung bezüglich kardialer und allgemein renaler Endorganschäden im Hypertonus führt. Zwar zeigte sich eine initiale verminderte Albuminurie bei C3 Blockade und bei C5 Blockade, jedoch verschwindet dieser Effekt teilweise im weiteren Verlauf. Aktuell gibt es in der Literatur noch keine Beschreibung bezüglich eines konkreten Pathomechanismus von Komplementfaktoren bei der zeitlichen Manifestation einer Albuminurie. Der klinische Nutzen zeigt sich daher auch limitiert, da eine Komplementinhibition im Sinne einer Therapie bei Albuminurie aufgrund des nur beschreibenden initialen Effekts etwas fraglich ist.

Bisher gab es, wie bereits erwähnt, wenig bis kaum Daten zu Komplementinhibitionen von hepatischem C3 und C5 mit therapeutischem Ansatz, sodass initial dies der logische nächste Schritt zu Knockout Versuchen gewesen wäre, welche eine potenziell protektive Wirkung demonstrieren könnten. Zudem wurden vaskuläre Schäden in dieser Arbeit nicht analysiert, falls hypertensive Endorganschäden des Komplementsystems sich primär in vaskuläre statt kardiale und renale Endorganschäden äußert.

Es ist nicht direkt auszuschließen, dass das Komplementsystem eine untergeordnetere Rolle in der Entstehung von hypertensiven Endorganschäden spielt als ursprünglich angenommen. Gleichzeitig erfordert diese Schlussfolgerung zukünftig weitere Studien, um die genauen Hauptfaktoren des Komplementsystems im Hypertonus zu verifizieren oder zu falsifizieren. Nicht nur die Inhibition der

Komplementfaktoren an sich, sondern auch die das Ausmaß könnte eine wichtige Rolle in der Entstehung hypertensiver Endorganschäden spielen.

Nichtsdestotrotz waren bisherige Komplement-Knockout Versuche überwiegend mit anderen Modellen oder Ratten durchgeführt worden als diese Arbeit genutzt hatte, sodass ein Ang II- und ein DOCA-Salz Versuch an C3- und C5-Knockout Mäusen die Daten der aktuellen Arbeit genauer erklären könnte. Darüber hinaus wäre es interessant über siRNA sowohl C3 als auch C5 zu inhibieren, um die Erkenntnisse von Chen et al. aus einem C3aR und C5aR Doppelknockout weiterhin zu verifizieren und das therapeutische Potenzial weitreichender zu evaluieren.

5.1 Ausblick

Die Daten dieser Arbeit betonen die komplexen Mechanismen im Komplementsystem bei hypertensiven Endorganschäden. Das Komplementsystem scheint eine Rolle in der Entwicklung im Hypertonus zu spielen, jedoch scheint der konkrete Einfluss auf kardiale und renale Endorganschäden unklar.

Ähnlich wie im C3 Knockout führt hepatische C3-Hemmung mit einer C3-siRNA zu einer Senkung der frühen Albuminurie, aber nicht des Blutdrucks und dessen Endorganschäden. Ebenfalls senkt eine C5 Blockade die initiale Albuminurie ohne bleibenden Effekt auf den Blutdruck und die Endorganschäden.

6 Zusammenfassung

Wie das Komplementsystem genau in der Entstehung und in der Progression des Hypertonus beteiligt ist, ist bisher nicht genau bekannt. Dies lässt sich unter anderem daran erklären, dass das Komplementsystem über verschiedenen Komplementfaktoren und Komplementrezeptoren fungiert, sodass eine Analyse jeder einzelnen Komponente erschwert ist. Die drei Wege der Komplementaktivierung enden alle mit denselben Zielen: Die Spaltung der Komplementfaktoren C3 und C5 und der damit einhergehenden Bildung des Membranangriffskomplexes. Um die Rolle der Komplementfaktoren C3 und C5 bei hypertensiven, renalen und kardialen Endorganschäden zu untersuchen, wurde in Wildtyp Mäusen in zwei verschiedenen Versuchen Bluthochdruck mit Angiotensin II Infusion und Deoxycorticosterone Acetat (DOCA) induziert. Des Weiteren wurden drei verschiedene Interventionsgruppen in den jeweiligen Gruppen gebildet: Kontroll-siRNA, C3-siRNA und C5-siRNA.

Die Inhibition der hepatischen Komplementfaktoren mit siRNA reduzierte die C3-Expression in beiden Versuchen zusammengefasst um 96% und die C5-Expression um 84%. Eine Inhibition von C3 mittels siRNA führte im Ang II-Modell zu einer initialen Verringerung der Albuminurie im Vergleich zur unbehandelten Kontroll-siRNA-Gruppe. Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten aus unseren Versuchen an C3-Knockout Mäusen überein. Ebenfalls zeigte die Gabe von C5-siRNA im DOCA-Salz Versuch zu allen gemessenen Zeitpunkten eine Verringerung der Albuminurie. Insgesamt gibt es bisher wenige Daten, bei denen Komplementfaktoren anstelle von Komplementrezeptoren gehemmt wurden. Darüber hinaus besteht die vorhandene Literatur überwiegend aus Studien an Ratten. Daten einer aktiven Komplementinhibition mittels siRNA in Ang II- und DOCA-Salz-Modellen bei Mäusen wurde bisher nicht publiziert.

Die vorliegende Arbeit ermöglicht mehrere Schlussfolgerungen und eröffnet neue Fragestellungen. Einerseits deutet sie darauf hin, dass das Komplementsystem in der Pathogenese des Hypertonus maßgeblich zum renalen Schaden in Form von Albuminurie beiträgt. Andere wesentliche Rollen des Komplementsystems im Kontext des Hypertonus konnten aus dieser Arbeit jedoch nicht eindeutig abgeleitet werden. Andererseits könnte es sein, dass die Inhibition in den Mäusen nicht ausreichend ausgeprägt war, sodass eine verbleibende Restaktivität genügte, um inflammatorische Endorganschäden im Hypertonus zu verursachen. Folgt man dieser Überlegung weiter, ist es zudem denkbar, dass eine doppelte Inhibition mittels siRNA einen messbaren Effekt zeigen könnte.

7 Summary

The precise role of the complement system in the development and progression of hypertension is not yet well understood. This is partly due to the complexity of the complement system, which operates through various complement factors and receptors, making the analysis of each component challenging. All three pathways of complement activation converge on the same endpoints: the cleavage of complement factors C3 and C5, leading to the formation of the membrane attack complex. To investigate the roles of complement factors C3 and C5 in hypertensive renal and cardiac end-organ damage, hypertension was induced in wild-type mice using two different methods: Angiotensin II infusion and Deoxycorticosterone Acetate (DOCA). Additionally, three intervention groups were established within each experimental group: control siRNA, C3 siRNA, and C5 siRNA.

Inhibition of hepatic complement factors with siRNA resulted in a 96% reduction in C3 expression and an 84% reduction in C5 expression across both experiments. In the Ang II model, C3 inhibition via siRNA led to an initial decrease in albuminuria compared to the untreated control siRNA group. These results are consistent with data from our studies on C3 knockout mice. Similarly, administration of C5 siRNA in the DOCA-salt model showed a reduction in albuminuria at all measured time points. Overall, there are few data available on the inhibition of complement factors as opposed to complement receptors. Moreover, the existing literature predominantly consists of studies conducted in rats. To date, active complement inhibition using siRNA in Ang II and DOCA-salt models in mice has not been reported.

This study allows for several conclusions and raises new questions. On the one hand, it suggests that the complement system significantly contributes to renal damage in the form of albuminuria in the pathogenesis of hypertension. However, other significant roles of the complement system in hypertension were not clearly identified in this work. On the other hand, it is possible that the inhibition in the mice was not sufficiently pronounced, leaving residual activity that could cause inflammatory end-organ damage in hypertension. Extending this line of thought, it is conceivable that a dual inhibition using siRNA might exhibit a measurable effect.

8 Erklärung des Eigenanteils

Folgende Anteile der vorliegenden Arbeit basieren auf meiner unmittelbaren (Mit-)Arbeit:

- Versuchsdesign, Versuchsplanung und Diskussion der Daten: gemeinsam mit Prof. Dr. Ulrich Wenzel
- Operative Eingriffe: gemeinsam mit Marlies Bode
- Injektion der siRNA: gemeinsam mit Marlies Bode und Stefan Gatzemeier
- Betreuung der Mäuse während des Versuches: gemeinsam mit der Versuchstierhaltung des UKE
- Gewinnung der Urinproben mittels Stoffwechselkäfigen: selbstständig
- Albumin ELISA: selbstständig
- Kreatinin-Assay: selbstständig
- RNA-Isolierung: selbstständig
- Realtime RT-PCR: selbstständig
- Tail-cuff-Blutdruckmessungen: selbstständig
- Herstellung der Leukozyteneinzelsuspension für die FACS-Analyse: gemeinsam mit Marlies Bode
- Histologische Aufarbeitung der Nierenproben: gemeinsam mit Stefan Gatzemeier
- Mikroskopische Auswertung der histologischen Schnitte: selbstständig
- Planung und Durchführung der statistischen Analyse: gemeinsam mit Prof. Dr. Ulrich Wenzel
- Erstellen der Abbildungen: selbstständig
- Korrekturlesen des Manuskriptes: gemeinsam mit Prof. Dr. Ulrich Wenzel

Die Durchführung nachfolgender Anteile der Arbeit basiert nicht auf meiner unmittelbaren Arbeit. Jedoch wirkte ich bei deren Auswertung und Interpretation mit:

- FACS-Analyse: Marlies Bode
- Bestimmung von Cholesterin und Blut-Harnstoff-N im Plasma per Autoanalyse: Stefan Gatzemeier, AG Tiegs
- Messung der GFR: Marlies Bode
- Western-Blot Analyse der Plasmaproben: Stefan Gatzemeier
- Komplementfaktoren ELISA: Alnylam Pharmaceuticals Inc.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
ANOVA	Analysis of variance
BNP	B-natriuretisches Peptid
C3	Complement factor 3
C3aR	Complement factor 3a Receptor
C3KO	Complement factor 3 Knockout
C5	Complement factor 5
C5aR	Complement factor 5a Receptor
C5KO	Complement factor 5 Knockout
CCL2	Chemokine Ligand 2
CD	Cluster of Differentiation
DAHL SS Rat	Dahl salt sensitive rat
DKO	Double Knockout
DNA	Desoxyribonucleic acid
DOCA	Deoxycorticosteron acetate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
KO Mäuse	Knockout Mäuse
MAC	Membrane attack complex
NaCl	Natriumchlorid
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PAS	Periodic acid-Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PMN	Polymorphnukleäre Zellen
RAG-1	Recombination activating gene 1

RAAS	Renin Angiotensin Aldosteron System
RISC	Rna-induced silencing complex
RNA	Ribonulceic acid
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SHR	Spontaneous Hypertensive Rats
siRNA	Small interfering RNA
SNX	Subtotal nephrectomy
tPA	Tissue plasminogen activator
Treg	Regulatorische T-Zelle
uPA	Urikinase plasminogen activator
WHO	World Health Organisation

10 Literaturverzeichnis

- Ahadzadeh, E., Rosendahl, A., Czesla, D., Steffens, P., Prüßner, L., Meyer-Schwesinger, C., Wanner, N., Paust, H.J., Huber, T.B., Stahl, R.A.K., Wiech, T., Kurts, C., Seniuk, A., Ehmke, H. & Wenzel, U.O. (2018) The chemokine receptor CX₃CR1 reduces renal injury in mice with angiotensin II-induced hypertension. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 315 (6), F1526–F1535. doi:10.1152/ajprenal.00149.2018.
- Alsheikh, A.J., Dasinger, J.H., Abais-Battad, J.M., Fehrenbach, D.J., Yang, C., Cowley, A.W. & Mattson, D.L. (2020) CCL2 mediates early renal leukocyte infiltration during salt-sensitive hypertension. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 318 (4), F982–F993. doi:10.1152/ajprenal.00521.2019.
- Bao, X., Meng, G., Zhang, Q., Liu, L., Wu, H., et al. (2017) Elevated serum complement C3 levels are associated with prehypertension in an adult population. *Clinical and Experimental Hypertension*. 39 (1), 42–49. doi:10.1080/10641963.2016.1210622.
- Barhoumi, T., Kasal, D.A., Li, M.W., Shbat, L., Laurant, P., Neves, M.F., Paradis, P. & Schiffrin, E.L. (2011) T Regulatory Lymphocytes Prevent Angiotensin II–Induced Hypertension and Vascular Injury. *Hypertension*. 57 (3), 469–476. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.162941.
- Bianca, G., Raluca, F., Veres, M., Orlandea, M., Badea, J., Hlavathy, K. & Cioc, A. (2015) Plasma Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) – Early Biomarker for Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients. *The Journal of Critical Care Medicine*. 1 (4), 154–161. doi:10.1515/jccm-2015-0023.
- Bode, M., Diemer, J.N., Luu, T.V., Ehnert, N., Teigeler, T., Wiech, T., Lindenmeyer, M.T., Herrnschmidt, G.R., Bülow, J., Huber, T.B., Tomas, N.M. & Wenzel, U.O. (2023) Complement component C3 as a new target to lower albuminuria in hypertensive kidney disease. *British Journal of Pharmacology*. 180 (18), 2412–2435. doi:10.1111/bph.16097.
- Bode, M., Herrnschmidt, G.R., Dreher, L., Ehnert, N., Kirkerup, P., Lindenmeyer, M.T., Meyer-Schwesinger, C.F., Ehmke, H., Köhl, J., Huber, T.B., Krebs, C.F., Steinmetz, O.M., Wiech, T. & Wenzel, U.O. (2024) Deficiency of Complement C3a and C5a receptors Does Not Prevent Angiotensin II–Induced Hypertension and Hypertensive End-Organ Damage. *Hypertension*. 81 (1), 138–150. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.123.21599.
- Chen, L., Fukuda, N., Matsumoto, T. & Abe, M. (2020a) Role of complement 3 in the pathogenesis of hypertension. *Hypertension Research*. 43 (4), 255–262. doi:10.1038/s41440-019-0371-y.
- Chen, X.-H., Ruan, C.-C., Ge, Q., Ma, Y., Xu, J.-Z., Zhang, Z.-B., Lin, J.-R., Chen, D.-R., Zhu, D.-L. & Gao, P.-J. (2018) Deficiency of Complement C3a and C5a Receptors Prevents Angiotensin II–Induced Hypertension via Regulatory T Cells. *Circulation Research*. 122 (7), 970–983. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.312153.
- Chow, W.-N., Lee, Y.-L., Wong, P.-C., Chung, M.-K., Lee, K.-F. & Yeung, W.S.-B. (2009) Complement 3 deficiency impairs early pregnancy in mice. *Molecular Reproduction and Development*. 76 (7), 647–655. doi:10.1002/mrd.21013.

- Coles, B., Lewis, R., Anning, P.B., Morton, J., Baalasubramanian, S., Morgan, B.P. & O'Donnell, V.B. (2007) CD59 or C3 are not required for angiotensin II-dependent hypertension or hypertrophy in mice. *Immunology*. 121 (4), 518–528. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02598.x.
- Drummond, G.R., Vinh, A., Guzik, T.J. & Sobey, C.G. (2019) Immune mechanisms of hypertension. *Nature Reviews Immunology*. 19 (8), 517–532. doi:10.1038/s41577-019-0160-5.
- Engström, G., Hedblad, B., Berglund, G., Janzon, L. & Lindgärde, F. (2007a) Plasma levels of complement C3 is associated with development of hypertension: a longitudinal cohort study. *Journal of Human Hypertension*. 21 (4), 276–282. doi:10.1038/sj.jhh.1002129.
- Engström, G., Hedblad, B., Berglund, G., Janzon, L. & Lindgärde, F. (2007b) Plasma levels of complement C3 is associated with development of hypertension: a longitudinal cohort study. *Journal of Human Hypertension*. 21 (4), 276–282. doi:10.1038/sj.jhh.1002129.
- Fattizzo, B. & Motta, I. (2023) Rise of the planet of rare anemias: An update on emerging treatment strategies. *Frontiers in Medicine*. 9, 1097426. doi:10.3389/fmed.2022.1097426.
- Fischer, L.-M., Fichte, L.A., Büttner-Herold, M., Ferrazzi, F., Amann, K., Benz, K. & Daniel, C. (2021) Complement in Renal Disease as a Potential Contributor to Arterial Hypertension. *Kidney and Blood Pressure Research*. 46 (3), 362–376. doi:10.1159/000515823.
- Garcia-Arguinzonis, M., Diaz-Riera, E., Peña, E., Escate, R., Juan-Babot, O., Mata, P., Badimon, L. & Padro, T. (2021) Alternative C3 Complement System: Lipids and Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (10), 5122. doi:10.3390/ijms22105122.
- Gorelik, A., Sapir, T., Ben-Reuven, L. & Reiner, O. (2018) Complement C3 Affects Rac1 Activity in the Developing Brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 11, 150. doi:10.3389/fnmol.2018.00150.
- Guzik, T.J., Hoch, N.E., Brown, K.A., McCann, L.A., Rahman, A., Dikalov, S., Goronzy, J., Weyand, C. & Harrison, D.G. (2007) Role of the T cell in the genesis of angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Journal of Experimental Medicine*. 204 (10), 2449–2460. doi:10.1084/jem.20070657.
- Harrison, D.G., Coffman, T.M. & Wilcox, C.S. (2021) Pathophysiology of Hypertension: The Mosaic Theory and Beyond. *Circulation Research*. 128 (7), 847–863. doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.318082.
- Hengel, F.E., Benitah, J.-P. & Wenzel, U.O. (2022) Mosaic theory revised: inflammation and salt play central roles in arterial hypertension. *Cellular & Molecular Immunology*. 19 (5), 561–576. doi:10.1038/s41423-022-00851-8.
- Hertle, E., van Greevenbroek, M.M.J. & Stehouwer, C.D.A. (2012) Complement C3: an emerging risk factor in cardiometabolic disease. *Diabetologia*. 55 (4), 881–884. doi:10.1007/s00125-012-2462-z.

- Jeong, B.Y., Uddin, M.J., Park, J.H., Lee, J.H., Lee, H.B., Miyata, T. & Ha, H. (2016) Novel Plasminogen Activator Inhibitor-1 Inhibitors Prevent Diabetic Kidney Injury in a Mouse Model S. Maeda (ed.). *PLOS ONE*. 11 (6), e0157012. doi:10.1371/journal.pone.0157012.
- Kashyap, S., Osman, M., Ferguson, C.M., Nath, M.C., Roy, B., Lien, K.R., Nath, K.A., Garovic, V.D., Lerman, L.O. & Grande, J.P. (2018) Ccl2 deficiency protects against chronic renal injury in murine renovascular hypertension. *Scientific Reports*. 8 (1), 8598. doi:10.1038/s41598-018-26870-y.
- Krebs, C.F., Lange, S., Niemann, G., Rosendahl, A., Lehnert, A., Meyer-Schwesinger, C., Stahl, R.A.K., Benndorf, R.A., Velden, J., Paust, H.-J., Panzer, U., Ehmke, H. & Wenzel, U.O. (2014) Deficiency of the Interleukin 17/23 Axis Accelerates Renal Injury in Mice With Deoxycorticosterone Acetate+Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertension*. 63 (3), 565–571. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02620.
- Kusner, L.L., Yucius, K., Sengupta, M., Sprague, A.G., Desai, D., Nguyen, T., Charisse, K., Kuchimanchi, S., Kallanthottathil, R., Fitzgerald, K., Kaminski, H.J. & Borodovsky, A. (2019) Investigational RNAi Therapeutic Targeting C5 Is Efficacious in Pre-clinical Models of Myasthenia Gravis. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. 13, 484–492. doi:10.1016/j.omtm.2019.04.009.
- Lawes, C.M.M., Hoorn, S.V. & Rodgers, A. (2008) *Global burden of blood-pressure-related disease, 200*. 371, 6.
- Levin, A.A. (2019a) Treating Disease at the RNA Level with Oligonucleotides. *New England Journal of Medicine*. 380 (1), 57–70. doi:10.1056/NEJMr1705346.
- Levin, A.A. (2019b) Treating Disease at the RNA Level with Oligonucleotides. *New England Journal of Medicine*. 380 (1), 57–70. doi:10.1056/NEJMr1705346.
- Liu, X., Zhang, Q., Wu, H., Du, H., Liu, L., et al. (2015) Blood Neutrophil to Lymphocyte Ratio as a Predictor of Hypertension. *American Journal of Hypertension*. 28 (11), 1339–1346. doi:10.1093/ajh/hpv034.
- Magen, E., Mishal, J., Paskin, J., Glick, Z., Yosefy, C., Kidon, M. & Schlesinger, M. (2008) Resistant Arterial Hypertension Is Associated With Higher Blood Levels of Complement C3 and C-Reactive Protein. *The Journal of Clinical Hypertension*. 10 (9), 677–683. doi:10.1111/j.1751-7176.2008.00002.x.
- Małgorzewicz, S., Skrzypczak-Jankun, E. & Jankun, J. (2013) Plasminogen activator inhibitor-1 in kidney pathology. *International Journal of Molecular Medicine*. 31 (3), 503–510. doi:10.3892/ijmm.2013.1234.
- Martínez-López, D., Roldan-Montero, R., García-Marqués, F., Nuñez, E., Jorge, I., Camafeita, E., Minguez, P., Rodriguez de Cordoba, S., López-Melgar, B., Lara-Pezzi, E., Fernández-Ortiz, A., Ibáñez, B., Valdivielso, J.M., Fuster, V., Michel, J.-B., Blanco-Colio, L.M., Vázquez, J. & Martín-Ventura, J.L. (2020) Complement C5 Protein as a Marker of Subclinical Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 75 (16), 1926–1941. doi:10.1016/j.jacc.2020.02.058.

Negishi, E., Fukuda, N., Otsuki, T., Katakawa, M., Komatsu, K., Chen, L., Tanaka, S., Kobayashi, H., Hatanaka, Y., Ueno, T., Endo, M., Mashimo, T., Nishiyama, A. & Abe, M. (2018) Involvement of complement 3 in the salt-sensitive hypertension by activation of renal renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 315 (6), F1747–F1758. doi:10.1152/ajprenal.00370.2018.

Ohsawa, I., Inoshita, H., Ishii, M., Kusaba, G., Sato, N., Mano, S., Onda, K., Gohda, T., Horikoshi, S., Ohi, H. & Tomino, Y. (2010) Metabolic impact on serum levels of complement component 3 in Japanese patients. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 24 (2), 113–118. doi:10.1002/jcla.20372.

Ray, K.K., Wright, R.S., Kallend, D., Koenig, W., Leiter, L.A., Raal, F.J., Bisch, J.A., Richardson, T., Jaros, M., Wijngaard, P.L.J. & Kastelein, J.J.P. (2020) Two Phase 3 Trials of Inclisiran in Patients with Elevated LDL Cholesterol. *New England Journal of Medicine*. 382 (16), 1507–1519. doi:10.1056/NEJMoa1912387.

Regal, J.F., Laule, C.F., McCutcheon, L., Root, K.M., Lund, H., Hashmat, S. & Mattson, D.L. (2018) The complement system in hypertension and renal damage in the Dahl SS rat. *Physiological Reports*. 6 (6), e13655. doi:10.14814/phy2.13655.

Ricklin, D., Mastellos, D.C., Reis, E.S. & Lambris, J.D. (2018) The renaissance of complement therapeutics. *Nature Reviews Nephrology*. 14 (1), 26–47. doi:10.1038/nrneph.2017.156.

Rondeau, E., Scully, M., Ariceta, G., Barbour, T., Cataland, S., et al. (2020) The long-acting C5 inhibitor, Ravulizumab, is effective and safe in adult patients with atypical hemolytic uremic syndrome naïve to complement inhibitor treatment. *Kidney International*. 97 (6), 1287–1296. doi:10.1016/j.kint.2020.01.035.

Ruan, C.-C., Ge, Q., Li, Y., Li, X.-D., Chen, D.-R., Ji, K.-D., Wu, Y.-J., Sheng, L.-J., Yan, C., Zhu, D.-L. & Gao, P.-J. (2015) Complement-Mediated Macrophage Polarization in Perivascular Adipose Tissue Contributes to Vascular Injury in Deoxycorticosterone Acetate–Salt Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 35 (3), 598–606. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304927.

Schreiber, A., Shulhevich, Y., Geraci, S., Hesser, J., Stsepankou, D., Neudecker, S., Koenig, S., Heinrich, R., Hoecklin, F., Pill, J., Friedemann, J., Schweda, F., Gretz, N. & Schock-Kusch, D. (2012) Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 303 (5), F783–F788. doi:10.1152/ajprenal.00279.2012.

Seniuk, A., Thiele, J.L., Stubbe, A., Oser, P., Rosendahl, A., Bode, M., Meyer-Schwesinger, C., Wenzel, U.O. & Ehmke, H. (2020) B6.Rag1 Knockout Mice Generated at the Jackson Laboratory in 2009 Show a Robust Wild-Type Hypertensive Phenotype in Response to Ang II (Angiotensin II). *Hypertension*. 75 (4), 1110–1116. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13773.

Skjeflo, E.W., Brækkan, S.K., Ludviksen, J.K., Snir, O., Hindberg, K., Mollnes, T.E. & Hansen, J.-B. (2021) Elevated plasma concentration of complement factor C5 is associated with risk of future venous thromboembolism. *Blood*. 138 (21), 2129–2137. doi:10.1182/blood.2021010822.

Springer, A.D. & Dowdy, S.F. (2018) GalNAc-siRNA Conjugates: Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics. *Nucleic Acid Therapeutics*. 28 (3), 109–118. doi:10.1089/nat.2018.0736.

Weiss, S., Rosendahl, A., Czesla, D., Meyer-Schwesinger, C., Stahl, R.A.K., Ehmke, H., Kurts, C., Zipfel, P.F., Köhl, J. & Wenzel, U.O. (2016) The complement receptor C5aR1 contributes to renal damage but protects the heart in angiotensin II-induced hypertension. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 310 (11), F1356–F1365. doi:10.1152/ajprenal.00040.2016.

Wenzel, U., Turner, J.E., Krebs, C., Kurts, C., Harrison, D.G. & Ehmke, H. (2016) Immune Mechanisms in Arterial Hypertension. *Journal of the American Society of Nephrology*. 27 (3), 677–686. doi:10.1681/ASN.2015050562.

Wenzel, U.O., Bode, M., Köhl, J. & Ehmke, H. (2017) A pathogenic role of complement in arterial hypertension and hypertensive end organ damage. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 312 (3), H349–H354. doi:10.1152/ajpheart.00759.2016.

Wenzel, U.O., Kemper, C. & Bode, M. (2021) The role of complement in arterial hypertension and hypertensive end organ damage. *British Journal of Pharmacology*. 178 (14), 2849–2862. doi:10.1111/bph.15171.

Zhang, C., Li, Y., Wang, C., Wu, Y., Cui, W., Miwa, T., Sato, S., Li, H., Song, W.-C. & Du, J. (2014a) Complement 5a Receptor Mediates Angiotensin II-Induced Cardiac Inflammation and Remodeling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 34 (6), 1240–1248. doi:10.1161/ATVBAHA.113.303120.

Zhang, C., Li, Y., Wang, C., Wu, Y. & Du, J. (2014b) Antagonist of C5aR Prevents Cardiac Remodeling in Angiotensin II-Induced Hypertension. *American Journal of Hypertension*. 27 (6), 857–864. doi:10.1093/ajh/hpt274.

Zhang, R., Inagawa, H., Kazumura, K., Tsuchiya, H., Miwa, T., Morishita, N., Uchibori, S., Hanashiro, J., Masaki, T., Kobara, H. & Soma, G.-I. (2018) Evaluation of a Hypertensive Rat Model Using Peripheral Blood Neutrophil Activity, Phagocytic Activity and Oxidized LDL Evaluation. *Anticancer Research*. 38 (7), 4289–4294. doi:10.21873/anticancer.12726.

Zhou, B., Carrillo-Larco, R.M., Danaei, G., Riley, L.M., Paciorek, C.J., et al. (2021) Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *The Lancet*. 398 (10304), 957–980. doi:10.1016/S0140-6736(21)01330-1.

11 Abbildungsverzeichnis

Material und Methoden:

Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf und Übersicht des Ang II-Modells.	6
Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf und Übersicht des DOCA-Salz Modells.	7

Anwendung der C3-siRNA im Ang II-Versuch:

Abbildung 3: Genetische Expression und Plasmakonzentration von C3.	13
Abbildung 4: Progression des Blutdrucks.	14
Abbildung 5: 14-tägige Überlebensrate im Ang II-Versuch.	15
Abbildung 6: Relativiertes Nierengewicht.	15
Abbildung 7: Histologische Auswertung.	16
Abbildung 8: Albuminurie im Verlauf des Versuches.	17
Abbildung 9: Nierenfunktion und Plasmakonzentrationen.	18
Abbildung 10: Expression von Markern renaler Schädigung	19
Abbildung 11: Relativierte Herzgewichte.	20
Abbildung 12: Kardialer Schaden anhand Expression von ANP und BNP.	20
Abbildung 13: FACS-Analyse myeloider Zellen.	21
Abbildung 14: FACS-Analyse lymphatischer Zellen.	22

Anwendung der C3-siRNA im DOCA-Salz Versuch:

Abbildung 15: Expression und Plasmakonzentration von C3.	23
Abbildung 16: Progression des Blutdrucks.	24
Abbildung 17: Überlebensrate im DOCA-Salz Versuch.	24
Abbildung 18: Relativiertes Nierengewicht.	25
Abbildung 19: Histologische Auswertung.	26
Abbildung 20: Albuminurie im Verlauf des Versuches.	27
Abbildung 21: Verlauf der Nierenfunktion und Plasmakonzentrationen.	28
Abbildung 22: Expression von Markern renaler Schädigung.	29
Abbildung 23: Relativierte Herzgewichte.	29
Abbildung 24: Kardialer Schaden anhand Expression von ANP und BNP.	30
Abbildung 25: FACS-Analyse myeloider Zellen.	31
Abbildung 26: FACS-Analyse lymphatischer Zellen.	32

Anwendung der C5-siRNA im Ang II-Versuch:

Abbildung 27: Genetische Expression und Plasmakonzentration von C5.	33
Abbildung 28: Progression des Blutdrucks.	34
Abbildung 29: 14-tägige Überlebensrate im Ang II-Versuch.	34
Abbildung 30: Relativiertes Nierengewicht.	35
Abbildung 31: Histologische Auswertung.	36
Abbildung 32: Albuminurie im Verlauf des Versuches.	37
Abbildung 33: Nierenfunktion und Plasmakonzentrationen.	37
Abbildung 34: Expression von Markern renaler Schädigung.	38
Abbildung 35: Relativiertes Herzgewicht.	39
Abbildung 36: Kardialer Schaden anhand Expression von ANP und BNP.	40
Abbildung 37: FACS-Analyse myeloider Zellen.	40
Abbildung 38: FACS-Analyse lymphatischer Zellen.	41

Anwendung der C5-siRNA im DOCA-Salz Versuch:

Abbildung 39: Genetische Expression und Plasmakonzentration von C5.	42
Abbildung 40: Progression des Hypertonus.	43
Abbildung 41: Überlebensrate im DOCA-Salz Versuch.....	43
Abbildung 42: Relativiertes Nierengewicht.	44
Abbildung 43: Histologische Auswertung.	45
Abbildung 44: Albuminurie im Verlauf des Versuches.	46
Abbildung 45: Verlauf der Nierenfunktion und Plasmakonzentrationen.	47
Abbildung 46: Expression von Markern renaler Schädigung.	48
Abbildung 47: Relativierte Herzgewichte.	49
Abbildung 48: Kardialer Schaden anhand Expression von ANP und BNP.	49
Abbildung 49: FACS-Analyse myeloider Zellen.	50
Abbildung 50: FACS-Analyse lymphatischer Zellen.	51

Complement component C3 as a new target to lower albuminuria in hypertensive kidney disease

Marlies Bode¹ | Jan Niklas Diemer¹ | The Vinh Luu¹ | Nikolas Ehnert¹ |
 Teresa Teigeler¹ | Thorsten Wiech^{2,3} | Maja T. Lindenmeyer^{1,2} |
 Georg R. Herrnschmidt¹ | Jasmin Bülow⁴ | Tobias B. Huber^{1,2} | Nicola M. Tomas^{1,2} |
 Ulrich O. Wenzel^{1,2} 

¹III. Department of Medicine, University Hospital Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

²Hamburg Center for Kidney Health (HCKH), University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

³Institute for Pathology, Section Nephropathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

⁴Institute of Orthopedic Research and Biomechanics, University Medical Center Ulm, Ulm, Germany

Correspondence

Ulrich Wenzel, III. Department of Medicine, University Hospital Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52; 20246 Hamburg, Germany.
 Email: wenzel@uke.de

Funding information. The study was supported by German Research Foundation grants. We 1688/19-1 to UOW and the SFB 1192. UOW is a member of the Scientific Network on 'Strategies for therapeutic targeting of the Aldosterone Mineralocorticoid Receptor signaling pathway (ADMIRE network)', funded by the German Research Foundation (DFG – ID 470188766). NMT is supported by the German Research Foundation (TO1013). The European Renal cDNA Bank - Kröner-Fresenius biopsy bank (ERCB-KFB) was supported by the Else Kröner-Fresenius Foundation. We also thank all participating centres of the ERCB-KFB and their patients for their cooperation.

Background and Purpose: Complement activation may drive hypertension through its effects on immunity and tissue integrity.

Experimental Approach: We examined expression of C3, the central protein of the complement cascade, in hypertension.

Key Results: Increased C3 expression was found in kidney biopsies and micro-dissected glomeruli of patients with hypertensive nephropathy. Renal single cell RNA sequence data from normotensive and hypertensive patients confirmed expression of C3 in different cellular compartments of the kidney. In angiotensin II (Ang II) induced hypertension renal C3 expression was up-regulated. C3^{-/-} mice revealed a significant lower albuminuria in the early phase of hypertension. However, no difference was found for blood pressure, renal injury (histology, glomerular filtration rate, inflammation) and cardiac injury (fibrosis, weight, gene expression) between C3^{-/-} and wildtype mice after Ang II infusion. Also, in deoxycorticosterone acetate (DOCA) salt hypertension, a significantly lower albuminuria was found in the first weeks of hypertension in C3 deficient mice but no significant difference in renal and cardiac injury. Down-regulation of C3 by C3 targeting GalNAc (*n*-acetylgalactosamine) small interfering RNA (siRNA) conjugate decreased C3 in the liver by 96% and lowered albuminuria in the early phase but showed no effect on blood pressure and end-organ damage. Inhibition of complement C5 by siRNA showed no effect on albuminuria.

Conclusion and Implications: Increased C3 expression is found in the kidneys of hypertensive mice and men. Genetic and therapeutic knockdown of C3 improved albuminuria in the early phase of hypertension but did not ameliorate arterial blood pressure nor renal and cardiac injury.

Abbreviations: Ang II, angiotensin II; ANP, atrial natriuretic peptide; BNP, brain natriuretic peptide; C3, complement factor 3; CCL2, CC-chemokine ligand 2; DOCA, deoxycorticosterone acetate; CD, clusters of differentiation; Foxp3, forkhead box P3; GalNAc, N-acetylgalactosamine; GFR, glomerular filtration rate; IFN, interferon; KIM-1, kidney injury molecule-1; M/M, monocytes/macrophages; NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; RORyt, retinoic-acid receptor-related orphan receptor gamma t; PAS, periodic acid Schiff; scRNAseq, single cell RNA sequencing; RORyt, retinoic-acid receptor-related orphan receptor gamma t; SRFG, sirius red/fast green.

Marlies Bode, Jan Niklas Diemer and The Vinh Luu contributed equally.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *British Journal of Pharmacology* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Pharmacological Society.

KEYWORDS

albuminuria, angiotensin II, C3, cardiac damage, DOCA salt, renal damage

1 | INTRODUCTION

Recent data suggest that hypertension and hypertensive end-organ damage are not only mediated by hemodynamic injury but also by innate and adaptive immune responses (Drummond et al., 2019; Hengel et al., 2021; van der Heijden et al., 2022; Wenzel et al., 2016, 2020).

The increasing number of clinical conditions that involve a pathological contribution of the complement system has spurred a regained interest in therapeutic options to modulate this host defence pathway. Based on these findings, the pharmaceutical industry has identified the complement system as potential and promising targets in various diseases (Wenzel, Kemper, & Köhl, 2021). The complement system protects the host from a hostile microbial environment and maintains tissue and cell integrity through the elimination of altered or dead cells. As an important effector arm of innate immunity, it also plays a central role in the regulation of adaptive immunity. Thus, complement activation may drive the pathology of hypertension through its effects on innate and adaptive immune responses. The role of complement and especially of anaphylatoxins in hypertension has been reviewed recently by us and others (Ruan & Gao, 2019; Wenzel et al., 2017; Wenzel, Ehmke, & Bode, 2021).

The complement system becomes rapidly activated in a cascade-like fashion when any of the three complement activation pathways, the classical, lectin or alternative pathway are triggered by the presence of pathogens. All three activation pathways culminate in cleavage and activation of the core complement components C3 and C5 into C3a and C3b and C5a and C5b, respectively. C3 is mainly produced by the liver but can also be formed in other organs. However, the specific regulation and its role in health and disease are still unclear.

Recent work has demonstrated the critical importance of extrahepatic tissue-specific C3 expression in various diseases. C3 in pancreatic islets prevents β cell death by regulating autophagy (King et al., 2019). In lung epithelial cells produced C3 protects against pneumonia (Sahu et al., 2023). Interestingly, C3 produced in the kidney may protect against **adriamycin (doxorubicin)** induced nephropathy (Sheerin et al., 2008). Beside these so called non canonical functions knockout or inhibition of liver derived C3 shuts down important effects of the complement system like the anaphylatoxins that recruit cells or the membrane attack complex C5b-9, which can damage or destroys cells. Elevated levels of serum C3 are associated with prehypertension in a study with over 7000 individuals, and high C3 concentrations in plasma are associated with future increases in blood pressure and the development of hypertension (Bao et al., 2017; Engström et al., 2007). This is in contrast to disease like systemic lupus erythematosus or postinfectious glomerulonephritis, in which consumption of C3 is a marker of disease activity.

What is already known

- Complement may play a role in arterial hypertension.

What does this study adds

- C3 inhibition by genetic knockout or siRNA lowers early albuminuria in two different models of arterial hypertension.

What is the clinical significance

- C3 inhibition may be a new therapeutic option to lower albuminuria in renal disease.

Therefore, we asked whether C3 is produced in the kidney in hypertension and whether its inhibition is protective or harmful. To determine the role of C3 in hypertension we first examined gene and protein expression of C3 in kidney biopsies from hypertensive patients. Next, we induced **angiotensin II (Ang II)** and **deoxycorticosterone acetate (DOCA)** salt hypertension in wildtype and C3 deficient mice and examined albuminuria as well as renal and cardiac injury. Finally, we down-regulated C3 and C5 by a small interfering RNA (siRNA) approach.

Overall, we aimed first to test the hypothesis that C3 is overexpressed in the kidney of hypertensive patients and secondly to examine whether C3 deficiency or inhibition of C3 reduces hypertension and hypertensive injury in different models of hypertension.

2 | METHODS

2.1 | Kidney biopsies

From the archive of the institute of pathology, section for nephropathology of the University Hospital Hamburg-Eppendorf (UKE) 30 biopsies of patients histopathologically diagnosed with so called malignant hypertension or stenosing arteriosclerosis were selected. The renal biopsy specimens were routinely examined by light microscopy, immunohistochemistry and electron microscopy. The diagnosis of malignant nephrosclerosis was defined as renal biopsy-proven vascular chronic changes: onion skin lesions, intimal fibrosis and arteriolar hyalinosis. Cases with clinical or serological evidence of malignancy,

TABLE 1 Patient characteristics.

	Thin basement membrane	Malignant nephrosclerosis
<i>n</i>	5	30
Age (years)	47.6 ± 5.0	48.2 ± 2.3
Male/female	4/1	27/3
Creatinine (mg·dl ⁻¹)	1.2 ± 0.3	5.5 ± 0.8

autoimmune disease, infection, drugs or pregnancy were excluded. Concurrent glomerulonephritis (GN) [e.g. immunoglobulin A (IgA) nephropathy] was also ruled out. For comparison, we took biopsies from patients with thin glomerular basement membrane disease. Characteristics of both groups are shown below (Table 1). This is a non-immunologic mediated renal disease. So called zero-hour implantation biopsies of kidney allografts are not helpful since they may show complement activation due to the death of the donor. Approval by the ethics committee of the city of Hamburg (WF-011/15) was obtained.

2.2 | C3 immunohistochemistry

Sections (1 µm) of paraffin blocks were cut and deparaffinized. Enzyme-induced epitope retrieval was performed for 15 min with proteinase (protease P-8038) at 40°C. Subsequently, primary antibodies specific for C3c (1:3000, DAKO A0062) were applied for 30 min at 40°C, and bound antibodies were then visualized manually using a standard APAAP (Alkaline Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase) protocol. C3b and C3c antibodies can be used to identify C3 in tissue.

2.3 | Human microarray analysis

Human renal biopsy specimens were collected in an international multicentre study, the European Renal cDNA Bank-Kröner-Fresenius biopsy bank (ERCB-KFB, Cohen et al., 2002). Biopsies were obtained from patients after informed consent and with approval of the local ethics committees. Following renal biopsy, the tissue was transferred to RNase inhibitor and micro dissected into glomeruli and tubule-
interstitium. Total RNA was isolated from micro-dissected glomeruli and tubuli, reverse transcribed, and linearly amplified according to a protocol previously reported (Cohen et al., 2002). Glomerular and tubular samples were analysed for mRNA expression levels (GSE32591, GSE35489, GSE37463 and GSE99340). Analysis included gene expression profiles from patients with hypertensive nephropathy (glomeruli *n* = 15, tubuli *n* = 21), as well as controls (living donors, glomeruli *n* = 41, tubuli *n* = 42). CEL file normalization was performed with the Robust Multichip Average method using RMAExpress (Version 1.20) and the human Entrez-Gene custom CDF annotation from Brain Array version 25 (http://brainarray.mbnl.med.umich.edu/Brainarray/Database/Custom/CDF_download.asp). The log-transformed dataset was corrected for batch effect using ComBat

from the GenePattern pipeline (<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern/>). To identify differentially expressed genes, the SAM (Significance Analysis of Microarrays) method (Tusher et al., 2001) was applied using SAM function in Multiple Experiment Viewer (TiGR MeV, Version 4.9). A *q*-value below 5% was considered to be statistically significant.

2.4 | scRNA-seq analysis

Pre-processed, quality controlled scRNA-seq data of 51,849 CD10^{negative} single cells from kidney biopsies of patients with hypertensive nephropathy or healthy controls were obtained from Kuppe et al. (Kuppe et al., 2021) and re-analysed using scRNA-seq analysis R package Seurat (version 4.1.0). More than 80% of renal cortical cells are proximal tubular epithelial cells and are dominating single cell maps, and masking other populations. Therefore, analysis was performed in a data set using viable, non-proximal tubular cells sorted for (CD10^{negative}). CD10 was used as a marker of proximal tubule cells. However, also CD10^{negative} cells contain proximal tubule cells. We used LogNormalize method in Seurat to normalize the scRNA-seq data before scaling by ScaleData function (default parameters). Highly variable genes were identified by function FindVariableFeatures, selection.method = 'vst', nfeatures = 2000. Principal component analysis was performed on the scaled data (function RunPCA, npcs = 50) to reduce dimensionality. Principal components were used to compute the KNN graph based on the Euclidean distance (function FindNeighbors) to subsequently generate cell clusters using function FindClusters. Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) was used to visualize clustering results. The top DEG in each cluster were found using the FindAllMarkers function (min.pct = 0.25, logfc.threshold = 0.25) that ran Wilcoxon rank sum tests. The top marker genes were then compared and validated with the original publication and used to determine the cell types of each cluster. Seurat functions Average Expression and DoHeatmap were used to visualize cluster identifying marker genes for each cell cluster. C3 gene expression was visualized by using Seurat functions FeaturePlot and DotPlot. Disease condition stratified C3 expression was visualized using Seurat function VlnPlot and modified by python package Seaborn (version 0.11.2).

2.5 | Mice and experimental groups

C3^{-/-} and matched wildtype male mice on the C57black6 background were used. C3^{-/-} mice were obtained from The Jackson laboratory, Bar Harbour, USA. Wildtype mice were randomly distributed between control and hypertensive group, while every C3 knockout mouse was allocated to hypertension. First, in the hospital several rounds of revisions were carried out with the UKE's animal welfare officers. Next the application was submitted to the approving authority. Here, it was discussed and send back with questions, comments and corrections by a \$15 commission. This commission is a commission under the

animal welfare act. If the commission gave finally the OK, the application was approved by the authority. Finally, the application for this project funded by the German Research Foundation contained an obligatory part that explains in detail the Replacement, Reduction and Refinement strategies used within this study and are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Percie du Sert et al., 2020) and with the recommendations made by the British Journal of Pharmacology (Lilley et al., 2020). Mice were used since the complex interplay of innate immunity, arterial hypertension and end organ damage cannot be examined *in vitro*. All experiments were performed in accordance with the journal's guidelines on animal welfare. Handling of mice was not done in a completely blinded fashion since normotensive and hypertensive animals are easily distinguished. However, hypertensive wildtype and knockout mice were not specifically labelled but kept in separate cages. Water and chow (Altromin 1328 P best) were made available *ad libitum*. Animal welfare criteria were body weight, general state of health (fur and eye condition, posture, temperature and colour of ears and feed), behaviour and wound healing. Animals were removed from the experiment when the previously defined termination criteria were met.

2.6 | Ang II-induced hypertension

Due to the fact that mice of the C57black strain are resistant to hypertensive renal injury by Ang II infusion (Wesseling et al., 2005), we induced an accelerated model of hypertension as previously described by us (Ahadzadeh et al., 2018; Weiss et al., 2016). C3^{-/-} mice have no renal phenotype (Cui et al., 2019). Also, in the present study no difference was found between C3 deficient and wildtype mice for albumin/creatinine ratio (0.13 ± 0.02 vs. 0.10 ± 0.01 mg·mg⁻¹) before start of the experiment at 10 weeks. Therefore, normotensive C3^{-/-} mice were not examined in the current experiment to reduce the number of mice as defined by ARRIVE guidelines. For the induction of hypertension mice, aged 10 weeks were uninephrectomized on day 0. Anaesthesia was given by 4% isoflurane and analgesia by 0.1 mg·kg⁻¹ buprenorphine s.c. as well as tramadol in the drinking water (0.5 mg·ml⁻¹) starting 1 day before surgery and lasting for 1 day after surgery. During anaesthesia, the mice body temperature was maintained by placing them on a heated surface and they were allowed to breath spontaneously. Mice received 0.9% NaCl in the drinking water starting on day 7 followed by constant administration of 1.5 ng of Ang II (Bachem, Switzerland) per gram body weight per minute through subcutaneously implantation of an osmotic minipump (Alzet 1002, Cupertino, USA) on day 14. Mice were killed by exposure to CO₂ flowed by dislocation of the neck at day 28, 2 weeks after commencement of Ang II infusion as described by us and depicted in Figure S1 (Ahadzadeh et al., 2018; Weiss et al., 2016). In total 30 wildtype mice (11 wildtype controls, 19 wildtype Ang II) and 17 C3-deficient mice were enrolled in the study. In a short-term experiment, albuminuria was measured 3 days and organs were removed 4 days after start of Ang II infusion (5 controls, 5 wildtype + Ang II, 15 C3^{-/-} + Ang II, no mortality).

2.7 | DOCA salt induced hypertension

At day 0 unilateral nephrectomy was performed in mice aged 10 weeks. Mice were housed in type II long cages with two to four mice per cage. A deoxycorticosterone acetate (DOCA) pellet (25 mg, 21-day release, Innovative Research of America, USA) was implanted subcutaneously, and 0.9% NaCl added to the drinking water. Anaesthesia was given by 4% isoflurane and analgesia by 0.1 mg·kg⁻¹ buprenorphine s.c. and tramadol in the drinking water. After 21 days, the DOCA pellet was renewed, after 42 days the mice were killed and organs removed as depicted in Figure S1. In total 29 mice (six wildtype controls, eight wildtype DOCA salt and 15 C3-deficient mice DOCA salt were enrolled in the study).

2.8 | Systolic blood pressure

Systolic blood pressure was measured with a computerized tail-cuff system (MC4000, Hatteras Instruments, USA) as described (Ahadzadeh et al., 2018; Weiss et al., 2016). For the measurements, the animals were placed into the small measurement chambers and the tails were put through the cuffs. Mice were restrained by the size of the measurement chamber, that did not allow movement of the mice. While rising slowly (within some seconds) the pressure in the cuffs the pulse is measured at the tail via a piezo element. The systolic pressure is reached at the point where no pulse signal is observed anymore. After that, the pressure is released (within 1–2 s). Every measurement has five adaptation cycles and 10 measurement cycles. For a reliable measurement, we trained the animals four to five times and rewarded them after every training with fruit puree. With appropriate training and device tail cuff measured blood pressure is reliable (Kurtz et al., 2005).

2.9 | Glomerular filtration rate (GFR) measurement

GFR was measured transcutaneously in conscious mice. The technique relies on a miniaturized device equipped with an internal memory that permits the transcutaneous measurement of the elimination kinetics of the fluorescent renal marker FITC-sinistrin. The device is started to measure the background signal for 1 min before the FITC-sinistrin is given by retrobulbar injection. The measurement runs for 1 h while mice are awake and have free access to food and water. GFR is calculated from FITC-sinistrin plasma clearance with 'MPD lab' software (Schreiber et al., 2012).

2.10 | Plasma and urine analysis

Mice were placed into metabolic cages for a 6-hour urine collection. At the end of the experimental period, heparinized blood was collected. Plasma cholesterol and urine creatinine were measured by an autoanalyzer (Ahadzadeh et al., 2018; Weiss et al., 2016). Albumin was

measured by ELISA (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA). Albumin/creatinine ratio was calculated to assess the extent of albuminuria.

2.11 | Histopathologic analysis

After removal of kidney and heart, tissues were fixed with 4% neutral buffered formalin, embedded in paraffin and sectioned at 1 μ m thickness. Sections were then deparaffinized and stained for light microscopy with PAS (renal tissue) or Sirius Red Fast Green (SRFG, cardiac tissue). Glomerular injury was evaluated histologically using a semi-quantitative scale with 0 indicating normal architecture, 1 mild injury in less than a third of the glomerular tuft (small mesangial expansion with matrix, cells and sclerosis), 2 damage of more than a third of the glomerular tuft, and 3 damage of the whole glomerulus. Under 400 $\times$ magnification, 30 glomeruli per animal were analysed (Krebs et al., 2014). The glomerular size was measured by computer-aided assessment. Tubulointerstitial damage was assessed by using a semi quantitative scale with 0 indicating no injury, 1 mild injury, 2 moderate and 3 intensive injury. Injury was defined by widening of tubular lumen, flattening and atrophy of tubular cells with enlargement of the basement membrane and widening and scarring of the interstitial space. Under 400 $\times$ magnification 30 fields per kidney were analysed (Ahadzadeh et al., 2018; Weiss et al., 2016). Cardiac fibrosis was evaluated by scoring heart sections using a scoring from 0 to 3 as described by us (Krebs et al., 2012). Ratings covered values between categories. Scoring was done in a blinded fashion.

2.12 | Confocal microscopy

Paraffin sections (3–4 μ m) of formalin fixed paraffin embedded human or mouse kidneys were deparaffinized and rehydrated to water. Antigen retrieval was obtained by boiling in Dako Target Retrieval pH 9 (Dako, Carpinteria) for 30 min in a steamer at constant 98°C, or by digestion with protease XXIV (5 μ g $\cdot$ ml⁻¹) for 15 min at 37°C. Unspecific binding was blocked with 5% horse serum (Vector Laboratories) with 0.05% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS for 30 min at room temperature before incubation at 4°C overnight with primary antibodies in blocking buffer. Staining was visualized with affinity purified, fluorochrome-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories or Invitrogen; 1:200) for 30 min at RT in blocking buffer. Nuclei were counterstained with DRAQ5 (1:1000; Cell Signalling 40,482), DAPI (1:400) or Hoechst 33342, (1:1000; Sigma-Aldrich). Sections were mounted with Fluoromount-G (Invitrogen). Optical images were obtained using the inverted laser confocal microscope LSM800 from Zeiss. Representative images were obtained using the Airyscan with 4-line averages and stored in 1024 $\times$ 1024 or 2048 $\times$ 2048 pixel frames with 16-bit colour depth. Enlargements are re-imaged zooms of the overview images (not enlargements of the overview image).

In human biopsies, C3b was localized using an anti-C3b antibody (mouse, 1:1000; Abcam ab11871). In mouse kidneys, C3 was localized using an anti-C3 antibody (fluorescein isothiocyanate(FITC) goat anti-C3, 1:100; Cappel 55500).

2.13 | Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA from kidney cortex or heart ventricles was isolated using the RNeasy kit (Qiagen, Netherlands). Real-time quantitative PCR was performed using Thermo Fisher Scientific's Quantstudio 3 system and PowerUp SYBR Green Mastermix (Thermo Fisher Scientific, USA). Mouse-specific PCR primers were used. The levels of mRNA expression in each sample were normalized to 18S rRNA expression (Krebs et al., 2012; Lehnert et al., 2014).

2.14 | *In situ* hybridization via RNAscope

Target mRNAs were detected with the RNAscope® 2.5 Brown kit using the RNAscope® Probe-Mm-C3-O2 (Advanced Cell Diagnostics ACD, Hayward, CA, USA). The *in situ* hybridization was performed according to the manufacturer's instructions. Kidney tissue was fixed with 4% neutral buffered formalin solution, dehydrated in an ascending ethanol and xylol series and embedded in paraffin. Hybridization signals were detected on 5- μ m tissue sections using diaminobenzidine (DAB) staining. Nuclei were counterstained with haematoxylin. Slices were mounted with Entellan™. To ensure interpretable results, positive and negative controls were routinely enclosed and evaluated.

2.15 | Flow cytometry

Kidneys were minced and incubated in digestion medium (Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 containing 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin, 1% HEPES, 0.1 mg $\cdot$ ml⁻¹ DNase and 0.4 mg $\cdot$ ml⁻¹ Collagenase D). To obtain a single-cell solution, kidneys were dissociated using the gentleMACS Dissociator. A Percoll gradient was used to further purify viable cells from cell debris. Erythrocytes were lysed with ammonium chloride. For flow cytometry, cells were surface-stained with fluorochrome-conjugated antibodies:- CD45 (30-F11), CD3 (17A2), γ TCR (GL3), CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7), CD11b (M1/70), Ly6G (1A8), CD11c (N418/HL3), MHCII (M5/114.15.2), Ly6C (AL-21/HK1.4) and F4/80 (BM8) (Biolegend, San Diego, USA, and BD Biosciences, Franklin Lakes, USA). Dead cells were excluded during flow cytometry via LIVE/DEAD staining (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, USA). After permeabilization the cells were stained for the transcriptional factors ROR γ t (Q31-378), FoxP3 (FJK-16s), Tbet (4B10) and GATA3 (L50-823) (BD Biosciences) and fixated (FoxP3/Transcription Staining Buffer Set) (Invitrogen). Data analysis was performed with FlowJo (Tree Star, USA).

2.16 | C3 siRNA

C3 was down-regulated by a siRNA approach. A subcutaneously administered N-acetylgalactosamine (GalNAc)-conjugated small interfering RNA (siRNA) targeting the C3 component of complement that silences C3 expression in the liver was used. GalNAc-siRNA conjugates bind to the asialoglycoprotein receptor (ASGPR) that is hepatocyte specific and expressed at a high level. This approach inhibits hepatic C3 production but does not affect extrahepatic C3 production. GalNAc-conjugated siRNAs targeting C3 and used as described (Kusner et al., 2019). Mice were randomly separated into two groups. The 10- μ g siRNA per 1-g body weight of C3 targeting GalNAc siRNA or control GalNAc conjugated siRNA targeting luciferase were administered subcutaneously every 2 weeks. First injection was given 1 week before start of Ang II infusion and the second injection 1 week after start of Ang II infusion. Four normotensive mice were used; 11 mice received control siRNA mice, whereas nine mice received C3 siRNA. Survival was six of 11 in the control siRNA and nine of 11 in the C3 siRNA group. Since variability is low in all parameters measured in normotensive control mice only four normotensive mice were studied. To examine the effect of a delayed start of C3 inhibition C3 siRNA was injected 3 days after start of Ang II infusion in another experiment (five controls, nine Ang II + control siRNA, 10 Ang II + C3 siRNA, mortality 2 in control siRNA and 1 in C3 siRNA).

2.17 | C5 siRNA

For the down-regulation of C5 an identical protocol as for C3 was used. Eleven mice received C5 siRNA (10- μ g siRNA per 1 g body weight) and survival was 9 of 11 mice in this group.

2.18 | Western blot analysis

Protein samples were prepared for western blot analysis by addition of T-Per buffer (Thermo Fisher Scientific, USA) and subsequent sonication. Proteins (10 μ g) were separated by electrophoresis in precast gels (Bio-Rad, USA) containing SDS in an electrophoresis chamber (Bio Rad, USA) in the presence of a migration buffer. Proteins were then transferred to methanol soaked PVDF membranes (Millipore) under semidry conditions using Transblot Turbo (Bio-Rad, USA) at 25 V constant for 30 min. Membranes were blocked in 3% dry milk with TBST (Tris buffered saline with Tween 20) and then incubated overnight with primary antibody. Incubation with secondary antibodies for 1 h at room temperature next day. Goat C3 antibody (GeneTex, USA) was used as primary antibody with SuperBlock Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific, USA) and horse radish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies in 3% dry milk with TBST. Membranes were washed three times for 10 min in TBS-Tween 0.05% after incubation with primary and secondary antibodies. Secondary antibodies were HRP-conjugated donkey anti-goat (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA). Detection was performed with

SuperSignal West Pico Plus Chemiluminescence Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA) and analysed with Amersham Imager 600 (GE Healthcare, USA). For housekeeping analysis of tissue, we used mouse β -actin (Sigma Aldrich, USA) and HRP-conjugated donkey anti-mouse (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA). Plasma samples were normalized against albumin; therefore the membrane was stained with 0.2% Ponceau S solution (Thermo Fisher Scientific, USA) and analysed with the imager. Since there is no suitable housekeeping protein in urine samples, we adjusted the urine amount of each lane by normalization to 0.3 μ g creatinine for each sample. The Immuno-related procedures used comply with the recommendations made by the *British Journal of Pharmacology* (Alexander et al., 2018).

2.19 | Statistics

Data and statistical analysis complied with the recommendations of the *British Journal of Pharmacology* on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis et al., 2022). For the statistical analysis, GraphPad Prism 8.3.0 was used. The Kolmogorov-Smirnov test was used to test for normal distribution of the values. In case of normal distribution, for multiple comparisons one-way analysis of variance (ANOVA) and post hoc analysis by Tukey's multiple comparisons test with a single pooled variance were performed. If data were not normally distributed, Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test was used. For comparison of two parameters, unpaired t-test for normally distributed and Mann-Whitney test for not normally distributed parameters were used. Post hoc tests were conducted if F in ANOVA achieved $p > 0.05$. Statistics were only done with groups of at least five animals per group ($n = 5$), where n is number of independent values. In addition, albuminuria in Ang II infused mice and blood pressure data were also analysed with a mixed model with Geisser-Greenhouse correction. Post hoc analysis for multiple comparisons was performed by Sidak's multiple comparisons test. Survival percentages were calculated by Kaplan-Meier and survival curves compared with Log-rank (Mantel-Cox) test and Log-rank test for trend. Differences were considered statistically significant at a level of probability smaller than 0.05 ($* = P < 0.05$). The exact p level is not stated.

In addition, histograms of raw albuminuria values showed a right skew in C3 siRNA and DOCA salt. Therefore, they were log10 transformed before regression analyses were analysed using linear mixed effect models with fixed effects for time, group and the interaction of time and group and a random intercept for each mouse. Contrasts between groups for each time point were estimated using estimated marginal means from the emmeans package in R (cite: Russell V. Lenth [2022]. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.7.2. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>). The Kenward-Roger approximation for degrees of freedom was used. P -values from the model are based on standard errors and t-ratios from the mixed effects model. Mixed effect models were calculated and evaluated using R version 4.1.2 (cite: R Core

Team [2021]. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

3 | MATERIALS

Proteinase (protease P-8038 and protease XXIV) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), along with DAPI and Hoechst 33342. Antibodies specific for C3c were obtained from Eching (town, state, Germany). Entellan™ was obtained from Merck Millipore (Billerica, MA, USA). Penicillin, streptomycin, and HEPES were obtained from Life Technologies, Thermo Fisher, Darmstadt, Germany, and DNase and Collagenase D were obtained from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany. Angiotensin II (Ang II) was obtained from Bachem, (Switzerland). GalNAc-conjugated siRNAs targeting C3 were provided by Alnylam Pharmaceuticals Inc. (Cambridge, USA). Isoflurane was obtained from Sedana Medical AB, Sweden; buprenorphine was obtained from Movianto Deutschland GmbH, Germany; and tramadol was obtained from Grünenthal GmbH, Germany. The osmotic minipumps (Alzet 1002) were purchased from Cupertino (USA). Details of other materials and suppliers are provided in the specific sections.

3.1 | Nomenclature of targets and ligands

Key protein targets and ligands in this article are hyperlinked to corresponding entries in the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY <http://www.guidetopharmacology.org> and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2021/22 (Alexander, Christopoulos, et al., 2021; Alexander, Cidlowski, et al., 2021).

4 | RESULTS

4.1 | Expression of C3 in hypertensive nephropathy

First, we localized C3 in human biopsies by confocal microscopy. We examined biopsies from patients with so-called malignant nephrosclerosis, which is the most aggressive form of hypertensive renal injury often leading to end stage renal disease. C3 staining was found in glomeruli and tubular cells as depicted in overview and enlargement in Figure 1a. Different glomerular pattern (mesangial and endothelial) of glomerular C3 staining was found in biopsies with malignant nephrosclerosis as shown in Figure S2. For comparison, we took biopsies from patients with thin glomerular basement membrane disease and found no staining of C3 as shown in Figure 1b.

Next, we quantified C3 staining in human biopsies by immunohistochemistry. For this approach, we examined 30 biopsies from patients with malignant nephrosclerosis. Representative examples and quantification are shown in Figure 1c. The 86% of intact glomeruli

were C3 negative, whereas 71% of damaged glomeruli were C3 positive. 76% of vessels with hyalinosis were positive for C3. 33% of vessels with onionskin lesion were C3 negative and 67% C3 positive (Figure 1c). For comparison, we evaluated five biopsies from patients with thin glomerular basement membrane disease and found no staining of C3 in glomeruli or vessels. In summary, using two different techniques of staining (conventional immunohistochemistry with light microscopy and confocal microscopy with increased contrast and resolution) we found an increased renal C3 staining in hypertensive patients especially in injured tissue.

However, immunohistochemistry of C3 cannot differentiate whether C3 is expressed or just trapped in damaged tissue. Therefore, we took advantage of the European renal cDNA bank (ERCB) and examined C3 expression in renal biopsies from patients with hypertensive nephropathies (n = 21) and compared these data with kidney biopsies from living donors (n = 42). Gene expression data from micro-dissected glomeruli and tubulointerstitium revealed a 2.65-fold glomerular and 2.55-fold tubulointerstitial C3 overexpression in hypertensive patients compared with healthy controls (Figure 1d). After analysing the glomerular and the tubulointerstitial compartment we were interested which cells express C3 in the kidney. Therefore, we next examined C3 expression in a single cell RNAseq approach. Re-analysing an integrated scRNA-seq dataset of renal biopsies from healthy controls and patients with hypertensive nephropathy (Kuppe et al., 2021) revealed relevant C3 expression in different cell types in the kidney (Figure 1e–h). C3 expression was mainly detected in monocytes and dendritic cells, followed in smaller amounts by injured proximal tubule cells and myofibroblasts but not by T cells (Figure 1g). Additionally, an enrichment of C3 expressing monocytes and dendritic cells was found in hypertensive nephropathy (Figure 1h).

4.2 | Expression of C3 in Ang II induced hypertension in mice

As a consequence of the increased expression of C3 in kidney biopsies of hypertensive patients, we decided to further study the role of C3 in two different hypertensive mouse models.

Hypertension was induced by combining Ang II infusion with unilateral nephrectomy and 0.9% salt in the drinking water. Since C3 is mainly produced in the liver, we studied hepatic mRNA expression of C3 first. Hypertension did not change the expression of C3 in the liver compared to normotensive controls (Figure 2a). Furthermore, cardiac expression of C3 was not altered either. However, a significant 15-fold increase was found for C3 mRNA expression in the kidney. Using *in situ* hybridization, we examined where exactly in the kidney C3 is produced. As shown in Figure S3a very low expression was found in control mice. Nevertheless, Ang II induced an increased expression that was mainly found in tubular cells. No expression was found in knockout mice. Since tubules are the most abundant cells of the kidney, this may explain the increased renal C3 expression found by real-time PCR in hypertensive mice. However, we cannot exclude

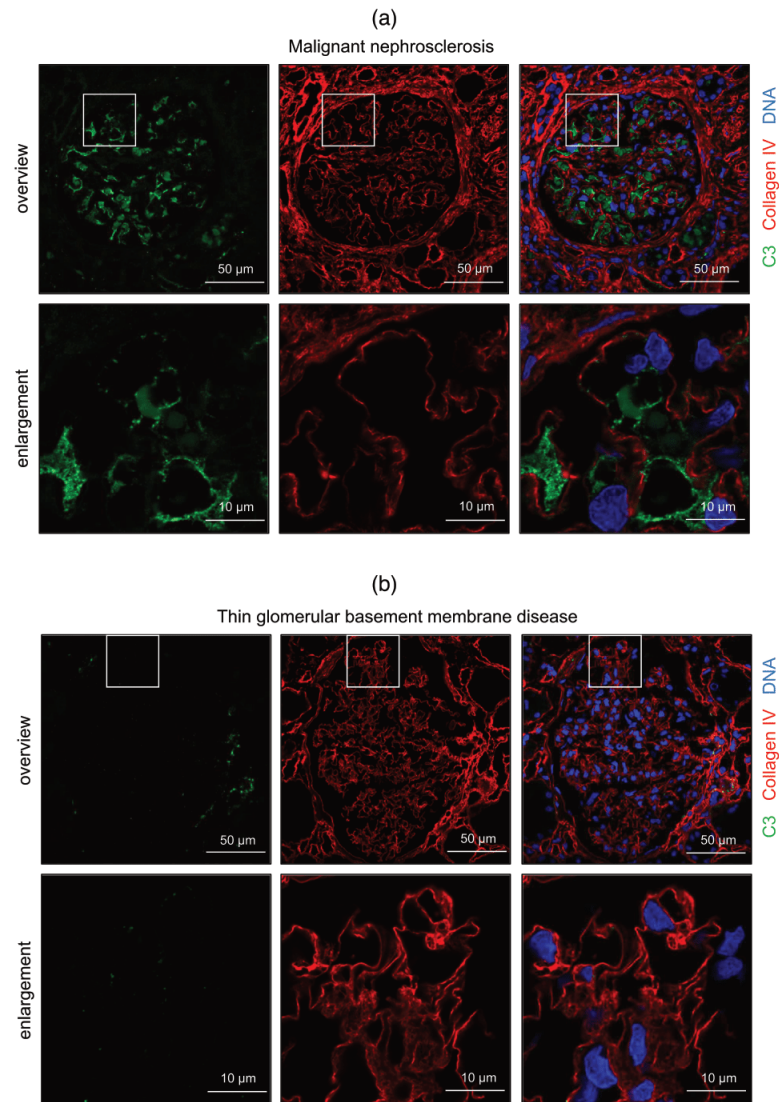


FIGURE 1 Expression of C3 in hypertensive nephropathy. (a) Confocal microscopy shows glomerular and tubular staining in patients with malignant nephrosclerosis. (b) Almost no staining is found in patients with thin basement disease. (c) Immunohistochemistry for C3 in biopsies with malignant nephrosclerosis reveals that intact glomeruli are mostly negative (86%) whereas the majority of damaged glomeruli stains positive (71%). 76% of vessels with hyalinosis (arrows) are positive. 33% of onion skin lesions are negative and 67% positive for C3 (arrows). (d) Gene expression analysis revealed significantly increased glomerular and tubulointerstitial C3 expression in renal biopsies from patients with hypertensive nephropathies compared to kidney biopsies from living donors. (e) Re-analysed reference UMAP embedding of 51,849 CD10^{negative} single cells from 15 human kidneys (n = 6 hypertensive nephropathy, n = 9 healthy control). BC, B cells; PC, plasma cells; Mast, mast cells; Mono/DC, monocytes/dendritic cells; MC, macrophages; NK, NK cells; TC, T cells; IC, intercalated cells; CD, collecting Duct; DCT/UC, distal convoluting tubule/urothel cells; TAL, thick ascending limb; iPT, injured proximal tubule; PT, proximal tubule; DTL/DM, distal convoluted tubule/macula densa; Podo, podocytes; Fib/MF, fibroblast/myofibroblast; vSM/Peri, vascular smooth muscle cell/pericytes; iEN, injured endothelium; LEn, lymph endothelium; GC, glomerular capillaries; Art, arteriolar endothelium; VR, vasa recta. Panel (e) right panel: Scaled gene expression of top cluster identifying genes. Each column is the average expression of all cells in a cluster. (f) UMAP plot showing C3 gene expression (scale bars indicate normalized expression). (g) Dot plot of C3 gene expression in each cluster. The size of the dot denotes the percentage of cells in each cluster expressing C3; the intensity of colour represents mean gene expression. (h) scaled C3 expression stratified by the three main C3 producing cell types and disease condition, blue = hypertensive nephropathy, grey = healthy control. Violin width represents proportion of cluster in each condition. (d) glomeruli t test, tubulointerstitium u-test. * = $P < 0.05$ versus controls.

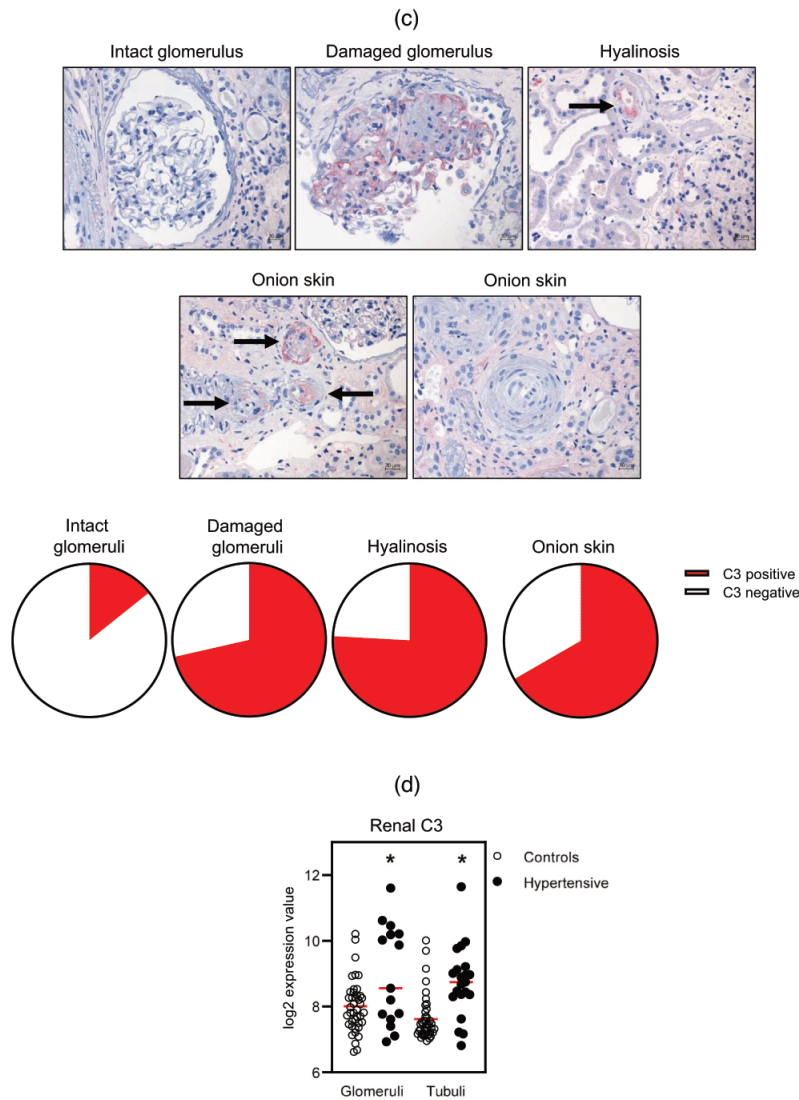


FIGURE 1 (Continued)

that C3 is also up-regulated in myeloid and lymphoid cells since RNAscope may not be sensitive enough to detect changes in these cells in the kidney. Next, we evaluated plasma levels of C3 by western blotting (Figure 2b). No significant difference was found between control and Ang II infused wildtype mice (densitometry 100 ± 2.3 vs. 82.9 ± 4.3). No C3 band was detected in the C3 deficient mice.

In a subset of mice, we further evaluated C3 protein in the kidney by western blotting as demonstrated shown in Figure 2c. Densitometry showed an increased amount of renal C3 protein after Ang II infusion (Figure 2d), which is supported by confocal microscopy revealing enhanced C3 staining in Ang II mice (Figure S3b).

4.3 | C3 deficiency decreases albuminuria

Our RNA and protein data clearly show an up-regulation of renal C3 in hypertensive patients and mice. Subsequently, we tested whether C3 deficiency influences hypertension and hypertensive end organ damage in mice. We first evaluated albuminuria as a hallmark of hypertensive renal injury. No albuminuria was found in wildtype and C3-deficient mice at the beginning of the experiment indicating that the knockout mice do not have a basal renal phenotype or renal abnormalities as shown in Figure 3a. Ang II infusion induced heavy albuminuria on day 3, 7 and 13. Significantly less albuminuria was found in C3-deficient mice in day 3 (Figure 3b). On day 7 it was

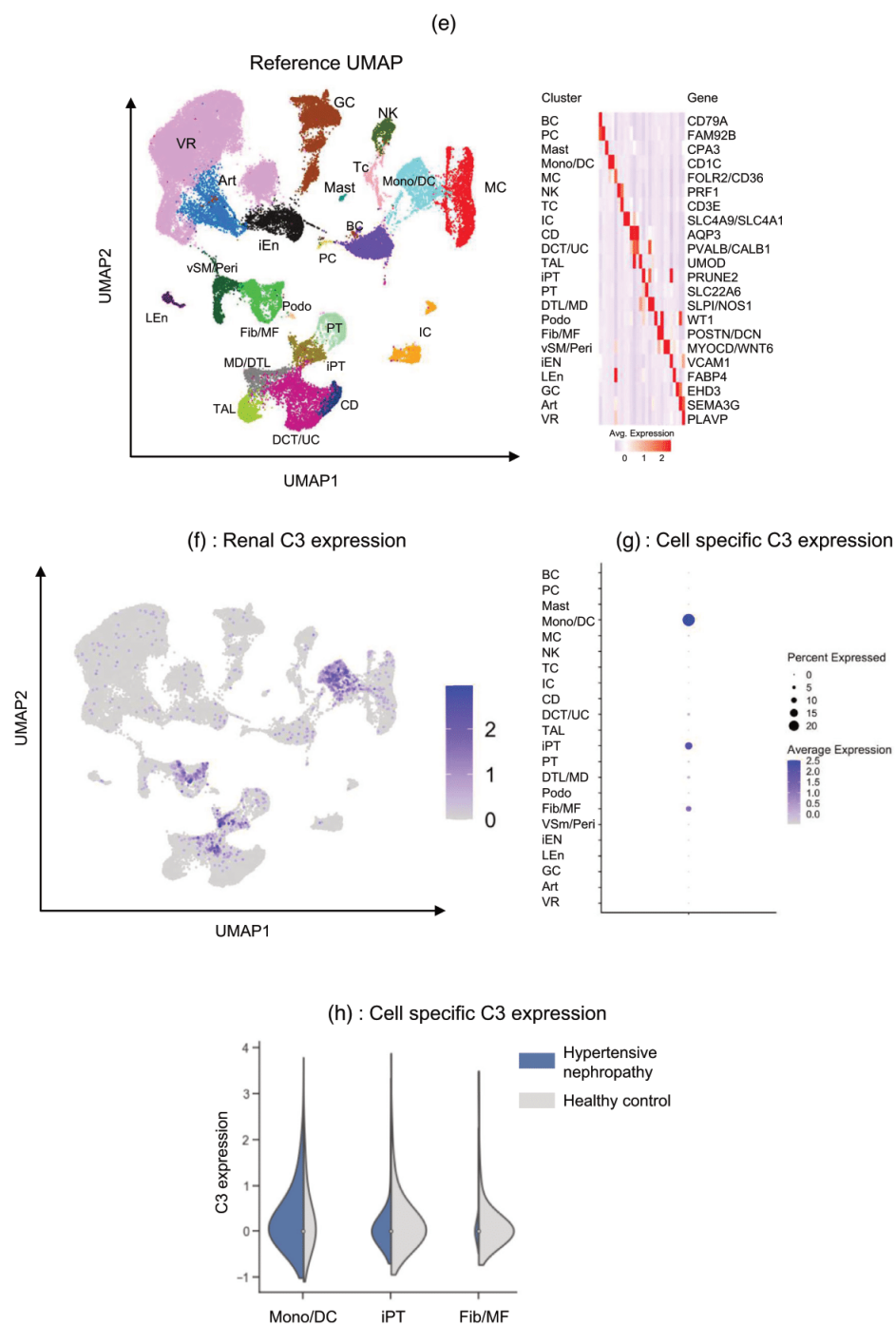


FIGURE 1 (Continued)

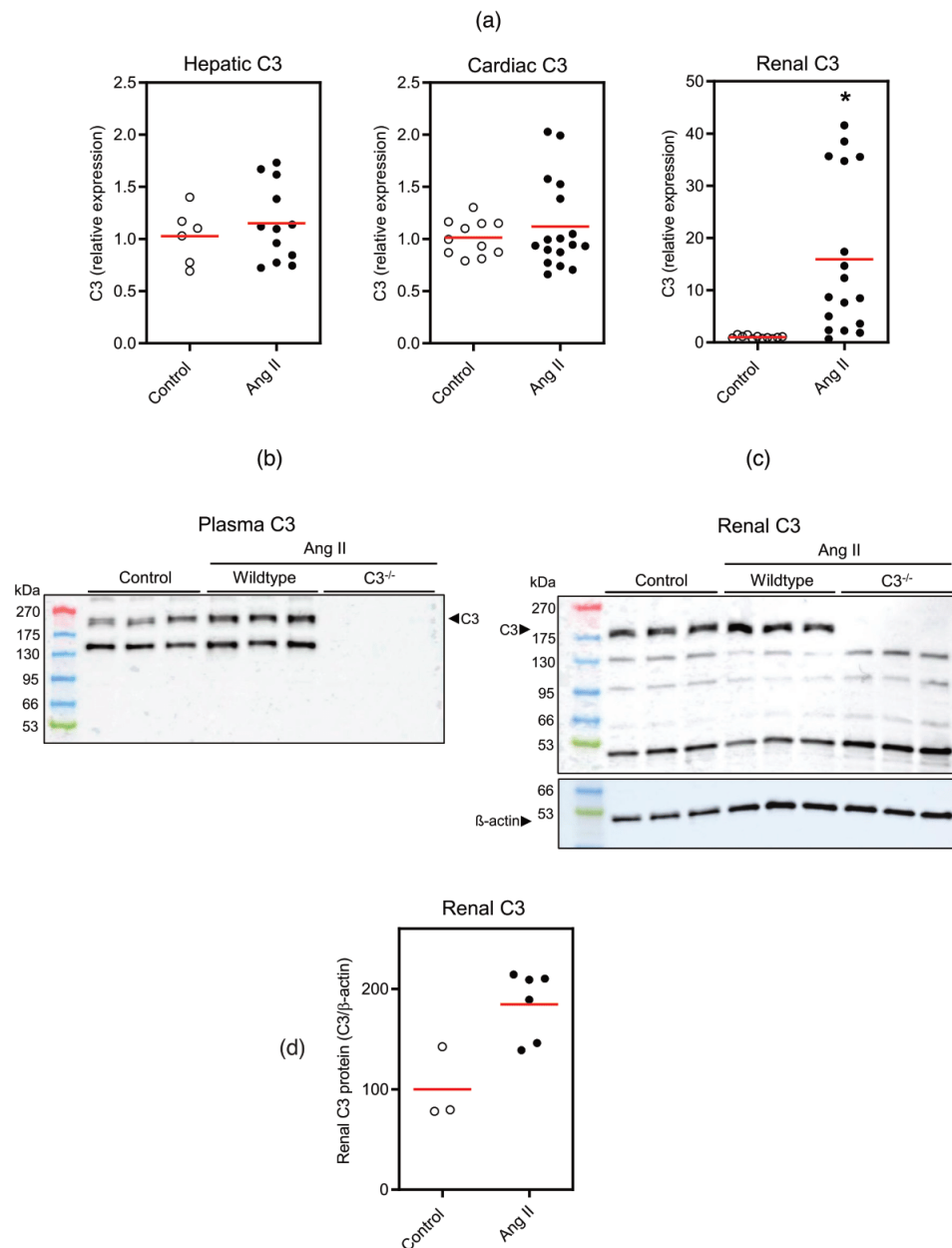


FIGURE 2 C3 expression in hypertensive mice. (a) Realtime quantitative PCR analysis showed that hypertension did not change expression of C3 in hepatic and cardiac tissue. A significant increase was found for renal C3 expression. (b) Western blotting of plasma C3 showed no significant difference between controls and hypertensive mice. No C3 band was detected in knockout mice. (c) Western blotting of renal tissue revealed an increase of C3 protein after Ang II infusion. (d) Densitometry of renal C3 protein expression. White dots normotensive mice, black dots hypertensive mice. (a,c) U-test was used to determine statistical significance. * = $P < 0.05$ versus control.

numerically lower (Figure 3c) and no more difference was found on day 13 (Figure 3d). However, calculating the area under the curve for the three time points showed a significant reduction of albuminuria in

C3-deficient mice (Figure 3e). The result remained the same after analysing the data by a mixed model and post hoc analysis for multiple comparisons.

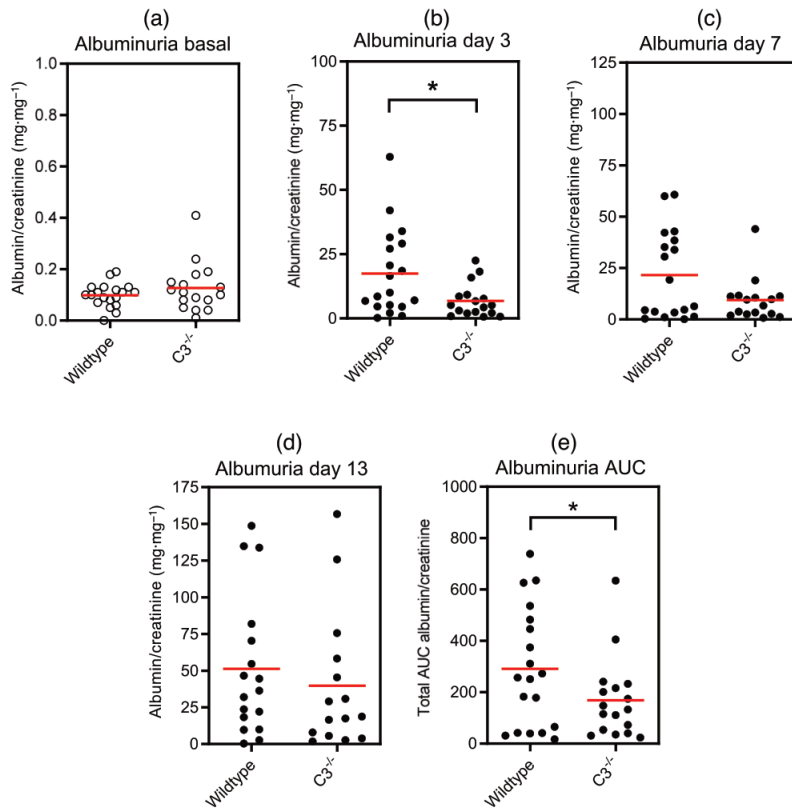


FIGURE 3 Albuminuria. No albuminuria was detected in WT and C3^{-/-} mice at basal. Ang II infusion induced albuminuria on day 3, 7 and 13. Significantly lower albuminuria was seen on day 3 but not day 7 and 13. The area under the curve for the three time points was significantly lower in C3 deficient compared to WT mice. White dots normotensive mice, black dots hypertensive mice. U test was used to determine statistical significance. Analysis by a mixed model with Geisser–Greenhouse correction and post hoc analysis for multiple comparisons by Sidak's showed the same result. * = $P < 0.05$ WT versus C3^{-/-}.

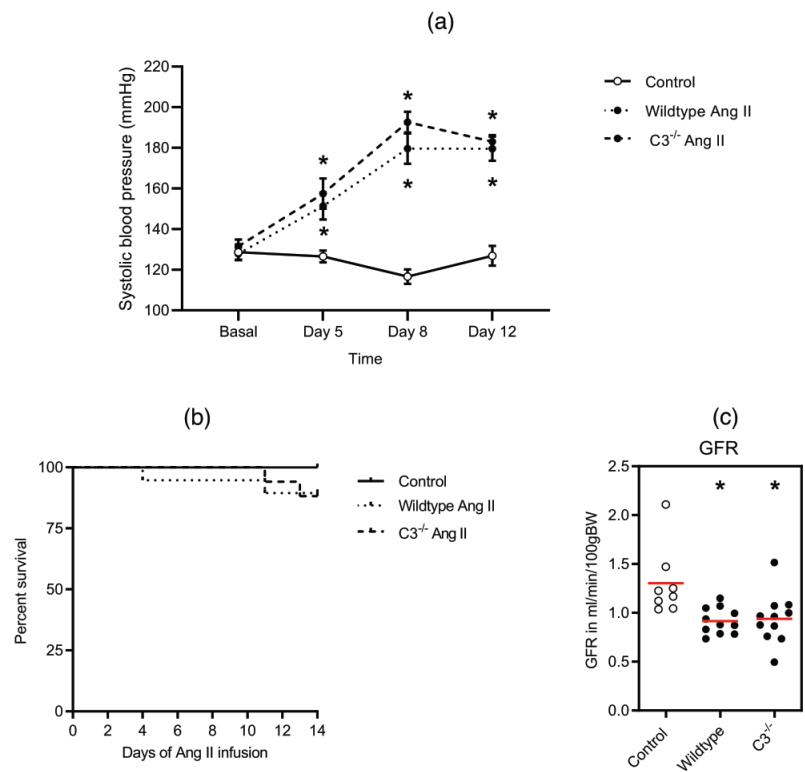
4.4 | Ang II induced hypertension and mortality

Ang II infusion increased systolic blood pressure in wildtype and C3-deficient mice with no difference between the two groups (Figure 4a). Mortality occurred in hypertensive mice without a significant difference between both genotypes (Figure 4b). Mortality was a combination of withdrawn for animal welfare and death. For a detailed analysis of kidney function, we measured the GFR in a subset of mice by using a FITC-sinistrin based technique, which allows measurement in conscious mice. At least to our knowledge this is the first measurement of GFR by FITC-sinistrin in this model of hypertension. First, we performed a basal measurement before induction of hypertension. GFR averaged 1.42 ± 0.04 in wildtype and 1.33 ± 0.09 ml·min⁻¹ per 100 g body weight in knockout mice showing no difference in renal function before the start of the experiment. Ang II administration caused a drop of GFR in hypertensive mice on day 11 (71% of controls in wildtype and 72% in C3-deficient mice) without difference between both genotypes (Figure 4c).

4.5 | Ang II induced renal injury

Next, we examined the kidney histology. Normal renal architecture was detected in normotensive controls (Figure 5a). Ang II infusion induced hypertensive glomerular injury with mesangial expansion and sclerosis in wildtype and C3^{-/-} mice shown in Figure 5a. Semi-quantitative analysis of glomerular injury by scoring revealed similar glomerular changes in C3-deficient and wildtype mice (Figure 5b). Similarly, no difference between both genotypes was found for glomerular size and tubulointerstitial damage (Figure 5b). Additionally, we utilized real-time PCR analysis to identify and quantify differentially expressed genes of renal tissue damage and inflammation. Real time PCR analysis showed a similar decreased expression of renin in both groups in response to salt and Ang II infusion. In addition, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule-1 (KIM-1) and CCL2 were significantly up-regulated but no difference was found between both hypertensive groups (Figure 5c,d).

FIGURE 4 Blood pressure and survival. (a) Angiotensin II (Ang II) infusion increased systolic blood pressure in WT and C3-deficient mice with no difference between the two groups. (b) Kaplan Meier survival curves and subsequent analysis showed equal mortality in both hypertensive mouse cohorts. (c) Ang II induced a significant drop of GFR in hypertensive mice without significant difference between both genotypes. White dots normotensive mice, black dots hypertensive mice. (a) Blood pressure was also analysed by a mixed model and post hoc analysis for multiple comparisons. (b) Survival curves were compared with log-rank (Mantel-Cox) test and Log-rank test for trend. (c) Kruskal–Wallis with Dunn's multiple comparisons test was used to determine statistical significance. * = $P < 0.05$ versus control.



4.6 | Ang II induced renal inflammation

Since scRNAseq analysis showed increased expression of C3 in inflammatory cells we analysed cell subsets infiltrating the kidney in hypertension in the presence or absence of C3. The gating strategy is shown in Figure S4a. First, we focused on cells of myeloid origin. The frequencies of polymorphonuclear neutrophils (PMNs), dendritic cells and macrophages within the CD45⁺ kidney cells were modestly increased and similar in hypertensive wildtype and C3-deficient mice. For dendritic cells the difference of both hypertensive groups to controls was significant (Figure S4b). In addition, the frequencies of CD3, CD4 and $\gamma\delta$ T cells were not different between both genotypes in hypertension. The same was valid for the T cell subtypes TH1, TH2, TH17 and Tregs. The number of TH2 cells was significantly increased in hypertensive wildtype mice. (Figure S4c). Similarly, the frequencies of natural killer T (NKT) cells and natural killer (NK) cells were indistinguishable between hypertensive wildtype and C3-deficient mice (Figure S4c).

4.7 | Ang II induced cardiac fibrosis

No fibrosis was detected in normotensive control mice as shown in Figure 6a. Ang II infusion induced extensive cardiac fibrosis. Scoring

of the fibrosis revealed no difference between both genotypes (Figure 6b). Cardiac hypertrophy is an important predictor of hypertensive end-organ damage. Relative heart weight was not different between C3-deficient and wildtype mice (Figure 6b). The presence of a significantly increased gene expression of [atrial natriuretic peptide \(ANP\)](#), [brain natriuretic peptide \(BNP\)](#) and [collagen III](#) in both genotypes further supports a similar cardiac injury (Figure 6c). Taken together these results endorse similar cardiac injury in wildtype and C3 knockout mice.

4.8 | Short term Ang II infusion

To examine whether difference in structural renal injury can be found between wildtype and C3 deficient mice in the early phase of Ang II induced hypertension we examined the kidney 4 days after start of Ang II infusion. Significantly lower albuminuria was found on day 3 as shown in Figure S5a. Renal histology revealed no tubulointerstitial injury and mild glomerular changes with mesangial widening and increased glomerular size in WT and KO mice as shown in Figure S5b. However, scoring of glomerular injury and measurement of glomerular size revealed no significant differences between both genotypes (Figure S5c). Analysis of PAI-1 and CCL2 showed increased expression of these markers of renal injury and inflammation in hypertensive

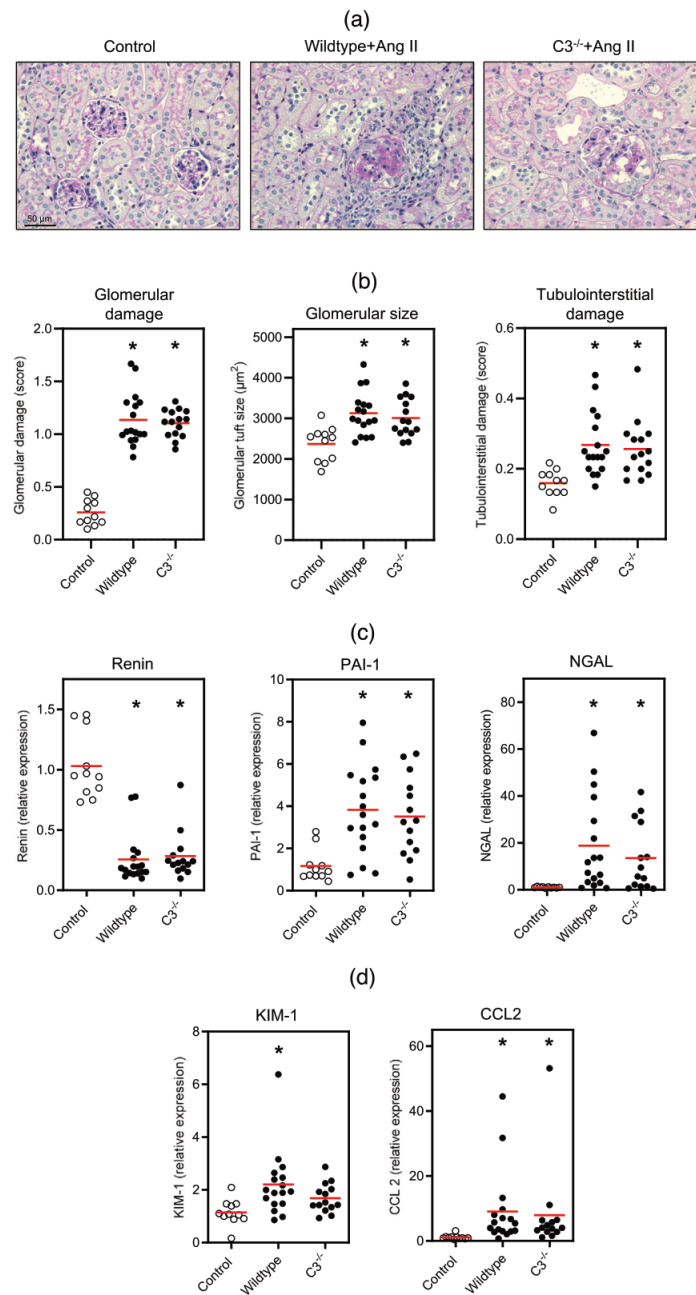
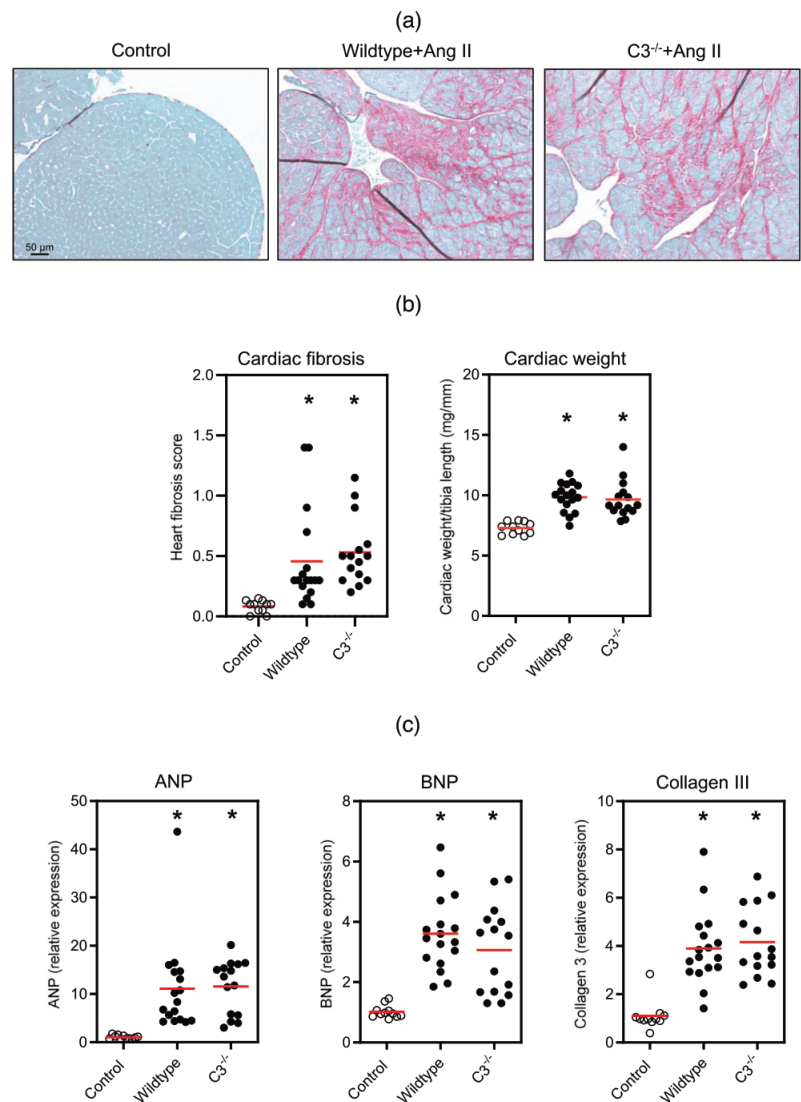


FIGURE 5 Structural renal injury. (a) PAS staining revealed normal renal architecture in normotensive controls. Angiotensin II (Ang II) infusion induced hypertensive glomerular injury with mesangial expansion and sclerosis in WT and knockout mice. (b) Semi-quantitative analysis revealed significantly increased glomerular injury, glomerular size and tubulointerstitial damage in WT and C3-deficient mice. (c and d) Suppression of renal renin and increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), and CCL2 were found in both genotypes. White dots normotensive mice, black dots hypertensive mice. (b–d) Kruskal–Wallis with Dunn's multiple comparisons test or one-way analysis of variance (ANOVA) and post hoc analysis by Tukey's multiple comparisons test were used to determine statistical significance. * = $P < 0.05$ versus control.

FIGURE 6 Cardiac injury.

(a) Sirius Red/Fast Green (SRFG) staining showed no cardiac fibrosis in normotensive controls. Angiotensin II (Ang II)-induced extensive cardiac fibrosis. (b) Scoring showed increased fibrosis in both hypertensive cohorts without difference. Cardiac weight was significantly increased in both groups. (c) Ang II induced a significant increase in cardiac expression of ANP, BNP and collagen III without any significant difference between both genotypes. White dots normotensive mice, black dots hypertensive mice. (b, c) Kruskal–Wallis with Dunn's multiple comparisons test or one-way analysis of variance (ANOVA) and post hoc analysis by Tukey's multiple comparisons test were used to determine statistical significance. * = $P < 0.05$ versus control.



wildtype mice and a tendency for lower expression in C3 deficient mice. However, the difference between both genotypes was not significant. In contrast, NGAL and KIM-1 were significantly increased in hypertensive wildtype mice compared to normotensive controls and C3 deficient mice showed significantly less expression than wildtype mice (Figure S5d). Since NGAL and KIM-1 are marker of proximal tubule injury, this points to a protective function of C3 in proximal tubules in the early phase of Ang II induced injury.

4.9 | DOCA salt

To examine whether the antiproteinuric effect of C3 deficiency in the early phase of Ang II induced hypertension is specific for Ang

II or can also be found in other models of hypertension, we induced DOCA salt hypertension in WT and C3-deficient mice. Mortality was 1 of 8 in WT and 3 of 15 mice in C3^{-/-} mice. One mouse died, 3 were withdrawn for animal welfare. Similar to the Ang II experiment expression of C3 was 8 fold increased in the kidney of DOCA salt mice compared to normotensive controls (Figure 7a). DOCA salt induced albuminuria in WT and C3-deficient mice as shown in Figure 7a. Interestingly and similar to the Ang II model C3-deficient mice showed significantly less albuminuria in week 2 and 3 compared to WT mice. With longer duration of hypertension, this difference diminished. No significant difference was found between WT and C3^{-/-} mice for blood pressure (Figure 7b) as well as glomerular and tubulointerstitial damage (Figure 7c). Increased expression of CCL2 (Figure 7d) as well as

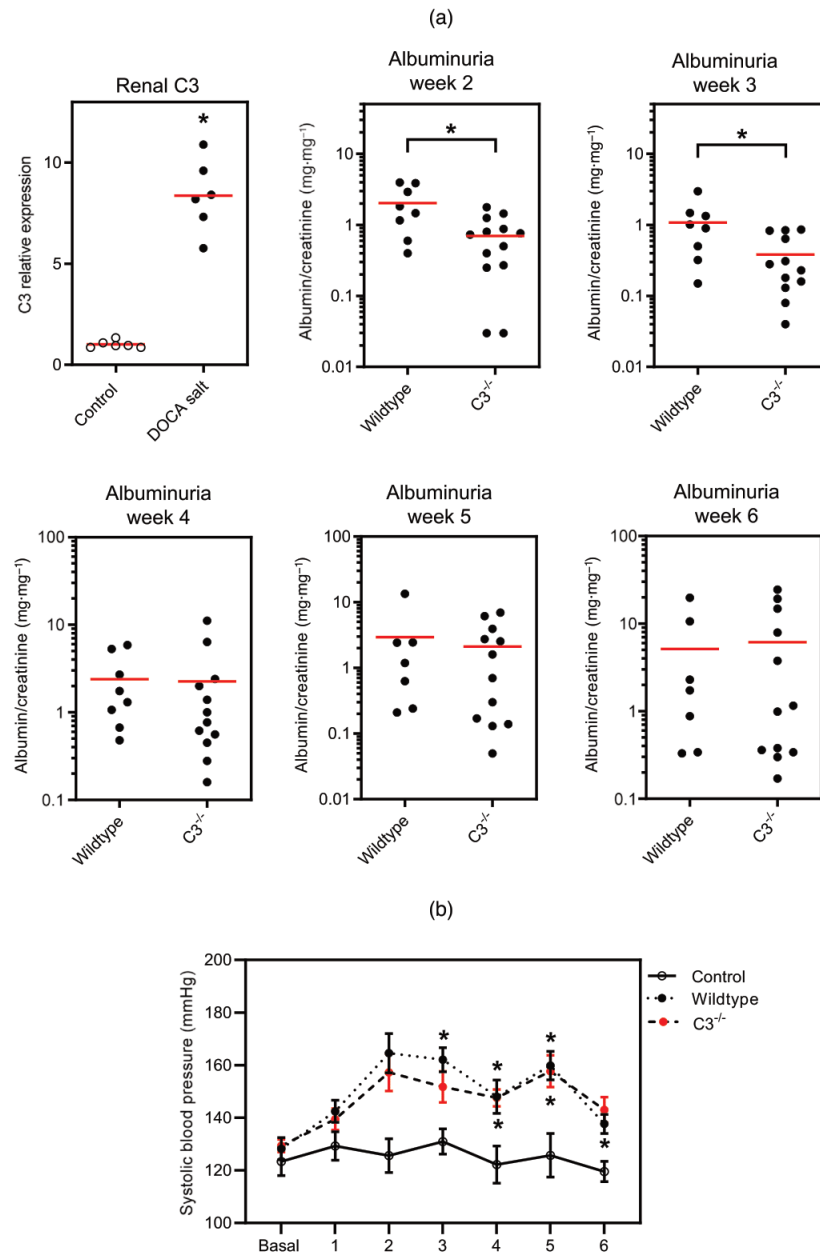


FIGURE 7 Deoxycorticosterone acetate (DOCA) salt. (a) DOCA salt increased renal C3 expression. Albuminuria was significantly lower in C3-deficient mice compared to WT in week 2 and 3. No difference was found in week 4, 5 and 6. (b) Blood pressure increase was not different between both genotypes. (c) Increased glomerular and tubulointerstitial damage was found in both genotypes. (d) Increased expression of CCL2 as well as decreased GFR were found in DOCA salt treated mice without difference between both genotypes. (e) The same was valid for cardiac weight, fibrosis and ANP expression. (a) U test was used to determine statistical significance. (b) Blood pressure was also analysed by a mixed model and post hoc analysis for multiple comparisons. (c–e) Kruskal–Wallis with Dunn's multiple comparisons test and ANOVA with Tukey's multiple comparisons was used to determine statistical significance. In addition, since histograms of raw albuminuria values showed a right skew, albuminuria values were log10 transformed and analysed using linear mixed effect models with fixed effects for time, group and the interaction of time and group and a random intercept for each mouse. Significances remained the same on week 2 but week 3 was no longer significant. White dots normotensive mice, black dots hypertensive mice. * = $P < 0.05$ versus control.

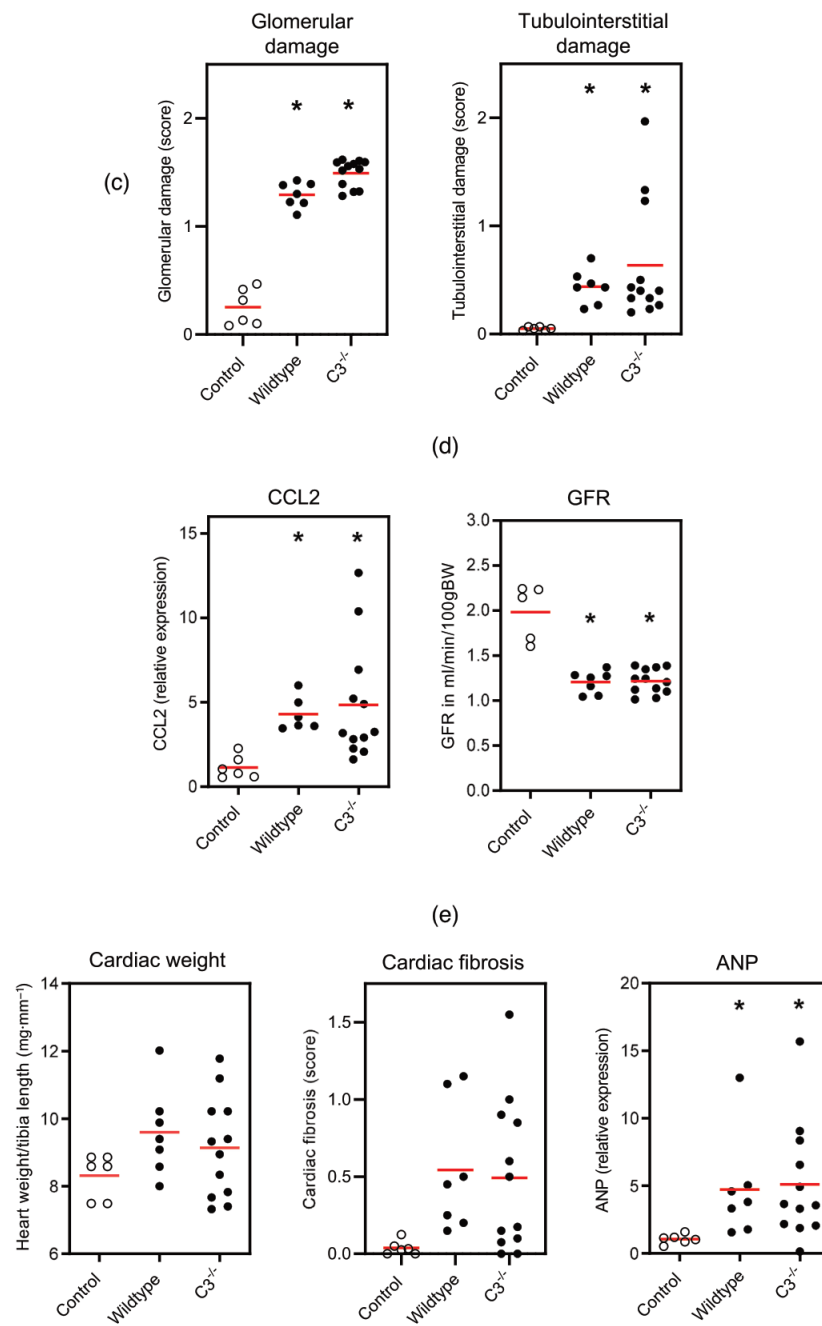


FIGURE 7 (Continued)

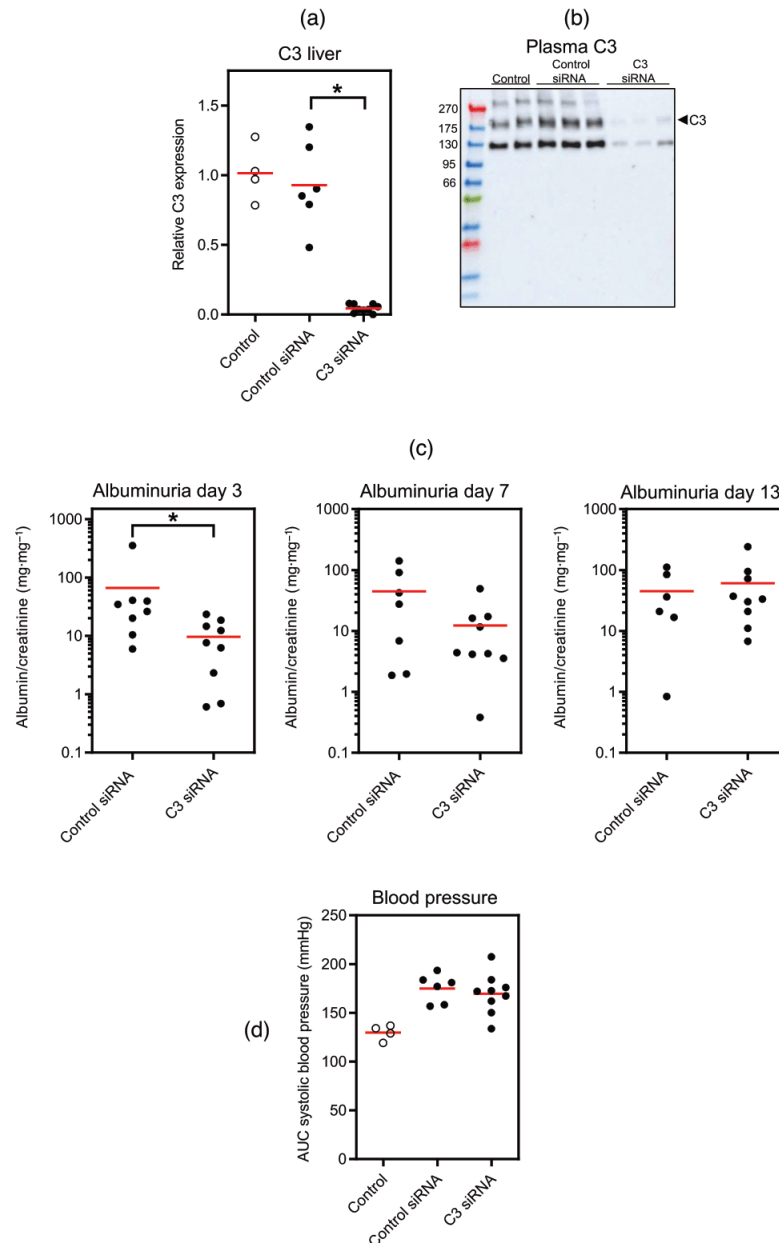


FIGURE 8 C3 inhibition by small interfering RNA (siRNA). (a) Administration of C3 siRNA lead to a down-regulation of liver C3 expression by 96% whereas control siRNA had no effect. (b) Western blotting of plasma samples showed a strong reduction of C3 in the C3 siRNA group. (c) Similar to the knockout experiment albuminuria on day 3 was significantly lower in the siRNA treated mice but not on day 7 and 13. (d) Ang II induced hypertension calculated as area under the curve of the blood pressure (due to the small number of mice and three time points) was not changed by the C3 siRNA. (e) No significant effect of C3 inhibition was seen on glomerular damage, glomerular size and tubulointerstitial injury. (f) No difference was found in CCL2-increase and GFR-decrease in both hypertensive groups. (g) No effect of C3 inhibition was found on Ang II induced cardiac hypertrophy as well as ANP expression. White dots normotensive mice, black dots hypertensive mice. (a,c) U-test was used to determine statistical significance. In addition, since histograms of raw albuminuria values showed a right skew, albuminuria values were log₁₀ transformed and analysed using linear mixed effect models with fixed effects for time, group and the interaction of time and group and a random intercept for each mouse. Significances remained the same. * = $P < 0.05$. [Correction added on 30 May 2023, after first online publication: Figure 8g has been updated on this version.]

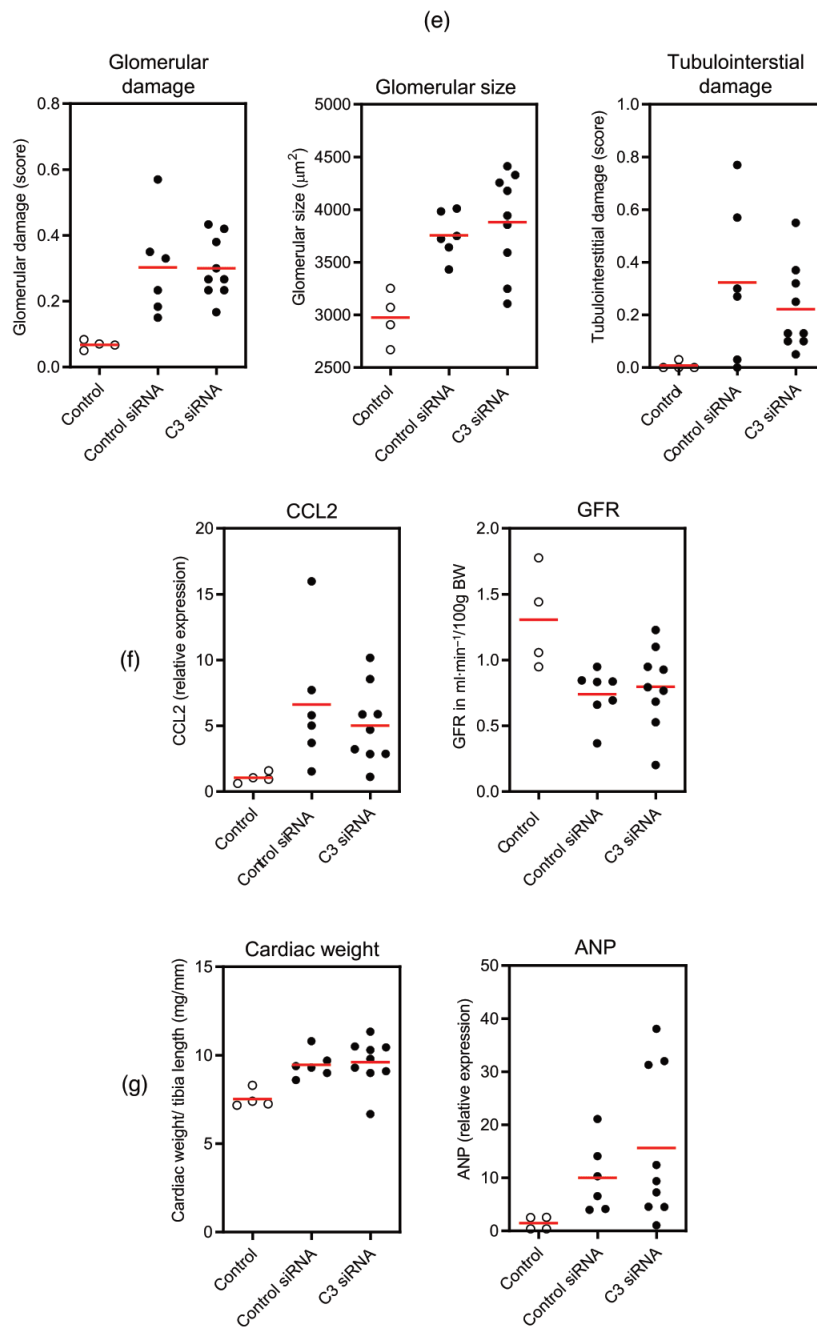


FIGURE 8 (Continued)

GFR reduction was found in both hypertensive groups. In addition, cardiac fibrosis, weight and ANP expression were not different between WT and $\text{C3}^{-/-}$ mice (Figure 7e). The albuminuria results

remained the same after log transformation and analysing the data by a mixed model with post hoc analysis for multiple comparisons.

4.10 | C3 siRNA

To overcome the disadvantages of the life-long absence of the C3 gene in knockout mice, we injected mice with a C3 siRNA in another set of experiments with Ang II induced hypertension. Administration of C3 siRNA resulted in a 96% reduction in liver C3 mRNA levels while a control siRNA had no effect on hepatic C3 expression (Figure 8a). The difference between control siRNA and C3 siRNA was significant. Western blotting of plasma samples showed a corresponding strong reduction of circulating C3 levels in the C3 siRNA group confirming shutdown of C3 production in the liver (Figure 8b). Mortality was 5 of 11 in mice treated by a control siRNA and 2 of 9 in C3 siRNA treated mice. Due to the small number of normotensive mice ($n = 4$) only hypertensive control siRNA and C3 siRNA treated mice were tested for statistical difference. Similar to the knockout experiment inhibition of liver production of C3 by the siRNA showed a significant reduction of albuminuria on day 3. The difference was significant with and without the outlier ($354 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$) in wildtype mice. This effect was still present on day 7 but no longer significant and no difference was found at the end of the experiment (Figure 8c). The same was valid for albuminuria after log transformation and analysing the data by a mixed model with post hoc analysis for multiple comparisons. No effect of the siRNA approach was found for blood pressure as shown in Figure 8d. Area under the curve was used for blood pressure since the number of mice was small (scrambled $n = 6$, C3 siRNA $n = 9$) and three time points were evaluated. In addition, no significant effect of C3 inhibition was seen on glomerular damage, glomerular size, tubulointerstitial injury (Figure 8e). CCL2 as a marker of inflammation was up-regulated in both treatment groups (Figure 8f). Ang II decreased GFR in both groups to the same extent (Figure 8f). Ang II induced cardiac hypertrophy and ANP expression (Figure 8g) were not altered by C3 inhibition either.

We also examined whether a delayed start of C3 inhibition lowers albuminuria by injection of the siRNA on day 3 after start of Ang II infusion. The time course of the experiment is shown in Figure S6a. Down-regulation of C3 after start of Ang II infusion did not lower albuminuria on day 7 and 13 as shown in Figure S6b. This demonstrates that C3 has to be down-regulated before start of hypertension to be protective.

4.11 | C5 siRNA

To solve the question whether the antiproteinuric effect of C3 inhibition is due to the resulting lack of formation of the C5b9 or C3 itself, we inhibited C5 by a siRNA approach. Down-regulation of C5 inhibits formation of C5b9 complex. As shown in Figure S7a administration of the C5 siRNA resulted in 90% reduction of C5 expression in the liver. However, C5 inhibition did not change Ang II induced albuminuria on day 3, 7 and 13 (Figure S7b). Moreover, no effect was seen on blood pressure, decrease in GFR as well as renal or cardiac injury (Figure S7c–e). This suggests that metabolic or inflammatory effects of C3 or its metabolites cause albuminuria.

5 | DISCUSSION

The innate and adaptive immune system are increasingly recognized to play a decisive role in the pathophysiology of arterial hypertension and hypertension-induced end organ damage (Wenzel et al., 2016). Whether the complement system, a major innate and inflammatory effector system, contributes to hypertensive end-organ damage is still unresolved (Wenzel, Ehmke, & Bode, 2021; Wenzel, Kemper, & Köhl, 2021). The current study provides novel insights into the role of complement in hypertensive end-organ damage. An increased expression of C3 protein and mRNA was found in the kidney of hypertensive patients and mice made hypertensive by Ang II or DOCA salt. Single cell Seq analysis of human kidneys revealed expression of C3 in different cellular compartments in healthy and hypertensive patients.

C3 deficiency significantly ameliorated albuminuria in the early phase of hypertension. However, with longer duration this effect declined. Although the effect was small, its significance is underlined by the fact that it was found in knockout mice and in C3 inhibition by a siRNA mice, as well as in two models of hypertension with different pathophysiology. However, both approaches and in both models C3 deficiency did not alter blood pressure, end organ damage and inflammation.

The classical liver-derived circulating C3 system is well appreciated as a key mediator of host protection via instruction of innate and adaptive immunity. Albeit recent studies have discovered an organ specific C3 and an intracellular C3, which have emerged as central regulators of core metabolic pathways and organ function (Kunz & Kemper, 2021). Several cells, including monocytes, and macrophages, fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells, astrocytes, adipocytes and myoepithelial cells, have all been reported to be potential extrahepatic sources of complement molecules in tissues (Chen et al., 2020). By analysing available single cell seqRNA data, we could confirm presence of C3 in these cells in the kidney. However, the role of the extrahepatic C3 in humans is still unclear.

In the present study, we found increased C3 staining in kidney biopsies from patients with so-called malignant nephrosclerosis. However, immunohistochemistry of C3 cannot differentiate whether the C3 is expressed or just trapped in damaged tissue. Therefore, we examined C3 expression in the European Renal cDNA biopsy bank and found a significantly up-regulated gene expression in glomeruli and tubulointerstitium. To further pin down the cellular source of C3 expression, we examined available kidney tissue data. Single cell data analysis from a kidney tissue atlas revealed that C3 is expressed in various cells including proximal tubule cells, monocyte derived cells and others. An increased abundance of cells expressing C3 was found in kidney biopsies with hypertensive nephropathy. The human data are matched by the mouse data with an increased RNA and protein expression in Ang II-infused mice. Our C3 staining data in patients with malignant nephrosclerosis were also described by Zhang et al, who found C3 positivity in 84% of all cases (Zhang et al., 2020). Moreover, recent studies have raised awareness that a number of patients with severe hypertension and hypertensive nephropathy may have mutations in the complement system (Timmermans et al., 2017, 2018).

C3 deficiency ameliorated albuminuria in two models of hypertension. How does C3 deficiency ameliorate albuminuria and why does the effect disappear with prolonged hypertension? Since we used a complete knockout of C3, we cannot distinguish whether liver-derived C3 or intrarenal C3 is responsible for this effect. Albuminuria in hypertension is a complex result of glomerular hemodynamics, increased glomerular permeability and tubular reabsorption. Beside its effect on innate and adaptive immunity, recent data suggest that intracellular C3 plays an important role in cellular homeostasis (Arbore et al., 2017). Cell specific knockout of C3 in cells involved in albuminuria like endothelial cells or podocytes as well as in proximal tubular cells will help to answer this question.

Recent data showed that C3 deficiency ameliorates rhabdomyolysis-induced acute kidney injury (Boudhabhay et al., 2021). The disease is largely driven by a direct injury of proximal tubular cells through oxidative stress and lipid peroxidation caused by myoglobin and heme. In addition, another disease, in which injury of proximal tubular cells is important, is ischemia reperfusion injury. This disease is also ameliorated by C3 deficiency (Zhou et al., 2000). Together with our data this points to a role of C3 in proximal tubular cell injury. This is further confirmed by the expression of Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) which is a marker of proximal tubule injury. Its expression was significantly lower in hypertensive C3 deficient mice compared to wildtype mice in the early phase of Ang II induced hypertension. This also implies that the pathogenesis of albuminuria differs over time in hypertension. Early albuminuria is C3 dependent whereas the late albuminuria is more likely caused by severe glomerular and tubulointerstitial sclerosis and C3 deficiency has no more protective effect.

Down-regulation of C3 in the liver by the siRNA approach also lowered early albuminuria strongly suggesting the pro-albuminuric effect of C3 comes from liver-derived C3. Future experiments with a cell specific knockout of C3, that is, in proximal tubular cells, will help to solve this question. It is important to narrow down the responsible cells to help generating a cell specific treatment option for complement in the long term. Especially, as albuminuria is an important progression factor in many renal disease entities. It would be of great interest and clinical importance to better define the role of complement in albuminuria and whether this can be used therapeutically in other non-hypertensive proteinuric diseases. Although there are many mechanisms causing albuminuria, hyperfiltration and increased glomerular capillary pressure are important factors. From our data we cannot determine whether C3 influences haemodynamics.

The spontaneously hypertensive rat (SHR) is a widely used genetic model of hypertension. Negishi and colleagues showed that knockout of the C3 gene by zinc-finger nuclease gene-editing in SHRs had a small but significant effect on systolic blood pressure, proliferation of mesangial cells and renal injury (Negishi et al., 2018). In contrast, mice deficient in C3 showed no differences in hypertension or hypertrophy responses to *in vivo* infusion with angiotensin II (Coles et al., 2007). However, in this latter study a low dose of Ang II ($1.1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) was given to mice of the C57black strain for only 7 days. Seven days of Ang II infusion induce a mild increase in blood pressure and vascular hypertrophy but do not induce hypertensive injury. Therefore, a role

for C3 in hypertensive injury cannot be ruled out based on this study. However, our blood pressure data from two models of hypertension are in agreement with these data. Our data are also in agreement with the recent data of Regal et al. These authors found no effect of administration of sCR1, a soluble form of endogenous complement receptor 1 in Dahl salt sensitive rats (Regal et al., 2018).

Systolic blood pressure was measured by tail cuff plethysmography. With appropriate training and device tail cuff measured blood pressure is reliable (Kurtz et al., 2005). No difference in blood pressure was found between hypertensive wildtype and C3 deficient mice. Also relative heart weight was no different between both hypertensive groups. In arterial hypertension cardiac hypertrophy is in most cases the integral of blood pressure over time. Therefore, the finding of no significant difference between hypertensive wildtype and knockout mice for cardiac hypertrophy supports that increased blood pressure is not different between both genotypes.

Renal infiltration of myeloid cells and lymphocytes was examined in detail. Recent data suggest that the intracellular complement system called complosome plays an important role especially in inflammatory cells (Arbore et al., 2017). C3 deficiency did not significantly change the number of infiltrating cells in Ang II induced hypertension in the present study. However, from our data we cannot exclude that C3 may have a role in function and interaction of the cells without altering the number. Inhibition of hepatic C5 expression that is distal of C3 did not lower albuminuria. This strongly suggests that the antiproteinuric effect of C3 inhibition is not due to lack of membrane attack formation but due to C3 itself or its metabolites. We can also rule out a role for C3a in albuminuria since C3a receptor deficient mice show no protection against albuminuria in Ang II induced hypertension (unpublished data). Therefore, C3 itself or another of its metabolites C3b may aggravate albuminuria, that is, by metabolic functions.

As C3 knockout mice completely lack C3 from birth compensatory effects cannot be excluded. Moreover, the genetic approach knocks down hepatic as well as extrahepatic C3 expression. This does not allow to differentiate between these two C3 sources. Therefore, we used a liver targeted siRNA approach to down-regulate hepatic C3. GalNAc-siRNA conjugates bind to the asialoglycoprotein receptor that is highly and almost exclusively expressed in hepatocytes. This allows efficient delivery to hepatocytes and long-lasting down-regulation of C3 following subcutaneous administration of the siRNA. Extrahepatic C3 remains intact and functionally active. In our experiment GalNAc-mediated targeting of C3 siRNA to hepatocytes enabled potent reduction of liver C3 mRNA level and subsequent dramatic lowering of plasma C3 protein levels. The siRNA approach also lowered early albuminuria but did not alter blood pressure or renal and cardiac injury. This is of translational importance. Beneficial effects found in knockout mice cannot easily be transferred into patients since the knockout mice lack the gene of interest from birth and the knockout is 100%. However, the C3-siRNA induced pharmaceutical down-regulation starts with the first injection and mice have a low amount of remaining C3 like patients undergoing drug treatment. This suggest that C3 could be a suitable drug target in certain mechanisms of albuminuria.

5.1 | Perspectives

Our data underscore the complexity of the complement system in hypertensive end-organ damage. There is a clear induction and up-regulation of C3 in hypertension in mice and men. C3 deficiency lowered albuminuria in the early phase of hypertension in two different models of hypertension and by two different approaches. However, this effect diminished with duration of hypertension and C3 deficiency did not result in reduced structural renal and cardiac end organ damage. Future studies are needed to examine why C3 alters early and not later albuminuria in hypertension. Several therapeutics targeting the complement system are presently in different stages of clinical development (Salvadori et al., 2015). Our study clearly demonstrates that C3 does not lower blood pressure and is not a therapeutic target in severe hypertensive end organ damage found in the used models. It has to be examined whether C3 may serve as marker of renal injury. The present data suggest that targeting complement may not be useful in treating albuminuria in severe hypertensive kidney disease given the lack of difference at longer time points. However, it has to be evaluated by which mechanisms C3 inhibition lowers early albuminuria and whether targeting complement will be useful to treat albuminuria in less severe models of arterial hypertension or other non-hypertensive models of renal injury since albuminuria is the most important risk factor for progression of chronic kidney disease.

AUTHOR CONTRIBUTION

Marlies Bode: performed animal experiments, writing of paper.
Jan Niklas Diemer: performed animal experiments, writing of paper.
The Vinh Luu: performed animal experiments, writing of paper.
Nikolas Ehnert: performed animal experiments.
Teresa Teigeler: analysis of human biopsies.
Thorsten Wiech: analysis of human and murine tissue.
Maja T. Lindenmeyer: ERCC data, microarray analysis.
Georg R. Herrstadt: single cell RNAseq.
Jasmin Bülow: performed animal experiments.
Tobias B. Huber: design of study, writing of manuscript.
Nicola M. Tomas: writing of paper, confocal microscopy.
Ulrich O. Wenzel: grant writing, writing of ethics for human and animal studies, concept of study, received funding for project, interpretation of data, writing of manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank S. Gatzemeier for excellent technical assistance and PD Dr. G. Zahner for supplying the C3 knockout mouse. We thank Dr. L. Krause, UKE, Medical Biometry and Epidemiology, for her statistical analyses and Dr. Anna Borodovsky, Alnylam Cambridge, MA 02142, USA for providing C3, C5 and control siRNAs and help with the siRNA protocol. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

No conflict of interest to declare.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data are available on request from the authors. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. Some data may not be made available because of privacy or ethical restrictions.

DECLARATION OF TRANSPARENCY AND SCIENTIFIC RIGOUR

This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research as stated in the *BJP* guidelines for [Design & Analysis](#), [Immunoblotting and Immunochemistry](#) and [Animal Experimentation](#) and as recommended by funding agencies, publishers and other organizations engaged with supporting research.

ORCID

Ulrich O. Wenzel  <https://orcid.org/0000-0002-0116-255X>

REFERENCES

- Ahadzadeh, E., Rosendahl, A., Czesla, D., Steffens, P., Prussner, L., Meyer-Schwesinger, C., Wanner, N., Paust, H. J., Huber, T. B., Stahl, R. A. K., Wiech, T., Kurts, C., Seniuk, A., Ehmke, H., & Wenzel, U. O. (2018). The chemokine receptor CX3CR1 reduces renal injury in mice with angiotensin II-induced hypertension. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 315, F1526–F1535. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00149.2018>
- Alexander, S. P., Christopoulos, A., Davenport, A. P., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Southan, C., Davies, J. A., Abbracchio, M. P., Alexander, W., Al-hosaini, K., Bäck, M., Barnes, N. M., Bathgate, R., ... Ye, R. D. (2021). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2021/22: G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology*, 178(S1), S27–S156. <https://doi.org/10.1111/bph.15538>
- Alexander, S. P., Cidlowski, J. A., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Southan, C., Davies, J. A., Coons, L., Fuller, P. J., Korach, K. S., & Young, M. J. (2021). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2021/22: Nuclear hormone receptors. *British Journal of Pharmacology*, 178(S1), S246–S263. <https://doi.org/10.1111/bph.15540>
- Alexander, S. P. H., Roberts, R. E., Broughton, B. R. S., Sobey, C. G., George, C. H., Stanford, S. C., Cirino, G., Docherty, J. R., Gienbycz, M. A., Hoyer, D., Insel, P. A., Izzo, A. A., Ji, Y., MacEwan, D., Mangum, J., Wonnacott, S., & Ahluwalia, A. (2018). Goals and practicalities of immunoblotting and immunohistochemistry: A guide for submission to the *British Journal of Pharmacology*. *British Journal of Pharmacology*, 175, 407–411. <https://doi.org/10.1111/bph.14112>
- Arbore, G., Kemper, C., & Kolev, M. (2017). Intracellular complement - the complosome - in immune cell regulation. *Molecular Immunology*, 89, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.05.012>
- Bao, X., Meng, G., Zhang, Q., Liu, L., Wu, H., Du, H., Shi, H., Xia, Y., Guo, X., Liu, X., Han, P., Dong, R., Wang, X., Li, C., Su, Q., Gu, Y., Fang, L., Yu, F., Yang, H., ... Niu, K. (2017). Elevated serum complement C3 levels are associated with prehypertension in an adult population. *Clinical and Experimental Hypertension*, 39, 42–49. <https://doi.org/10.1080/10641963.2016.1210622>
- Boudhabhay, I., Poillerat, V., Grunenwald, A., Torset, C., Leon, J., Daugan, M. V., Lucibello, F., El Karoui, K., Ydee, A., Chauvet, S., Girardie, P., Sacks, S., Farrar, C. A., Garred, P., Berthaud, R., Le

- Quintrec, M., Rabant, M., de Lonlay, P., Rambaud, C., ... Roumenina, L. T. (2021). Complement activation is a crucial driver of acute kidney injury in rhabdomyolysis. *Kidney International*, 99, 581–597. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.09.033>
- Chen, L., Fukuda, N., Matsumoto, T., & Abe, M. (2020). Role of complement 3 in the pathogenesis of hypertension. *Hypertension Research*, 43, 255–262. <https://doi.org/10.1038/s41440-019-0371-y>
- Cohen, C. D., Frach, K., Schlöndorff, D., & Kretzler, M. (2002). Quantitative gene expression analysis in renal biopsies: A novel protocol for a high-throughput multicenter application. *Kidney International*, 61, 133–140. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00113.x>
- Coles, B., Lewis, R., Anning, P. B., Morton, J., Baalasubramanian, S., Morgan, B. P., & O'Donnell, V. B. (2007). CD59 or C3 are not required for angiotensin II-dependent hypertension or hypertrophy in mice. *Immunology*, 121, 518–528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02598.x>
- Cui, J., Wu, X., Song, Y., Chen, Y., & Wan, J. (2019). Complement C3 exacerbates renal interstitial fibrosis by facilitating the M1 macrophage phenotype in a mouse model of unilateral ureteral obstruction. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 317, F1171–F1182. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00165.2019>
- Curtis, M. J., Alexander, S. P. H., Cirino, G., George, C. H., Kendall, D. A., Insel, P. A., Izzo, A. A., Ji, Y., Panettieri, R. A., Patel, H. H., Sobey, C. G., Stanford, S. C., Stanley, P., Stefanska, B., Stephens, G. J., Teixeira, M. M., Vergnolle, N., & Ahluwalia, A. (2022). Planning experiments: Updated guidance on experimental design and analysis and their reporting III. *British Journal of Pharmacology*, 179, 3907–3913. <https://doi.org/10.1111/bph.15868>
- Drummond, G. R., Vinh, A., Guzik, T. J., & Sobey, C. G. (2019). Immune mechanisms of hypertension. *Nature Reviews Immunology*, 19, 517–532. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0160-5>
- Engström, G., Hedblad, B., Berglund, G., Janzon, L., & Lindgärde, F. (2007). Plasma levels of complement C3 is associated with development of hypertension: A longitudinal cohort study. *Journal of Human Hypertension*, 21, 276–282. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1002129>
- Hengel, F., Benitah, J., & Wenzel, U. (2021). Mosaic theory revisited: Inflammation and salt play a central role in arterial hypertension. *Cellular & Molecular Immunology*, 19, 561–576.
- King, B. C., Kulak, K., Krus, U., Rosberg, R., Golec, E., Wozniak, K., Gomez, M. F., Zhang, E., O'Connell, D. J., Renström, E., & Blom, A. M. (2019). Complement component C3 is highly expressed in human pancreatic islets and prevents β cell death via ATG16L1 interaction and autophagy regulation. *Cell Metabolism*, 29, 202–210.e206. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.09.009>
- Krebs, C., Fraune, C., Schmidt-Haupt, R., Turner, J. E., Panzer, U., Quang, M. N., Tannapfel, A., Velden, J., Stahl, R. A., & Wenzel, U. O. (2012). CCR5 deficiency does not reduce hypertensive end-organ damage in mice. *American Journal of Hypertension*, 25, 479–486. <https://doi.org/10.1038/ajh.2011.243>
- Krebs, C. F., Lange, S., Niemann, G., Rosendahl, A., Lehnert, A., Meyer-Schwesinger, C., Stahl, R. A., Benndorf, R. A., Velden, J., Paust, H. J., Panzer, U., Ehmke, H., & Wenzel, U. O. (2014). Deficiency of the interleukin 17/23 axis accelerates renal injury in mice with deoxycorticosterone acetate+angiotensin ii-induced hypertension. *Hypertension*, 63, 565–571. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02620>
- Kunz, N., & Kemper, C. (2021). Complement has brains-do intracellular complement and immunometabolism cooperate in tissue homeostasis and behavior? *Frontiers in Immunology*, 12, 629986. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.629986>
- Kuppe, C., Ibrahim, M. M., Kranz, J., Zhang, X., Ziegler, S., Perales-Patón, J., Jansen, J., Reimer, K. C., Smith, J. R., Dobie, R., Wilson-Kanamori, J. R., Halder, M., Xu, Y., Kabgani, N., Kaesler, N., Klaus, M., Gernhold, L., Puelles, V. G., Huber, T. B., ... Kramann, R. (2021). Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis. *Nature*, 589, 281–286. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2941-1>
- Kurtz, T. W., Griffin, K. A., Bidani, A. K., Davisson, R. L., & Hall, J. E. (2005). Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals. Part 2: Blood pressure measurement in experimental animals: A statement for professionals from the subcommittee of professional and public education of the American Heart Association council on high blood pressure research. *Hypertension*, 45, 299–310.
- Kusner, L. L., Yucius, K., Sengupta, M., Sprague, A. G., Desai, D., Nguyen, T., Charisse, K., Kuchimanchi, S., Kallanthottathil, R., Fitzgerald, K., Kaminski, H. J., & Borodovsky, A. (2019). Investigational RNAi therapeutic targeting C5 is efficacious in pre-clinical models of myasthenia gravis. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 13, 484–492. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.04.009>
- Lehnert, A., Lange, S., Niemann, G., Rosendahl, A., Meyer-Schwesinger, C., Oh, J., Stahl, R., Ehmke, H., Benndorf, R., Klinke, A., Baldus, S., & Wenzel, U. O. (2014). Myeloperoxidase deficiency ameliorates progression of chronic kidney disease in mice. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 307, F407–F417. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00262.2014>
- Lilley, E., Stanford, S. C., Kendall, D. E., Alexander, S. P. H., Cirino, G., Docherty, J. R., George, C. H., Insel, P. A., Izzo, A. A., Ji, Y., Panettieri, R. A., Sobey, C. G., Stefanska, B., Stephens, G., Teixeira, M., & Ahluwalia, A. (2020). ARRIVE 2.0 and the British Journal of Pharmacology: Updated guidance for 2020. *British Journal of Pharmacology*, 177(16), 3611–3616. <https://doi.org/10.1111/BPH.15178>
- Negishi, E., Fukuda, N., Otsuki, T., Katakawa, M., Komatsu, K., Chen, L., Tanaka, S., Kobayashi, H., Hatanaka, Y., & Ueno, T. (2018). Involvement of complement 3 in the salt-sensitive hypertension by activation of renal renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 315, F1747–F1758. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00370.2018>
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D., Karp, N. A., Lalic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., ... Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *British Journal of Pharmacology*, 177, 3617–3624. <https://doi.org/10.1111/bph.15193>
- Regal, J. F., Laule, C. F., McCutcheon, L., Root, K. M., Lund, H., Hashmat, S., & Mattson, D. L. (2018). The complement system in hypertension and renal damage in the dahl SS rat. *Physiological Reports*, 6, e13655. <https://doi.org/10.14814/phy2.13655>
- Ruan, C.-C., & Gao, P.-J. (2019). Role of complement-related inflammation and vascular dysfunction in hypertension. *Hypertension*, 73, 965–971. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11210>
- Sahu, S. K., Ozantürk, A. N., Kulkarni, D. H., Ma, L., Barve, R. A., Dannull, L., Lu, A., Starick, M., McPhatter, J., Garnica, L., Sanfilippo-Burchman, M., Kunen, J., Wu, X., Gelman, A. E., Brody, S. L., Atkinson, J. P., & Kulkarni, H. S. (2023). Lung epithelial cell-derived C3 protects against pneumonia-induced lung injury. *Science Immunology*, 8, eabp9547. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abp9547>
- Salvadori, M., Rosso, G., & Bertoni, E. (2015). Complement involvement in kidney diseases: From physiopathology to therapeutic targeting. *World Journal of Nephrology*, 4, 169–184. <https://doi.org/10.5527/wjn.v4.i2.169>
- Schreiber, A., Shulhevich, Y., Geraci, S., Hesser, J., Stsepankou, D., Neudecker, S., Koenig, S., Heinrich, R., Hoecklin, F., & Pili, J. (2012). Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 303, F783–F788. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00279.2012>
- Sheerin, N. S., Risley, P., Abe, K., Tang, Z., Wong, W., Lin, T., & Sacks, S. H. (2008). Synthesis of complement protein C3 in the kidney is an

- important mediator of local tissue injury. *The FASEB Journal*, 22, 1065–1072. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8719com>
- Timmermans, S., Abdul-Hamid, M. A., Vanderlocht, J., Damoiseaux, J., Reutelingsperger, C. P., van Paassen, P., & Limburg Renal, R. (2017). Patients with hypertension-associated thrombotic microangiopathy may present with complement abnormalities. *Kidney International*, 91, 1420–1425. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.12.009>
- Timmermans, S. A., Abdul-Hamid, M. A., Potjewijd, J., Theunissen, R. O., Damoiseaux, J. G., Reutelingsperger, C. P., van Paassen, P., & Registry, L. R. (2018). C5b9 formation on endothelial cells reflects complement defects among patients with renal thrombotic microangiopathy and severe hypertension. *Journal of the American Society of Nephrology*, 29, 2234–2243. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018020184>
- Tusher, V. G., Tibshirani, R., & Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 5116–5121. <https://doi.org/10.1073/pnas.091062498>
- van der Heijden, C., Bode, M., Riksen, N. P., & Wenzel, U. O. (2022). The role of the mineralocorticoid receptor in immune cells in cardiovascular disease. *British Journal of Pharmacology*, 179, 3135–3151. <https://doi.org/10.1111/bph.15782>
- Weiss, S., Rosendahl, A., Czesla, D., Meyer-Schwesinger, C., Stahl, R. A., Ehmke, H., Kurts, C., Zipfel, P. F., Kohl, J., & Wenzel, U. O. (2016). The complement receptor C5aR1 contributes to renal damage but protects the heart in angiotensin II-induced hypertension. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 310, F1356–F1365. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00040.2016>
- Wenzel, U., Kemper, C., & Köhl, J. (2021). Canonical and non-canonical functions of the complement system in health and disease. *British Journal of Pharmacology*, 178, 2751–2753. <https://doi.org/10.1111/bph.15503>
- Wenzel, U., Turner, J. E., Krebs, C., Kurts, C., Harrison, D. G., & Ehmke, H. (2016). Immune mechanisms in arterial hypertension. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27, 677–686. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015050562>
- Wenzel, U. O., Bode, M., Kohl, J., & Ehmke, H. (2017). A pathogenic role of complement in arterial hypertension and hypertensive end organ damage. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 312, H349–H354. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00759.2016>
- Wenzel, U. O., Ehmke, H., & Bode, M. (2021). Immune mechanisms in arterial hypertension. *Recent Advances. Cell Tissue Research*, 385, 393–404. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03409-0>
- Wenzel, U. O., Kemper, C., & Bode, M. (2020). The role of complement in arterial hypertension and hypertensive end organ damage. *British Journal of Pharmacology*, 178, 2849–2862.
- Wesseling, S., Ishola, D. A. Jr., Joles, J. A., Bluysen, H. A., Koomans, H. A., & Braam, B. (2005). Resistance to oxidative stress by chronic infusion of angiotensin II in mouse kidney is not mediated by the AT2 receptor. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 288, F1191–F1200. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00322.2004>
- Zhang, Y., Yang, C., Zhou, X., Hu, R., Quan, S., Zhou, Y., Li, Y., & Xing, G. (2020). Association between thrombotic microangiopathy and activated alternative complement pathway in malignant nephrosclerosis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 36, 1222–1233.
- Zhou, W., Farrar, C. A., Abe, K., Pratt, J. R., Marsh, J. E., Wang, Y., Stahl, G. L., & Sacks, S. H. (2000). Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 105, 1363–1371. <https://doi.org/10.1172/JCI8621>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Bode, M., Diemer, J. N., Luu, T. V., Ehnert, N., Teigeler, T., Wiech, T., Lindenmeyer, M. T., Herrnstadt, G. R., Bülow, J., Huber, T. B., Tomas, N. M., & Wenzel, U. O. (2023). Complement component C3 as a new target to lower albuminuria in hypertensive kidney disease. *British Journal of Pharmacology*, 1–24. <https://doi.org/10.1111/bph.16097>

13 Danksagung

Besonders möchte ich mich hiermit bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Wenzel, für die langjährige, zuverlässige und ausgezeichnete Betreuung bedanken. Seine immer schnelle und offene Kommunikation, Unterstützung und Zuverlässigkeit haben diese Arbeit primär ermöglicht und auch nach der Förderung des Graduiertenkollegs des SFB 936 kontinuierlich vorangetrieben.

Ebenso gilt mein Dank an das Graduiertenkollegs des SFB 936, welches mir diese Erfahrung überhaupt möglich gemacht hat.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ehmke und Herrn Prof. Dr. Wiech für die Revision und für das Feedback meiner Arbeit bedanken.

Ein weiterer Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe im Labor von Herrn Prof. Dr. Wenzel. Deren technische Hilfe und Unterstützung haben wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Schließlich möchte ich vom ganzen Herzen bei meinen Eltern, meiner Schwester und besonders bei meiner Freundin Helena bedanken, welche mich stetig in allen möglichen Aspekten dieser Arbeit unterstützt haben.

14 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

15 Eidesstaatliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

The Vinh Luu