

# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

Direktorin Prof. Dr. Ania Carolina Muntau

## **Lokale podozytäre Komplementregulation**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

Medical Doctor - Doctor of Philosophy (MD/PhD)

an der Medizinischen Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Dr. med. univ. Anne Katrin Mühlig  
aus Leipzig

Hamburg 2018

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 23.8.2018**

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

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Jun Oh**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Ulf Panzer**

# 1 Inhalt

2	Einleitung .....	6
2.1	Das Komplementsystem.....	6
2.1.1	Die Aktivierung des Komplementsystems.....	6
2.1.2	Die Regulation des Komplementsystems .....	7
2.1.3	Das Komplementsystem und renale Erkrankungen .....	9
2.1.4	Systemische und lokale Bildung von Komplement-Komponenten .....	9
2.2	Aufbau und Funktion des Glomerulums und des Podozyten .....	10
2.2.1	Lage des Podozyten im Glomerulum.....	10
2.2.2	Filtrationsfunktion des Podozyten und Entstehung einer Proteinurie .....	11
2.2.3	Sekretion durch Podozyten .....	12
2.3	Komplement-assoziierte Glomerulonephritis .....	13
2.3.1	Membranöse Glomerulonephritis.....	13
2.3.2	Hämolytisch-urämisches Syndrom .....	14
3	Zielsetzung.....	15
4	Material und Methoden.....	16
4.1	Material .....	16
4.1.1	Verbrauchsmaterial, Lösungen, Kits, Chemikalien und Geräte.....	16
4.1.2	Verwendete Puffer und Zusammensetzung.....	21
4.1.3	Verwendete Antikörper.....	22
4.1.4	Verwendete Primer und Sonden .....	24
4.1.5	Verwendete Tiere .....	25
4.1.6	Software und Programme .....	26
4.2	Methoden .....	26
4.2.1	Zellkultur und Stimulationen .....	26
4.2.2	Tierversuche .....	29
4.2.3	Methoden zur Untersuchung von gewonnenen Proben .....	31
4.2.4	Grafische und Statistische Auswertung .....	38
5	Ergebnisse .....	40
5.1	Kultivierte Podozyten wurden von einer Komplement-Aktivierung angegriffen und geschädigt .....	40

5.1.1	Komplement-Aktivierung führte zu einer Ablagerung von C3c durch die Aktivierung des klassischen Komplement-Weges.....	40
5.1.2	Komplement-Aktivierung resultierte in einer Ablagerung von C5b-9.....	41
5.1.3	Komplement-Aktivierung verursachte eine Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) .....	42
5.1.4	Reorganisation des Aktin- Zytoskeletts durch Komplement-Aktivierung .....	43
5.2	Bildung und Sekretion von regulierenden Komplement-Komponenten durch kultivierte Podozyten.....	44
5.2.1	Podozyten bildeten mRNA regulierender Komplement-Komponenten.....	45
5.2.2	Podozyten exprimierten die Komplement-Regulatoren CFH, CD46, CD55 und CD59 als Proteine und sezernierten CFH.....	45
5.2.3	Zelllinienspezifische Sekretion von CFH.....	46
5.2.4	Podozytär sezerniertes CFH war funktionell aktiv.....	47
5.3	Bildung und Sekretion von aktivierenden Komplement-Faktoren durch kultivierte Podozyten.....	48
5.3.1	Podozyten bildeten mRNA für aktivierende Komplement-Komponenten .....	49
5.3.2	Podozyten exprimierten die Komplement-Komponenten C2, C3 und C5 auf Proteinebene.....	49
5.3.3	Podozyten sezernierten die Komplement-Komponenten C2, C3, C5, Faktor B und Properdin.....	50
5.3.4	Podozyten bildeten und sezernierten aktives C3a .....	51
5.4	Transport und Exozytose der Komplement-Komponenten C3 und CFH.....	52
5.4.1	Stimulation der Komplement-Faktoren-Sekretion durch Interferon Gamma....	52
5.4.2	Speicherung der Komplement-Komponenten C3 und CFH im Golgi-Apparat.	54
5.4.3	Inhibition der Sekretion von Komplement-Faktoren mit Brefeldin A .....	55
5.4.4	Die Sekretion von C3 erfolgte in Neuronen-ähnlichen Vesikeln.....	56
5.5	Bildung von podozytären Komplement-Faktoren <i>in vivo</i> .....	58
5.5.1	Nachweis von mRNA in Podozyten gesunder Mäuse.....	59
5.5.2	Regulation von C3 und CFH im Proteinurie-Modell .....	60
6	Diskussion.....	65
6.1	Wie beeinflusst eine glomeruläre Komplementaktivierung den Podozyten? .....	65
6.2	Wie beeinflusst der Podozyt die glomeruläre Komplementaktivierung? .....	66
6.2.1	Regulation der glomerulären Komplementaktivierung .....	67

6.2.2	Aktivierung der glomerulären Komplement-Reaktion.....	69
6.3	Der Podozyt als immunologisch aktive Zelle.....	72
6.4	Konklusion und Ausblick .....	74
7	Literaturverzeichnis .....	76
8	Zusammenfassung.....	82
9	Summary.....	83
10	Danksagung.....	84
11	Lebenslauf.....	85
12	Abbildungsverzeichnis.....	87
13	Abkürzungsverzeichnis.....	88
14	Eidesstattliche Versicherung .....	93

## 2 Einleitung

Eine Glomerulonephritis ist eine entzündliche Erkrankung der Nierenkörperchen (= Glomeruli) und eine der häufigsten Erkrankungen der Niere. Das Glomerulum setzt sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen. Vor allem die glomerulären Epithelzellen (Podozyten) sind von einer Glomerulonephritis betroffen. Häufig wird die Erkrankung durch eine fehlgeleitete und überschießende Komplementaktivierung verursacht. Das Komplementsystem dient der Abwehr von eindringenden Mikroorganismen und der Beseitigung von apoptotischen Zellen nach Entzündungsreaktionen oder Gewebeschäden unterschiedlichen Ursprungs. Mutationen oder Veränderungen in den Komplementaktivierungswegen, die zu einer gestörten Aktivierung führen, begünstigen schwerwiegende bakterielle Infektionen.

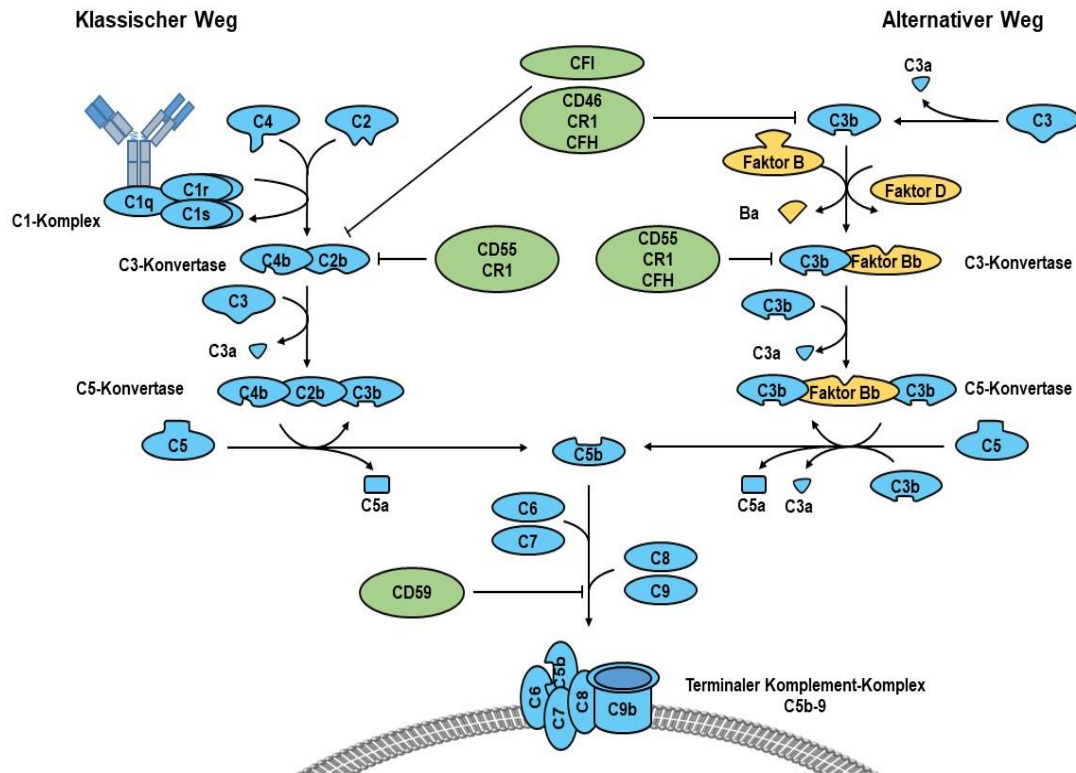
### 2.1 Das Komplementsystem

#### 2.1.1 Die Aktivierung des Komplementsystems

Das Komplementsystem ist ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. Es besteht aus über 30 löslichen und Membran-gebundenen Proteinen und kann über drei unterschiedliche Wege aktiviert werden: Der klassische Aktivierungsweg wird durch das Auftreten von Immunkomplexen oder durch die Interaktion von IgM oder IgG (Ig = Immunglobulin) mit der Komplement-Komponente C1q gestartet. Der Lektin-Weg wird durch das Vorkommen von Mannose-bindendem Lektin in Bakterien, aktiviert. Der alternative Aktivierungsweg beinhaltet eine spontane Hydrolyse von C3, die im Serum kontinuierlich auftritt, aber unter normalen Umständen von Komplement-Regulatoren reguliert und angehalten wird. Für die Entwicklung von Nierenerkrankungen (wie zum Beispiel dem atypischen hämolytisch-urämischen Syndrom oder einer membranösen Glomerulonephritis) spielen vor allem der klassische und der alternative Weg eine Rolle. Diese beiden Wege sind in **Abbildung 1** dargestellt. Alle drei Wege führen über eine kaskadenartige Spaltung zur Bildung einer sogenannten C3-Konvertase, eine Serin-Protease, auf der Oberfläche der Zielzelle, welche C3 spaltet. Die Spaltung von C3 zu C3a und C3b stellt einen zentralen Schritt in der Komplement-Aktivierung dar. Durch die Bildung der aktiven Komponente C3a kommt es zur Bildung einer C5-Konvertase, welche wiederum die Komplement-Komponente C5 zu C5a und C5b spaltet. C5b lagert sich mit anderen Komplement-Faktoren des späten Komplement-Weges (C6, C7, C8 und C9) zum sogenannten terminalen Komplement-Komplex (TCC, C5b-9) zusammen, der in ausreichender Konzentration eine Art „Pore“ bildet und zur Lyse der Zielzelle führt. Die Spaltprodukte der frühen Komplement-Faktoren C1 bis C5, welche in den einzelnen Wegen entstehen, wirken zusätzlich als Anaphylatoxine, locken weitere Entzündungszellen an und sind damit an inflammatorischen Prozessen beteiligt.

### 2.1.2 Die Regulation des Komplementsystems

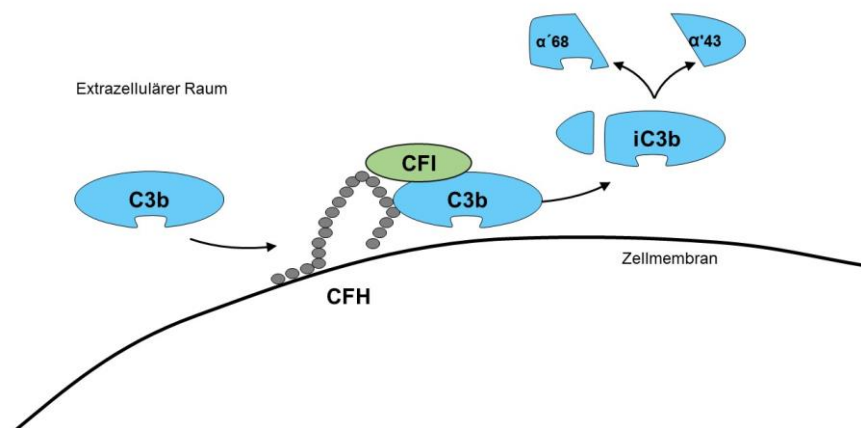
Das Komplementsystem, insbesondere der terminale Komplementkomplex, besitzt starke lytische Eigenschaften. Eine ungebremste Aktivierung würde zu einer Zerstörung auch von körpereigenem Gewebe führen. Der alternative Aktivierungsweg kann jederzeit und überall angeschaltet werden. Bereits die Spaltung eines einzelnen C3-Moleküls kann die Aktivierung starten und die Kaskade amplifizieren. Es existiert daher ein System aus löslichen und Membran-gebundenen Komplement-Regulatoren, welches die Komplement-Aktivierung zielgerichtet reguliert. Körpereigene Zellen exprimieren Membran-ständige Regulatoren (z.B. CD46, CD55 und CD59 (CD = Cluster of Differentiation)), um sich selbst vor dem Angriff durch das Komplementsystem zu schützen. Diese Komplement-Regulatoren fehlen auf der Oberfläche von beispielsweise Mikroorganismen. Damit kann das Komplementsystem zwischen „eigen“ und „fremd“ unterscheiden. CD46, auch als *Membrane-Cofactor-Protein* (MCP) bezeichnet wirkt dabei als Ko-Faktor gemeinsam mit Komplement-Faktor I und spaltet die Komponente C3b um damit die Aktivierung im alternativen Weg zu unterbrechen. CD55 (auch bezeichnet als *Decay Accelerating Factor*) bindet unter anderem C3b, verhindert so die Bildung einer C5-Konvertase und beschleunigt den Abbau von C3b. CD59 verhindert die Anlagerung des terminalen Komplementkomplexes an der Zelle und wirkt damit erst auf der Endstrecke des Komplementaktivierungsweges (**Abbildung 1**) (1, 2).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des klassischen und des alternativen Aktivierungsweges des Komplement-Systems.** Im klassischen Aktivierungsweg führt die Bindung eines Antikörpers an ein Antigen über die Aktivierung des C1-Komplexes zur Aktivierung von C4 und zur Herstellung einer C3-Konvertase. Der alternative Weg wird durch eine spontane Hydrolyse von C3 zu C3b aktiviert. C3b wiederum stellt im alternativen Weg einen Bestandteil der C3-Konvertase, welche weiter C3 spaltet. Die C3-Konvertasen in beiden Wegen führen über die Herstellung von C3b zur Bildung einer C5-Konvertase. Die C5-Konvertase führt wiederum zur Spaltung von C5 zu C5a und C5b. Das entstandene C5b ist wichtiger Bestandteil des terminalen Komplementkomplexes C5b-9. Um eine überschießende Aktivierung zu vermeiden, existieren mehrere Komplement-Regulatoren (in grün), die auf unterschiedlichen Ebenen der Komplement-Aktivierung eingreifen (1, 2).

Zusätzlich existieren Regulatoren, die im Serum zirkulieren. Der wichtigste regulatorische Mechanismus im alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems ist der Komplement-Faktor H (CFH). Er bindet über Heparansulfat an der Oberfläche von Zellen und stellt einen essentiellen Ko-Faktor für die Faktor I (CFI) vermittelte Spaltung der zentralen Komplement-Komponente C3b, dar (**Abbildung 2**). Er kann so ebenfalls eine überschießende Aktivierung des Systems verhindern und körpereigene Zellen vor einem Schaden durch Komplement schützen (1, 2).





**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Funktion von Komplement-Faktor H (CFH) und Faktor I (CFI).** CFH bindet über Heparansulfat an die Oberfläche der Zelle und fixiert C3b. Dadurch ermöglicht es die Spaltung von C3b in zwei inaktive Bruchstücke durch CFI. Die beiden Bruchstücke können im Westernblot bei einer Höhe von 68kDa und 43kDa sichtbar gemacht werden. Dieser Nachweis dient im sogenannten Ko-Faktor-Versuch als Hinweis auf eine funktionierende Spalt-Aktivität von CFI und CFH.

### 2.1.3 Das Komplementsystem und renale Erkrankungen

Es gibt zahlreiche Erkrankungen, die mit einer fehlerhaften Komplementregulation oder einer überschießenden Komplement-Aktivierung einhergehen. Häufig sind die Komplement-Regulatoren betroffen. Mutationen in den Regulator-Genen oder Antikörper gegen Regulatoren, zum Beispiel gegen CFH, führen zu Erkrankungen wie dem atypischen hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) (3), einer C3-Glomerulonephritis oder einer membranoproliferativen Glomerulonephritis (MPGN). Zusätzlich existieren viele renale Erkrankungen, bei der die Aktivierung des Komplementsystems durch die stark zellzerstörende Wirkung zu einem Gewebeschaden führen kann, wie zum Beispiel ein systemischer Lupus erythemathodes oder eine membranöse Glomerulonephritis (siehe 2.3.1).

### 2.1.4 Systemische und lokale Bildung von Komplement-Komponenten

Die Bildung der Komplement-Komponenten findet in erster Linie in der Leber statt und die löslichen Komponenten zirkulieren anschließend im Blut. In den letzten Jahren konnte aber auch gezeigt werden, dass eine lokale Komplement-Produktion in bestimmten Organen wie der Niere, dem Gehirn, dem Darm und anderen eine bedeutsame Rolle bei der Entstehung verschiedener Komplement-vermittelter Erkrankungen spielt (4-11). Vor allem in der Niere konnte sowohl bei gesunden, als auch bei erkrankten Probanden die lokale Produktion von Komplement-Komponenten nachgewiesen werden (12-17). Völlig unklar ist, welchen Anteil

die verschiedenen Zelltypen der Niere jeweils an der lokalen Komplement-Produktion haben und welcher Schaden in den unterschiedlichen Zelltypen durch eine lokale Aktivierung gesetzt wird. Entscheidend ist hierbei aber auch der Anteil und der Einfluss der regulierenden Komplement-Faktoren, welche ebenfalls in der Niere gebildet werden (18-20). Daher gewinnt die differenzierte Untersuchung der lokalen zellspezifischen Produktion einzelner Komplement-Bestandteile und der Auswirkung der lokalen Komplement-Aktivierung zunehmend an Bedeutung.

Zusätzlich zur Beteiligung an einer Komplement-Reaktion konnte vor kurzem gezeigt werden, dass lokal produzierte Komplement-Komponenten weitere Aufgaben haben. So trägt C3a, welches von T-Zellen sezerniert wird und anschließend wieder an Rezeptoren (C3a-Rezeptor) auf der Oberfläche von T-Zellen bindet, zur Differenzierung und Proliferation der T-Zellen bei (21).

Die Bildung von Komplement-Komponenten im Glomerulum war dabei bereits Gegenstand einiger weniger Studien. In Zellkultur-Studien aus Primärkulturen wurde gezeigt, dass mesangiale, glomeruläre endotheliale Zellen und auch Podozyten in der Lage sind C3, C4 und den Komplement-Faktor B zu bilden (22-26). Einige Studien demonstrierten die Wichtigkeit der lokalen Produktion der zentralen Komplement-Komponente C3 im Rahmen der Immunkomplex-induzierten Glomerulonephritis (13) aber auch bei Erkrankungen wie der membranösen Glomerulonephritis (27). Im Mausmodell trug die lokale Komplementsynthese wesentlich zum entstehenden Schaden bei einer experimentell induzierten Proteinurie bei (28). Zusätzlich zu den aktivierenden Faktoren, spielen aber auch regulierende Faktoren eine wichtige Rolle. In gesunden und erkrankten Glomeruli erfolgte ein Nachweis der Expression der Membran-ständigen Regulatoren CD46, CD55 und CD59 (18, 19). Auch die Bildung von CFH wurde in Glomeruli (20) und den Tubuli gezeigt (19).

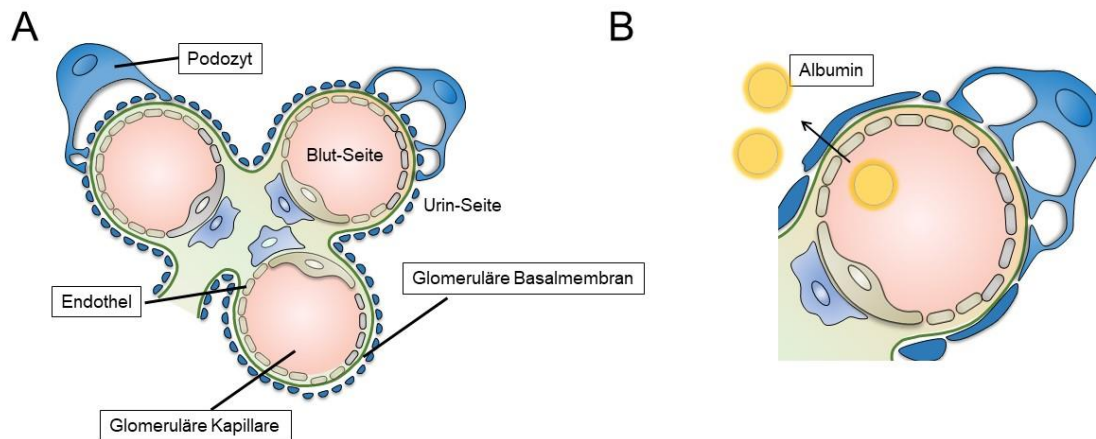
C3 spielt eine zentrale Rolle in allen Aktivierungswegen des Komplementsystems. Seine spontane Zersetzung erfolgt vor allem im alternativen Weg und kann daher ungehemmt fortlaufen, so lang keine Regulatoren eingreifen können. CFH ist damit im alternativen Komplement-Aktivierungsweg der wichtigste Gegenspieler. Membran-ständige Regulatoren werden auf der Oberfläche von nahezu allen Körper-Zellen exprimiert. Für CFH liegt der wesentliche Bildungsort vor allem in der Leber. Da der Podozyt keinen Kontakt zu im Serum zirkulierenden CFH hat, war die Annahme dieser Arbeit, dass er auf seine eigenständige Bildung angewiesen ist.

## **2.2 Aufbau und Funktion des Glomerulums und des Podozyten**

### **2.2.1 Lage des Podozyten im Glomerulum**

Das Glomerulum (= Nieren-Körperchen) ist besonders häufig von Komplement-aktivierenden Erkrankungen betroffen. Der Grund für diese besondere Empfindlichkeit konnte bis heute nicht

vollständig geklärt werden. Das Glomerulum ist der Filtrationsapparat der Niere und setzt sich im Wesentlichen aus drei Schichten zusammen (**Abbildung 3**): der glomerulären Endothelzelle, welche die glomeruläre Kapillare auskleidet, der glomerulären Basalmembran (GBM), und dem außen auf der Urinseite aufsitzenden Podozyten. Der Podozyt steht damit über den Urin im Kontakt mit der Außenseite und kann von eindringenden Mikroorganismen direkt betroffen sein.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Glomerulums und Entstehung einer Proteinurie. A:** Die Kapillare eines Glomerulums wird von einem gefensterten Endothel ausgekleidet (Blut-Seite), welches auf der glomerulären Basalmembran liegt. Der Podozyt sitzt außen auf der Kapillare auf (Urin-Seite) und bildet Fußfortsätze aus. Die Fußfortsätze benachbarter Podozyten greifen Reißverschluss-artig ineinander und bilden die podozytäre Schlitzmembran. Für die Funktion des Glomerulums ist die Aufrechterhaltung der Architektur der Podozyten von entscheidender Bedeutung. **B:** Kommt es zu einer Schädigung des Podozyten, so resultiert ein Verschmelzen der Fußfortsätze (*effacement*) und es entsteht eine Proteinurie (Verlust von Albumin und anderen Proteinen über den Urin) (29) (*Bilder adaptiert und mit freundlicher Genehmigung von E. Hoxha*).

### 2.2.2 Filtrationsfunktion des Podozyten und Entstehung einer Proteinurie

Podozyten bilden mit ihrer Schlitzmembran einen entscheidenden Teil des glomerulären Filterapparates und verhindern den Verlust von Albumin und andere Plasmaproteinen. Sie bilden zwischen ihren interdigitierenden Fußfortsätzen eine hochkomplexe Zell-Zell-Kontaktstelle, die Schlitzmembran, aus. Gemeinsam mit dem Kapillarendothel und der glomerulären Basalmembran bildet sie eine effektive Barriere für hochmolekulare Substanzen aus dem Blut (29). Die Schlitzmembran stellt sich als elektronendichte, reißverschlussartige Struktur dar und ist aus diversen trans-membranären Molekülen (Nephrin, Neph1, p-Cadherin und FAT) zusammengesetzt, die über Podocin und CD2AP am Aktin-Zytoskelett der Podozyten verankert sind.

Werden Podozyten verletzt, so erfahren sie eine hochgradige Veränderung ihres Aktin-Zytoskeletts und zeigen dadurch das Bild der Fußfortsatzverbreiterung. Durch diese Veränderungen wird die komplexe renale Filtrationsbarriere gestört und es kommt zur Proteinurie. Diese Fußfortsatzverbreiterung kann nur elektronenmikroskopisch gesehen werden und wird als *effacement* bezeichnet. Bei einigen proteinurischen Erkrankungen ist dieses *effacement* der einzige erkennbare pathologische Befund und wird deshalb als *Minimal Changes Disease* bezeichnet. Trotz dieser kaum erkennbaren Veränderung kann eine schwerwiegende Erkrankung, das nephrotische Syndrom, mit der Entwicklung einer Hypalbuminämie und massiven Ödemen, entstehen. Diese Erkrankung, bei der ausschließlich Podozyten betroffen scheinen, verdeutlicht die Wichtigkeit der Podozyten an der Filtrationsbarriere. Die Aufrechterhaltung der spezialisierten Architektur des Podozyten ist daher wesentlich für die glomeruläre Filtrationsfunktion verantwortlich (30-32). Eine gestörte Filtrationsfunktion führt zu einem vermehrten Auftreten von Serumbestandteilen im Urin, dadurch können weitere Nierenzellen, zum Beispiel Tubuluszellen, geschädigt werden (33). Durch diese Schädigung entstehen weitere akute und chronische Veränderungen in der Niere, welche die Nieren-Funktion beeinträchtigen und die Prognose der Erkrankung massiv verschlechtern können (33).

Häufig führen auch Komplement-vermittelte Nierenerkrankungen (siehe **2.3**) zu einer Beeinträchtigung der Filtrationsbarriere. Zum Teil entsteht eine Proteinurie bereits ganz zu Beginn der Erkrankung und ist dann das erste erkennbare Symptom.

### **2.2.3 Sekretion durch Podozyten**

Es ist bereits bekannt, dass Podozyten neben ihrer „mechanischen“ Aufgabe der Regulation der Filtration eine Rolle als sezernierende Zellen spielen können. Hierbei scheint die Kommunikation zwischen Podozyten und anderen Zellen (*crosstalk*), aber auch der Podozyten untereinander von Bedeutung zu sein. Der Podozyt sezerniert unter anderem den *Vascular endothelial growth Factor A* (VEGF A), welcher für die Differenzierung von Mesangiumzellen, für die Beweglichkeit von Endothelzellen und für die Entwicklung des Glomerulums von essentieller Bedeutung ist (34-36).

Außerdem scheinen Podozyten über Neuronen-artige funktionell aktive „synaptische“ Vesikel zu verfügen (37, 38), und ähnlich den Neuronen, darüber miteinander zu kommunizieren (39). Es wäre daher durchaus denkbar, dass auch eine Sekretion von verschiedensten Proteinen durch den Podozyten, der Sekretion von Neurotransmittern durch Neuronen sehr ähnlich sein könnte. Daher wurde in einem Teil dieses Projektes der Sekretionsmechanismus und die intrazelluläre Lokalisierung (Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum) sowie die Assoziation mit Bestandteilen neuronaler Vesikel untersucht.

## **2.3 Komplement-assoziierte Glomerulonephritis**

Das Komplementsystem ist ein essentieller Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. Es spielt aber auch bei zahlreichen glomerulären Erkrankungen eine wichtige Rolle. Diese Erkrankungen können zum einen durch eine verstärkte Aktivierung des Komplementsystems, zum anderen aber auch durch eine verminderte Regulation des Systems ausgelöst werden. Es können verschiedene Ursachen (z.B. Gen-Mutationen, Auftreten von Antikörpern) für eine verstärkte Aktivierung oder eine verminderte Regulation verantwortlich sein. Das Komplementsystem kann dabei primär beteiligt sein, d.h. die Komplement-Aktivierung verursacht direkt die auftretende Gewebe-Zerstörung und damit die Erkrankung. Das Komplementsystem kann aber auch sekundär aktiviert werden, zum Beispiel nach einer anderweitig verursachten Schädigung und dann den bereits entstandenen Schaden noch weiter verschlechtern. In den meisten Fällen sind die Übergänge hier jedoch fließend, und der primäre und sekundäre Anteil des Komplementsystems an einer Erkrankung ist nicht klar zu trennen. Zudem kann man zwischen Erkrankungen unterscheiden, bei denen die Aktivierung des Komplementsystems primär lokal in der Niere abläuft (z.B. membranöse Glomerulonephritis) und Erkrankungen, bei denen es zu einer systemischen Komplement-Aktivierung kommt. Das Glomerulum ist dann auf Grund seiner erhöhten Vulnerabilität betroffen (z.B. membranoproliferative Glomerulonephritis, atypisches hämolytisch-urämisches Syndrom, C3-Glomerulopathie).

In diesen Experimenten sollte die Rolle des Podozyten in der Komplement-assoziierten Glomerulonephritis allgemein untersucht werden. Zum einen spielt der Schaden am Podozyten selbst eine wichtige Rolle, zum anderen wollte ich den Einfluss des Podozyten auf die lokale Komplementreaktion analysieren. Diese beiden Mechanismen spielen vermutlich bei allen dieser Komplement-assoziierten Erkrankungen eine Rolle. Der Fokus dieser Arbeit wurde aber auf zwei wichtige glomeruläre Erkrankungen gelegt. Bei der membranösen Glomerulonephritis kommt es lokal zu einer Komplement-Aktivierung und Schädigung am Podozyten direkt. Beim atypischen hämolytisch-urämisches Syndrom führt eine systemisch ablaufende Aktivierung vor allem zu einer renalen Schädigung.

### **2.3.1 Membranöse Glomerulonephritis**

Bei der membranösen Glomerulonephritis (MGN) steht der Podozyt im Mittelpunkt der Erkrankung. Das erste Symptom der Erkrankung ist in der Regel das Auftreten einer Proteinurie unterschiedlichen Ausmaßes. Bei Erwachsenen lassen sich in 80-85% (40), bei Kindern in etwa 50% (41) der Fälle Antikörper nachweisen, welche gegen Antigene auf Podozyten gerichtet sind. Es kommt im Glomerulum zur Bindung der Antikörper an den Podozyten, zur Entstehung

von subepithelialer Anhäufung von Antikörpern und Antigenen und zu einer Aktivierung des Komplementsystems (42, 43) unterhalb des Podozyten. Es ist, ähnlich wie bei anderen glomerulären Erkrankungen umstritten ob das Komplementsystem ursächlich an der Krankheitsentstehung beteiligt ist oder eher eine sekundäre Rolle spielt. In den subepithelialen Immundepots lässt sich vorwiegend der Subtyp IgG4 als Antikörper nachweisen (44). IgG4 allein ist nicht in der Lage das Komplementsystem über den klassischen Weg zu aktivieren. Daher scheint vor allem die Aktivierung über den alternativen Weg von Bedeutung bei der Entwicklung der MGN zu sein (45). Unabhängig von der Art der Aktivierung und der Ursache der Krankheitsentstehung scheint aber das Komplementsystem an dem verursachten Schaden in der Niere und insbesondere am Podozyten verantwortlich zu sein.

### **2.3.2 Hämolytisch-urämisches Syndrom**

Das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) ist durch die Symptom-Trias Thrombopenie, Anämie und akutes Nierenversagen gekennzeichnet. Die Erkrankung wird durch das Auftreten einer thrombotischen Mikroangiopathie verursacht, welche vor allem die glomerulären Kapillaren betrifft. In den meisten Fällen spielt hierbei eine Infektion mit einem Shigatoxin-produzierenden *E.coli* eine Rolle (sogenanntes typisches HUS). Das Shigatoxin kann Podozyten direkt schädigen (46), aber auch das Komplementsystem aktivieren (47, 48). Beim Komplement-assoziierten (oder atypischen HUS) ist keine Infektion mit einem *E.coli* nachweisbar. In der Regel liegen genetische Defekte der Komplement-Regulation zu Grunde. Ursachen hierfür können zum Beispiel *loss of function*- Mutationen für CFH, CFI oder CD46 oder aber das Auftreten von Autoantikörpern gegen CFH sein (49, 50). Die Erkrankung setzt entweder spontan (idiopathisch) ein, kann aber auch durch einen banalen „Trigger“ wie eine respiratorische Infektion oder einem Magen-Darm-Infekt mit einem nicht Shigatoxin produzierenden Keim auftreten (51). Beide Formen des HUS verursachen einen Endothelzellschaden, der vor allem die glomerulären Gefäße betrifft und zu einer thrombotischen Mikroangiopathie führt. Daher wird das HUS primär als eine Erkrankung der Endothelzelle angesehen, dennoch zeigt sich eine Proteinurie und damit eine Beteiligung des Podozyten in einer sehr frühen Phase in der Erkrankung (52). Die durch die Komplement-Aktivierung verursachte Schädigung am Podozyten kann wesentlich zur Verschlechterung beitragen (53).

### 3 Zielsetzung

Da Patienten mit einer Komplement-assoziierten Nierenerkrankung, wie der MGN, als erstes Symptom eine Proteinurie entwickeln, der Schaden also zunächst am Podozyten auftritt, wurde der Podozyt in den Mittelpunkt dieser Arbeit gestellt.

In diesen Experimenten sollte gezeigt werden, wie das Komplementsystem dem Podozyten schaden kann. Außerdem war ich interessiert daran, mit welchen Mitteln sich Podozyten gegen einen Komplementangriff wehren können, also welche Komplement-Regulatoren sie exprimieren, und ob diese auch funktionell aktiv sind. Da der Komplement-Faktor H (CFH) eine sehr zentrale Rolle in der Komplement-Regulation im alternativen Aktivierungsweg spielt, wurde vor allem die Expression und Sekretion von CFH fokussiert. Außerdem scheint die lokale Komplementsynthese bei zahlreichen Komplement-vermittelten Nierenerkrankungen wichtig zu sein. Daher wollten ich wissen, ob der Podozyt in der Lage ist, nicht nur regulierend, sondern auch aktivierend in die glomeruläre Komplement-Aktivierung einzugreifen. Aus diesem Grund wurde die Fähigkeit der Podozyten untersucht, aktivierende Komplement-Faktoren zu bilden und an die Umgebung abzugeben. In diesen Untersuchungen lag die Konzentration dabei vor allem auf der Komplement-Komponente C3, da C3 eine zentrale Rolle bei der Aktivierung des Komplementsystems über alle drei Wege spielt.

Insgesamt sollte mit dieser Arbeit gezeigt werden, welche Rolle Podozyten in der Komplement-assoziierten Glomerulonephritis spielen können.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Verbrauchsmaterial, Lösungen, Kits, Chemikalien und Geräte

Verbrauchsmaterial	Firma
53 µm Cellstrainer	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
100 µm Cellstrainer	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
48-well Plates	Sarstedt, Nümbrecht, GER
50 ml Reaktionsgefäß	Greiner, Kremsmünster, AUT
96-well Mikrotiterplatte	Sarstedt, Nümbrecht, GER
BD Microfine +30G	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
Butterfly	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Deckgläser, 13 mm, rund	Marienfeld, VWR, Radnor, PA, USA
Deckgläser, 25 mm, eckig	Marienfeld, VWR, Radnor, PA, USA
Einfrier-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, GER
FACS-Röhrchen	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
Immobilon FL-Membran	Merck-Millipore, Burlington, MA, USA
Multistix	Siemens, München, GER
Objekträger	Marienfeld, VWR, Radnor, PA, USA
Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Serum-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Spritzen 2 ml	Braun, Frankfurt, GER
TC- Schale 100, Cell+	Sarstedt, Nümbrecht, GER
TC-Flasche T75, Cell+, Bel. Kap.	Sarstedt, Nümbrecht, GER
TC-Flasche T75, Cell+, Bel. Kap.	Sarstedt, Nümbrecht, GER
TC-Platte 6-well standard	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Tissue Tek Compound Einbettmedium	Tissue Tek, VWR, Radnor, PA, USA,
Tubes 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, GER
Wattetupfer	Meditrade, Kiefersfelden, GER
Westernblot Schwämme	Biorad, Hercules, CA, USA
Zellschaber 16 cm	Sarstedt, Nümbrecht, GER

**Tabelle 1: Verbrauchsmaterial**



<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, GER
Trizma Base	Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA
Agarose	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Aqua ad iniectionabilia	Braun, Frankfurt, GER
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA
Calyculin-A	Vector, Youngstown, OH, USA
Complete 25x	Merck-Millipore, Burlington, MA, USA
DTT	Roth, Karlsruhe, GER
EDTA	Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA
Eisessig	Merck-Millipore, Burlington, MA, USA
Ethanol 100%	Merck-Millipore, Burlington, MA, USA
Ethidiumbromid	Life Technologies, Darmstadt, GER
Formalin	Life Technologies, Darmstadt, GER
Glyzin	Roth, Karlsruhe, GER
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, GER
Methanol 100%	Roth, Karlsruhe, GER
Methanol 100%	Merck-Millipore, Burlington, MA, USA
MOPS	Biomol, Hamburg, GER
Na <sub>2</sub> EDTA	Merck-Millipore, Burlington, MA, USA
NaCl 0,9%	Braun, Frankfurt, GER
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, GER
Natriumfluorid (NaF)	Merck-Millipore, Burlington, MA, USA
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Merck-Millipore, Burlington, MA, USA
Natriumvanadat (NaVO <sub>3</sub> )	Merck-Millipore, Burlington, MA, USA
Paraformaldehyd	Thermo Fischer, Waltham, MA, USA
PBS	Lonza, Basel, CH
Tissue Protein Extraction Reagent	Thermo Fischer, Waltham, MA, USA
Trisaminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA
Citraconsäureanhydrid	Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA
Dako antibody diluting reagent	Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA
Dako Blocking Reagent	Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA
Fluoromount	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA

Isofluran	Abbvie, North Chicago, IL, USA
Kollagenase 1A	Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA
Magnetische Beads (Dynabeads)	Thermo Fischer, Waltham, MA, USA
Succrose	Serva, Heidelberg, GER
Triton X-100	Merck-Millipore, Burlington, MA, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien**

Medium Zellkultur	Firma
RPMI 1640 with L-Glutamine	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, GER
0,05% Trypsin-EDTA	Life Technologies, Darmstadt, GER
DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA
EGM-2 BulletKit	Lonza, Basel, CH
Endothelial Basal Medium 2 [EBM-2]	Lonza, Basel, CH
Fetal Bovine Serum	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, GER
ITS (100x insulin, transferrin, selenium)	Pan-Biotech, Aidenbach, GER
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt, GER
rat tail collagen type I	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

**Tabelle 3: Nährmedium Zellkultur**

Stimulantien und Toxine	Firma
Brefeldin A	Life Technologies, Darmstadt, GER
Doxorubicin-Lösung 2mg/ml = Adriamycin	UKE Apotheke
Interferon Gamma	R&D Systems, Wiesbaden, GER
Puromycin Aminonukleosid	Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA

**Tabelle 4: Verwendete Stimulantien und Toxine**

Proteine, Serum, Antikörper	Firma
anti-CD46 (GB24, IgG1)	J.P. Atkinson (Washington University)
anti-CD55 (BRIC216, IgG1)	NHS Blood and Transplant, UK
anti-CD55 (BRIC216, IgG1)	NHS Blood and Transplant, UK
Normales Humanserum	Laborpersonal
rC3b	Merck-Millipore, Burlington, MA, USA
rCFH	Merck-Millipore, Burlington, MA, USA

rCFI	Merck-Millipore, Burlington, MA, USA
normales Serum Schwein	Dianova, Hamburg, GER

**Tabelle 5: Verwendete Proteine, Seren, Antikörper**

<b>Kommerzielle Assays und Kits</b>	<b>Firma</b>
100bp DNA ladder	Biomol, Hamburg, GER
Affymetrix Quantigene View RNA	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
FACS Clean	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS Flow	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS Rinse	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Albumin-ELISA	Bethyl Laboratories, Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA
SYBRgreen PCR	Eurogentec, Lüttich, BEL
Dream Taq Polymerase-set	Fermentas, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Kreatinin-Bestimmung	Hengler Analytik, Steinbach, GER
complete Mini Inhibitor Cocktail	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel 1.0mm, 15well	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Tissue Protein Extraction buffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
5x Puffer PCR	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
dNTPs	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Random Hexamer Primer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
RNAse out	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
cDNA synthesis kit	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SeeBlue Plus2 prestained Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Odyssey Blocking Buffer	Li-Cor Biosciences, Lincoln, NB, USA
Nucleo Spin RNA	Machery-Nagel, Düren, GER
C3 Konvertase	MicroVue, Quidel, San Diego, CA, USA
LDH Cytotoxicity Kit	Pierce, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
96well Testplatten PCR	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Kreatinin (Standard)	Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA
ImmEdge Pen	Vector, Youngstown, OH, USA

**Tabelle 6: Verwendete Assays und Kits**

<b>Geräte</b>	<b>Firma</b>
Brutschränke 33 und 38°C	Heraeus, Hanau, GER
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, GER
Dampfgarer	Braun, Frankfurt, GER
Einfrierhilfe	Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA
Einmalskalpelle	Braun, Frankfurt, GER
Elektrophorese Power supply	Pharmacia Biotec, Piscataway, NJ, USA
Gefrierschrank -20°C	Privileg, Stuttgart, GER
Gefrierschrank -80°C	Privileg, Stuttgart, GER
Gelgießstation	PeqLab, VWR, Radnor, PA, USA
Gelkammer	PeqLab, VWR, Radnor, PA, USA
Glas-Homogenisierer	OMNI, Seattle, WA, USA
Isofluran-Narkose-Kammer	Völker, Kaltenkirchen, GER
Klemme	F.S.T., Freudenberg, GER
Kryotom	Leica, Wetzlar, GER
Kühlplatte COP30	Medite, Burgdorf, GER
Kühlschrank -20°C	Privileg, Stuttgart, GER
Kühlschrank 4°C	Privileg, Stuttgart, GER
Kühlschrank -80°C	Privileg, Stuttgart, GER
Leica TCS SP5	Leica Biosystems, Nussloch, GER
LSR II Flow Cytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Magnetic Microparticel Concentrator	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Mäusekäfige	Bioscape, Otterndorf, GER
Mikroplate reader EL808	BIOTEK, Winooski, VT, USA
Mikroskop IM 35	Zeiss, Jena, GER
Mikroskop Perfusion	Zeiss, Jena, GER
Mikrotom Leica RM2255	Leica Biosystems, Nussloch, GER
Mikrowelle	Clatronic, Kempen, GER
MiniSpin	Eppendorf, Hamburg, GER
Nanodrop ND-1000 spectrophotometer	Thermo Fischer, Waltham, MA, USA
Novex MiniCell	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Odyssey® Clx Blot Scanner	Li-Cor Biosciences, Lincoln, NB, USA
Personal Thermocycler	Biometra, Göttingen GER
ph-Meter	WTW, Weilheim, GER
Pinzette	F.S.T., Freudenberg, GER

Pipetus	Hirschmann, Mörfelden-Walldorf, GER
Rattenkäfige	Bioscape, Castrop-Rauxel, GER
Rocky 3D Wipptisch	Froebel, Lindau, GER
Schere	F.S.T., Freudenberg, GER.
StepOne qPCR System	Thermo Fischer, Waltham, MA, USA
Stoffwechselfähig Sammelplatte	96well Mikrotiter Testplatten
Stoffwechselfähige-Deckel	Eigenkonstruktion
Stoppuhr	Roth, Karlsruhe, GER
Taumelrollschüttler RM5 30V	CAT, Ballrechten-Dottingen, GER
Thermocycler	Biometra, Göttingen, GER
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, GER
Trans-Blot® Turbo™	BioRad, Hercules, CA, USA
UV-Lampe und Kamera 365nm	Alphalmager Mini Cell Biosciences, Protein-simple, San Jose, CA, USA
Vortex VF 2	Janke & Kunkel, Staufen, GER
Waage SBA 41	Scaltec, Göttingen, GER
Waage Tierstall	Acculab, Bradford, MA, USA
Wärmematte	Sanitas, Kaunas, LIT
Wasserbad	Köttermann, Ütze, GER
Werkbank	Heraeus, Hanau, GER
WesternBlot XCell Secure Lock	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Zentrifuge, Multifuge 3 S-R	DJB Labcare, Buckinghamshire, UK

**Tabelle 7: Verwendete Geräte**

#### 4.1.2 Verwendete Puffer und Zusammensetzung

Pufferlösungen	Zusammensetzung
AP-Puffer	20 mM HEPES 10 mM EGTA 144 mM NaCl 7 mM MgCl <sub>2</sub> pH 7.4
Blotpuffer	192 mM Glycin 50mM Tris ad 1 L H <sub>2</sub> O

Ladepuffer Western Blot (4xSDS)	40 % Glycerol 240 mM Tris/HCl (pH 6,8) 8 % SDS 0,04 % Bromphenol blau 5 % $\beta$ -Mercaptoethanol 0,4 M DTT Ad H <sub>2</sub> O
Lysepuffer Westernblot	1 x Complete 25x 1 mM Natriumvanadat 1 mM Natriumfluorid 1 mM Caliculin A ad T-PER
TAE-Puffer 50x	242g Tris in 500ml H <sub>2</sub> O 100ml Na <sub>2</sub> EDTA 57,1 ml Eisessig
MOPS-Puffer	50mM MOPS 50mM Tris 0,1% SDS 1mM EDTA

**Tabelle 8: verwendete Puffer und Herstellung**

#### 4.1.3 Verwendete Antikörper

Antikörper Immunfluoreszenz	Spezies	Firma
<b>Primärantikörper</b>		
C2	Kaninchen	Pierce, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
C3	Ziege	Pierce, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
C5	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
CFH	Ziege	Calbiochem, Schwalbach
Giantin	Kaninchen	Sigma Aldrich, Carlsbad, CA, USA
C5b-9	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
CD46	Kaninchen	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
CD55	Ziege	R&D Systems, Minneapolis, USA
CD59	Ratte	Abd Serotec, Oxford, UK
Laminin	Kaninchen	Sigma Aldrich, Carlsbad, CA, USA
Nephrin	Meerschwein	Progene, Heidelberg, GER

Synaptobrevin	Kaninchen	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
Tubulin	Kaninchen	Cell signalling, Danvers, MS, USA
<b>Sekundärantikörper/Färbungen</b>		
Alexa fluor 488/555/647	anti Kaninchen anti Ziege anti Ratte anti Meerschwein	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Dapi		Vector, Youngstown, OH, USA
Draq5		Cell signalling, Danvers, MS, USA
Alexa Fluor Phalloidin		Invitrogen

**Tabelle 9: Antikörper Immunfluoreszenz**

Antikörper Westernblot	Spezies	Firma
<b>Primärantikörper</b>		
C2	Kaninchen	Pierce, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
C3	Ziege	Pierce, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
C5	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
CFH	Ziege	Calbiochem, Schwalbach
Faktor B	Kaninchen	Pierce, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Properdin	Maus	Pierce, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
GAPDH	Ziege	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
Cox 1	Kaninchen	Cell signalling, Danvers, MS, USA
PDI	Kaninchen	Cell signalling, Danvers, MS, USA
Histone H3	Kaninchen	Cell signalling, Danvers, MS, USA
<b>Sekundär-Antikörper:</b>		
IRDye 680RD	anti-Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
IRDye 800CW	anti-Ziege	Abcam, Cambridge, UK
IRDye 800CW	Anti-Maus	Abcam, Cambridge, UK

**Tabelle 10: Antikörper Westernblot**

Antikörper Durchflußzytometrie	Spezies	Firma
<b>Primärantikörper</b>		

CD46	Kaninchen	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
CD55	Ziege	R&D Systems, Minneapolis, USA
CD59	Ratte	Abd Serotec, Oxford, UK
C3c FITC	Ziege	Abcam, Cambridge, UK
<b>Sekundär-Antikörper:</b>		
Alexa fluor 488	anti Ziege anti Kaninchen anti Ratte	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Alexa Fluor 780 ( <i>live/dead staining</i> )		Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

**Tabelle 11: Antikörper Durchflußzytometrie**

#### 4.1.4 Verwendete Primer und Sonden

Alle verwendeten Primer wurden mit Hilfe von Primer3 (<http://www.primer3.ut.ee/>) entworfen und erstellt. Die verwendete Sequenz stammte aus der NCBI/ Pubmed-Bibliothek (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Die Herstellung der Primer erfolgte über *Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA.

##### 4.1.4.1 Primer konventionelle PCR

C1q <i>forward</i>	CAGGGATAAAAGGAGAGAAAGG
C1q <i>reverse</i>	TGGCGTGGTAGGTGAAGTAGTA
C1r <i>forward</i>	GATCTATGCCAACGGGAAGA
C1r <i>reverse</i>	CATTCTTCCAAATGCCCTGT
C1s <i>forward</i>	AAGAGCGTTTTACGGGGTTT
C1s <i>reverse</i>	AATCTCCCAATCAGTGCAG
C2 <i>forward</i>	CCTTGAATGGGAGCAAACCTGAAC
C2 <i>reverse</i>	GATTGATGTGAAAGTCTCGTGGC
C3 <i>forward</i>	GCTGCTCCTGCTACTAACCCA
C3 <i>reverse</i>	AAAGGCAGTTCCTCCACTTT
C4 <i>forward</i>	TGCTGCCTCCATCTAGTACA
C4 <i>reverse</i>	AGTGTGTGGAAGGGTGAAG
C5 <i>forward</i>	AGTGTGTGGAAGGGTGAAG
C5 <i>reverse</i>	GTTCTCTCGGGCTTCAACAG
Faktor B <i>forward</i>	GTGTGACCACCACTCCATGG
Faktor B <i>reverse</i>	CCATCCTCAGCATCGACTCC
Faktor D <i>forward</i>	CGACCACGACCTCCTGCTGCTACA
Faktor D <i>reverse</i>	GCTCGGGACTTTGTTGCTTGGGTG
Properdin <i>forward</i>	GATGGGCGGCTGGTCTGGCTG
Properdin <i>reverse</i>	TGCGGCTTCGTGTCTCCTTAG
CD55 <i>forward</i>	TACTACCCGTCTTCTATCTGGG
CD55 <i>reverse</i>	TTTTCAAGAGGTGTAGGTGTGC
CD59 <i>forward</i>	ACTGCAAAACAGCCGTCAAT



CD59 reverse	AGGATGTCCCACCATTTTCA
CD46 forward	GCTGCTCCAGAGTGTAAGTGG
CD46 reverse	AACAATCACAGCAATGACCC
CR1 forward	AGTCATTGTGTCTTGGTTGG
CR1 reverse	AGACGAGACAAGTAGTAGATGG
CFH forward	ACATTACTTCATTCCCGTTGTC
CFH reverse	ATACTCCAGTTTCCCATCCCAA

**Tabelle 12: Primer für konventionelle PCR**

#### 4.1.4.2 Primer quantitative PCR

C2 forward	TGCTATCGCTGCTCCTCGAA
C2 reverse	ATAAGAGTAGGGTTGGCGGC
C3 forward	CCAAGAGCTCAAGGTGAGGG
C3 reverse	GGAACGGACAACGAGGACTT
C4 forward	CAAGACAGAGCAGTGGAGCA
C4 reverse	CAAGACAGAGCAGTGGAGCA
CFH forward	AGCAGTACCATGCCTCAGAAA
CFH reverse	GGATGGCAGGCAACGTCTAT

**Tabelle 13: Primer für qPCR**

#### 4.1.4.3 Sonden Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung

Die Herstellung erfolgte über Affymetrix (Santa Clara, CA, USA).

CFH	NM_009888, <i>Catalogue No</i> VB1-16095
C3	NM_009778, <i>Catalogue No</i> VB1-13781

**Tabelle 14: Sonden für FISH**

#### 4.1.5 Verwendete Tiere

Tiere	Herkunft der Tiere
<i>Sprague Dawley</i> Ratten	<i>Charles River</i> , Wilmington, MA, USA
Balb/C Mäuse	<i>Charles River</i> , Wilmington, MA, USA
C57Bl/6 Mäuse	Forschungstierhaltung des UKE

**Tabelle 15: Verwendete Tiere und Tierarten**

#### 4.1.6 Software und Programme

Software	Firma
Alphamager	Proteinsimple, San Jose, CA, USA
FACS BD Diva	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
FlowJo	Tree Star Inc, Ashland, OR, USA
GraphPad PRISM	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Image J	Wayne Rasband
ImageStudio	Li-Cor Biosciences, Lincoln, NB, USA
KCJunior (v.1.41.6)	BIOTEK, Winooski, VT, USA
Microsoft Office	Microsoft
StepOne	Thermo Fischer, Waltham, MA, USA

**Tabelle 16: Verwendete Software**

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellkultur und Stimulationen

#### 4.2.1.1 Zellkultur

##### *Humane Podozyten*

Es wurde eine konditionierte immortalisierte Zelllinie aus humanen Podozyten verwendet, die aus einer gesunden Niere isoliert wurden (Immortalisierte humane Podozyten von Prof. Dr. Moin A. Saleem, Children's Renal Unit and Academic Renal Unit, University of Bristol, South Mead Hospital, Bristol, (54)). Diese Linie enthält als Transgen eine temperaturabhängige Variante des SV40. Dadurch kann die Zelllinie bei 33 °C und 5 % CO<sub>2</sub> proliferieren. Bei 38 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgt die Differenzierung der Zellen für 10-14 Tage. Das Zellkulturmedium setzt sich folgendermaßen zusammen: 500 ml RPMI 1640 Nährmedium, 50 ml FBS 10%, 5 ml ITS, 5 ml Penicillin/Streptomycin. Der Medium-Wechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage (meistens Montag, Mittwoch, Freitag) nach mikroskopischer Wachstums- und Kontaminationskontrolle.

Zum Auftauen wurden die Zellen in ein 37 °C warmes Wasserbad gegeben und in einer Flasche mit ausreichend frischem Medium ausgesät, das Medium wurde am Folgetag nach Absetzen und Anheftung der Zellen gewechselt, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO möglichst schnell zu entfernen. Eine Passagierung der Zellen erfolgte nach Erreichen einer Konfluenz von 70 bis 80 %. Dafür wurden die adhärennten Kulturen nach einmaligem Waschen mit PBS mit Trypsin-EDTA (ca. 3 Minuten, 37 °C) von der Unterlage abgelöst. Die enzymatische Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von FBS-haltigem Medium gestoppt, die Zellen zur Subkultivierung auf mehrere Schalen oder Flaschen aufgeteilt. Für Versuche wurden

die Zellen nach dem Trypsinieren ausgezählt, die gewünschte Zellzahl (10 cm Schale/ T75-Flasche:  $5 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  Zellen, pro 6-well:  $1 - 5 \times 10^4$ ) eingestellt und in ein neues Kulturgefäß überführt.

Für die Ausdifferenzierung wurden die Zellen nach dem Erreichen einer Konfluenz von 70 bis 80 % in den 38 °C Brutschrank überführt.

Für die Kryokonservierung wurden vitale Zellen trypsiniert, in FBS-haltigem Medium aufgenommen und für 10 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 % DMSO/Zellkulturmedium gelöst und in Einfrier-Röhrchen überführt. Es erfolgte das stufenweise Einfrieren mit einer Einfrierhilfe bei -80 °C, eine Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

#### *Blood Outgrowth Endothelial Cells (BOECs)*

Für Vergleiche bezüglich der Expressionsstärke von Komplement-Regulatoren zwischen unterschiedlichen Zelltypen wurden sogenannte *blood outgrowth endothelial cells* (BOECs) verwendet. Diese Versuche wurden im Labor von Prof. Dr. Christoph Licht im *Hospital for Sick Children* in Toronto, Kanada, durchgeführt (55). Die meisten Schritte (Auftauen, Einfrieren, Passagieren, Subkultivieren) waren mit der Zellkultur der humanen Podozyten vergleichbar, im Folgenden wird nur auf die Besonderheiten und Unterschiede zu den Podozyten eingegangen.

Das Medium für die Endothelzellen setzt sich wie folgt zusammen: 500 ml Endothelial Basal Medium 2 [EBM-2], EGM-2 BulletKit, (enthält Wachstumsfaktoren und Hormone), 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin

Die Zellkulturschalen für die Endothelzellen wurden mit Kollagen beschichtet. Dafür wurde Kollagen I in 0,02 M Eisessig gelöst und in einer Konzentration von 0,05 mg/ml über Nacht auf den Schalen inkubiert. Im Anschluss wurden die Schalen mit PBS gewaschen und bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt. Bei der Zelllinie handelt es sich um eine proliferierende Zelllinie, es wurden ca.  $1 \times 10^5$  Zellen pro 10 cm Schale bzw.  $1-5 \times 10^4$  Zellen pro 6-well ausgesät, und die Zellen dann ab einer Dichte von ca. 70 bis 80 % verwendet. Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> proliferiert. Das Medium der Zellen wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Für die Experimente wurden Zellen der Passagen 3 bis 14 verwendet.

### 3.2.1.2 Stimulation und Zellkultur-Experimente

Für die Messungen der Expression wurden die Zellen auf 10 cm Schalen ausplattiert und für 10 bis 14 Tage ausdifferenziert. Nach Erreichen der Differenzierung (mikroskopische Kontrolle) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erhielten für 24 Stunden FBS-freies Medium. Für die Bestimmung der Konzentrationen aus den Überständen in der Zellkultur wurden 10 cm Schalen mit definierten Zellzahlen nach Erreichen von 70 bis 80 % Konfluenz bei 38 °C differenziert. Die Schalen wurden dann einmal mit PBS gewaschen und mit exakt 3 ml frischem FBS-freiem Medium versehen. Die Entnahme erfolgte dann zu den entsprechenden Zeitpunkten aus den Schalen. Für den Ko-Faktor-Assay Versuch wurde Überstand nach 48 Stunden von unstimulierten Podozyten verwendet.

#### *Interferon Gamma und Brefeldin A*

Für die Stimulationsexperimente mit Interferon Gamma (IFN $\gamma$ ) wurden die ausdifferenzierten Zellen einmal mit PBS gewaschen. IFN $\gamma$  wurde in PBS gelöst und mit einer Endkonzentration von 0,1-100 ng/ml in FBS-freiem Medium verdünnt und zu den Zellen gegeben (4 ml Medium auf eine 10 cm Schale).

Brefeldin A (BFA) wurde in Ethanol nach Herstellerangaben verdünnt, und nach dem Waschen ebenfalls in Nährmedium in einer Endkonzentration von 5 ng/ml zu den Zellen gegeben. Die Inkubation mit BFA betrug für die Messung im Überstand 0 bis 8 Stunden, für die Untersuchung in der Immunfluoreszenz 4 Stunden.

Für die Messung der Komplement-Faktoren-Konzentration im Überstand wurden nach 12, 24 und 36 Stunden 40  $\mu$ l Zellkulturüberstand abgenommen. Für die Messung der Faktoren-Konzentration in den Zellen wurden die Zellen nach Beendigung der Inkubationszeit mit PBS gewaschen und anschließend geerntet.

#### *Komplement-Aktivierung*

Um die Ablagerung und Fixierung von Komplement-Aktivierung auf den Podozyten zu untersuchen wurde das Komplementsystem auf den Zellen aktiviert:

Für die Analyse in der Durchflußzytometrie wurden die Podozyten mit Trypsin von der Unterlage gelöst und in 1,5 ml Röhrchen gefüllt. Das Trypsin wurde abzentrifugiert (800 g, 5 Minuten) und die Zellen in FBS-freiem Medium resuspendiert. Das Medium wurde erneut abzentrifugiert und die Podozyten mit blockierenden Antikörpern gegen CD46, CD55 und CD59 behandelt (5  $\mu$ g/ml in FBS-freiem Medium) für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dabei erfolgte alle

5 Minuten ein sanftes Bewegen der Röhren, um ein Anhaften an der Gefäßwand zu verhindern. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium mit den gelösten Antikörpern durch Zentrifugieren entfernt und es erfolgte ein Inkubationsschritt mit 50 % humanem Serum (NHS) in FBS-freiem Medium. Die Zellen wurden in den Röhren für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, auch dabei erfolgte alle 5 Minuten ein kurzes Drehen der Gefäße. Im Anschluss wurden die Zellen durch Abzentrifugieren und Zugabe von PBS drei Mal gewaschen und anschließend erfolgte die Färbung gegen C3c.

Für den Nachweis von C5b-9 und die Beurteilung des Zytoskeletts in der Immunfluoreszenz erfolgte die Inkubation auf Zellen, die auf Deckgläschen angewachsen waren. Die Deckgläschen wurden einmal gewaschen und mit einem Gemisch aus den Antikörpern gegen CD55 und CD59 (Konzentration 5 µg/ml in serumfreiem Medium) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 25 % NHS (in FBS-freiem Medium) für 2 Stunden. Nach drei Mal Waschen mit PBS erfolgte die Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) 4 % für die Immunfluoreszenz.

Für die Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase (LDH) -Freisetzung wurden die Zellen in 48 *well*-Platten ausplattiert. Nach Beendigung der Differenzierung wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und analog zur Inkubation für die Durchflußzytometrie mit einem Antikörper-Gemisch aus anti-CD46, anti-CD55 und anti-CD59 inkubiert. Bei der LDH-Messung erfolgt die Messung der Freisetzung von LDH in den Überstand. Da es sich hierbei um eine photometrische Bestimmung handelt, musste die Konzentration des verwendeten Humanserums auf 10 % reduziert werden, da der hohe NHS Gehalt ansonsten die photometrische Messung des LDH-Produktes zu stark beeinflusst hätte. Daher erfolgte der zweite Inkubationsschritt nur mit 10 % NHS in FBS-freiem Medium bei 37 °C. Nach 24 Stunden wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und für die LDH-Messung verwendet.

## **4.2.2 Tierversuche**

### **3.2.2.1 Puromycin-induzierte Nephropathie in Ratten und Glomeruli-Gewinnung**

Die Ratten wurden in der Forschungstierhaltung des UKE gezüchtet und aufgezogen. Sie erhielten eine artgerechte Aufzucht mit freiem Zugang zu Wasser und handelsüblichem Futter. Für die Durchführung der Experimente lagen die entsprechenden Genehmigungen vor. Die Durchführung der Tierversuche erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Catherine Meyer-Schwesinger. Die Analyse und Bestimmung der in dieser gezeigten Arbeit wurden aber in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Puromycin Aminonukleosid induziert bei Ratten eine schwere Proteinurie und einen starken glomerulären und vor allem podozytären Schaden. Er-

wachsene Ratten mit einem Körpergewicht von etwa 250 g erhielten eine einzelne Dosis Puro-mycin-Aminonukleosid (15 mg/100 g Körpergewicht), welches in PBS gelöst war. Die Tiere entwickelten eine starke Proteinurie und wurden am Tag 30 nach Induktion narkotisiert und getötet. Die Nieren wurden entnommen, die Kapsel mit einem Skalpell und einer Pinzette entfernt. Die Nierenrinde wurde vom Nierenmark getrennt mechanisch zerkleinert, in PBS aufgenommen und durch einen 53 µm Filter gedrückt. Die entstandenen Glomeruli wurden zentrifugiert (10 Minuten, 1000 rpm), der Überstand verworfen und die Glomeruli drei Mal mit 0,5 % BSA in PBS gewaschen. Die Proben wurden dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

### 3.2.2.2 Adriamycin induzierte Nephropathie in Mäusen

#### *Tiermodell*

Die Mäuse wurden in der Forschungstierhaltung des UKE gezüchtet und aufgezogen. Sie erhielten eine artgerechte Aufzucht mit freiem Zugang zu Wasser und handelsüblichem Futter. Für die Durchführung der Experimente lagen die entsprechenden Genehmigungen vor. Adriamycin/Doxorubicin (ADR) ruft bei Balb/C-Mäusen ähnlich der PAN in Ratten einen toxischen Schaden in den Podozyten hervor, der in einem Glomerulosklerose-ähnlichen Bild endet. Etwa 7 bis 10 Tage nach der Injektion von ADR entwickeln die Tiere eine schwere Proteinurie.

Für die Adriamycin-induzierte Nephropathie wurden 11 Wochen alte Wildtyp-Balb/C Mäuse verwendet. Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn gewogen und Urin im Stoffwechsellkäfig gewonnen. An Tag 0 erhielten die Tiere 6 µl/g Körpergewicht der 2 mg/ml Doxorubicin-Lösung intravenös. Dazu wurden die Tiere in eine Isofluran-Kurznaarkose versetzt und das Doxorubicin retrobulbär verabreicht. Zum Aufwachen und Erholen aus der Naarkose wurden die Tiere zurück in ihren Käfig und die Käfige zu einem Drittel auf eine Wärmematte gesetzt. Nach Injektion wurden die Tiere zunächst alle 12 Stunden, später dann bei unauffälligem Verhalten der Tiere alle 24 Stunden klinisch beurteilt. Es erfolgte eine Uringewinnung und Wiegen der Tiere an Tag 3, 7 und 11, sowie das Töten und die Organentnahme der Tiere am Tag 4, 8 und 12. Für die Organentnahme wurden die Tiere erneut mit Isofluran narkotisiert und mit cervikaler Dislokation getötet. Nach dem Töten wurde der Bauchraum mit einem Y-förmigen Schnitt eröffnet, Darm und Leber wurden mit einem Wattetupfer vorsichtig auf die Seite geschoben und die Aorta mit paravertebraler Muskulatur unterhalb der Nierenabgänge mit einer Klemme gegriffen. Unterhalb der Klemme wurden Aorta und Muskulatur durchtrennt und die Aorta bis zum Zwerchfell mit einer kleinen Schere freipräpariert. Aorta und Leber wurden von dem freipräparierten Nierenpaket getrennt und die Organe in gekühltes HBSS gegeben.

### *Isolation Glomeruli Maus*

Die entnommenen Organpakete wurden in HBSS auf Eis bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die Nieren wurden mit magnetischen Beads unter einem Mikroskop über die Nierenarterien perfundiert (durchgeführt von Prof. Dr. C. Meyer-Schwesinger). Von den Nieren wurde ein kleines Stück (ca. 2-3 mm Polstück) für die Histologie entnommen und sofort in kaltem Formalin fixiert. Die magnetischen Beads bleiben in den Glomeruli hängen, so können die Glomeruli über Magnete isoliert werden. Die Nieren werden von Gefäßen, Kapsel und Fettgewebe befreit und mit einem Skalpell zerkleinert. Die Nierenmischung pro Tier wurde auf zwei 2 ml Röhrrchen aufgeteilt, pro Röhrrchen mit 1,5 ml 1,2 mg/ml Kollagenase 1A vermischt und 30 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Die Mischung wurde im Anschluss zweimalig durch einen 100 µm Filter in ein 50 ml Falcon-Röhrrchen gedrückt und mit HBSS verdünnt. Die Glomerulimischung wurde abzentrifugiert und das Pellet erneut auf 2 ml Eppendorf Röhrrchen aufgeteilt. Die Röhrrchen wurden an einen Magnetic Microparticle Concentrator geheftet, und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 0,05 % BSA/HBSS resuspendiert, und der Konzentrierungsschritt am Magneten insgesamt drei Mal wiederholt. Die Glomeruli aus den verschiedenen Eppendorf Röhrrchen aus einem Tier wurden schließlich in 1 ml HBSS gesammelt und die Konzentration der Glomeruli, sowie der Erfolg der Isolation unter dem Mikroskop beurteilt. Im Anschluss wurden die Glomeruli erneut zentrifugiert (4000 g, 5 Minuten, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### **4.2.3 Methoden zur Untersuchung von gewonnenen Proben**

#### 4.2.3.1 Westernblot

Für den Westernblot aus der Zellkultur wurden die Zellen zunächst einmalig mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber in einigen Tropfen PBS geerntet und anschließend in 1,5 ml Röhrrchen zentrifugiert (5000 g, 15 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert. Zur Herstellung eines Proteinlysats wurde ein Lysepuffer (ca. 100 µl für  $1 \times 10^6$  Zellen) aus *Tissue Protein Extraction buffer*, mit *complete Mini Inhibitor Cocktail* (25-fach, 1:25) und 1 mM *Calyculin-A*, 1 mM NaF, and 1 mM NaVO<sub>3</sub> verwendet. Die Pellets wurden mit dem Puffer vermischt und auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Das Lysat wurde im Anschluss zentrifugiert und der Überstand mit 4x Ladepuffer und 0,1 M DTT 10 Minuten bei 96 °C gekocht. 20 µl der Probe wurden gleichzeitig mit 5 µl *SeeBlue Plus2 Marker* auf ein *NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm, 15 well*, geladen. Für die Elektrophorese wurde ein 1x MOPS-Puffer und folgendes Programm verwendet: 15 Minuten 80 V, 15 Minuten 120 V, 60 Minuten 140 V. Nach der Auftrennung wurden die Proteine aus dem Gel auf eine

*Immobilon-FL* Membran mittels Elektrophorese übertragen. Die Membran wurde zuvor für 1 Minute mit Methanol aktiviert und kurz mit dH<sub>2</sub>O gespült. Zwei Schwämme wurden für den Transfer ebenfalls in Blot Puffer für 5 Min. eingeweicht. Für den Transfer wurde der Trans-Blot® Turbo™ Transfer System verwendet. Hierbei wird die Membran auf einen der feuchten Schwämme gelegt. Darauf wird das Polyacrylamid-Gel gelegt und darauf ein weiterer Schwamm geschichtet. Durch die Kassette, die hier sowohl als Kathode als auch als Anode dient, wird für 30 Minuten eine konstante Spannung von 25V angelegt.

Nach dem Transfer wurden unspezifische Bindungen mit *Odyssey* Blockpuffer für 60 Minuten bei RT geblockt und die Membranen über Nacht mit dem entsprechenden Antikörper (Verdünnung 1:500) in Blockpuffer (+ 0,01 % Tween 20) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen 4 x 5 Minuten mit PBS (+0,1% Tween = PBST) gewaschen und anschließend mit Sekundäantikörper (Verdünnung 1:10.000, 0,002 % SDS, 10 %, 0,01 % Tween20) für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach 4 x 5 Minuten waschen mit PBST erfolgte das Einlesen der Membran mit dem *Odyssey* Clx Blot Scanner.

Für den Westernblot aus dem Zellkulturüberstand wurde unverdünnter Überstand nach 48 Stunden Inkubationszeit von den Zellkulturen abgenommen, mit 4x Ladepuffer versetzt, gekocht und auf das Gel aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde Humanserum 0,1-3 % verdünnt mit PBS, versetzt und gekocht mit 4x Ladepuffer aufgetragen. Als Ladekontrolle für CFH wurde rekombinantes CFH verwendet. Für den Nachweis der Spaltprodukte aus dem Ko-Faktor-Assay wurden die entsprechenden Lösungen ebenfalls mit 4x Ladepuffer versetzt, gekocht und auf ein Gel aufgetragen.

Für die Untersuchung der einzelnen Zellfraktionen erfolgte nach Ernte der Zellen auf Eis (insgesamt 5 10 cm- Schalen) mit jeweils 50 µl PBS pro Schale ein erster Zentrifugations-Schritt für 10 Minuten bei 1000 rpm, zum Abtrennen des PBS. Danach folgte eine mechanische Zerkleinerung auf Eis mit einem Glas-Homogenisierer. Es erfolgte ein zweiter Zentrifugations-Schritt mit 2400 rpm für 10 Minuten bei 4 °C, bei dem sich Zellkerne, große Membranbruchstücke und Zellkerne in einem Pellet sammeln. Der Überstand wurde abgenommen und enthält zytosolisch gelöste Proteine. Das Pellet wurde erneut zerkleinert und der Überstand (zytosolische Proteine) nach Zentrifugation (1900 rpm, 10 Minuten, 4°C) entnommen. Das Pellet (Zellkerne, große Membranbruchstücke, endoplasmatisches Retikulum) wurde bei -80°C eingefroren. In einem weiteren Schritt wurde der abgenommene Überstand erneut zentrifugiert (11.000 rpm, 10 Minuten, 4 °C) um Zytosol und Mikrovesikelfraktion aufzutrennen. Zytosol (Überstand) und Mikrovesikel wurden getrennt voneinander bei -80 °C bis zur Lyse aufbewahrt. Lyse und Westernblot erfolgten wie oben beschrieben.



#### 4.2.3.2 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz aus den Zellen wurden die Podozyten auf Deckgläschen ausplatziert und bei 38 °C ausdifferenziert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, für 10 Minuten mit 4% PFA fixiert und erneut mit PBS gewaschen. Der Block unspezifischer Bindungsstellen und die Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit 3 % BSA 0,5 % Triton X-100 in PBS für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Für die Färbung der Membran-ständigen Komplement-Regulatoren (CD55, CD59 und CD46) erfolgte eine Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen ohne Zugabe von Triton X-100 um ausschließlich Membran-ständige Regulatoren darzustellen. Die Permeabilisierung wurde dann vor Färbung mit dem Sekundärantikörper und der *AlexaFluor*-Phalloidinfärbung in einem Extraschritt nachgeholt. Nach 3 x Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern (Verdünnung 1:100 für C2, C3, C5, Giantin und C5b-9, bzw. 1:1000 für CFH und CD59, 1:50 für CD55 und CD46) bei 4 °C über Nacht. Nach dem Waschen erfolgte am nächsten Tag die Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (Verdünnung 1:200 in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Bei der Färbung der Komplement-Regulatoren CD46, CD55 und CD59 erfolgte zudem eine Gegenfärbung des Aktin-Zytoskeletts mit Alexafluor-Phalloidin (Verdünnung 1:200, gemeinsam mit dem Sekundärantikörper). Der Sekundärantikörper wurde erneut mit PBS abgewaschen und es erfolgte eine Inkubation mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Verdünnung 1:1000 in PBS) für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen wurden die Deckgläschen mit Fluoromount eingebettet auf einem Objektträger fixiert. Die Bilder wurden mit dem Leica TCS SP5 und einem Objektiv 63x HCX PL APO Lbd. aufgenommen. Eine Bearbeitung der Bilder (isolierte Bearbeitung der einzelnen Farbkanäle in Kontrast und Helligkeit) erfolgte mit *Image J*. Die Aufnahmen erfolgten in der *University Microscope Imaging Facility (UMIF)*, University Medical Center Hamburg-Eppendorf. Die Negativkontrollen wurden ohne die Zugabe der entsprechenden Primärantikörper hergestellt.

Für die Färbung von CFH in der Niere wurden die entnommenen Nierenstücke über Nacht in Formalin bei 4 °C fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Herstellung der Schnitte erfolgte am Mikrotom (Schnittdicke 2 µm). Die hergestellten Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 40 °C getrocknet. Danach erfolgte eine Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte. Dafür durchliefen sie folgende Alkoholreihe jeweils 5 Minuten – Xylol (3x) – Alkohol 100 % (3x) – Alkohol 96 % (2x) – Alkohol 70 % (2x) – dH<sub>2</sub>O (2x). Die Schnitte wurden anschließend in Citraconsäureanhydrid in einer feuchten Kammer für 30 Minuten gekocht. Die Objektträger wurden anschließend vorsichtig getrocknet und die Schnitte mithilfe des *ImmEdge Pen* umrandet. Um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren und das Gewebe zu permeabilisieren wurden die Schnitte für 30 Minuten in 5 % Schweine-Serum und 0,05 % Triton-X 100 (= Blockpuffer IF) behandelt. Über Nacht erfolgt die Inkubation

mit dem Primär-Antikörper (CFH 1:1600, Nephritin 1:100 in Blockpuffer IF) bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3x mit PBS gewaschen und anschließend mit den Sekundärantikörpern (1:200 in Blockpuffer IF) für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach 3x Waschen erfolgte die Kernfärbung mit Draq5 (1:1000 in PBS) für 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln und erneut 3x Waschen mit PBS. Danach wurden die Schnitte mit Fluoromount und Deckgläschen eingedeckt.

#### 4.2.3.3 Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH)

Für die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) wurden unbehandelte Wildtyp C57BL/6 Mäuse getötet und die Nieren entnommen. Das Gewebe wurde in RNase freiem 4 % PFA über Nacht bei 4 °C fixiert und in 25 %iger Saccharose-Lösung für zwei Mal 24 Stunden bei 4 °C gelagert. Am Kryotom wurden mit Kryotec Gefrierblöcke und 14 µm Gefrierschnitte erstellt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die FISH erfolgte nach Angaben des Herstellers: Nach dem Auftauen wurden die Schnitte 60 Minuten bei 60 °C getrocknet. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet und für 20 Minuten mit der im Kit enthaltenen Protease Q bei 40 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit den von *Affymetrix* gelieferten Sonden für 4 Stunden bei 40 °C in der feuchten Kammer, sowie anschließend mit dem *Preamplifier*, dem *Amplifier* und dem *Label-Probe*, nach Herstellerangaben. Das Signal wurde schließlich mit dem Farbstoff *FastRed* sichtbar gemacht. Als Negativ-Kontrolle erfolgte eine Inkubation ohne Sonde (*No Probe-Control*). Nach dem Waschen folgte nun eine Immunfluoreszenzfärbung von Laminin, um Strukturen im Glomerulum erkennen zu können. Dazu wurden die Schnitte gewaschen und mit *DAKO* Blockpuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Der anti-Laminin-Antikörper (1:100 in *DAKO antibody diluting reagent*) wurde über Nacht bei 4 °C auf die Schnitte gegeben. Der Sekundärantikörper (1:200 in PBS) wurde nach dem Waschen für eine Stunde auf die Schnitte gegeben. Es folgten weitere 3 Waschschritte mit PBS und die Inkubation mit DAPI (1:10.000 in PBS) für 10 Minuten. Nach dem Waschen wurden die Schnitte getrocknet und mit Fluoromount eingebettet. Die Darstellung erfolgte am Leica SP5. Die Einstellung erfolgte an einem Kontroll-Objektträger und wurde für alle folgenden Präparate aus einer Versuchsreihe nicht verändert.

#### 4.2.3.4 Durchflußzytometrie

Für die Untersuchung der Oberflächenproteine in der Durchflußzytometrie wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA von der Oberfläche gelöst. Aus einer T75 Flasche wurden die ausdifferen-

zierten Zellen auf sechs 1,5 ml- Röhrchen aufgeteilt. Nach dem Zentrifugieren (700 g, 3 Minuten, Raumtemperatur) wurden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und das Pellet mit dem entsprechenden Primärantikörper (Verdünnung 1:50 (CD46 und CD55), 1:1000 (CD59) in PBS) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen (zentrifugiert, Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert). Um ausschließlich lebende Zellen zu beurteilen erfolgte eine *live/dead* Färbung (*AlexaFluor 780*, 1:1000 in PBS) gemeinsam mit der Inkubation des Sekundärantikörpers (1:200) lichtgeschützt bei 4  C. Nach erneuten 3 Waschschritten mit PBS erfolgte eine Fixierung mit 0,5 % PFA in PBS, die Proben wurden in FACS-Röhrchen überführt und bis zu Messung im Kühlschrank aufbewahrt. Für die Berechnung der Kompensation in der Durchflußzytometrie wurde

- eine ungefärbten Kontrolle
- eine Positivkontrolle für die *live/dead* Färbung (Zellen wurden 5 Minuten bei 65  C inkubiert, dabei wurde etwa die Hälfte der Zellen getötet, die Zellen werden dann ohne Primär- oder Sekundärantikörper, nur mit der *live/dead* Färbung gefärbt)
- eine Färbung eines positiven Antigens (z.B. CD59, als das am höchsten exprimierte Antigen, ohne *live/dead* Färbung)

verwendet. Die Aufzeichnung der Rohdaten in der Durchflußzytometrie erfolgte mit der *BDiv* Software, die Auswertung und Erstellung der Graphen mit der *FlowJo* Software.

#### 4.2.3.5 RNA Isolation und cDNA-Synthese

Für die konventionelle und quantitative PCR aus der Zellkultur wurden die Zellen zunächst einmalig mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber in einigen Tropfen PBS geerntet und anschließend zentrifugiert (5000 g, 15 Minuten, 4  C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zum Gebrauch bei -80  C gelagert. Die RNA wurde mit einem RNA-Isolations-Kit (Nucleo Spin RNA) nach Herstellerangaben isoliert. Die RNA- Konzentration und die Reinheit der Probe wurden anschließend mit Hilfe eines NanoDrop bestimmt. 200 ng der RNA wurden in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das cDNA Synthese Kit verwendet. 200 ng der RNA wurden gemeinsam mit 1 Öl DNTPs und 1 Öl Random Hexamer Primer in insgesamt 12,5 Öl destilliertem H<sub>2</sub>O gemischt und 5 Minuten bei 65  C inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 4 Öl 5x Puffer, 1 Öl *reverse* Transkriptase, 0,5 Öl RNase out zu den Ansätzen gegeben und gemischt. Die Proben wurden im Anschluss im *Thermocycler* inkubiert (10 Min 25  C, 60 Minuten 42  C, 15 Minuten 70  C) und die so gewonnene cDNA danach auf Eis oder im Kühlschrank aufbewahrt.

#### 4.2.3.6 Konventionelle Polymerase Chain Reaction (PCR)

Für die konventionelle PCR wurden 2 µl der cDNA zusammen mit jeweils 1 µl des 10 µM primer *forward* und *reverse*, 0,5 µl dNTPs, 2 µl 10x Dream Taq Puffer, 0,1 µl Dream Taq und 15,4 µl H<sub>2</sub>O auf Eis vermischt und die PCR im *Thermocycler* gestartet (94 °C 2 Minuten; (94 °C 1 Minute, 60 °C 1 Minute, 72 °C 1 Minute) x 34; 72 °C 2 Minuten). Das PCR Produkt wurde zusammen mit einer *100bp DNA ladder* auf ein 1,5 %-Agarose Gel geladen. Das Gel lief dann 30 Minuten bei 120 V in TAE Puffer, die entstandenen Produkte wurden mit UV Licht sichtbar gemacht.

#### 4.2.3.7 quantitative PCR (qPCR)

Die Real-Time-quantitative-PCR (kurz qPCR) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, welche auf der Basis der Polymerasen-Ketten-Reaktion beruht. Die gewonnene DNA kann mittels Photometrie quantitativ bestimmt werden. Hierfür wurden in eine qPCR Platte pro *well* und zu bestimmendem Gen 1,5 µl der cDNA mit 6,35 µl SYBR green, jeweils 1,25 µl Primer *forward/reverse* (100 µM in aqua a. i.) und 2,25 µl aqua a. i. vermischt, und in einem Realtime-Analyser (*StepOne*), mit folgendem Programm amplifiziert und sichtbar gemacht: 10 Minuten 95 °C, ( 95 °C 15 Sekunden, 60 °C 1 Minute) x 42. Die Einstellungen am Gerät und die Auswertung erfolgten über die *StepOne* Software.

#### 4.2.3.8 C3a-ELISA

Die Bestimmung der C3a- Konzentration im Überstand der Zellkultur erfolgte innerhalb von 2 Stunden nach Entnahme des Überstandes. Die Bestimmung der Konzentration von C3a erfolgte mit einem Kit nach Herstellerangaben. C3a wurde bei 450 nm in der mitgelieferten Testplatte mit Hilfe eines Testplatten-*Readers* ausgelesen. Zur besseren Darstellung und statistischen Auswertung wurde ein Quotient aus der Probe und der unbehandelten Kontrolle gebildet.

#### 4.2.3.9 Ko-Faktor-Assay

Im Ko-Faktor Assay wurde die Aktivität des von den Podozyten in den Überstand sezernierten CFHs getestet. CFH ist zusammen mit seinem Ko-Faktor I (CFI) in der Lage aktives C3b zu spalten. Dabei entstehen Spaltprodukte einer Größe von 68 und 43 kDa. Diese können in einem Westernblot gegen C3 sichtbar gemacht werden. Zellkulturüberstand nach 48 Stunden,

von dem zuvor gezeigt wurde, dass CFH nachweisbar war, wurde entnommen und gemeinsam mit rekombinantem C3b und rekombinantem CFI in einer Konzentration von 6 µg/ml (C3b) und 40 µg/ml (CFI) bei 37 °C inkubiert. Aus dem Gemisch wurden zum Zeitpunkt 0, nach 5, 15 und 30 Minuten kleine Proben entnommen und sofort mit 4x Ladepuffer für Bestimmung im Westernblot bei 96 °C für 5 Minuten gekocht. Die Proben wurden dann auf das Westernblot-Gel aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde rekombinantes CFH in einer Konzentration von 40 µg/ml eingesetzt.

#### 4.2.3.10 LDH-Messung

Die Messung von LDH erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden wie im oberen Abschnitt beschrieben mit Komplement inkubiert und die Überstände abgenommen. In eine 96 *well* Platte wurden 50 µl/*well* Überstand pipettiert und 50 µl der Reaktionssubstanz zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe der Stop-Lösung ein eine Messung der Absorbtion bei 490 und 680 nm. Als Positivkontrolle wurde der Lysepuffer des Herstellers verwendet, die Podozyten wurden 10 Minuten mit dem Lysepuffer behandelt und der Überstand abgenommen. Pro Ansatz wurden Triplets der einzelnen Inkubationen verwendet. Die Messung im 96 *well* erfolgte in Duplikaten.

#### 4.2.3.11 Herstellung normales Humanserum (NHS)

Als Positivkontrolle und zur externen Komplementstimulation wurde Komplement-aktives Serum gesunder Personen verwendet. Dafür wurden Serum-Monovetten befüllt und 10 Minuten bei 3000 g bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde in 1,5 ml Röhrchen gefüllt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 4.2.3.12 Albuminbestimmung Urin

Die Untersuchung des Urins erfolgte mittels Albumin-ELISA nach Herstellerangaben. Die Lösungen (*Waschpuffer*, *Conjugat Diluent*, *Postcoat-Solution*, *Coating Buffer*) wurden nach Anweisung hergestellt. Die Urine wurden zunächst mit Hilfe eines Albuminstixes gemessen und die Proben entsprechend ihrer Konzentration mit *Conjugate Diluent* vorverdünnt (siehe **Tabelle 17**).

Ergebnis Urinstix	Verdünnung
Negativ/Spur	1:500
+	1:5000
++	1:20000
+++	1:50000
++++	1:100000

**Tabelle 17: Verdünnung der Urinproben entsprechend der Werte im Albumin-Stix**

Ein Standard wurde in einer Konzentration von 7,8-1000 ng/ml Albumin hergestellt. Eine 96 *well*-Platte wurde über Nacht mit dem Anti-Albumin-Antikörper (1:100 in *Coating Buffer*) inkubiert (4 °C, Schüttler). Am nächsten Tag wurde die Platte 3x mit Waschpuffer gewaschen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit *Postcoat-Solution* inkubiert. Nach 3 x Waschen der Platte wurden jeweils 100 µl Standard bzw. Probe zugegeben und für ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Platte wurde erneut gewaschen und das gebundene Albumin mit einem Sekundärantikörper (1:40.000 in *Conjugate Diluent*) für 1 Stunde bei Raumtemperatur markiert. Im Anschluss erfolgte weiteres 5 x Waschen und die Zugabe von 100 µl Substratreagenz für 5 Minuten. Durch Zugabe von H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> wurde die Reaktion gestoppt. Die Platte wurde dann im Testplatten Reader bei 450 nm ausgelesen. Um Schwankungen durch Konzentrationsunterschiede im Urin auszugleichen erfolgte aus den gleichen Proben die Bestimmung des Kreatinins. Für die Auswertung wurde ein Quotient aus Albumin und Kreatinin gebildet (Angaben in g/g).

#### 4.2.3.13 Kreatinin-Bestimmung Urin

Die Kreatinin-Bestimmung im Urin erfolgte nach Jaffe, mit einem Kit nach Herstellerangaben in 96 *well*-Platten. Ein Standard wurde mit Kreatinin in NaCl 0,9 % in einer Konzentration von 0,02-0,5 g/l hergestellt. Das Reagenz wurde ebenfalls nach Herstellerangaben hergestellt (10 ml alkalischer Puffer und 2 ml Pikrinsäure). Davon wurden 50 µl zusammen mit 10 µl Probe oder Standard pro *well* für 1 Minute inkubiert und im Testplatten Reader bei 492 nm gemessen.

#### 4.2.4 Grafische und Statistische Auswertung

Für die Berechnung der Fluoreszenzintensität von C5b-9 nach Inkubation mit Komplement-Aktivierungs-Produkten wurde ImageJ verwendet. Die Intensität der Fluoreszenz pro Zell-

fläche wurde berechnet. Zur Beurteilung der zytoskelettalen Veränderungen wurde in der Immunfluoreszenz nach Inkubation mit aktiviertem Komplement das Aktin-Zytoskelett gefärbt. Es erfolgte eine Messung der Zellfläche mit dem Programm *ImageJ*.

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism. Für den Vergleich zweier Gruppen wurde bei Normalverteilung der T-Test verwendet. Ergebnisse galten als statistisch signifikant, wenn der p-Wert  $<0,05$  war.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Kultivierte Podozyten wurden von einer Komplement-Aktivierung angegriffen und geschädigt

Um zu überprüfen, welche Auswirkungen eine exogene Komplement-Aktivierung auf kultivierte Podozyten hat, wurde ein *in vitro* Komplementaktivierungsmodell entwickelt (55). Podozyten wurden mit Antikörpern gegen die Komplement-Regulatoren CD46, CD55 und CD59 und im Anschluss mit Komplement-aktivem humanem Serum (NHS) behandelt. Durch diese Behandlung kam es zu einer Blockade der inhibierenden Membran-ständigen Komplement-Regulatoren und gleichzeitig zu einer Bindung dieser Antikörper an der Oberfläche der Zellen. Die Komplement-Aktivierung erfolgte am ehesten über eine Kombination aus der Aktivierung des klassischen Aktivierungsweges durch die stattfindende Bindung der Antikörper an die Oberfläche der Zellen und einer Inhibition bzw. Blockade der Komplement-Regulatoren CD46, CD55 und CD59 und damit zu einer Amplifizierung der Reaktion über den alternativen Weg. Die Kontrollbehandlung wurde mit NHS allein, das heißt ohne Komplement-Regulatoren-Antikörper durchgeführt.

#### 5.1.1 Komplement-Aktivierung führte zu einer Ablagerung von C3c durch die Aktivierung des klassischen Komplement-Weges.

Um zu zeigen, dass das Komplementsystem durch unser Modell auf der Oberfläche der Zellen aktiviert wurde, wurden Komplementaktivierungsprodukte gemessen. C3c, ist die aktive Form von C3 und entsteht bei der Spaltung von C3. Die Herstellung von C3c aus C3 ist ein zentraler Schritt in der Komplement-Aktivierungskaskade. Das Komplement-Aktivierungsprodukt C3c konnte mittels Durchflußzytometrie auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden (

**Abbildung 4A**). Die Komplement-Aktivierung resultierte in einer vermehrten Ablagerung von C3c. In der Durchflußzytometrie konnte ein gesteigertes Signal für C3c von 5290 +/- 4989 mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI), im Vergleich zur Kontroll-Behandlung mit NHS allein von 660,5 +/- 379 MFI, ( $p = 0,0079$ ) gemessen werden. Die ungefärbten Kontrollen zeigten eine MFI von 122 +/- 29,3.

Das Komplementsystem wird im Wesentlichen über den alternativen Aktivierungsweg, durch spontane Hydrolyse von C3 oder über den klassischen Weg, durch eine Bindung eines Antikörpers an ein Antigen aktiviert (**Abbildung 1**). Um zu untersuchen, welcher Weg in unserem Modell betroffen war, wurde die Komplement-Aktivierung in einem sogenannten AP-Puffer (*Alternative Pathway*) durchgeführt. Der AP-Puffer enthält Magnesium-Ethylen-bis(oxyethylennitrilo)-tetraessigsäure (MgEGTA), welches die Funktion von C1q und damit die Aktivierung des



klassischen Weges unterdrückt, so dass die Aktivität im alternativen Aktivierungsweg allein bestimmt werden kann. Bei Komplement-Aktivierung in AP-Puffer kam es zu einer signifikant reduzierten Ablagerung von C3c (657,8 +/- 515,2 MFI,  $p = 0,0079$ ) im Vergleich zur Aktivierung von Komplement in PBS (

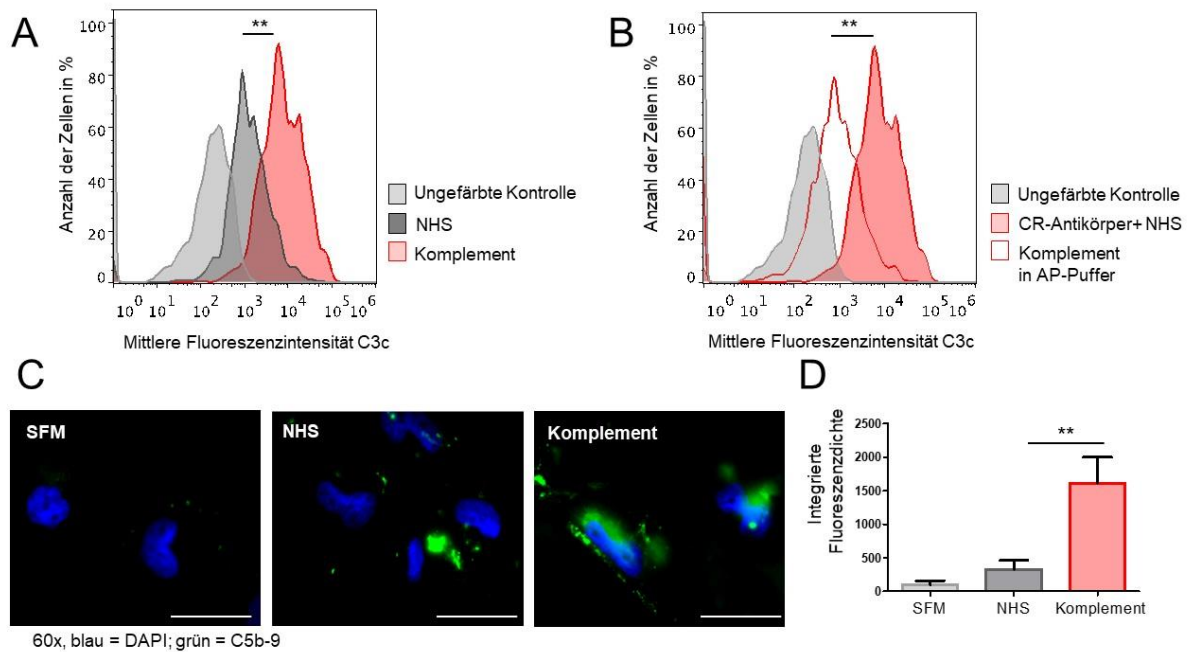
**Abbildung 4B).** Die in AP-Puffer stattfindende C3c-Deposition entsprach in etwa der Behandlung mit NHS ( $p = 0,5$ ). Da es im AP-Puffer zu einer reduzierten C3c-Deposition kam, ist die erfolgte Aktivierung vor allem auf den klassischen Aktivierungsweg zurück zu führen, die wahrscheinlich über die Bindung der Antikörper gegen die Komplement-Regulatoren auf der Oberfläche ausgelöst wurde.

### 5.1.2 Komplement-Aktivierung resultierte in einer Ablagerung von C5b-9

Die Aktivierung des Komplementsystems führt auf der Oberfläche von angegriffenen Zellen auch zu einer Ablagerung von C5b-9, dem terminalen Komplement-Angriffskomplex. C5b-9 formt eine Art Pore, die in ausreichender Konzentration starke lytische Eigenschaften besitzt. Um die Ablagerung dieser Komplexe nachzuweisen, wurde Komplement auf Podozyten aktiviert und der C5b-9 in der Immunfluoreszenz angefärbt (

**Abbildung 4C).** Um die Menge des abgelagerten C5b-9 zu berechnen, wurden pro Behandlung 10 Gesichtsfelder mit Hilfe von ImageJ analysiert. Es wurde die integrierte Fluoreszenzdichte (iFD) (d.h. Signalintensität pro Fläche) berechnet. Zellen, auf denen Komplement aktiviert, zeigten eine signifikant höhere Ablagerung von C5b-9 (1611 +/- 1345 iFD) im Vergleich zur Behandlung mit NHS allein (330,3 +/- 470 iFD,  $p = 0,0015$ ). Ohne Komplement-Aktivierung zeigte sich eine Hintergrund-iFD 99,26 +/- 159, die sich knapp nicht signifikant ( $p = 0,0565$ ) von der C5b-9 Deposition mit NHS allein unterschied (

**Abbildung 4D).**



**Abbildung 4: Eine Komplement-Aktivierung auf kultivierten humanen Podozyten führte zu einer Ablagerung von Komplementaktivierungs-Produkten. A + B:** Ablagerung von C3c gemessen in der Durchflußzytometrie: Podozyten wurden mit Antikörpern gegen die Komplement-Regulatoren CD46, CD55 und CD59 und im Anschluss mit Komplement-aktivem humanem Serum (NHS) behandelt. Dies führte zu einer gesteigerten mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) für C3c auf der Oberfläche der Zellen im Vergleich zur Behandlung mit NHS (A) (\*\*  $p = 0,0079$ ,  $n = 5$ ). Wurde für die Komplement-Aktivierung AP-Puffer verwendet, der den klassischen Aktivierungsweg des Komplementsystems blockiert, kam es zu einer deutlichen Reduktion der C3c-Ablagerung (B) (\*\*  $p = 0,0079$ ,  $n = 5$ ). **C+D:** Ablagerung des terminalen Membranangriffskomplexes C5b-9 auf der Oberfläche von Podozyten, gemessen in der Immunfluoreszenz: Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz für C5b-9 (grün) nach Behandlung mit Antikörpern gegen Komplement-Regulatoren und NHS (Komplement), im Vergleich zur Behandlung mit NHS oder Serum-freiem Medium (SFM) (60-fache Vergrößerung, Maßstabs-Balken 25  $\mu\text{m}$ ) (C). Statistische Auswertung der integrierten Fluoreszenzdichte (Fluoreszenz-Intensität, integriert auf die gemessene Fläche der Zelle) gemessen mit Hilfe von *ImageJ* (D) (\*\*  $p = 0,0015$ ,  $n = 7$ ). NHS=normales Humanserum, CR=Komplement-Regulatoren, AP=alternativer *Pathway*, SFM=Serum-freies Medium

### 5.1.3 Komplement-Aktivierung verursachte eine Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH)

LDH ist ein zytosolisches Enzym, welches bei einer Schädigung der Zelle in den Überstand freigesetzt wird. Die Messung von LDH im Überstand dient demnach einem Nachweis der Zellschädigung und -zerstörung. Das freigesetzte LDH kann mit Hilfe eines Assays (z.B. von

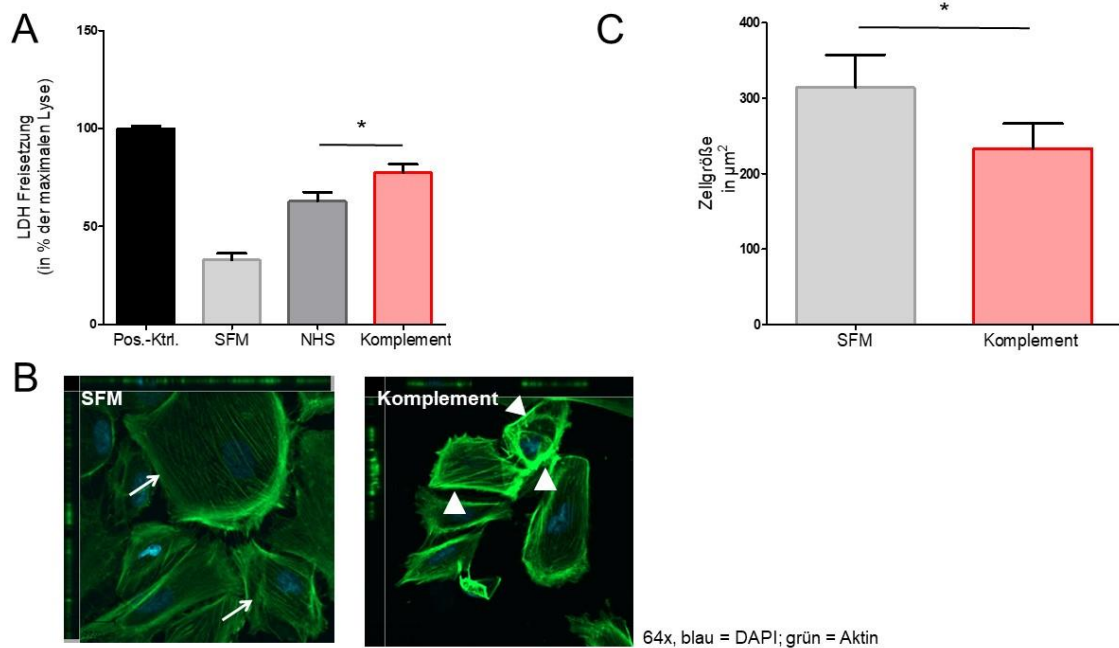
*Pierce*) über eine gekoppelte enzymatische Reaktion gemessen werden: LDH katalysiert die Umwandlung von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) zu NADH, welches dann aus einem Tetrazolium Salz ein rotes Formazan Produkt herstellt. Dieses kann dann bei 490 nm photometrisch gemessen werden. Als Positiv-Kontrolle wurde ein Lysepuffer des Herstellers verwendet, welcher durch vollständige Lyse der Podozyten zu einer maximal möglichen LDH-Freisetzung führte. Dieser photometrisch bestimmte Wert wurde als 100% angesehen.

Die Komplement-Aktivierung führte zu einer vermehrten Freisetzung von LDH in den Überstand der Zellen. Die spontane LDH-Freisetzung (Inkubation mit serumfreiem Medium = SFM) in den kultivierten Podozyten betrug 32,88 +/- 13,68 % der maximal möglichen LDH-Freisetzung. Die Zugabe von 10 % NHS erhöhte den Wert auf 62,9 +/-17,99 %, diese Erhöhung wurde vor allem wahrscheinlich durch den LDH-Gehalt im Serum und die Eigenfarbe des Serums in der photometrischen Messung bedingt. Im Vergleich dazu erreichte die Inkubation mit Komplement, also der Antikörper und NHS, einen signifikant höheren Wert von 77,49 +/- 16,63 % ( $p = 0,0172$ ) (**Abbildung 5A**). Die Komplement-Aktivierung führte also zu einer hoch signifikanten gesteigerten Freisetzung von LDH aus Podozyten.

#### **5.1.4 Reorganisation des Aktin- Zytoskeletts durch Komplement-Aktivierung**

Werden Podozyten geschädigt, verändern sie ihren komplexen Aufbau und die hoch-differenzierte Architektur ihres Zytoskeletts, welche für die Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere *in vivo* essentiell ist. Das Zytoskelett und seine Veränderungen lassen sich in kultivierten Podozyten durch indirekte Färbung des Aktin-Zytoskeletts mit Hilfe von Fluoreszenzmarkiertem Phalloidin untersuchen. Phalloidin ist ein Peptid des Giftpilzes *Amanita phalloides*, welches spezifisch an F-Aktin in fixierten und permeabilisierten Zellen bindet.

Die Inkubation mit Komplement führte zu einer Re-Organisation des Aktin-Zytoskeletts. Die **Abbildung 5B** zeigt eine Aktin-Färbung auf ausdifferenzierten Podozyten in unbehandeltem Zustand (SFM) und nach Behandlung mit Komplement. In der Mitte der im Normalzustand weit ausgebreiteten Podozyten zeigten sich parallel angeordnete Bündel von Aktin-Fasern, welche als „Stress-Fasern“ bezeichnet werden. Gesunde, unbehandelte Zellen trugen im Verhältnis wenig Aktin in der Peripherie des Zellkörpers. Im Gegensatz dazu erschien das Zytoskelett in den mit Komplement behandelten Zellen verdichtet, die Zellen zogen sich zusammen und im Zentrum der Zellen erschienen die parallelen Aktin-Fasern vermindert. Als Zeichen des geschädigten Zytoskeletts verloren die mit Komplement-behandelten Zellen ihre flächige Ausbreitung und waren in der Messung im Durchschnitt signifikant kleiner (233,3 +/-147,6  $\mu\text{m}^2$ ) als die unbehandelten Kontrollen (313,8  $\mu\text{m}^2$  +/- 196,3  $\mu\text{m}^2$ ,  $p = 0,0319$ ) (**Abbildung 5C**).



**Abbildung 5: Auswirkungen einer Komplement-Aktivierung auf kultivierte Podozyten.** **A:** Nach erfolgter Aktivierung des Komplementsystems mit Hilfe von Antikörpern gegen Komplement-Regulatoren und der anschließenden Inkubation mit normalem Humanserum (NHS) kam es zu einer erhöhten Freisetzung von LDH, gemessen im Überstand, im Vergleich zur Inkubation mit NHS ( $*p = 0,0172$ ,  $n = 5$  (in Triplets)). Die Komplement-Aktivierung führte zu einem Aktin-Remodeling. Exemplarische Bilder von kultivierten Podozyten nach Aktivierung des Komplementsystems auf der Oberfläche im Vergleich zur Kontrolle mit Serum-freiem Medium (SFM) (grün=Aktin, blau=Zellkerne). Die parallele Anordnung der Aktin-Stress-Fasern in gesunden Podozyten (Pfeile) in der Kontrolle ging verloren und es zeigte sich eine Kondensierung des randständigen Aktins in den mit Komplement- behandelten Zellen (Pfeilspitzen) und eine Abnahme der Zellgröße. **B:** Messung der Zellgröße nach erfolgter Aktivierung des Komplementsystems auf der Oberfläche der Zellen mit Hilfe von *ImageJ* (**C**) ( $*p = 0,037$ ,  $n = 3$ , 10 Gesichtsfelder pro Ansatz).

Pos.-Ktrl.=Positiv-Kontrolle, Lysepuffer=100% Lyse, SFM=Serum-freies Medium, NHS=normales Humanserum.

## 5.2 Bildung und Sekretion von regulierenden Komplement-Komponenten durch kultivierte Podozyten

Eine ungebremste Aktivierung des Komplementsystems führt auch zu einer Schädigung von körpereigenen Zellen. Die Zirkulation von löslichen Komplement-Regulatoren im Serum aber auch die Expression von Regulatoren auf der zellulären Oberfläche ist daher für den Schutz

der Zellen von essentieller Bedeutung. *In vitro* können Podozyten von einer Komplement-Aktivierung angegriffen werden (siehe **5.1**). Daher untersuchte ich im Folgenden die Fähigkeit der kultivierten Podozyten eine lokale Komplement-Reaktion regulierend zu beeinflussen um sich so gegen einen Komplementangriff zu schützen.

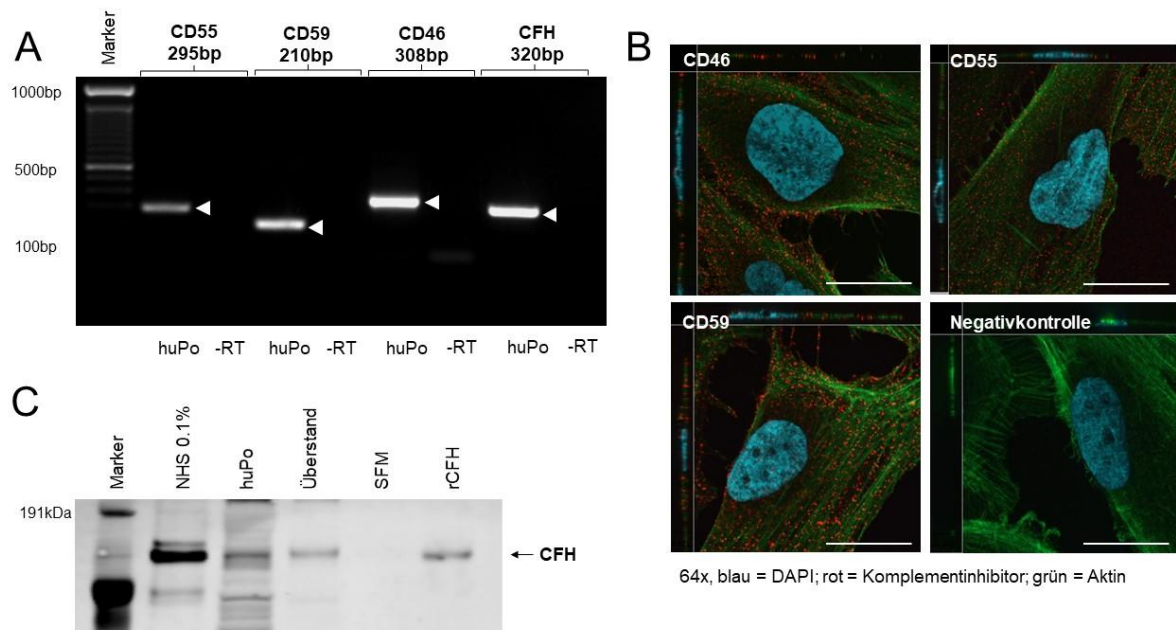
### **5.2.1 Podozyten bildeten mRNA regulierender Komplement-Komponenten**

Ausdifferenzierte humane Podozyten wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, verschiedene Komplement-Komponenten zu exprimieren. Nach Ernte der Zellen wurde aus dem Zellpellet zunächst die RNA isoliert, und diese zu cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe einer konventionellen *reversen Transkriptase Polymerase Chain Reaction* (PCR) und Primern für verschiedene Komplement-Komponenten (**Tabelle 12**) wurde untersucht, für welche regulatorisch wirkenden Komplement-Proteine Podozyten mRNA bilden konnten. Es zeigten sich in der konventionellen PCR mRNA-Produkte für die Membran-ständigen regulierenden Komplement-Inhibitoren CD46, CD55 und CD59. Zudem konnte ebenfalls mRNA für den löslichen und eigentlich im Serum zirkulierenden Komplement-Faktor H (CFH) nachgewiesen werden (**Abbildung 6A**).

### **5.2.2 Podozyten exprimierten die Komplement-Regulatoren CFH, CD46, CD55 und CD59 als Proteine und sezernierten CFH**

Da für die Funktion nur die tatsächliche Bildung von Bedeutung ist, wurden die Podozyten mit Hilfe verschiedener Methoden auch auf Protein-Ebene untersucht.

In der Immunfluoreszenz in nicht permeabilisierten ausdifferenzierten Podozyten konnte die Expression der Membran-ständigen Inhibitoren CD46, CD55 und CD59 auch auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 6B**). CFH zeigte sich im Westernblot aus dem Zell-Lysat. Podozyten waren auch in der Lage CFH in den Zellkultur-Überstand zu sezernieren (**Abbildung 6C**).



**Abbildung 6: Humane kultivierte Podozyten exprimierten verschiedene inhibierende Komplement-Faktoren auf mRNA- und Protein-Ebene, Komplement-Faktor H (CFH) wurde in den Überstand sezerniert.** **A:** Mit Hilfe einer konventionellen, reverse Transkriptase *Polymerase Chain Reaction* (rtPCR) gelang der Nachweis von mRNA-Produkten für die inhibierenden Komponenten CD55, CD59, CD46 und CFH. **B:** Expression der Membran-ständigen Komplement-Regulatoren CD46, CD55 und CD59 auf der Oberfläche der Zellen (repräsentative Bilder einer Immunfluoreszenz für die Inhibitoren in Rot, auf nicht permeabilisierten Podozyten (grün=Aktin, blau=DAPI, Aufnahme konfokal mit 64x Objektiv, Maßstabs-Balken 25  $\mu$ m). **C:** Westernblot aus einem Lysat unbehandelter Podozyten (huPo) und aus Zellkultur-Überstand, Serumfreies Medium (SFM) diente als Negativ-Kontrolle, rekombinanter Komplement-Faktor H (rCFH) und normales Humanserum (NHS) als Positivkontrolle. bp=Basenpaare, huPo=humane Podozyten, -RT=Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase, NHS=normales Humanserum, SFM= Serum-freies Medium

### 5.2.3 Zelllinienspezifische Sekretion von CFH

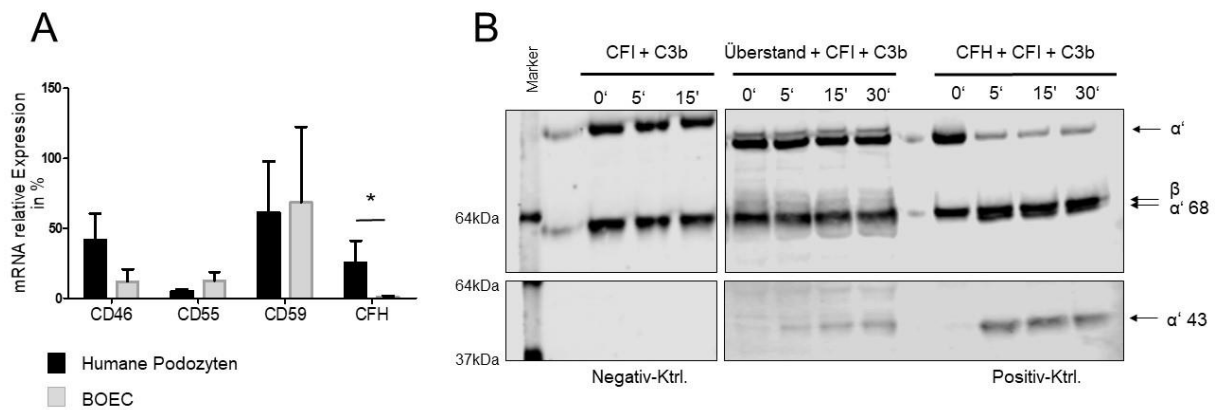
Um zu untersuchen inwiefern die Bildung von Komplement-Regulatoren in Podozyten zellspezifisch ist, wurde Expression der Regulatoren auf Podozyten mit der Expression in Blut-Endothelzellen (BOECs) in einer quantitativen *realtime* PCR verglichen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression bezüglich der Komponenten CD46 (Podozyten 41,67 +/- 45,96 vs. BOEC 12,2 +/- 19,1 relative Expression,  $p=0,1001$ ), CD55 (Podozyten 5,33 +/- 3,011 vs. BOEC 12,6 +/- 13,87 relative Expression,  $p=0,5$ ) und CD59 (Podozyten 61,5 +/- 88,87 vs. BOEC 68,6 +/- 120,3 relative Expression,  $p=0,3312$ ).

Die Expression von CFH war auf den Podozyten allerdings signifikant höher (25,5 +/- 38,22 relative Expression) als die Expression in den Blutendothelzellen (1,2 +/- 1,304 relative Expression,  $p = 0,0211$ ) (**Abbildung 7A**) (alle Angaben in % der relativen Expression für podozytäres GAPDH).

Da CFH der wichtigste Regulator im alternativen Aktivierungsweg ist, und scheinbar spezifisch für Podozyten war, fokussierte ich mich in den folgenden Experimenten vor allem auf die Sekretion und Funktion von CFH.

#### **5.2.4 Podozytär sezerniertes CFH war funktionell aktiv**

Die wichtigste Funktion von CFH ist der enzymatische Abbau der Komplement-Komponente C3b (**Abbildung 2**). Damit wird die Amplifizierung im alternativen Komplement-Aktivierungsweg gestoppt. Um zu zeigen, dass das durch Podozyten sezernierte CFH funktionell aktiv war, wurden die Zellkultur-Überstände mit Hilfe eines Ko-Faktor-Versuchs untersucht (**Abbildung 7B**): CFH spaltet gemeinsam mit seinem Ko-Faktor I (CFI) die Komplement-Komponente C3b. Gibt man CFH und CFI gemeinsam zu Faktor C3b entstehen Spaltprodukte, welche sich im Westernblot bei 43 und 68 kDa nachweisen lassen. Dieses Ergebnis zeigte sich auch in der Positivkontrolle: rekombinantes (r) CFH und rCFI waren in der Lage das zugegebene rC3b zu spalten. Im Westernblot zeigte sich eine Abnahme der intakten C3b-Alpha- ( $\alpha'$ ) Kette (**Abbildung 7B rechte 4 Spalten**) nach 5, 15 und 30 Minuten, sowie eine Zunahme der Spaltprodukte bei 68 kDa ( $\alpha'68$ ) und 43 kDa ( $\alpha'43$ ) als Nachweis des Abbaus. Zellkultur-Überstand von Podozyten, welcher CFH enthält, war gemeinsam mit rCFI ebenfalls in der Lage C3b abzubauen. So zeigte sich auch hier eine Zunahme der Spaltprodukte bei 68 und 43 kDa (**Abbildung 7B mittlere 4 Spalten**). Ohne podozytären Überstand oder rCFH, ist CFI allein nicht in der Lage C3b zu spalten (**Abbildung 7B, linke 3 Spalten**).



**Abbildung 7: Die Expression für CFH war zellspezifisch und unterschied sich zwischen Podozyten und Blut-Endothelzellen. Von Podozyten sezerniertes CFH war funktionell aktiv. A:** Expression der Membran-ständigen Komplement-Regulatoren CD46, CD55 und CD59 sowie CFH auf mRNA Ebene in Podozyten (schwarze Balken) und Blut-Endothelzellen (hellgraue Balken)(BOEC) gemessen in der qPCR, normalisiert auf die Expression von GAPDH in Podozyten ( $*p = 0,0211$ ,  $n = 5$ ). **B:** Im Ko-Faktor-Versuch wurde die Aktivität des in den Überstand sezernierten CFHs untersucht. Rekombinantes CFH, aber auch podozytärer Überstand spaltete zusammen mit seinem Ko-Faktor I (CFI) die Komponente C3b, die entstandenen Spaltprodukte (C3 -  $\alpha'$ 68 Kette und - $\alpha'$ 43 Kette) konnten im Westernblot nachgewiesen werden. Negativkontrolle (Ktrl.): CFI und C3b in PBS, Positiv-Ktrl.: CFH, CFI und C3b in PBS.

Findet eine glomeruläre Komplement-Aktivierung statt, sind Podozyten scheinbar in der Lage, diese Reaktion regulierend zu beeinflussen, und sich damit vermutlich selbst zu schützen.

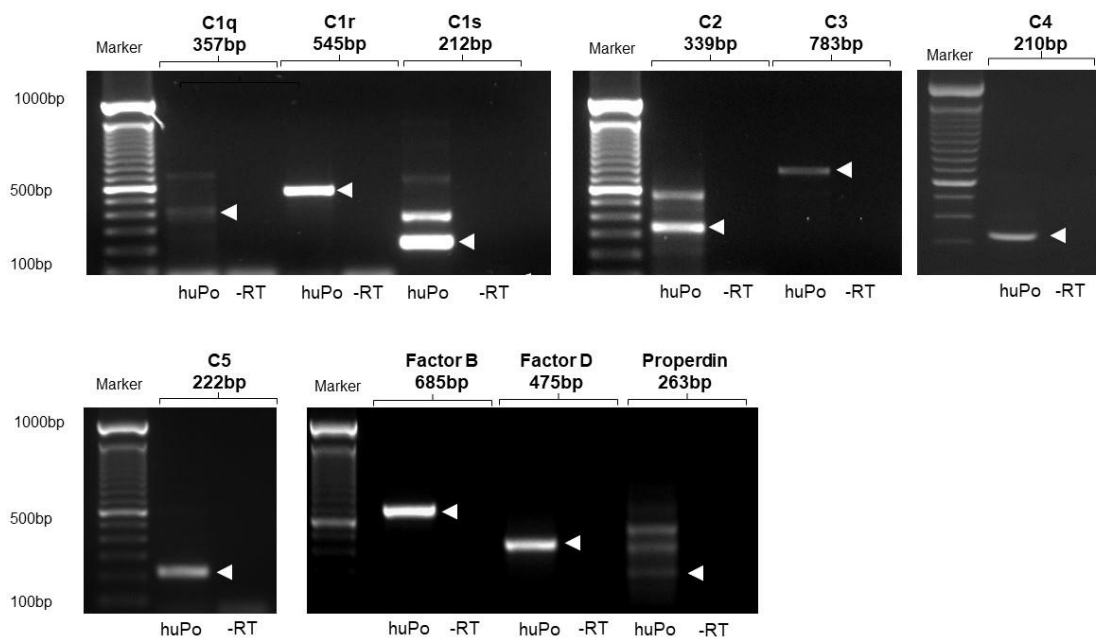
### 5.3 Bildung und Sekretion von aktivierenden Komplement-Faktoren durch kultivierte Podozyten

Komplement-Komponenten werden zum Großteil in der Leber gebildet und zirkulieren dann im Blut. So können sie bei Bedarf an die Stelle transportiert werden, an der eine akute Komplement-Aktivierung benötigt wird. Zusätzlich scheint jedoch auch die lokale Bildung von Komplement-Komponenten bei der Aktivierung des Systems eine Rolle zu spielen. Podozyten stehen bei Glomerulopathien im Mittelpunkt der Erkrankung und sind häufig bereits früh von einer Komplement-assoziierten Glomerulonephritis betroffen. Aus diesem Grund wollte ich untersuchen, welche Möglichkeiten Podozyten haben, um sich an der Aktivierung des Komplementsystems zu beteiligen. Dafür wurden kultivierte humane Podozyten mit Hilfe verschiedener Methoden bezüglich ihres Potentials charakterisiert, Komplement-Komponenten zu bilden.



### 5.3.1 Podozyten bildeten mRNA für aktivierende Komplement-Komponenten

Neben den positiven Befunden für Komplement-Regulatoren zeigten sich in unseren Untersuchungen auch mRNA-Produkte für die frühen aktivierenden Komplement-Komponenten C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, C5 und die Aktivatoren des alternativen Weges Faktor B, Faktor D und Properdin (**Abbildung 8**).



**Abbildung 8: Humane kultivierte Podozyten exprimierten verschiedene aktivierende Komplement-Faktoren auf mRNA-Ebene:** Mit Hilfe einer konventionellen, reverse Transkriptase *Polymerase Chain Reaction* (rtPCR) gelang der Nachweis von PCR-mRNA Produkten für verschiedene aktivierende Anteile des Komplementsystems.

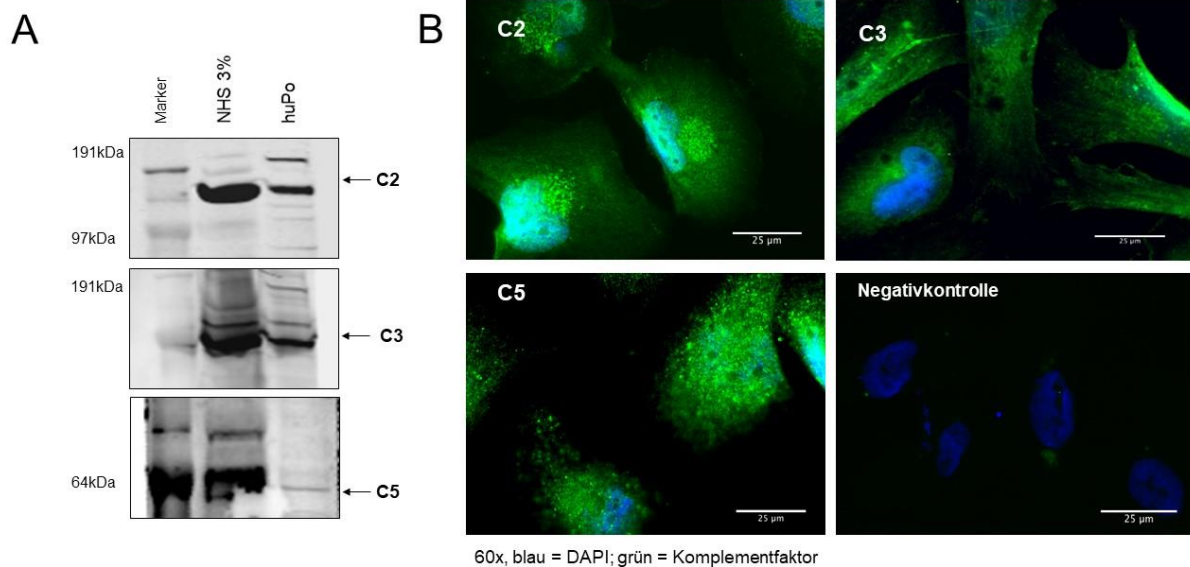
bp=Basenpaare, huPo=humane Podozyten, -RT=Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase

### 5.3.2 Podozyten exprimierten die Komplement-Komponenten C2, C3 und C5 auf Proteinebene

Um diese aktivierenden Komplement-Komponenten auch auf Proteinebene nachzuweisen, untersuchte ich unbehandelte humane Podozyten und den Zellkultur-Überstand mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen und Westernblot-Studien.

Es konnte eine Expression für die Komplement-Faktoren C2, C3 und C5 auch auf Proteinebene mit Hilfe von Westernblot-Untersuchungen und Immunfluoreszenz-Färbungen

(Abbildung 9) belegt werden. Im Westernblot diente verdünntes NHS als Positivkontrolle. In der Immunfluoreszenz zeigte sich in der Negativ-Kontrolle, also einer Inkubation ohne den entsprechenden Primärantikörper, keine Färbung. Für die anderen auf mRNA-Ebene nachgewiesenen Komplement-Komponenten gelang uns, mit den von uns verwendeten Methoden kein Nachweis auf Proteinebene.



**Abbildung 9: Kultivierte humane Podozyten exprimierten die aktivierenden Komplement-Komponenten C2, C3 und C5. A:** Westernblots aus Lysaten von ausdifferenzierten Podozyten für C2, C3 und C5, verdünntes normales Humanserum (NHS) diente als Positivkontrolle. **B:** Repräsentative Bilder einer Immunfluoreszenz für die Komplement-Komponenten C2, C3 und C5 auf ausdifferenzierten Podozyten (grün=Komplement-Faktor, blau=Zellkerne (DAPI), Maßstabs-Balken 25 µm, Aufnahme mit 60-facher Vergrößerung)

NHS= normales Humanserum, huPo= humane Podozyten, SFM= Serum-freies Medium

### 5.3.3 Podozyten sezernierten die Komplement-Komponenten C2, C3, C5, Faktor B und Properdin

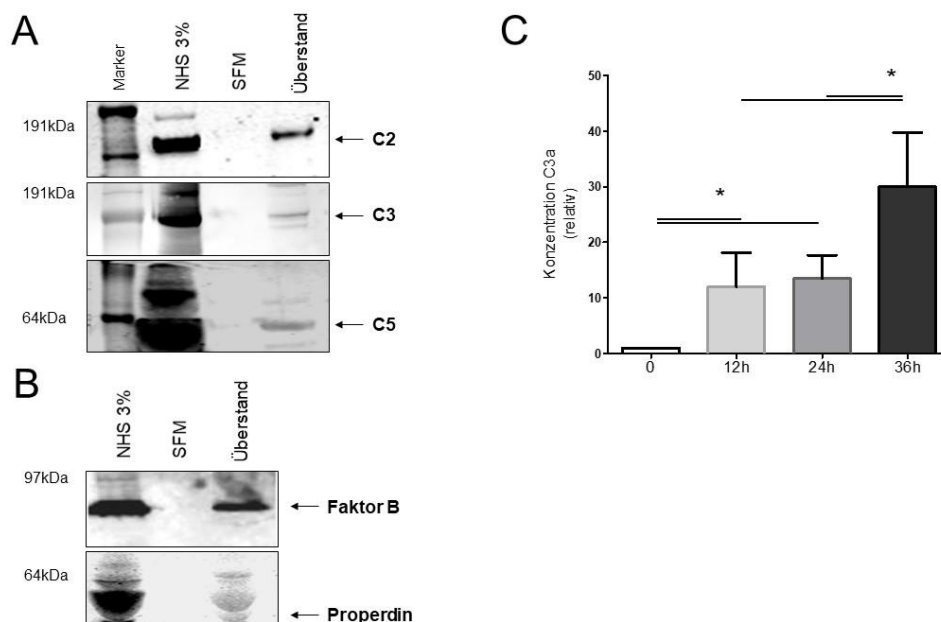
Um sich an einer außerhalb der Zelle ablaufenden Komplement-Aktivierung beteiligen zu können, müssen die gebildeten Komplementproteine auch in den Überstand der Zellen abgegeben werden. Daher wurde das Auftreten der Komplementproteine im Zellkultur-Überstand mit Hilfe von Westernblot-Studien untersucht.

In Zellkulturüberständen konnten verschiedene Komplementproteine nachgewiesen werden: kultivierte Podozyten waren in der Lage Komplement-Komponenten C2, C3, C5, Faktor B und Properdin in den Überstand zu sezernieren (Abbildung 10A und B).

### 5.3.4 Podozyten bildeten und sezernierten aktives C3a

C3a ist die zentrale, aktive Komponente aller drei Komplementaktivierungswege. C3a wird durch die Spaltung der Komplement-Komponente C3, unter anderem durch eine, zuvor in der Komplementaktivierungskaskade gebildete C3-Konvertase, gebildet. Mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISAs, welcher spezifisch C3a detektiert, wurde Zellkultur-Überstand von unbehandelten Podozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von C3a im Überstand von unbehandelten Podozyten abhängig von der Inkubationszeit zunahm (**Abbildung 10C**).



**Abbildung 10: Kultivierte humane Podozyten sezernierten Komplement-Komponenten in den Überstand. A+B:** Westernblots aus dem Überstand von ausdifferenzierten unbehandelten Podozyten, Nachweis der Komplement-Komponenten C2, C3, C5 (**A**), Faktor B und Properdin (**B**); normales Humanserum (NHS) diente als Positivkontrolle, Serumfreies Medium (SFM) als Negativkontrolle. **C:** Messung des aktiven Spaltproduktes C3a im Überstand unbehandelter ausdifferenzierter Podozyten nach 12, 24 und 36 Stunden. (\* $p = 0,0313$ ,  $n = 5$  in Duplikaten) Inkubationszeit.

NHS= normales Humanserum, huPo= humane Podozyten, SFM= Serum-freies Medium

Für die folgenden Untersuchungen konzentrierte ich mich auf Grund der Bedeutung für die verschiedenen Aktivierungswege vor allem auf die Komplement-Komponente C3, da diese Komponente eine Schlüsselrolle in der Aktivierung einnimmt.

## 5.4 Transport und Exozytose der Komplement-Komponenten C3 und CFH

Da C3 die zentrale aktivierende Komponente in der frühen Komplement-Aktivierung ist und CFH den wichtigsten Regulator im alternativen Weg darstellt, lag der Fokus bei folgenden Untersuchungen vor allem auf diesen beiden essentiellen Komponenten. Beispielhaft wurde aber in den *realtime* PCR-Studien auch C2 und C4 bearbeitet. Das Ziel dieser Teilerperimente war, zu untersuchen, ob es sich bei der Sekretion um einen aktiven, induzierbaren Prozess in den Zellen handelte.

### 5.4.1 Stimulation der Komplement-Faktoren-Sekretion durch Interferon Gamma

Um zu zeigen, dass es sich bei der Bildung und Sekretion von Komplement-Komponenten um einen stimulierbaren Prozess handelte, wurden die Zellen mit Interferon Gamma (IFN $\gamma$ ) inkubiert. IFN $\gamma$  ist ein immun-modulatorisches Molekül, welches bei zahlreichen inflammatorischen Prozessen freigesetzt wird, und für die Freisetzung von Komplement-Komponenten aus extra-hepatischen Quellen (56-58) sorgt.

Mit Hilfe von *realtime* PCR-Studien konnte nachgewiesen werden, dass ausdifferenzierte Podozyten nach einer 6-stündigen Behandlung mit IFN $\gamma$  (1 ng/ml und 10 ng/ml) signifikant mehr C3 mRNA bildeten. Ähnliches wurde auch bei der Inkubation mit 10 ng/ml IFN $\gamma$  für CFH gefunden. Zudem kam es zu einem Anstieg der mRNA für C2 und C4 nach IFN $\gamma$ -Behandlung (**Abbildung 11 und Tabelle 18**).

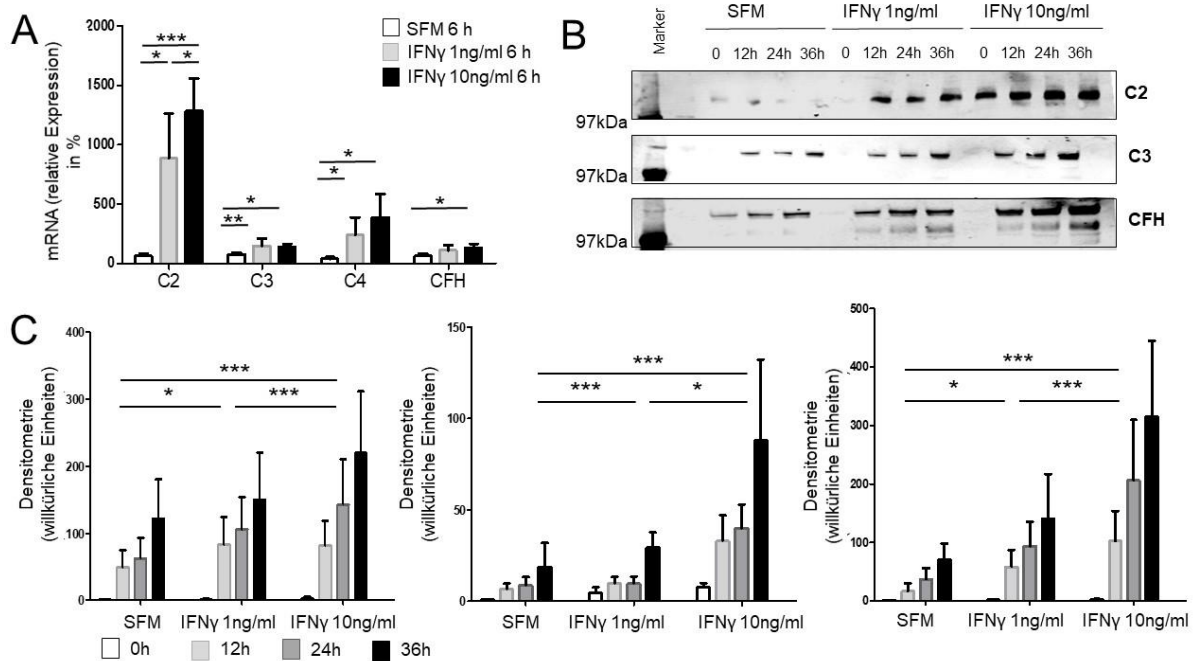
mRNA Komplement	Kontrolle	IFN $\gamma$ 1 ng/ml	IFN $\gamma$ 10 ng/ml
C3	100%	240,4 +/- 158,7 %, $p = 0,0060$	151,2 +/- 57,6 %, $p = 0,02$
CFH	100%	176,6 +/- 113,3 %, $p = 0,2188$	159,4 +/- 46,3 %, $p = 0,013$
C2	100%	1417 +/- 1013 %, $p = 0,0439$	1538 +/- 278,9 %, $p = 0,0002$
C4	100%	823,5 +/- 568,7 %, $p = 0,0466$	803,3 +/- 409,1 %, $p = 0,0313$

**Tabelle 18: Relative Expression für C3, CFH, C2 und C4**, gemessen in einer qPCR aus mRNA von unstimulierten Podozyten (Kontrolle) im Vergleich zur Behandlung mit IFN $\gamma$  1ng/ml und 10ng/ml für 6 Stunden (ausgedrückt in % der relativen Expression. +/- der Standardabweichung, Mann-Whitney U-Test).

Auch auf Proteinebene zeigte sich eine erhöhte Sekretion, nachgewiesen in Westernblot-Studien aus Zellkultur-Überständen nach 12, 24 und 36 Stunden für C2, C3 und CFH (**Abbildung 11, Tabelle 19**).

Komplementprotein	Kontrolle	IFN $\gamma$ 1 ng/ml	IFN $\gamma$ 10 ng/ml
C3	77.89+/- 79,23	112,9 +/- 100,3, <i>p</i> = 0,0005	148,0 +/- 135,6, <i>p</i> = 0,0002
CFH	41,56 +/- 44,45	112,9 +/- 100,3, <i>p</i> = 0,0105	208,0 +/- 203,1, <i>p</i> = 0,0002
C2	11,39 +/- 15,88	16,31 +/- 14,17, <i>p</i> = 0,05	53,64 +/- 56,48, <i>p</i> = 0,0002

**Tabelle 19: Densitometrie-Ergebnisse der Westernblots auf C3, CFH und C2** aus dem Überstand unstimulierter Podozyten (Kontrolle) nach 0,12, 24 und 36 Stunden im Vergleich zur Stimulation mit IFN $\gamma$  1ng/ml und 10ng/ml (willkürliche Densitometrie-Einheiten, angegeben im Mittelwert für 12, 24 und 36 Stunden, Wilcoxon-Test gegen SFM).



**Abbildung 11: Die Produktion und Sekretion von Komplement-Faktoren war durch Interferon Gamma (IFN $\gamma$ ) induzierbar. A:** Expression von C2, C3, C4 und Komplement-Faktor H (mRNA), gemessen in der qPCR nach 6 Stunden Stimulation mit IFN $\gamma$  1 ng/ml bzw. 10 ng/ml im Vergleich zur Kontrolle (SFM). Dargestellt wurde die relative Expression der Komplement-Komponenten im Vergleich zur Kontrolle ( $n = 5$  in Duplikaten). **B+C:** Sekretion von C2, C3 und CFH durch Podozyten in den Überstand unter Stimulation mit IFN $\gamma$  1 ng/ml bzw. 10 ng/ml nach 0, 12, 24 und 36 Stunden, dargestellt an exemplarischen Westernblots (**B**) und in der Densitometrie (**C**) ( $n = 4$  in Duplikaten).

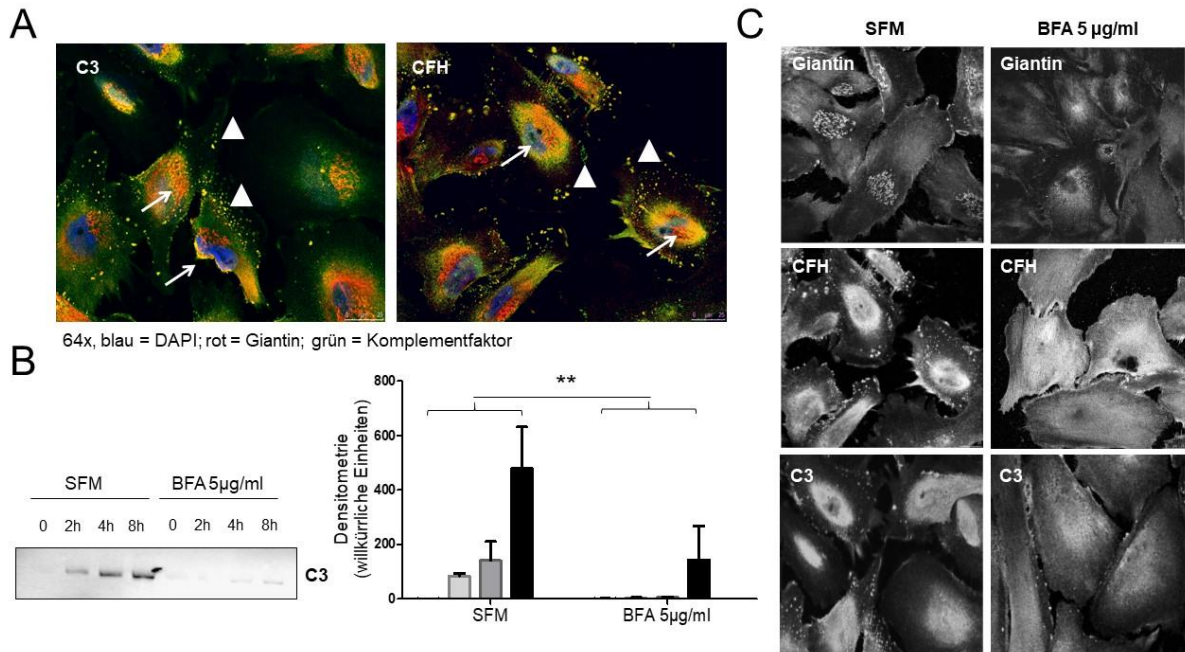
SFM = Serum-freies Medium, IFN $\gamma$  = Interferon Gamma, \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

#### 5.4.2 Speicherung der Komplement-Komponenten C3 und CFH im Golgi-Apparat

Die Verarbeitung und Verpackung für die Sekretion von intrazellulär gebildeten Proteinen findet im Golgi-Apparat statt. Proteine, welche für eine exozytische Sekretion vorgesehen sind, werden im Golgi bearbeitet, verpackt und gelangen in Vesikeln zur Zellmembran. Um zu zeigen, dass die Produktion der Komplement-Komponenten C3 und CFH ein aktiver Prozess der Zelle ist, wurde in der Immunfluoreszenz eine Ko-Färbung von C3 bzw. CFH mit einem Marker für den Golgi-Apparat (Giantin) durchgeführt (**Abbildung 12A**). Hier zeigte sich eine Ko-Lokalisation der beiden Proteine C3 und CFH mit dem Golgi-Apparat, sowohl peri-nukleär, also im Golgi-Apparat selbst, als auch in peripher angeordneten Vesikeln, die vermutlich für die Exozytose bestimmt waren.

### 5.4.3 Inhibition der Sekretion von Komplement-Faktoren mit Brefeldin A

Durch eine Behandlung mit Brefeldin A (BFA), einem Exozytose-Inhibitor, sollte untersucht werden, ob es sich bei der Sekretion von Komplement-Komponenten um einen exozytotischen Prozess handelt. Nach Inkubation der Podozyten mit BFA wurde die Konzentration von C3 im Überstand mit Hilfe eines Westernblots im Vergleich zu dem Überstand unbehandelter Kontroll-Zellen gemessen. Hier zeigte sich deutlich, dass die Konzentration von C3 im Überstand von BFA-behandelten Zellen signifikant geringer war (SFM 253,6 +/- 243 vs. BFA 56,92 +/- 135,2,  $p = 0,0078$ , willkürliche Densitometrie-Einheiten, angegeben im Mittelwert für 12, 24 und 36 Stunden, Wilcoxon-Test) als im Überstand der Kontrollzellen (**Abbildung 12B**). Für CFH konnte die reine Sekretion unter BFA Behandlung nicht untersucht werden, da CFH erst nach einer längeren Inkubationszeit (>8 Stunden) signifikant im Überstand nachweisbar war. Daher wäre eine sehr lange Behandlung der Zellen mit BFA nötig gewesen, welche die Zellen nicht überleben würden. In der Immunfluoreszenz konnte aber gezeigt werden, dass die Behandlung mit BFA auch für kürzere Zeiten (4 Stunden) zu einer Zerstörung des Golgi-Apparates führte (**Abbildung 12C, obere Reihe**), und es damit zu einer Umverteilung des intrazellulär gespeicherten CFH (**Abbildung 12C, mittlere Reihe**) und C3 (**Abbildung 12C, untere Reihe**) kam. Die sonst eher peri-nukleär, also wahrscheinlich im Bereich des Golgi-Apparates vorhandenen Komplement-Komponenten C3 und CFH, zeigten nach einer 4-stündigen Behandlung eher ein zytoplasmatisches intrazelluläres Verteilungsmuster (**Abbildung 12C, rechte Spalte**).



**Abbildung 12: Abhängigkeit der Sekretion von CFH und C3 vom Golgi-Apparat. A:** Immunfluoreszenz auf ausdifferenzierten Podozyten, Ko-Lokalisation der Komplement-Faktoren C3 (linkes Bild) und CFH (rechtes Bild) jeweils in grün mit dem Golgi-Apparat (angefärbt mit einem Antikörper gegen Giantin in Rot), Zellkerne in Blau, Vergrößerung 64-fach, Maßstabs-Balken = 25 µm. Die Ko-Lokalisation zeigte sich sowohl peri-nukleär im Bereich des Golgi-Apparates (Pfeile), als auch in der Peripherie in Vesikeln (Pfeilspitzen). **B:** Einfluss von 5 µg/ml Brefeldin A (BFA), einem Inhibitor der Exozytose, für 2, 4 und 8 Stunden, auf die Sekretion von C3 in den Zellkulturüberstand. Repräsentativer Westernblot und Densitometrie (n=4, \*\*p = 0,0078). **C:** Auswirkungen einer Behandlung mit BFA (rechte Spalte) für 4 Stunden im Vergleich zu Serum-freiem Medium (SFM) (linke Spalte) auf die Struktur des Golgi-Apparates (oberste Reihe), und auf die Verteilung der Komplement-Komponenten CFH (mittlere Reihe) und C3 (untere Reihe). Immunfluoreszenzfärbung, Vergrößerung 64-fach. (Repräsentative Bilder, n = 3). SFM= Serum-freies Medium, BFA= Brefeldin A

#### 5.4.4 Die Sekretion von C3 erfolgte in Neuronen-ähnlichen Vesikeln

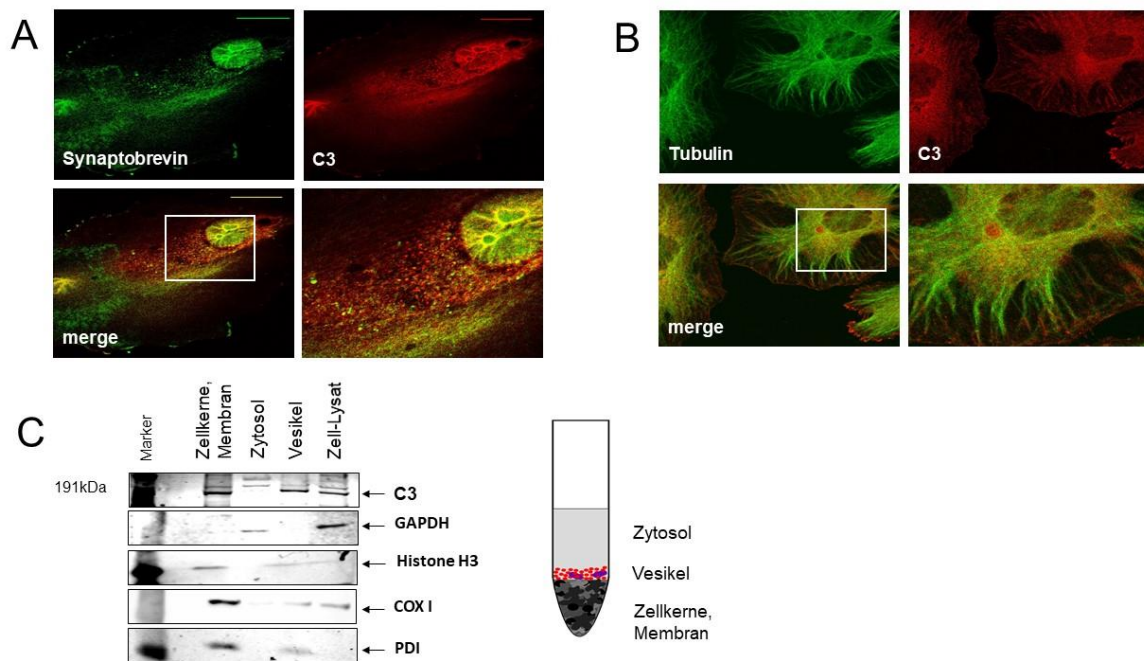
In diesem Teilabschnitt wollte ich einen weiteren Hinweis dafür gewinnen, der zeigte, dass es sich bei der Sekretion von Komplement-Komponenten um einen aktiven, steuerbaren Prozess handelte. Podozyten scheinen Neuronen sehr ähnlich zu sein, und andere Stoffe über Neuronen-artige Vesikel zu sezernieren (37, 38). Von daher wurde der Sekretionsweg für C3 in Hinblick auf Gemeinsamkeiten mit der Sekretion von Neurotransmittern in Neuronen untersucht. Synaptobrevin ist ein kleines Membran-Molekül und stellt einen wichtigen Bestandteil des sogenannten SNARE-Komplexes dar. Die Entstehung dieses Komplexes ist für die Verschmelzung der zellulären Membran und der Membran von intrazellulären Vesikeln verantwortlich,



und führt so zur Exozytose (59). In Immunfluoreszenz-Färbungen auf ausdifferenzierten Podozyten zeigte sich eine Ko-Lokalisation von Synaptobrevin und der Komplement-Komponente C3. Diese Ko-Lokalisation zeigte sich peri-nukleär, aber auch im Bereich der Zell-Peripherie. Dieses Ergebnis könnte auf eine Verpackung des hergestellten C3 in Synaptobrevinhaltige Vesikel hindeuten (**Abbildung 13A**).

Der gerichtete Transport von exozytotischen Vesikeln in der Zelle erfolgt entlang von Mikrotubuli. Mikrotubuli sind röhrenförmige Strukturen in der Zelle, die gemeinsam mit Aktin-Filamenten das Zytoskelett der Zelle bilden. Auch hier konnte in Immunfluoreszenz-Färbungen eine Ko-Lokalisation von C3 und Tubulin, als Mikrotubulus-Marker, gezeigt werden (**Abbildung 13B**).

Um zu bestätigen, dass sich die Komponente C3 in der Vesikelfraktion und in der Membran der Zelle befindet, und nicht frei im Zytosol schwimmt, wurden ausdifferenzierte Podozyten mit Hilfe einer Ultrazentrifugation aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in einen zytosolischen Bestandteil, einen Mikrovesikel-Anteil und einen Anteil mit großen Membranbruchstücken, Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum und Zellkernen. Hier zeigte sich in Westernblot-Studien, dass sich die Komponente C3 zum einen in der Membranfraktion, zum anderen in der Vesikelfraktion, nicht aber im Zytosol befand. Um eine saubere Auftrennung der Kompartimente zu bestätigen wurde in unseren Westernblot-Untersuchungen entsprechende Ladekontrollen (Histone H3 für die Kernfraktion, PDI für das endoplasmatische Retikulum, Cox I für Mitochondrien und GAPDH für das Zytosol) durchgeführt (**Abbildung 13C**).



**Abbildung 13: Die Speicherung und der Transport der Komplement-Komponente C3 im Podozyten erfolgte in Neuronen-ähnlichen Vesikeln.** Immunfluoreszenzfärbung ausdifferenzierter unstimulierter humaner Podozyten. Ko-Färbung von Komplement C3 (rot) mit **A**: Synaptobrevin und **B**: Tubulin (jeweils grün). In der Überlagerung erscheint die Ko-Lokalisation (merge) der gefärbten Proteine in Gelb (Repräsentative Bilder,  $n = 3$ , Maßstabs-Balken  $25 \mu\text{m}$ ). **C**: Westernblot der einzelnen Bestandteile nach Ultrazentrifugation für C3 von kultivierten Podozyten (erste Zeile) mit entsprechenden Ladekontrollen: GAPDH (Zeile 2) liegt im Zytosol und im gesamten Zelllysat vor; Histone H3 (Zeile 3), als Erkennungsprotein für Zellkerne; Cox I, als Mitochondrienmarker und PDI, als Marker für das endoplasmatische Retikulum, sind vor allem in der Fraktion mit Zellkernen und großen Membranbruchstücken nachzuweisen (Zeilen 4 und 5) (repräsentativer Westernblot,  $n = 3$ ).

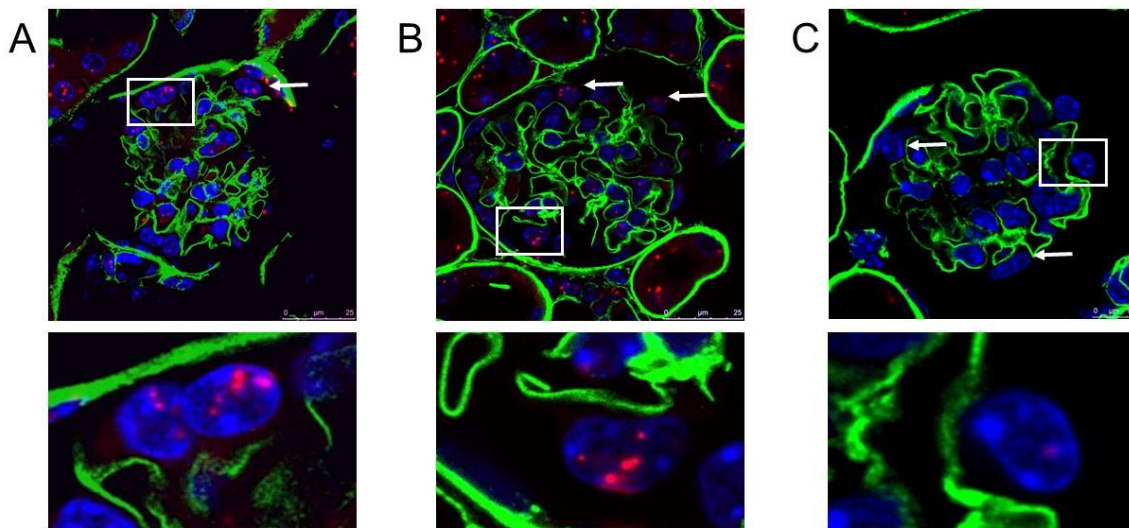
Diese Ergebnisse waren ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei der Sekretion von Komplement-Komponenten um einen aktiven exozytotischen Prozess handelte.

## 5.5 Bildung von podozytären Komplement-Faktoren *in vivo*

Die Untersuchungen in kultivierten Podozyten eignen sich sehr gut, um grundlegende Mechanismen zu untersuchen und Aussagen über Signalwege und Fähigkeiten machen zu können. Dennoch handelt es sich dabei um ein artifizielles System. In dem folgenden Abschnitt sollten die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse auf ihre Relevanz in Tiermodellen überprüft werden.

### 5.5.1 Nachweis von mRNA in Podozyten gesunder Mäuse

Um zu zeigen, dass die Bildung von Komplement-Komponenten auch *in vivo* stattfindet, sollte die mRNA-Expression in den Nieren von unbehandelten Mäusen dargestellt werden. Hierzu wurde eine Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH) mit Sonden gegen C3 und CFH auf Nierenschnitten gesunder, unbehandelter C57/Bl6-Mäuse etabliert. Durch die Sonden wird die entsprechende mRNA erkannt und über einen Amplifizierungsprozess mit einem Farbstoff markiert. Um die Lokalisation der entsprechenden mRNA eindeutig Podozyten zuordnen zu können, erfolgte eine Ko-Färbung mit Laminin. Laminin färbt unter anderem die glomeruläre Basalmembran. Podozyten konnten so im Nieren-Schnitt eindeutig identifiziert werden. Als Podozyten wurden die Zellen gewertet, die sich im Glomerulum außerhalb der mit Laminin gefärbten Basalmembran befinden. Podozyten zeigten ein positives Signal für C3-mRNA aber auch für CFH (**Abbildung 14 A und B**). Neben dem Nachweis im Podozyten zeigten auch Tubuluszellen ein positives Signal.



64x, blau = DAPI; rot = Komplementfaktor; grün = Laminin

**Abbildung 14: Podozyten exprimierten den Komplement-Faktor C3 und den Komplement-Inhibitor CFH auf mRNA-Ebene *in vivo*.** **A+B:** Nieren gesunder Mäuse wurden mit PBS perfundiert und mit PFA fixiert. In einer Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH) erfolgte der Nachweis von C3 (**A**) und CFH (**B**) (rote Punkte) gemeinsam mit einer Färbung gegen Laminin (grün), Zellkerne in blau. Podozyten sind Zellen innerhalb des Glomerulums, die außerhalb der glomerulären Basalmembran (weiße Pfeile) liegen. (Repräsentative Bilder,  $n = 3$ , Maßstabs-Balken 25  $\mu\text{m}$ ). **C:** Negativkontrolle

### 5.5.2 Regulation von C3 und CFH im Proteinurie-Modell

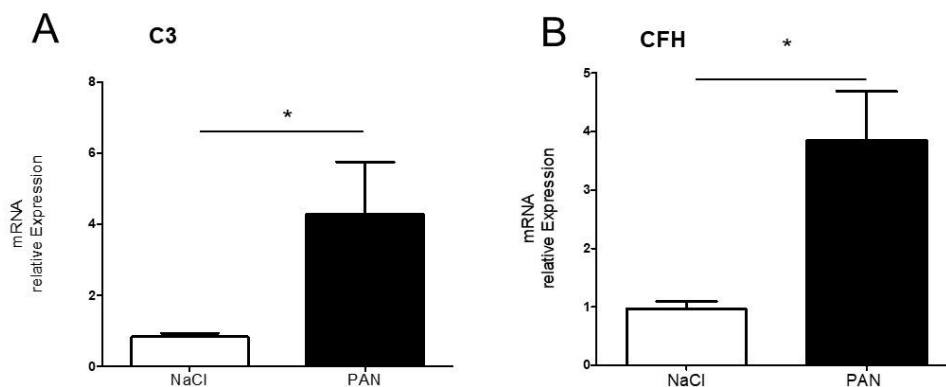
Podozyten stellen einen wichtigen Bestandteil der glomerulären Filtrationsbarriere dar. Eine Proteinurie entsteht durch eine Schädigung des Podozyten. Durch diese Schädigung kommt es in der Regel zu einer Veränderung der komplexen Architektur des Podozyten und zu einer Zerstörung des komplizierten Aufbaus der sogenannten Schlitzmembran, also der Verbindung von benachbarten Fußfortsätzen der Podozyten. Die Veränderungen können Elektronenmikroskopisch als Fußfortsatz-Verschmelzung beurteilt werden.

Um Vorgänge bei einer Proteinurie genauer zu untersuchen, können verschiedene Tier-Modelle verwendet werden, welche über einen relativ spezifischen Podozyten-Schaden eine Proteinurie auslösen. In den von uns untersuchten Proteinurie-Modellen kommt es zu einer toxischen Schädigung der Podozyten durch die Gabe von Puromycin-Aminonukleosid (PA) in Ratten und die Gabe von Adriamycin (ADR) in der Maus. PA ist ein Antibiotikum, welches relativ spezifisch in Podozyten die Proteinsynthese inhibiert. Zu Beginn ähnelt die Erkrankung der *Minimal Changes* Glomerulonephritis des Menschen, im Verlauf entwickelt sich eine massive Proteinurie und histologisch das Bild einer fokal segmentalen Glomerulosklerose. Auch ADR schädigt spezifisch Podozyten durch eine Interaktion mit podozytärer DNA und einer Inhibition der makromolekularen Biosynthese (60). Zusätzlich kommt es in beiden Modellen zu einer Aktivierung des Komplement-Systems in der näheren Umgebung (60, 61).

Da der Podozyt bei diesen Modellen im Mittelpunkt der Schädigung der Erkrankung steht, schienen diese Modelle als sehr gut geeignet, um die Vorgänge zu untersuchen, die bei einer Proteinurie von Bedeutung sind. In der Zellkultur konnte gezeigt werden, dass Podozyten über eine gerichtete und induzierbare Exozytose in der Lage sind funktionell aktives CFH und aktiviertes C3 in die Umgebung abzugeben. Mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurde gezeigt, dass der Podozyt auch *in vivo* C3 und CFH bilden kann. Durch Verwendung der Tiermodelle sollte dargestellt werden, welchen Einfluss eine spezifische Podozyten-Schädigung auf die Produktion von Komplement-Komponenten in den Podozyten hat, und ob der Podozyt in der Lage ist, sich an dieser lokalen Komplement-Aktivierung aktivierend oder regulierend zu beteiligen. Daher wurde die Expression und Regulation der Komplement-Komponenten C3 und CFH in den Glomeruli der behandelten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen gemessen.

### 5.5.2.1 Die Puromycin-assoziierte Nephritis in der Ratte führte zu einer erhöhten glomerulären Expression von CFH und C3

Nach der Behandlung von Sprague-Dawley Ratten mit PA entwickelten die Tiere nach etwa 10-14 Tagen eine Proteinurie. Die Tiere wurden nach 4 Wochen getötet und die Nieren entnommen. Aus den entkapselten Nieren wurden mittels Siebtechnik die Glomeruli isoliert. Aus den Glomeruli wurde RNA gewonnen, cDNA hergestellt und in einer qPCR die glomeruläre mRNA auf die Expression der Komplement-Komponente C3 und des Komplement-Regulators CFH untersucht. In unseren Untersuchungen zeigte sich, dass die Behandlung der Tiere mit PA im Vergleich zu den Kontrolltieren in einer erhöhten glomerulären Expression von C3 (4,294 +/- 3,261 vs. 0,832 +/- 0,1830 relative Expression,  $p = 0,0179$ , Mann Whitney U-Test) (Abbildung 15A) resultierte. Auch die glomeruläre Expression für CFH stieg mit der Behandlung der Tiere mit PA im Vergleich zu den mit NaCl 0,9% behandelten Tieren signifikant an (1,849 +/- 1,879 vs. 0,9620 +/- 0,2254 relative Expression,  $p = 0,0179$ , Mann Whitney U-Test) (Abbildung 15B). Hierbei handelte es sich um die Expression der gesamten glomerulären, also nicht nur der podozytären mRNA.



**Abbildung 15: Erhöhte Expression von glomerulärer mRNA für C3 und CFH in der Puromycin-Aminonukleosid-induzierten Nephropathie (PAN) in der Ratte. A:** Expression von C3 mRNA und **B:** CFH-mRNA aus isolierten Ratten-Glomeruli in der PAN im Vergleich zur Kontrolle mit NaCl ( $n = 3$  Kontrollen,  $n = 5$  PAN,  $*p = 0,0179$ )

Die Zellen des Glomerulums reagierten also auf einen spezifischen Schaden am Podozyten mit einer Erhöhung der Bildung der aktivierenden Komponente C3, aber auch mit der gleichzeitigen erhöhten Bildung einer inhibierenden Komponente (CFH). Die auftretende lokale

Komplement-Aktivierung könnte demnach durch die Bildung und Sekretion von Komplement-Komponenten aktivierend oder regulierend beeinflusst werden.

#### 5.5.2.2 Die Adriamycin induzierte Nephropathie der Maus führte zu einer erhöhten glomerulären Expression von CFH

Um zu zeigen, dass es sich bei der Regulation nicht um ein Spezies-spezifisches Phänomen handelte, wurde zudem ein dem PA-Modell der Ratte ähnliches Mausmodell, die Adriamycin (ADR) induzierte Nephropathie, verwendet. Da ich besonders an dem regulierenden Einfluss durch die Sekretion des Komplement-Regulators CFH interessiert war und das gewonnene Material auf Grund der geringen Menge nur eingeschränkt zur Verfügung stand, wurden die Untersuchungen nur für den Komplement-Regulator CFH durchgeführt.

Eine intravenöse Gabe von ADR führte in Mäusen zur Entwicklung einer Proteinurie nach etwa 6-7 Tagen (**Abbildung 16A**). Der Urin der Tiere wurde nach 4, 7 und 11 Tagen nach Induktion der Nephritis in einem Stoffwechsellkäfig gewonnen und untersucht. Eine Organentnahme, erfolgte jeweils einen Tag später. Gegen Ende des Beobachtungs-Zeitraumes (maximal 12 Tage) entwickelten die Tiere Ödeme und zum Teil massiven Aszites und waren in ihrem Verhalten und Wohlbefinden stark beeinträchtigt, so dass eine längere Beobachtung und Untersuchung zu einem späteren Zeitpunkt nicht vertretbar gewesen wäre.

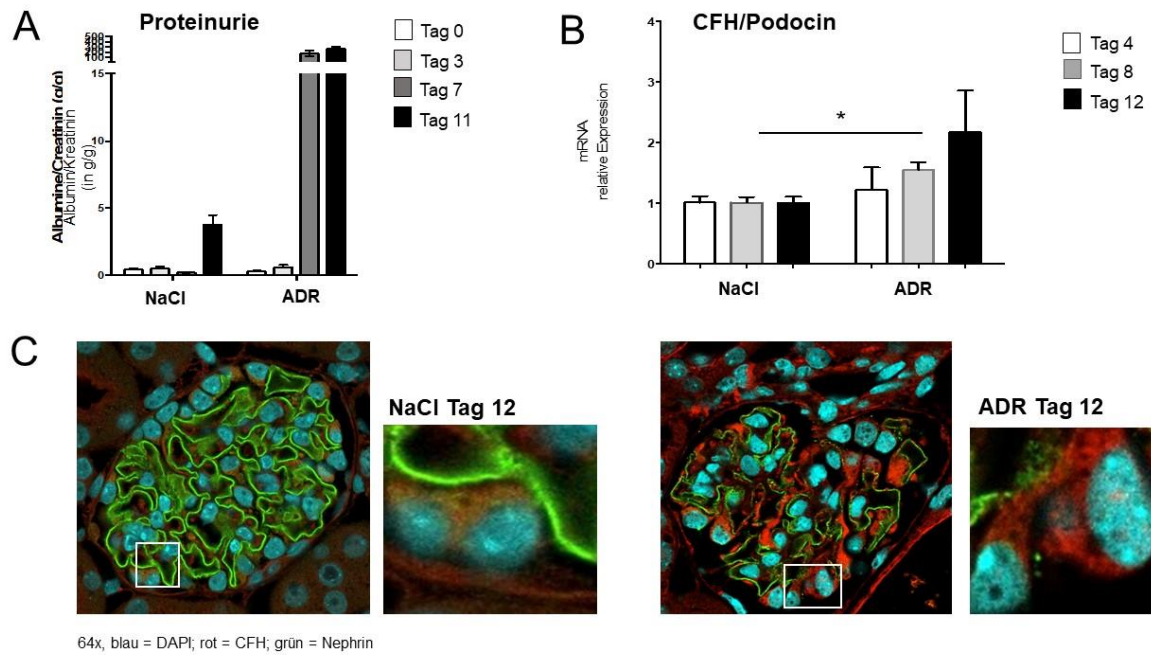
Die Nierenpakete (Bauchaorta und beide Nieren inklusive der anhängenden Nierenarterien) wurden entnommen und *ex vivo* unter einem Mikroskop mit magnetischen Kügelchen (sogenannte *Beads*) perfundiert. Die Kügelchen blieben in den Glomeruli hängen und konnten über die Verwendung von Magneten aus dem verdauten Nierengewebe gemeinsam mit den Glomeruli isoliert werden. Zusätzlich wurde ein Teilstück der Niere in Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet.

Aus den gewonnenen Glomeruli wurde die RNA isoliert und zu cDNA umgeschrieben. In einer quantitativen *realtime* PCR wurde die Expression von CFH untersucht. In den isolierten Glomeruli zeigte sich auch im ADR-Mausmodell eine signifikant erhöhte Expression der mRNA für CFH nach 7 Tagen (1,547 +/- 0,2868 relative Expression,  $p = 0,0357$ ) im Vergleich zur Kontrolle mit NaCl (1,009 +/- 0,1609 relative Expression, Mann Whitney U-Test). Nach 12 Tagen zeigte sich zwar wahrscheinlich eine erhöhte Expression in den ADR-Tieren (2,172 +/- 1,371 relative Expression) im Vergleich zur Kontrolle (1,009 +/- 0,1681 relative Expression), diese war aber auf Grund der hohen Standard-Abweichung nicht signifikant ( $p = 0,11$ , Mann Whitney U-Test) (**Abbildung 16B**). Da ADR durch die direkte Schädigung zu einem Ablösen der Podozyten aus den Glomeruli führt, wurden die Ergebnisse auf die mRNA für Podocin, einem Podozyten-Marker, normalisiert. Insgesamt wurden mit Hilfe der RNA-Gewinnung aus

den Glomeruli nur Rückschlüsse auf den gesamten RNA-Gehalt im Glomerulum gezogen. Der Anteil der einzelnen Zelltypen im Glomerulum an der RNA-Bildung konnte dabei nicht näher differenziert werden.

Um zu untersuchen, ob die gesteigerte Produktion von CFH auf mRNA-Ebene auch zu einer gesteigerten Ablagerung und Speicherung von CFH führte, und welchen Anteil Podozyten an der gesamten Bildung hatten, wurden die Nieren zusätzlich mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Auf den fixierten und in Paraffin eingebetteten Nieren wurde eine Färbung für CFH mit einer Ko-Färbung gegen Nephrin, als Podozyten-Marker, durchgeführt. Mit dieser Methode lassen sich die entstandenen Produkte den einzelnen Zell-Kompartimenten besser zuordnen und auf die entsprechenden Zellen lokalisieren.

In unseren Untersuchungen zeigte sich in den mit ADR behandelten Tieren eine gesteigerte Signalintensität für CFH im gesamten Glomerulum vor allem gegen Ende des Beobachtungszeitraumes nach 12 Tagen (**Abbildung 16C**). Mit Hilfe der Ko-Färbung gegen den Podozytenmarker Nephrin ließen sich Podozyten lokalisieren. Hier zeigte sich, dass die erhöhte glomeruläre Färbung auch auf eine Beteiligung und Signalzunahme in den Podozyten zurückzuführen war (**Abbildung 16C, vergrößerter Ausschnitt**).



**Abbildung 16: Expression von CFH in der Adriamycin (ADR)-induzierten Nephropathie (ADR) der Maus.** **A:** Entwicklung der Albuminurie (in g Albumin pro g Kreatinin) 3, 7 und 11 Tage nach Induktion einer ADR-induzierten Nephropathie im Vergleich zur mit NaCl behandelten Kontrolle. **B:** CFH- mRNA (gemessen in der qPCR) aus isolierten Glomeruli der behandelten Tiere 4, 8 und 12 Tage nach Induktion der ADR, normalisiert auf Podocin als Podozytenmarker ( $*p = 0,037$ ,  $n = 3$  Kontrolltiere, 5 ADR-Tiere). **C:** Expression von CFH (in rot) intraglomerulär auf Proteinebene, nachgewiesen in der Immunfluoreszenz in der ADR-induzierten Nephropathie im Vergleich zur Kontrolle mit NaCl (Zellkerne in blau) (Repräsentative Bilder,  $n = 3$ ).

Zusammenfassend zeigten sich in den mit ADR-behandelten Tieren eine erhöhte Expression von CFH-mRNA im Glomerulum und eine verstärkte Fluoreszenz für CFH in den Podozyten. Die Podozyten schienen also auf die Gabe von ADR mit einer vermehrten Bildung von CFH zu reagieren.



## 6 Diskussion

### 6.1 Wie beeinflusst eine glomeruläre Komplementaktivierung den Podozyten?

Das Komplementsystem stellt einen sehr wichtigen Bestandteil der angeborenen Immunabwehr dar. Es ist aber auch, neben der Bekämpfung von eindringenden Mikroorganismen, an zahlreichen inflammatorischen Ereignissen beteiligt (62). Die Niere reagiert besonders sensibel auf eine ungebremste Komplementaktivierung. So kommt es bei einer systemischen Aktivierung des Komplementsystems, zum Beispiel im Rahmen eines Lupus erythematodes oder eines atypischen hämolytisch-urämischen Syndroms, besonders häufig zu einer Beteiligung der Nieren, während andere Organe weniger stark betroffen sind. Der Grund für diese besondere Empfindlichkeit ist noch nicht vollständig geklärt, man vermutet aber, dass die gute Perfusion der Niere und ihr besonderer Aufbau und ihre Funktion zu dieser Empfänglichkeit beitragen (33). Durch die starke Durchblutung und die Filtration von großen Mengen an Primärurin kommt das Glomerulum mit Schadstoffen aber auch mit Abwehrzellen in großen Mengen in Kontakt und scheint damit empfindlicher zu sein.

Podozyten sind komplex aufgebaute, enddifferenzierte Zellen und sehr wichtig für die Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere. Werden Podozyten geschädigt, besitzen sie nur eine eingeschränkte Fähigkeit zur Regeneration (63) und es kommt zur Proteinurie. Diese verschlechtert zusätzlich den Verlauf von Nieren-Erkrankungen. Albumin und andere Serumbestandteile treten vermehrt im Urin auf, da sie durch die Schädigung am Podozyten nicht mehr zurückgehalten werden und beschädigen unter anderem Nierentubuluszellen (33). Die vermehrte Exposition von Albumin scheint in Tubuluszellen auch die Regulation des Komplementsystems zu beeinträchtigen. Durch den Protein-Überschuss kommt es zu einer beeinträchtigten Bindung von CFH auf der Oberfläche des Tubulus-Epithels (64). Dieser Mechanismus könnte vor allem bei Komplement-assoziierten Glomerulopathien, bei denen die glomeruläre Komplementaktivierung auch zu einer vermehrten Freisetzung von aktivierten Komplement-Produkten führt, eine Rolle spielen. So entsteht zusätzlich zum glomerulären Schaden ein Tubulusschaden. Aus diesem Grund sind die Intaktheit des Podozyten und seine Widerstandsfähigkeit gegen eine lokal ablaufende Komplement-Aktivierung von entscheidender Bedeutung. Daher wollte ich untersuchen, welchen Schaden eine Komplementaktivierung auf dem Podozyten selbst ausrichten kann.

Um zu zeigen, wie humane Podozyten *in vitro* von Komplement beschädigt werden können, haben wir mit Hilfe der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. C. Licht (Universität Toronto) ein Komplementaktivierungsmodell auf Podozyten etabliert (65). Hierfür wurden Antikörper gegen CD46, CD55 und CD59 verwendet, um die auf der Oberfläche exprimierten Komplement-Regulatoren

zu blockieren. Gleichzeitig wurde durch die Bindung der Antikörper der klassische Komplement-Weg aktiviert. Bei diesem Modell handelte es sich natürlich nur um eine *in vitro* Methode zur Untersuchung der Auswirkungen einer Komplement-Aktivierung. Die kultivierten Podozyten behalten zwar viele Eigenschaften der Primärzellen, aus denen sie gewonnen werden (54), dennoch fehlt den Zellen in der Kulturschale ihre natürliche Umgebung und der Kontakt bzw. die Interaktion mit umgebender Matrix und Zellen. Trotzdem scheint uns die Untersuchung in den kultivierten Zellen als eine geeignete Methode, um subzelluläre Mechanismen und ablaufende Signalwege zu untersuchen. Auch andere Arbeitsgruppen konnten mit ähnlichen Modellen zeigen, dass der terminale Membranangriffskomplex C5b-9 in sublytischer Konzentration eine Anzahl an verschiedenen intrazellulären Signalwegen aktiviert und die Intaktheit des Aktin-Zytoskeletts, sowie verschiedene Schlitzmembran-Proteine angreift (66, 67). Mit unserem Komplement-Aktivierungs-Modell gelang es, die Ablagerung von Komplement-Aktivierungsprodukten auf der Oberfläche der Zellen (C3c und C5b-9) nach einer erfolgten Aktivierung des Systems nachzuweisen. Außerdem konnten so gezeigt werden, dass die Zellen LDH freisetzen und dass das Aktin-Zytoskelett in seiner Architektur gestört wurde. LDH wird immer dann freigesetzt, wenn Zellen geschädigt werden. Eine Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts beeinflusst die Funktion des Podozyten.

Zusammenfassend konnte also belegt werden, dass humane kultivierte Podozyten durch eine Komplement-Aktivierung angegriffen und geschädigt werden können. Diese Ergebnisse verdeutlichen noch einmal, wie wichtig es ist, dass der Podozyt im Rahmen einer Komplement-assoziierten Glomerulopathie vor einer Aktivierung des Komplementsystems geschützt wird, da er sensibel auf einen Angriff reagiert. Gleichzeitig war ich daran interessiert, welche Einflussmöglichkeiten der Podozyt auf diese ablaufende Komplementaktivierung hat.

## **6.2 Wie beeinflusst der Podozyt die glomeruläre Komplementaktivierung?**

Podozyten werden durch eine Komplementaktivierung geschädigt. Ob sie aber selbst in der Lage sind die ablaufende lokale Komplementreaktion zu beeinflussen war die Hauptfrage dieser Arbeit. Wie andere Zellarten müssen sich die Podozyten vor einer Schädigung durch das Komplementsystem schützen und benötigt daher Faktoren, die das System regulieren. Zum anderen könnte eine Aktivierung des Komplementsystems ein wichtiger Bestandteil der lokalen Immunabwehr darstellen.

### 6.2.1 Regulation der glomerulären Komplementaktivierung

Es ist bekannt, dass Podozyten sich vor einem Angriff durch das Komplementsystem mit Autophagie des terminalen Komplement-Komplexes schützen können (68, 69). Ein weiterer und ebenfalls wichtiger Weg um eine Komplement-Angriff abzuwehren, scheint die Expression von Komplement-Regulatoren zu sein. Durch diese Regulatoren werden Komplement-Aktivierungsprodukte abgebaut und inaktiviert und damit eine Aktivierung des Komplementsystems unterbrochen. Gerade die Regulation im alternativen Aktivierungsweg durch CFH aber auch CD46 und CD55 scheint von entscheidender Bedeutung zu sein, da sich das System auf der alternativen Seite spontan aktivieren kann und sich die Aktivierung über die Herstellung von C3b als Bestandteil der C3-Konvertase selbst amplifiziert. Unter physiologischen Umständen scheint es somit ein Gleichgewicht zwischen der spontanen Aktivierung und Amplifikation im alternativen Weg und den regulierenden Faktoren zu geben. Dieses empfindliche Gleichgewicht könnte bei glomerulären Komplement-assoziierten Erkrankungen gestört sein.

Mit diesen Experimenten konnte ich beweisen, dass Podozyten in der Lage sind Membranständige Komplementregulatoren zu exprimieren. Auf mRNA- und Proteinebene konnte eine Expression der Regulatoren CD46, CD55 und CD59 nachgewiesen werden. Es wurde beschrieben, dass Podozyten den Komplement-Faktor Complement Regulator 1 (CR1) *in vivo* exprimieren (70, 71). Jedoch gelang dieser Nachweis in den humanen kultivierten Podozyten nicht. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls die CR1 Expression in der Zellkultur nicht bestätigen konnten (72). Podozyten scheinen sich unter den Kulturbedingungen so zu verändern und damit die Fähigkeit zu verlieren, CR1 zu exprimieren. Im Vergleich zu Blutendothelzellen scheint sich die Expression der Komponenten CD46, CD55 und CD59 nicht zu unterscheiden. Das Expressions-Muster dieser Membran-ständigen Regulatoren scheint also insgesamt für den Podozyten eher unspezifisch zu sein. Wahrscheinlich handelt es sich um einen allgemeinen Mechanismus, mit dem sich Körperzellen gegen den Angriff durch das Komplementsystem schützen können. In einem gesunden Organismus halten sich die spontane Aktivierung über den alternativen Weg des Komplementsystems und diese regulierenden Komponenten wahrscheinlich die Waage.

Der Schutz durch die Komplement-Regulatoren scheint auch *in vitro* in unserem Modell erfolgreich gegen einen Komplement-Angriff zu sein. Die Zugabe von Komplement-Komponenten in Humanserum (NHS) genügte nicht für die Aktivierung des Komplementsystems und führte nicht zu einer Ablagerung von Komplement-Aktivierungsprodukten. Eine Komplement-Aktivierung erfolgte erst nach der Blockade der Membran-ständigen Regulatoren (65).

Im Unterschied zu den Membran-ständigen Regulatoren unterschied sich in unseren Untersuchungen die Expression von CFH in Podozyten signifikant von der Expression in Blut-Endothelzellen. Ein Grund hierfür könnte die unterschiedliche Lage der beiden Zellarten im Körper sein. Die Blut-Endothelzellen wurden aus dem Blut gesunder Probanden gewonnen. Diese Zellen stehen in ständigem Kontakt mit zirkulierendem CFH, und sind demnach wahrscheinlich nicht auf ihre eigene CFH-Produktion angewiesen. Im Gegensatz dazu fanden sich signifikant höhere Mengen mRNA für CFH in den kultivierten humanen Podozyten. Die Expression von CFH erfolgte zudem auf Proteinebene und die Zellen waren in der Lage das gebildete CFH in den Überstand abzugeben. Das sezernierte CFH zeigte im Ko-Faktor-Versuch die Fähigkeit die zentrale Komponente C3b zu spalten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das inflammatorisch wirksame Interferon gamma die Produktion und Sekretion von CFH noch weiter erhöhte. Mit diesem Schritt scheint der Podozyt in einer Inflammationssituation in der Lage zu sein, die Komplementaktivierung über den alternativen Weg auf seiner Oberfläche zu reduzieren. Unsere Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen anderer Gruppen überein. So konnten Endo *et al* auch eine erhöhte Expression von CFH in Glomeruli von Patienten mit einer membranösen Glomerulonephritis nachweisen (73). CFH ist ein 150 kDa schweres Protein, welches unter physiologischen Bedingungen in der gesunden Niere nicht in den Urin filtriert wird. Dennoch wurde es im Urin von gesunden (74) und proteinurischen Patienten und Patienten mit Glomerulopathien (73, 75, 76) nachgewiesen. Auch ich konnte in den Versuchen einen Beweis dafür finden, dass CFH in den Glomeruli *in vivo* gebildet wird. Durch die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung konnte die mRNA für CFH auch in den Podozyten nachgewiesen werden. Im Tiermodell zeigte sich sowohl in der Ratte, als auch in Mäusen mit einer experimentell induzierten Proteinurie, dass es nach spezifischer Schädigung des Podozyten zu einem Anstieg des glomerulären CFHs kam. CFH könnte also sowohl unter physiologischen Umständen, als auch im Rahmen verschiedener Erkrankungen lokal und bei Bedarf gebildet werden und die örtliche Komplementaktivierung regulieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass Podozyten wahrscheinlich eine Quelle dieser lokalen CFH Bildung sind.

Der Verlust der Fähigkeit Komplement lokal zu regulieren, könnte für Patienten mit Komplement-assoziierten Glomerulopathien, wie zum Beispiel dem atypischen hämolytisch-urämisches Syndroms (aHUS) oder einer membranösen Glomerulonephritis, von Bedeutung sein, bei denen es eines sogenannten „*second hit*“ bedarf (77). Beim aHUS kann es systemisch zu einer zunächst unterschwelligen Komplement-Aktivierung auf Grund von Mutationen in einem der Komplement-Regulator-Gene kommen. Die Schwelle für die Entstehung einer Komplement-assoziierten Erkrankung liegt dann bereits tiefer, als bei gesunden Patienten (78). Es ist gut vorstellbar, dass der Ausfall der lokalen Komplement-Regulation, auf Grund eines weiteren Ereignisses (z.B. Infektion, Schwangerschaft und Medikamente) nun zur Entstehung der Erkrankung in der Niere bzw. im Glomerulum führt. Das hämolytisch-urämische Syndrom wird

zwar primär als eine Erkrankung der Endothelzelle angesehen, dennoch zeigt sich eine Proteinurie häufig bereits zu Beginn der Erkrankung, welche auf eine frühe Beteiligung der Podozyten hindeutet (52).

Zusätzlich kann die Kommunikation und gegenseitige Beeinflussung (*Crosstalk*) zwischen Podozyten und Endothelzellen eine Rolle bei der glomerulären Komplementregulation spielen. Dieser *crosstalk* wurde bereits für den *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) (34) beschrieben: VEGF wird von Podozyten sezerniert und ermöglicht dadurch die Beweglichkeit von glomerulären Endothelzellen, die Differenzierung von glomerulären Mesangiumzellen und die korrekte Entwicklung des Glomerulums (34-36). Podozytäres VEGF scheint auch die lokale glomeruläre Expression von CFH zu begünstigen (79), eine Blockade des VEGF vermindert im Glomerulum die Expression des Komplementregulators CFH. Der funktionierende *crosstalk* zwischen Endothelzelle und Epithelzelle (Podozyt) über VEGF ist also wahrscheinlich Voraussetzung für eine ausreichende Komplementregulation im Glomerulum. Werden Podozyten geschädigt, und sinkt dadurch die Sekretion von VEGF, wird dadurch auch die Komplement-Regulation im Glomerulum angegriffen. Daher ist die Funktionalität des Podozyten für die renale Prognose des aHUS und anderer Komplement-assoziiierter Glomerulopathien wahrscheinlich von klinischer Bedeutung.

Nichtsdestotrotz handelt sich bei dem Großteil unserer Versuche um *in vitro* Versuche in der Zellkultur. Diesen *crosstalk* konnte ich in den von uns verwendeten Modellen daher nicht untersuchen, vermutlich spielt die Interaktion zwischen den verschiedenen glomerulären Zelltypen aber eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit fanden sich Hinweise, dass das podozytär sezernierte CFH in der Lage ist, die Komplement-Reaktion zu regulieren, und dass auch Podozyten *in vivo* CFH exprimieren. Ob dies aber wirklich die glomeruläre Komplement-Aktivierung beeinflusst, konnte noch nicht festgelegt werden. Aus diesem Grund sind weitere *in vivo* Versuche in Maus-Modellen geplant. Unsere Arbeitsgruppe hat bereits begonnen eine Mauslinie mit einem podozytären *knockout* für CFH herzustellen. Durch die Untersuchung dieser Maus in verschiedenen Proteinurie-Modellen hoffen wir zeigen zu können, welchen Einfluss das lokal produzierte CFH auf die glomeruläre Komplementaktivierung hat und welche Konsequenzen durch diesen *knockout* entstehen.

### **6.2.2 Aktivierung der glomerulären Komplement-Reaktion**

Gerade im alternativen Komplement-Weg spielt das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und regulierenden Komplementfaktoren eine wichtige Rolle, da dieser Weg durch eine spontane, kontinuierlich ablaufende Aktivierung gekennzeichnet ist. Vor allem die Komplementkomponente C3 steht im Zentrum dieser Seite der Komplement-Aktivierung.

Bekannterweise findet die Synthese der Komplement-Komponenten zum großen Teil in der Leber statt. Von hier gelangen die Komponenten über den Blutkreislauf zum Ort der Inflammation. In den letzten Jahren zeigte sich, dass aber auch eine lokale Komplement-Produktion in bestimmten Organen und Geweben eine wichtige Rolle bei der Entstehung verschiedener Erkrankungen spielt (4). Bei Erkrankungen, wie der Immunkomplex-Glomerulonephritis (13) und im Bereich der Transplantation-Medizin (14, 80) zeigte sich, dass die lokale Produktion und Aktivierung des Komplementsystems einen entscheidenden Anteil an der inflammatorischen Schädigung der Niere hat. Daher gewinnt die Untersuchung der lokalen Produktion von Komplementfaktoren zunehmend an Bedeutung. Völlig unklar ist aktuell aber noch, welchen Anteil die verschiedenen Zelltypen der Niere jeweils an der lokalen Komplementproduktion haben.

Der Podozyt stellt mit seinem Kontakt zur Urinseite eine Verbindung zwischen Urin- und Blutseite her. Von daher erscheint es durchaus als sinnvoll, dass er sich gegen eindringende Mikroorganismen zur Wehr setzen kann. Das Komplementsystem stellt einen wichtigen Teil des angeborenen Immunsystems dar. In der Niere kommt es auch im gesunden Zustand zu einer kontinuierlich ablaufenden Komplement-Aktivierung, welche aber vermutlich durch lokale Komplement-Regulatoren reguliert werden kann. Dadurch wird verhindert, dass körpereigene Zellen fälschlicherweise zu Schaden kommen (81). Dieses System könnte der Bekämpfung von eindringenden Mikroorganismen dienen (81). Der Podozyt steht mit der Außenwelt in ähnlichem Kontakt, wie das Epithel des Darms oder der Lunge. Anders, als lang angenommen wurde, zeigte sich, dass auch der Urogenitaltrakt mit einer natürlichen „Flora“ an Bakterien besiedelt ist. Eine Störung des empfindlichen Gleichgewichtes dieses Mikrobioms geht mit einer Reihe an nephrologischen und urologischen Erkrankungen, wie z.B. Harnwegsinfektionen, Blasendysfunktion oder Inkontinenz einher (82). Für andere Epithelzellen ließ sich eine lokale Produktion von aktivierenden Komplement-Komponenten nachweisen. Für die Epithelzellen des Darms (83, 84) ist schon seit längerem bekannt, dass die lokale Expression verschiedener Komplement-Komponenten, insbesondere von C3, einen entscheidenden Beitrag zur Abwehr von eindringenden Mikroorganismen leistet. Sie spielt aber auch eine Rolle bei der Entstehung von inflammatorischen Erkrankungen. Auch in alveolären Epithelzellen ließ sich die Sekretion von Komplement-Komponenten nachweisen (85).

Ich konnte in diesen Untersuchungen die Expression von verschiedenen aktivierenden Komplement-Komponenten in Podozyten nachweisen. Unter Kultur-Bedingungen sezernierten Podozyten auch C3 und aktives C3a in den Überstand. Die Voraussetzung für die Herstellung von C3a ist das Vorhandensein eines C3 spaltenden Enzyms, zum Beispiel einer C3-Konvertase. Neben der C3-Konvertase könnte aber auch eine intrazelluläre Spaltung von C3, wie sie bei T-Zellen beobachtet wurde, eine Rolle spielen (21). Insgesamt scheinen Podozyten daher durchaus in der Lage zu sein, die Aktivierung des Komplement-Systems zu starten. Zusätzlich

konnten in der Zellkultur gezeigt werden, dass die Sekretion der Komponenten C2, C3 und C4 durch die Zugabe des inflammatorischen Moleküls IFN $\gamma$  die Produktion und Sekretion noch weiter gesteigert werden konnte. Es scheint also durchaus denkbar zu sein, dass Podozyten unter inflammatorischen oder infektiologischen Bedingungen in der Lage sind, die umgebende Komplementreaktion zu beeinflussen. Eine andere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls in murinen Podozyten die Expression von verschiedenen Komplement-Proteinen der frühen Aktivierungskaskade nachweisen (61). Diese Daten unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit. Interessanterweise scheinen die Maus-Podozyten im Gegensatz zu unseren Untersuchungen an humanen Zellen jedoch C5 und Faktor B nicht zu exprimieren. Hierbei könnten die unterschiedlichen Kulturbedingungen der beiden Zellkultur-Linien aber auch Spezies-Unterschiede in der Komplement-Expression eine Rolle spielen. Neben den Untersuchungen in der Zellkultur konnte ich ebenfalls eine Produktion von C3 in der Niere der gesunden Maus mit Hilfe einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung nachweisen. Auch hier zeigte sich, ähnlich wie die Regulation für CFH eine Induktion der Expression von C3-mRNA im Rahmen eines Proteinurie-Modells in Ratten. Auch Li *et al* (61) bewiesen diese vermehrte Einlagerung und Bildung von C3 in einem in der Puromycin-induzierten Nephritis der Ratte. Ähnlich wie auch für CFH konnte in mehreren Studien das Auftreten von Komplementproteinen im Urin gezeigt werden (76, 86-93). Natürlich kann aber auch die Fehlfunktion des glomerulären Filterapparates im Rahmen proteinurischer Verhältnisse für den Verlust der im Serum zirkulierenden Komplement-Proteine verantwortlich gemacht werden (93). Auch andere Zelltypen, wie Nierentubulus-Zellen, könnten für eine Sekretion von Komplementproteinen in den Urin verantwortlich sein (27). Dennoch geben die Ergebnisse Hinweise darauf, dass auch glomeruläre Zellen, insbesondere Podozyten, aktivierende Komplement-Komponenten bilden können, um sich somit aktiv an einer ablaufenden Komplement-Aktivierung beteiligen zu können. Diese Fähigkeit scheint der lokalen Immunabwehr zu dienen, könnte aber unter bestimmten Umständen auch das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und regulierenden Komplement-Komponenten stören. Eindringende Mikroorganismen könnten die Produktion von podozytären Komplementfaktoren induzieren und so das Gleichgewicht in Richtung der aktivierenden Komplementkomponenten verschieben. In einer vorgeschädigten oder aber auch einer transplantierten Niere, könnte dieses Ereignis dann den Beginn einer Komplement-assoziierten Glomerulopathie begünstigen. Um diese Theorien beweisen zu können, fehlen aber weitere funktionelle *in vivo* Daten. Auch hier könnte eine Maus mit einem podozytären Knockout für den Komplementfaktor C3, und die Untersuchung in verschiedenen Proteinurie- und Infektionsmodellen hilfreich sein. In diesen Modellen könnte auch untersucht werden, welchen Einfluss die Sekretion von C3 durch den Podozyten auf die umgebenden glomerulären Strukturen hat.

Die von uns durchgeführten Zellkultur-Versuche und die deskriptive Beschreibung der Produktion von C3 in Podozyten geben aber wichtige Hinweise auf die Möglichkeit einer Produktion

von Komplementkomponenten und damit einer Beteiligung an der Komplementaktivierung. Damit zeigten wir, dass diesen Zellen, neben der Aufrechterhaltung der Filtrationsbarriere auch andere Aufgaben und Funktionen zukommen könnten.

### 6.3 Der Podozyt als immunologisch aktive Zelle

Zusätzlich zu der Bedeutung des Podozyten im Rahmen der lokalen Komplement-Aktivierung betrachtete ich in dieser Arbeit einen weiteren wichtigen Teilaspekt: Neben seiner Filtrationsfunktion scheint der Podozyt über einen aktiven Sekretionsmechanismus für Komplementkomponenten zu verfügen.

Insgesamt weisen ausdifferenzierte Podozyten viele Gemeinsamkeiten mit Neuronen auf: es handelt sich bei beiden Zelltypen um ausdifferenzierte, nicht mehr teilungsfähige Zellen, beide exprimieren ähnliche Oberflächenproteine (Nephrin, Synaptopodin, CAT3 und EAAT) (94-96) und sowohl die Organisation des Zytoskeletts als auch die Ausbildung der Fortsatzstrukturen ähneln sich. Außerdem scheinen Podozyten über Neuronen-artige funktionell aktive „synaptische“ Vesikel nicht nur zu verfügen (37, 38), sondern auch, ähnlich den Neuronen, darüber miteinander zu kommunizieren (39). Es wäre daher durchaus denkbar, dass auch eine Sekretion von Proteinen durch den Podozyten, der Sekretion von Neurotransmittern durch Neuronen sehr ähnlich sein könnte. Es konnte gezeigt werden, dass die Komplement-Komponenten C3 und CFH im Golgi-Apparat gebildet und gespeichert werden. Es erfolgte eine Art gerichteter Transport entlang der Tubuli, und die Komplement-Komponente C3 lag nach Ultrazentrifugation in einer Vesikelfraktion vor. Zudem zeigte sich in der Immunfluoreszenz eine Ko-Lokalisation von C3 mit Synaptobrevin, einem Bestandteil des Synaptosoms, welches in Neuronen für die Verschmelzung der Vesikel mit der Zellmembran und damit für die aktive Exozytose bestimmt ist. Natürlich handelte es sich bei diesen Daten zunächst um vorläufige Daten, die nur auf eine Gemeinsamkeit von Podozyten und Neuronen hindeuten, dennoch zeigten sie ebenfalls, dass es sich bei der Sekretion von Komplement-Komponenten um einen gerichteten Transport und eine induzierbare Exozytose handelt. Durch den Nachweis dieses aktiven Sekretionsmechanismus gelang ein weiterer Hinweis darauf, dass sich Podozyten aktiv am Immunsystem beteiligen, und auch hier bestimmte Aufgaben übernehmen könnten. Diese Theorie wurde unter anderen Aspekten auch von anderen Arbeitsgruppen untersucht.

So konnte gezeigt werden, dass Podozyten verschiedene *Toll like* Rezeptoren (TLR) exprimieren, unter anderem TLR3, TLR4 und TLR9 (97-101). TLR spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität. Insgesamt sind 10 verschiedene TLR bekannt, jeder von ihnen erkennt ein spezielles Pathogen assoziiertes molekulares Pattern (PAMPs) und führt über den nuklearen Faktor Kappa B zur Produktion inflammatorischer Zytokine (wie TNF- $\alpha$ , IL-6 oder



IFN $\gamma$ ). TLR werden unter anderem in Makrophagen, T- und B-Zellen exprimiert, wo sie dann nach chemotaktischer Anlockung, unter anderem durch die Komplementkomponente C3a, die Immunantwort auslösen (102, 103). Man vermutet, dass über den TLR vermittelte Signalkaskaden (besonders über TLR4) in Podozyten für die Entstehung verschiedener glomerulärer Erkrankungen verantwortlich sind (101). TLR sind unter anderem auch in den Prozess der Apoptose in Podozyten involviert (97). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Podozyten im Rahmen proteinurischer Erkrankungen vermehrt B7-1 exprimieren (98). B7-1, ist ein trans-Membran Protein, welches in der Regel von B-Zellen oder Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert wird. Obwohl es gewisse Hinweise darauf gibt, dass B7-1 mit Schlitzmembran-Proteinen interagiert (104) und damit einen indirekten Einfluss auf die Architektur des Podozyten hat, stellt sich die Frage, warum Podozyten als „nicht immunologische“ Zellen immunologische Rezeptoren wie den TLR oder vielleicht B7-1 exprimieren. Wie bereits erwähnt, steht der Podozyt mit der „Außenwelt“ über das Mikrobiom des Urogenitaltraktes in Verbindung. Es wäre daher durchaus denkbar, dass Podozyten dazu beitragen könnten, eindringende Mikro-Organismen zu erkennen, selbst bekämpfen und andere Immunzellen, wie T- und B-Zellen bei der Immunantwort zu unterstützen. Daher wäre auch die Beteiligung und Beeinflussung der Elimination von Pathogenen durch das Komplementsystem denkbar.

Diese Überlegungen über die potentielle Beteiligung des Podozyten an der angeborenen Immunabwehr belegen die Wichtigkeit der Ergebnisse. Ein Hinweis für eine vielschichtige Rolle des Podozyten in der Immunabwehr und in der Regulation immunologischer Mechanismen könnte der Nachweis der Sekretion von C3a durch die Podozyten sein. Neben der Komplement-Aktivierung scheinen der Komponente C3a nämlich weitere und neu entdeckte Rollen zuzukommen. C3a spielt eine Rolle als Anaphylatoxin und lockt so weitere Entzündungszellen und Mediatoren an. Zudem konnte gezeigt werden, dass C3a in einer Proteinurie zu einer Transition von Tubuluszellen zu Mesenchymzellen führt (105). C3a spielt aber auch eine zentrale Rolle in der Zelldifferenzierung, Proliferation und Induktion der erworbenen Immunabwehr (106). In T-Zellen wird C3 intrazellulär durch Cathepsin L gespalten und als C3a freigesetzt. Intrazellulär scheint C3a notwendig für das Überleben der T-Zellen zu sein. Eine Freisetzung führte über eine autokrine Aktivierung der T-Zelle unter anderem über den C3a-Rezeptor, zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (21). Auch Podozyten exprimieren den C3a-Rezeptor (107). Daher wäre auch denkbar, dass die Herstellung von C3a zu einem autokrinen Stimulationsmechanismus führt und der Podozyt eine Immunantwort initiieren und/oder unterstützen kann. Podozyten exprimieren ebenfalls Cathepsin L (108) und wären damit, ähnlich wie die T-Zellen in der Lage C3a herzustellen. Die Detektion im Überstand der Podozyten der zentralen Komponente C3a verdeutlicht die Möglichkeit des Einflusses des Podozyten in der lokalen Immunabwehr und bringt gleichzeitig eine Menge neue Fragestellungen hervor.

Da C3a ein Produkt der Spaltung aus C3 ist, und bei diesem Schritt unweigerlich C3b entsteht, welches wiederum zu einer fortlaufenden Komplement-Aktivierung führen würde, ist auch hier vorstellbar, dass Komplement-Regulatoren und vor allem CFH unter physiologischen Umständen, das anfallende C3b wiederum abbauen. So könnte C3a hergestellt werden, ohne dass zu viel C3b zu einer überschießenden und nicht regulierten Komplementaktivierung führt.

Auch hier scheint das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Komponenten von Bedeutung zu sein. Im Shigatoxin-induzierten HUS-Mausmodell kann durch die Blockade des C3a-Rezeptors der Schaden am Podozyten verhindert werden (107). Ebenso findet sich in Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung eine erhöhte Expression von Cathepsin L in den Podozyten. Diese vermehrte Expression wiederum könnte zu einer vermehrten Spaltaktivität und zu einem vermehrten Anfallen von C3a und C3b und damit zu einer Komplementaktivierung führen. Um diesen Zusammenhang zu beweisen, fehlen zum aktuellen Zeitpunkt aber noch entsprechende *in vivo* Daten. Auch hier würden entsprechende podozytäre *Knockout*-Modelle (z.B. für den Komplementrezeptor C3a, oder für Cathepsin L) bei der Beantwortung der Fragestellung behilflich sein, inwiefern sich der Podozyt aktiv am Immunsystem beteiligt und welche Rolle podozytäres C3a spielt.

Auch, wenn entsprechende *in vivo* Daten fehlen, so konnte ich in dieser Arbeit zahlreiche Hinweise darauf finden, dass der Podozyt in gewissem Maße die lokale Immunabwehr beeinflussen könnte. Diese potentiellen Einflussmöglichkeiten an der Beteiligung des Immunsystems zeigen aber auch, dass diese Systeme in unkontrolliertem Zustand zur Auslösung einer glomerulären Erkrankung oder zu einer sekundären Verstärkung einer Glomerulopathie führen können. Natürlich sind weitere Untersuchungen und Daten notwendig, um die zu Grunde liegenden Pathomechanismen zu verstehen, und um in Zukunft auch neue Optionen für Therapien entwickeln zu können.

## 6.4 Konklusion und Ausblick

Mit dieser Arbeit konnte belegt werden, dass Podozyten über die Fähigkeit verfügen Komplement-Komponenten zu bilden, zu bearbeiten, zu speichern und auch exozytotisch in die Umgebung abzugeben. Damit könnte dem Podozyten neben seiner elementar wichtigen Aufgabe in der Erhaltung der Filtrationsfunktion eine weitere wichtige Aufgabe zu kommen. Durch die Beeinflussung der Komplement-Aktivierung erfüllt er vermutlich eine immunologische Rolle. Zum einen scheint er über die Expression der Membran-ständigen Regulatoren die Komplement-Aktivierung zu regulieren, zum anderen schützt er wahrscheinlich sich selbst und seine Umgebung durch die Sekretion von funktionell aktivem CFH. Die Sekretion von CFH scheint vor allem für die glomeruläre Basalmembran von Bedeutung zu sein, da diese keine weiteren

Komplementregulatoren exprimiert (109). Auf der anderen Seite trägt er über die Bildung und Sekretion von aktivierenden Komplement-Komponenten der frühen Komplement-Kaskade und besonders durch die Herstellung von C3a zu einer Verstärkung einer ablaufenden Aktivierung bei. Diese Aktivierung kann als Schutz vor eindringenden Mikroorganismen gedeutet werden. Zudem könnte die vermehrte Sekretion unter inflammatorischen Bedingungen, also zum Beispiel im Rahmen von Komplement-vermittelten Glomerulopathien, zu einer Verstärkung des Schadens und einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufes führen oder eine Erkrankung sogar initiieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei jeder glomerulären Erkrankung die Rolle der lokalen Produktion von Komplement-Faktoren durch Podozyten in Betracht gezogen werden sollte.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Pangburn MK. Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement. *Immunopharmacology*. 2000 Aug;49(1-2):149-57. PubMed PMID: 10904114. eng.
2. Pickering MC, Cook HT. Translational mini-review series on complement factor H: renal diseases associated with complement factor H: novel insights from humans and animals. *Clin Exp Immunol*. 2008 Feb;151(2):210-30. PubMed PMID: 18190458. Pubmed Central PMCID: PMC2276951. eng.
3. Goodship TH. Atypical HUS and complement dysregulation. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Jul;17(7):1775-6. PubMed PMID: 16790505. eng.
4. Li K, Sacks SH, Zhou W. The relative importance of local and systemic complement production in ischaemia, transplantation and other pathologies. *Molecular immunology*. 2007 Sep;44(16):3866-74. PubMed PMID: 17768105.
5. Whaley K. Biosynthesis of the complement components and the regulatory proteins of the alternative complement pathway by human peripheral blood monocytes. *J Exp Med*. 1980 Mar;151(3):501-16. PubMed PMID: 6444659. Pubmed Central PMCID: PMC2185797. eng.
6. Ripoché J, Mitchell JA, Erdei A, Madin C, Moffatt B, Mokoena T, *et al*. Interferon gamma induces synthesis of complement alternative pathway proteins by human endothelial cells in culture. *J Exp Med*. 1988 Nov;168(5):1917-22. PubMed PMID: 2972796. Pubmed Central PMCID: PMC2189095. eng.
7. Andoh A, Fujiyama Y, Bamba T, Hosoda S. Differential cytokine regulation of complement C3, C4, and factor B synthesis in human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *J Immunol*. 1993 Oct;151(8):4239-47. PubMed PMID: 8409399. eng.
8. Andoh A, Fujiyama Y, Sumiyoshi K, Bamba T. Local secretion of complement C3 in the exocrine pancreas: ductal epithelial cells as a possible biosynthetic site. *Gastroenterology*. 1996 Jun;110(6):1919-25. PubMed PMID: 8964419. eng.
9. Andoh A, Fujiyama Y, Sakumoto H, Uchihara H, Kimura T, Koyama S, *et al*. Detection of complement C3 and factor B gene expression in normal colorectal mucosa, adenomas and carcinomas. *Clin Exp Immunol*. 1998 Mar;111(3):477-83. PubMed PMID: 9528886. Pubmed Central PMCID: PMC1904873. eng.
10. Andoh A, Shimada M, Takaya H, Hata K, Fujiyama Y, Bamba T. Transforming growth factor-beta1 acts as a potent inhibitor of complement C3 biosynthesis in human pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*. 2000 Mar;20(2):138-45. PubMed PMID: 10707928. eng.
11. Li K, Fazekasova H, Wang N, Sagoo P, Peng Q, Khamri W, *et al*. Expression of complement components, receptors and regulators by human dendritic cells. *Mol Immunol*. 2011 May;48(9-10):1121-7. PubMed PMID: 21397947. Pubmed Central PMCID: PMC3084445. eng.
12. Welch TR, Beischel LS, Witte DP. Differential expression of complement C3 and C4 in the human kidney. *J Clin Invest*. 1993 Sep;92(3):1451-8. PubMed PMID: 8376597. Pubmed Central PMCID: PMC288290. eng.
13. Sacks SH, Zhou W, Andrews PA, Hartley B. Endogenous complement C3 synthesis in immune complex nephritis. *Lancet*. 1993 Nov;342(8882):1273-4. PubMed PMID: 7901586. eng.
14. Farrar CA, Zhou W, Lin T, Sacks SH. Local extravascular pool of C3 is a determinant of postischemic acute renal failure. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006 Feb;20(2):217-26. PubMed PMID: 16449793.
15. Damman J, Seelen MA, Moers C, Daha MR, Rahmel A, Leuvenink HG, *et al*. Systemic complement activation in deceased donors is associated with acute rejection after renal transplantation in the recipient. *Transplantation*. 2011 Jul 27;92(2):163-9. PubMed PMID: 21677599.
16. Miyazaki M, Abe K, Koji T, Furusu A, Ozono Y, Harada T, *et al*. Intraglomerular C3 synthesis in human kidney detected by in situ hybridization. *J Am Soc Nephrol*. 1996 Nov;7(11):2428-33. PubMed PMID: 8959636. eng.
17. Serinsöz E, Bock O, Gwinner W, Schwarz A, Haller H, Kreipe H, *et al*. Local complement C3 expression is upregulated in humoral and cellular rejection of renal allografts. *Am J Transplant*. 2005 Jun;5(6):1490-4. PubMed PMID: 15888059. eng.
18. Nakanishi I, Moutabarrik A, Hara T, Hatanaka M, Hayashi T, Syouji T, *et al*. Identification and characterization of membrane cofactor protein (CD46) in the human kidneys. *European journal of immunology*. 1994 Jul;24(7):1529-35. PubMed PMID: 8026516.

19. Nangaku M. Complement regulatory proteins in glomerular diseases. *Kidney Int.* 1998 Nov;54(5):1419-28. PubMed PMID: 9844117. eng.
20. Timmerman JJ, van der Woude FJ, van Gijlswijk-Janssen DJ, Verweij CL, van Es LA, Daha MR. Differential expression of complement components in human fetal and adult kidneys. *Kidney Int.* 1996 Mar;49(3):730-40. PubMed PMID: 8648914. eng.
21. Liszewski MK, Kolev M, Le Fric G, Leung M, Bertram PG, Fara AF, *et al.* Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity.* 2013 Dec 12;39(6):1143-57. PubMed PMID: 24315997. Pubmed Central PMCID: 3865363.
22. Sacks S, Zhou W, Campbell RD, Martin J. C3 and C4 gene expression and interferon-gamma-mediated regulation in human glomerular mesangial cells. *Clinical and experimental immunology.* 1993 Sep;93(3):411-7. PubMed PMID: 8370168. Pubmed Central PMCID: 1554924.
23. Sacks SH, Zhou W, Pani A, Campbell RD, Martin J. Complement C3 gene expression and regulation in human glomerular epithelial cells. *Immunology.* 1993 Jul;79(3):348-54. PubMed PMID: 8406564. Pubmed Central PMCID: 1421987.
24. Zhou W, Campbell RD, Martin J, Sacks SH. Interferon-gamma regulation of C4 gene expression in cultured human glomerular epithelial cells. *Eur J Immunol.* 1993 Oct;23(10):2477-81. PubMed PMID: 8405048. eng.
25. Sheerin NS, Zhou W, Adler S, Sacks SH. TNF-alpha regulation of C3 gene expression and protein biosynthesis in rat glomerular endothelial cells. *Kidney international.* 1997 Mar;51(3):703-10. PubMed PMID: 9067902.
26. Zhou W, Marsh JE, Sacks SH. Intrarenal synthesis of complement. *Kidney international.* 2001 Apr;59(4):1227-35. PubMed PMID: 11260382.
27. Montinaro V, Lopez A, Monno R, Cappiello V, Manno C, Gesualdo L, *et al.* Renal C3 synthesis in idiopathic membranous nephropathy: correlation to urinary C5b-9 excretion. *Kidney international.* 2000 Jan;57(1):137-46. PubMed PMID: 10620195.
28. Sheerin NS, Riskey P, Abe K, Tang Z, Wong W, Lin T, *et al.* Synthesis of complement protein C3 in the kidney is an important mediator of local tissue injury. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2008 Apr;22(4):1065-72. PubMed PMID: 18039928.
29. Greka A, Mundel P. Cell biology and pathology of podocytes. *Annual review of physiology.* 2012;74:299-323. PubMed PMID: 22054238. Pubmed Central PMCID: 3600372.
30. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, *et al.* The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nature medicine.* 2008 Sep;14(9):931-8. PubMed PMID: 18724379.
31. Oh J, Reiser J, Mundel P. Dynamic (re)organization of the podocyte actin cytoskeleton in the nephrotic syndrome. *Pediatric nephrology.* 2004 Feb;19(2):130-7. PubMed PMID: 14673634.
32. Patrakka J, Tryggvason K. New insights into the role of podocytes in proteinuria. *Nature reviews Nephrology.* 2009 Aug;5(8):463-8. PubMed PMID: 19581907.
33. Zoja C, Abbate M, Remuzzi G. Progression of renal injury toward interstitial inflammation and glomerular sclerosis is dependent on abnormal protein filtration. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2015 May;30(5):706-12. PubMed PMID: 25087196.
34. Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, Hochster H, Haas M, Weisstuch J, *et al.* VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *The New England journal of medicine.* 2008 Mar 13;358(11):1129-36. PubMed PMID: 18337603. Pubmed Central PMCID: 3030578.
35. Eremina V, Baelde HJ, Quaggin SE. Role of the VEGF--a signaling pathway in the glomerulus: evidence for crosstalk between components of the glomerular filtration barrier. *Nephron Physiology.* 2007;106(2):p32-7. PubMed PMID: 17570946.
36. Eremina V, Quaggin SE. The role of VEGF-A in glomerular development and function. *Current opinion in nephrology and hypertension.* 2004 Jan;13(1):9-15. PubMed PMID: 15090854.
37. Rastaldi MP, Armelloni S, Berra S, Calvaresi N, Corbelli A, Giardino LA, *et al.* Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2006 May;20(7):976-8. PubMed PMID: 16585060.
38. Rastaldi MP, Armelloni S, Berra S, Li M, Pesaresi M, Poczewski H, *et al.* Glomerular podocytes possess the synaptic vesicle molecule Rab3A and its specific effector rabphilin-3a. *The American journal of pathology.* 2003 Sep;163(3):889-99. PubMed PMID: 12937130. Pubmed Central PMCID: 1868247.
39. Giardino L, Armelloni S, Corbelli A, Mattinzoli D, Zennaro C, Guerrot D, *et al.* Podocyte glutamatergic signaling contributes to the function of the glomerular filtration barrier. *Journal of the*

- American Society of Nephrology : JASN. 2009 Sep;20(9):1929-40. PubMed PMID: 19578006. Pubmed Central PMCID: 2736779.
40. Pozdzik A, Brocheriou I, David C, Touzani F, Goujon JM, Wissing KM. Membranous Nephropathy and Anti-Podocytes Antibodies: Implications for the Diagnostic Workup and Disease Management. *BioMed research international*. 2018;2018:6281054. PubMed PMID: 29511687. Pubmed Central PMCID: 5817285.
  41. Dettmar AK, Wiech T, Kemper MJ, Soave A, Rink M, Oh J, *et al*. Immunohistochemical and serological characterization of membranous nephropathy in children and adolescents. *Pediatric nephrology*. 2018 Mar;33(3):463-72. PubMed PMID: 29034405.
  42. Cattran DC, Wald R, Brenchley PE, Coupes B, North American Nephrotic Syndrome G, Genes G, *et al*. Clinical correlates of serial urinary membrane attack complex estimates in patients with idiopathic membranous nephropathy. *Clinical nephrology*. 2003 Jul;60(1):7-12. PubMed PMID: 12872852.
  43. Coupes BM, Kon SP, Brenchley PE, Short CD, Mallick NP. The temporal relationship between urinary C5b-9 and C3dg and clinical parameters in human membranous nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1993;8(5):397-401. PubMed PMID: 8393542.
  44. Ronco P, Debiec H. Target antigens and nephritogenic antibodies in membranous nephropathy: of rats and men. *Seminars in immunopathology*. 2007 Nov;29(4):445-58. PubMed PMID: 17899086.
  45. Borza DB. Alternative Pathway Dysregulation and the Conundrum of Complement Activation by IgG4 Immune Complexes in Membranous Nephropathy. *Frontiers in immunology*. 2016;7:157. PubMed PMID: 27199983. Pubmed Central PMCID: 4842769.
  46. Dettmar AK, Binder E, Greiner FR, Liebau MC, Kurschat CE, Junggraithmayr TC, *et al*. Protection of human podocytes from shiga toxin 2-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and apoptosis by human serum amyloid P component. *Infection and immunity*. 2014 May;82(5):1872-9. PubMed PMID: 24566618. Pubmed Central PMCID: 3993451.
  47. Keir LS, Langman CB. Complement and the kidney in the setting of Shiga-toxin hemolytic uremic syndrome, organ transplantation, and C3 glomerulonephritis. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2016 Apr;54(2):203-11. PubMed PMID: 27156109.
  48. Zoja C, Buelli S, Morigi M. Shiga toxin triggers endothelial and podocyte injury: the role of complement activation. *Pediatric nephrology*. 2017 Dec 6. PubMed PMID: 29214442.
  49. Noris M, Remuzzi G. Genetics and genetic testing in hemolytic uremic syndrome/thrombotic thrombocytopenic purpura. *Seminars in nephrology*. 2010 Jul;30(4):395-408. PubMed PMID: 20807612.
  50. Noris M, Caprioli J, Bresin E, Mossali C, Pianetti G, Gamba S, *et al*. Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2010 Oct;5(10):1844-59. PubMed PMID: 20595690. Pubmed Central PMCID: 2974386.
  51. Johnson S, Stojanovic J, Ariceta G, Bitzan M, Besbas N, Frieling M, *et al*. An audit analysis of a guideline for the investigation and initial therapy of diarrhea negative (atypical) hemolytic uremic syndrome. *Pediatric nephrology*. 2014 Oct;29(10):1967-78. PubMed PMID: 24817340.
  52. Sellier-Leclerc AL, Fremeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA, Macher MA, Niaudet P, Guest G, *et al*. Differential impact of complement mutations on clinical characteristics in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Aug;18(8):2392-400. PubMed PMID: 17599974. eng.
  53. Noris M, Mele C, Remuzzi G. Podocyte dysfunction in atypical haemolytic uraemic syndrome. *Nature reviews Nephrology*. 2015 Apr;11(4):245-52. PubMed PMID: 25599621.
  54. Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, Farren T, *et al*. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2002 Mar;13(3):630-8. PubMed PMID: 11856766.
  55. Noone DG, Riedl M, Pluthero FG, Bowman ML, Liszewski MK, Lu L, *et al*. Von Willebrand factor regulates complement on endothelial cells. *Kidney international*. 2016 Jul;90(1):123-34. PubMed PMID: 27236750.
  56. Brooimans RA, van der Ark AA, Buurman WA, van Es LA, Daha MR. Differential regulation of complement factor H and C3 production in human umbilical vein endothelial cells by IFN-gamma and IL-1. *J Immunol*. 1990 May;144(10):3835-40. PubMed PMID: 2139673. eng.
  57. Gerritsma JS, Gerritsen AF, De Ley M, van Es LA, Daha MR. Interferon-gamma induces biosynthesis of complement components C2, C4 and factor H by human proximal tubular epithelial cells. *Cytokine*. 1997 Apr;9(4):276-83. PubMed PMID: 9112336. eng.
  58. Luo W, Vik DP. Regulation of complement factor H in a human liver cell line by interferon-gamma. *Scand J Immunol*. 1999 May;49(5):487-94. PubMed PMID: 10320641. eng.

59. Baumert M, Maycox PR, Navone F, De Camilli P, Jahn R. Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain. *The EMBO journal*. 1989 Feb;8(2):379-84. PubMed PMID: 2498078. Pubmed Central PMCID: 400817.
60. Yang JW, Dettmar AK, Kronbichler A, Gee HY, Saleem M, Kim SH, *et al*. Recent advances of animal model of focal segmental glomerulosclerosis. *Clinical and experimental nephrology*. 2018 Mar 20. PubMed PMID: 29556761.
61. Li X, Ding F, Zhang X, Li B, Ding J. The Expression Profile of Complement Components in Podocytes. *International journal of molecular sciences*. 2016 Mar 30;17(4):471. PubMed PMID: 27043537. Pubmed Central PMCID: 4848927.
62. Reis ES, Mastellos DC, Yancopoulos D, Risitano AM, Ricklin D, Lambris JD. Applying complement therapeutics to rare diseases. *Clinical immunology*. 2015 Dec;161(2):225-40. PubMed PMID: 26341313. Pubmed Central PMCID: 4658209.
63. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney international*. 2006 Jun;69(12):2131-47. PubMed PMID: 16688120.
64. Buelli S, Abbate M, Morigi M, Muioli D, Zanchi C, Noris M, *et al*. Protein load impairs factor H binding promoting complement-dependent dysfunction of proximal tubular cells. *Kidney international*. 2009 May;75(10):1050-9. PubMed PMID: 19242507.
65. Riedl M, Noone DG, Khan MA, Pluthero FG, Kahr WHA, Palaniyar N, *et al*. Complement Activation Induces Neutrophil Adhesion and Neutrophil-Platelet Aggregate Formation on Vascular Endothelial Cells. *Kidney international reports*. 2017 Jan;2(1):66-75. PubMed PMID: 29142942. Pubmed Central PMCID: 5678626.
66. Zhang H, Cybulsky AV, Aoudjit L, Zhu J, Li H, Lamarche-Vane N, *et al*. Role of Rho-GTPases in complement-mediated glomerular epithelial cell injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Jul;293(1):F148-56. PubMed PMID: 17376765. eng.
67. Takano T, Elimam H, Cybulsky AV. Complement-mediated cellular injury. *Semin Nephrol*. 2013 Nov;33(6):586-601. PubMed PMID: 24161043. eng.
68. Wang L, Hong Q, Lv Y, Feng Z, Zhang X, Wu L, *et al*. Autophagy can repair endoplasmic reticulum stress damage of the passive Heymann nephritis model as revealed by proteomics analysis. *J Proteomics*. 2012 Jul;75(13):3866-76. PubMed PMID: 22595305. eng.
69. Lv Q, Yang F, Chen K, Zhang Y. Autophagy protects podocytes from sublytic complement induced injury. *Exp Cell Res*. 2016 Feb;341(2):132-8. PubMed PMID: 26883468. eng.
70. Moll S, Miot S, Sadallah S, Gudat F, Mihatsch MJ, Schifferli JA. No complement receptor 1 stumps on podocytes in human glomerulopathies. *Kidney international*. 2001 Jan;59(1):160-8. PubMed PMID: 11135068.
71. Nolasco FE, Cameron JS, Hartley B, Coelho RA, Hildredth G, Reuben R. Abnormal podocyte CR-1 expression in glomerular diseases: association with glomerular cell proliferation and monocyte infiltration. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1987;2(5):304-12. PubMed PMID: 2962013.
72. Java A, Liszewski MK, Hourcade DE, Zhang F, Atkinson JP. Role of complement receptor 1 (CR1; CD35) on epithelial cells: A model for understanding complement-mediated damage in the kidney. *Molecular immunology*. 2015 Oct;67(2 Pt B):584-95. PubMed PMID: 26260209. Pubmed Central PMCID: 4565762.
73. Endo M, Fuke Y, Tamano M, Hidaka M, Ohsawa I, Fujita T, *et al*. Glomerular deposition and urinary excretion of complement factor H in idiopathic membranous nephropathy. *Nephron Clinical practice*. 2004;97(4):c147-53. PubMed PMID: 15331938.
74. Endo M, Fuke Y, Ohi H, Satomura A, Fukuda N, Fujita T, *et al*. [Evaluation of urinary factor H excretion in patients with idiopathic membranous nephropathy]. *Nihon Jinzo Gakkai shi*. 2007;49(5):499-504. PubMed PMID: 17695812.
75. Tamano M, Fuke Y, Endo M, Ohsawa I, Fujita T, Ohi H. Urinary complement factor H in renal disease. *Nephron*. 2002;92(3):705-7. PubMed PMID: 12372960. eng.
76. Zhang JJ, Jiang L, Liu G, Wang SX, Zou WZ, Zhang H, *et al*. Levels of urinary complement factor H in patients with IgA nephropathy are closely associated with disease activity. *Scand J Immunol*. 2009 May;69(5):457-64. PubMed PMID: 19508377. eng.
77. Allen U, Licht C. Pandemic H1N1 influenza A infection and (atypical) HUS--more than just another trigger? *Pediatr Nephrol*. 2011 Jan;26(1):3-5. PubMed PMID: 21057815. eng.
78. Riedl M, Fakhouri F, Le Quintrec M, Noone DG, Jungraithmayr TC, Fremeaux-Bacchi V, *et al*. Spectrum of complement-mediated thrombotic microangiopathies: pathogenetic insights identifying novel treatment approaches. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2014 Jun;40(4):444-64. PubMed PMID: 24911558.
79. Keir LS, Firth R, Aponik L, Feitelberg D, Sakimoto S, Aguilar E, *et al*. VEGF regulates local inhibitory complement proteins in the eye and kidney. *The Journal of clinical investigation*. 2017 Jan

- 3;127(1):199-214. PubMed PMID: 27918307. Pubmed Central PMCID: 5199702 has been employed at GlaxoSmithKline since October 2014. All contributions to this work were undertaken during her Wellcome Trust intermediate clinical fellowship. Her spouse, David Kavanagh, is head of the National Renal Complement Therapeutics Centre, UK, and a board member and scientific advisor to Gyroscope Therapeutics Ltd.
80. Damman J, Nijboer WN, Schuurs TA, Leuvenink HG, Morariu AM, Tullius SG, *et al.* Local renal complement C3 induction by donor brain death is associated with reduced renal allograft function after transplantation. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2011 Jul;26(7):2345-54. PubMed PMID: 21127132.
  81. McCullough JW, Renner B, Thurman JM. The role of the complement system in acute kidney injury. *Seminars in nephrology.* 2013 Nov;33(6):543-56. PubMed PMID: 24161039. Pubmed Central PMCID: 3816009.
  82. Aragon IM, Herrera-Imbroda B, Queipo-Ortuno MI, Castillo E, Del Moral JS, Gomez-Millan J, *et al.* The Urinary Tract Microbiome in Health and Disease. *European urology focus.* 2016 Nov 14. PubMed PMID: 28753805.
  83. Sina C, Kemper C, Derer S. The intestinal complement system in inflammatory bowel disease: Shaping intestinal barrier function. *Seminars in immunology.* 2018 Feb 24. PubMed PMID: 29486961.
  84. Sunderhauf A, Skibbe K, Preisker S, Ebbert K, Verschoor A, Karsten CM, *et al.* Regulation of epithelial cell expressed C3 in the intestine - Relevance for the pathophysiology of inflammatory bowel disease? *Molecular immunology.* 2017 Oct;90:227-38. PubMed PMID: 28843904.
  85. Zhao YX, Andoh A, Shimada M, Takaya H, Hata K, Fujiyama Y, *et al.* Secretion of complement components of the alternative pathway (C3 and factor B) by the human alveolar type II epithelial cell line A549. *International journal of molecular medicine.* 2000 Apr;5(4):415-9. PubMed PMID: 10719060.
  86. Maillard N, Wyatt RJ, Julian BA, Kiryluk K, Gharavi A, Fremeaux-Bacchi V, *et al.* Current Understanding of the Role of Complement in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Jul;26(7):1503-12. PubMed PMID: 25694468. eng.
  87. Kalantari S, Rutishauser D, Samavat S, Nafar M, Mahmudieh L, Rezaei-Tavirani M, *et al.* Urinary prognostic biomarkers and classification of IgA nephropathy by high resolution mass spectrometry coupled with liquid chromatography. *PLoS One.* 2013;8(12):e80830. PubMed PMID: 24339887. Pubmed Central PMCID: PMC3855054. eng.
  88. Onda K, Ohsawa I, Ohi H, Tamano M, Mano S, Wakabayashi M, *et al.* Excretion of complement proteins and its activation marker C5b-9 in IgA nephropathy in relation to renal function. *BMC Nephrol.* 2011;12:64. PubMed PMID: 22111871. Pubmed Central PMCID: PMC3283454. eng.
  89. Li K, Sacks SH, Sheerin NS. The classical complement pathway plays a critical role in the opsonisation of uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular immunology.* 2008 Feb;45(4):954-62. PubMed PMID: 17870166.
  90. Morita Y, Ikeguchi H, Nakamura J, Hotta N, Yuzawa Y, Matsuo S. Complement activation products in the urine from proteinuric patients. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Apr;11(4):700-7. PubMed PMID: 10752529. eng.
  91. Negi VS, Aggarwal A, Dayal R, Naik S, Misra R. Complement degradation product C3d in urine: marker of lupus nephritis. *J Rheumatol.* 2000 Feb;27(2):380-3. PubMed PMID: 10685801. eng.
  92. Cumming AD, Thomson D, Davidson AM, Robson JS. Significance of urinary C3 excretion in glomerulonephritis. *J Clin Pathol.* 1976 Jul;29(7):601-7. PubMed PMID: 789406. Pubmed Central PMCID: PMC476125. eng.
  93. Klajman A, Avital A, Myers BD. Renal handling of the third (C3) and fourth (C4) components of the complement system in the nephrotic syndrome. *Nephron.* 1976;16(5):333-43. PubMed PMID: 1264308. eng.
  94. Putaala H, Soininen R, Kilpelainen P, Wartiovaara J, Tryggvason K. The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Human molecular genetics.* 2001 Jan 1;10(1):1-8. PubMed PMID: 11136707.
  95. Gloy J, Reitingner S, Fischer KG, Schreiber R, Boucherot A, Kunzelmann K, *et al.* Amino acid transport in podocytes. *American journal of physiology Renal physiology.* 2000 Jun;278(6):F999-F1005. PubMed PMID: 10836988.
  96. Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Kruger M, Reiser J, Kriz W. Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *The Journal of cell biology.* 1997 Oct 6;139(1):193-204. PubMed PMID: 9314539. Pubmed Central PMCID: 2139823.
  97. Saurus P, Kuusela S, Lehtonen E, Hyvonen ME, Ristola M, Fogarty CL, *et al.* Podocyte apoptosis is prevented by blocking the Toll-like receptor pathway. *Cell death & disease.* 2015 May 7;6:e1752. PubMed PMID: 25950482. Pubmed Central PMCID: 4669704.



98. Reiser J, von Gersdorff G, Loos M, Oh J, Asanuma K, Giardino L, *et al.* Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 2004 May;113(10):1390-7. PubMed PMID: 15146236. Pubmed Central PMCID: 406528.
99. Machida H, Ito S, Hirose T, Takeshita F, Oshiro H, Nakamura T, *et al.* Expression of Toll-like receptor 9 in renal podocytes in childhood-onset active and inactive lupus nephritis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2010 Aug;25(8):2530-537. PubMed PMID: 20181802.
100. Sheng X, Zuo X, Liu X, Zhou Y, Sun X. Crosstalk between TLR4 and Notch1 signaling in the IgA nephropathy during inflammatory response. *International urology and nephrology*. 2018 Apr;50(4):779-85. PubMed PMID: 29230705.
101. Banas MC, Banas B, Hudkins KL, Wietecha TA, Iyoda M, Bock E, *et al.* TLR4 links podocytes with the innate immune system to mediate glomerular injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2008 Apr;19(4):704-13. PubMed PMID: 18256364. Pubmed Central PMCID: 2390962.
102. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. 2010 May;11(5):373-84. PubMed PMID: 20404851.
103. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews Immunology*. 2004 Jul;4(7):499-511. PubMed PMID: 15229469.
104. Khullar B, Balyan R, Oswal N, Jain N, Sharma A, Abdin MZ, *et al.* Interaction of CD80 with Neph1: a potential mechanism of podocyte injury. *Clinical and experimental nephrology*. 2017 Oct 11. PubMed PMID: 29022109.
105. Tang Z, Lu B, Hatch E, Sacks SH, Sheerin NS. C3a mediates epithelial-to-mesenchymal transition in proteinuric nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Mar;20(3):593-603. PubMed PMID: 19158354. Pubmed Central PMCID: PMC2653680. eng.
106. Kolev M, Le Friec G, Kemper C. Complement--tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol*. 2014 Dec;14(12):811-20. PubMed PMID: 25394942. eng.
107. Locatelli M, Buelli S, Pezzotta A, Corna D, Perico L, Tomasoni S, *et al.* Shiga toxin promotes podocyte injury in experimental hemolytic uremic syndrome via activation of the alternative pathway of complement. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2014 Aug;25(8):1786-98. PubMed PMID: 24578132. Pubmed Central PMCID: 4116050.
108. Cao Y, Liu X, Li Y, Lu Y, Zhong H, Jiang W, *et al.* Cathepsin L activity correlates with proteinuria in chronic kidney disease in humans. *International urology and nephrology*. 2017 Aug;49(8):1409-17. PubMed PMID: 28534128.
109. Zipfel PF, Heinen S, Józsi M, Skerka C. Complement and diseases: defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases. *Mol Immunol*. 2006 Jan;43(1-2):97-106. PubMed PMID: 16026839. eng.

## 8 Zusammenfassung

Eine unregulierte Aktivierung des Komplement-Systems kann zur Entstehung einer Komplement-assoziierten Nierenerkrankung, wie zum Beispiel einer membranösen Glomerulonephritis oder einem atypischen hämolytisch-urämischen Syndrom, führen. Obwohl Komplement-Komponenten zum Großteil in der Leber gebildet werden, scheint auch die lokale Bildung von Komplement-Bestandteilen für zahlreiche Erkrankungen von Bedeutung zu sein. Podozyten stellen einen wichtigen Anteil der glomerulären Filtrationsbarriere dar und werden häufig bereits in frühen Phasen einer Komplement-assoziierten Glomerulopathie geschädigt.

Daher war das Ziel dieser Arbeit, die Rolle des Podozyten im Rahmen von Komplement-assoziierten Glomerulopathien zu untersuchen. Ich wollte wissen, wie Podozyten von einer lokalen Komplement-Aktivierung geschädigt werden und ob sie in der Lage sind, eine lokale Komplement-Reaktion zu beeinflussen.

Mit Hilfe eines *in vitro* Komplement-Aktivierungsmodells wurde die Auswirkungen einer Komplementaktivierung auf humane kultivierte Podozyten evaluiert. Außerdem wurde die Zelllinie auf ihre Fähigkeit untersucht aktivierende und inhibierende Komplement-Komponenten zu exprimieren und zu sezernieren. In Proteinurie-Tiermodellen wurde die Regulation der zentralen aktivierenden Komplement-Komponente C3 und des Regulators CFH geprüft.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Komplementaktivierung auf der Oberfläche der Zellen zu einer Zellschädigung im Sinne einer LDH-Freisetzung und einem Umbau des Aktin-Zytoskeletts führte. Die kultivierten Podozyten waren aber auch in der Lage verschiedenen aktivierende Komplement-Komponenten (z.B. C3) und -Regulatoren (z.B. CFH) auszubilden und zu sezernieren. Sowohl C3, als auch CFH verfügten über eine funktionelle Aktivität und die Sekretion folgte einem aktiven Exozytose-Mechanismus. In Nieren gesunder Mäuse gelang ebenfalls der Nachweis der Produktion dieser beiden Komponenten in den Podozyten mit Hilfe einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung. Nach spezifischer Podozyten-Schädigung im Tiermodell zeigte sich eine vermehrte glomeruläre Expression von C3 und CFH.

Insgesamt konnte belegt werden, dass Podozyten *in vitro* in der Lage sind, eine Komplement-Reaktion zu beeinflussen, und es auch *in vivo* nach einer Podozyten-Schädigung zu einer vermehrten Expression der Komponenten C3 und CFH kommt. Es wäre daher durchaus denkbar, dass sich Podozyten an einer lokalen Komplement-Reaktion beteiligen, und zusätzlich zur Filtrationsfunktion andere Aufgaben haben können. Um diese Hypothese bestätigen zu können, fehlen aber aktuell noch weitere funktionelle *in vivo* Daten.

## 9 Summary

Unregulated complement activation can cause complement associated kidney diseases, for example membranous nephropathy or atypical hemolytic uremic syndrome. Complement components usually are built in the liver. Nevertheless also local complement production seems to be important for several diseases. Podocytes are an important part of the glomerular filtration barrier. They are often damaged in early phases of complement associated glomerulopathies.

The aim of this PhD thesis was to evaluate the role of podocytes within complement-associated glomerulopathies. We were interested in podocytes' damage induced by complement activation and the potential of podocytes to influence local complement activation.

In an *in vitro* model, we analyzed the consequences of complement activation for cultured human podocytes. We also characterized the podocyte cell line for its ability to express and secrete activating or regulating complement factors. In animal proteinuria models we investigated the expression of the central complement component C3 and central regulator CFH.

We could show that complement activation induced cell damage, marked by LDH release und actin remodeling. Cultivated podocytes were able to express and secrete several complement components (e.g. C3) and complement regulators (amongst others CFH). C3 and CFH were functionally active and the secretion followed an active exocytosis pathway. In the kidneys of healthy mice both components could be detected in podocytes, using a fluorescence *in situ* hybridization. After specific podocyte damage expression of glomerular C3 and CFH increased.

In summary we could prove that cultured podocytes were able to influence complement activation. *In vivo* podocyte damage caused an increased expression of C3 and CFH. Therefore it is absolutely conceivable that podocyte activate or regulate local complement activation. So podocytes may have other tasks beyond their filtration function. To prove this hypothesis more functional *in vivo* data are needed.

## 10 Danksagung

Seit meinem Beginn im Forschungslabor der Kinderklinik im Juni 2011 liegen zahlreiche arbeitsreiche, anstrengende und aufreibende Wochen und Monate hinter mir. Der Spagat zwischen Klinik, Forschung und auch meinen privaten Interessen war nicht immer leicht zu meistern. Er hat mich häufig an den Rand der Überforderung gebracht und gelegentlich das Gefühl verursacht, allen Bereichen nicht so zu genügen, wie meine Ansprüche es vorgesehen hätten. Letzten Endes war es aber genau die Kombination der beiden Anteile meines Berufslebens und die Intensität meines Privatlebens, die mich immer durchhalten ließ. Und eigentlich bestand nur selten ernsthafter Zweifel daran, das Richtige zu tun. Daher blicke ich mit Stolz auf diese Arbeit und auf die vergangenen Jahre zurück.

Ich möchte mich an dieser Stelle für alle Hilfe und Unterstützung bedanken, die mir sowohl beruflich, als auch privat zu Teil wurde. Ein ganz besonderer Dank gilt dabei meinem Betreuer, Mentor und Oberarzt Jun Oh, der mich in zweifelnden Momenten wieder aufbaute (manchmal ohne es zu merken) und mich in starken Momenten noch mehr bestärkte. Ich konnte mich, trotz seines überbuchten Terminkalenders immer darauf verlassen, dass er dennoch Zeit für mich fand, und auch die knappsten Deadlines mit mir einhielt. Und ich wusste immer, dass er beschützend vor mir und unterstützend hinter mir steht. Ebenso immer Zeit fanden Gabriele Rune und Ulf Panzer, die mir bei dieser Arbeit und darüber hinaus beratend zur Seite standen. Es macht einfach eine große Freude, mit so guten Wissenschaftlern und tollen Menschen zusammen zu arbeiten. Dies gilt auch für Catherine Meyer-Schwesinger, die mir wissenschaftlich unter die Arme gegriffen hat, die immer ein offenes Ohr für berufliche und private Sorgen hatte und von der ich extrem viel gelernt habe. Ich bedanke mich bei der Arbeitsgruppe von Christoph Licht für die Unterstützung bei der Entwicklung des Aktivierungsmodells und bei Christoph selbst, für seinen beratenden Beistand. Und ich möchte mich an diesem Punkt auch bei den Kollegen in der Klinik und im Labor bedanken, die meine jeweiligen Abwesenheiten kompensieren mussten.

Die größte Dankbarkeit empfinde ich jedoch gegenüber meiner Familie. Ich bin so glücklich meine Eltern und meine Schwester zu haben. Sie haben mich nicht nur finanziell, sondern vor allem menschlich immer unterstützt. Auch, wenn meine Entscheidungen nicht immer die einfachsten und leichtesten waren, so wusste ich sie immer beruhigend hinter mir. Zuletzt bedanke ich mich bei meinem Mann, besten Freund und Berater Malte, der zu oft meine berufliche Belastung und den zeitlichen Aufwand, den ich betrieben habe, zu spüren bekam. Er hat dies –wie so vieles– mit einem Lächeln und einer Engels-Geduld getragen, wofür ich ihn unendlich bewundere.

# 11 Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Dr. Anne Katrin Mühlig (geb. Dettmar)  
Anschrift Puckholm 15, 22457 Hamburg  
Telefon 0176/30363410  
E-mail a.dettmar@uke.de  
Geboren 27.10.1981 in Leipzig  
Familienstand verheiratet, keine Kinder  
Staatsangehörigkeit Deutsch

## Schulische und universitäre Ausbildung

09/1992- 06/2001 Besuch des Ignaz- Taschner- Gymnasiums, Dachau,  
Abschluss: Abitur (Note 1,6)  
10/2001- 09/2007 Studium der Humanmedizin und Dissertation an der Medizinischen Uni-  
versität Innsbruck, Promotion 1.10.07

## Klinische Ausbildung

01.10.07- 31.05.11 Assistenzärztin am Department für Kinder- und Jugendheilkunde, Uni-  
versitätsklinikum Innsbruck  
seit 01.06.11 Assistenzärztin Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin,  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
2.12.2015 Prüfung zum Facharzt für Kinder- und Jugendheilkunde  
Seit 1.8.16 Weiterbildung für pädiatrische Nephrologie

## Wissenschaftliche Tätigkeiten

01/2006- 10/2007 Dissertation Department für Kinder- und Jugendheilkunde, Innsbruck:  
„Koagulabilitätsveränderungen nach orthopädischen Operationen“

Seit 10/2007	Durchführung des Projektes „Einfluss von Shigatoxin auf humane Podozyten“, Sektion für Physiologie und Hygiene, Innsbruck
02/2008	Forschungsaufenthalt in Bristol, GB, Methodik und Umgang mit humanen Podozyten (bei Prof. M. Saleem)
06/2011-04/2014	Fortsetzung des Projektes „Einfluss von Shigatoxin und Komplementaktivierung auf humane Podozyten“ am UKE (AG Oh)
Seit 08/2014	Beginn MD/PhD mit dem Projekt „Expression und Sekretion von Komplementfaktoren durch humane Podozyten“
Seit 08/2014	Vollzeit oder Teilzeit- Forschungsfreistellung und stellvertretende Laborleitung des Labors der pädiatrischen Nephrologie (Ag Oh)
04-05/2015	Forschungsaufenthalt „Hospital for Sick Children“, Toronto (AG Licht)
Seit 01/2017	Etablierung des Registers „membranöse Glomerulonephritis im Kindesalter“ (Zusammenarbeit mit Prof. R. Stahl, SFB1192)

#### **Wissenschaftliche Auszeichnungen, Stipendien und eingeworbene Drittmittel**

01.07.2015	Unterstützung des Forschungsprojektes “Produktion von Komplement C3 in humanen Podozyten, Nachweis mit Fluoreszenz in situ Hybridisierung”
01.04.2015	Reisestipendium der Fritz Thyssen Stiftung, Forschungsaufenthalt Toronto, Kanada
01.01.2015	Stipendium „Freies Forschungsjahr für exzellente Nachwuchswissenschaftler“ der Universität Hamburg
01.01.2015	Unterstützung des Projekts: “Expression von Komplementfaktoren in Podozyten” durch die Peterstiftung
01.07.2014	Unterstützung einer Forschungsfreistellung für 6 Monate durch die Stiftung: “Hamburg macht Kinder gesund, e.V.”
07.12.2013	1. Preis des „Novartis Research Day Pädiatrie“, Nürnberg
23.03.2012	„Else-Kröner-Fresenius-Preis“ der Gesellschaft für pädiatrische Nephrologie, Jahrestagung 2012 in Heidelberg

## 12 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aktivierungswege des Komplement-Systems ...	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Funktion von Komplement-Faktor H (CFH) und Faktor I (CFI).....	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Glomerulums und Entstehung einer Proteinurie.....	11
Abbildung 4: Eine Komplement-Aktivierung auf kultivierten humanen Podozyten führte zu einer Ablagerung von Komplementaktivierungs-Produkten .....	42
Abbildung 5: Auswirkungen einer Komplement-Aktivierung auf kultivierte Podozyten. ....	44
Abbildung 6: Humane kultivierte Podozyten exprimierten verschiedene inhibierende Komplement-Faktoren auf mRNA- und Protein-Ebene, Komplement-Faktor H (CFH) wurde in den Überstand sezerniert .....	46
Abbildung 7: Die Expression für CFH war zellspezifisch und unterschied sich zwischen Podozyten und Blut-Endothelzellen. Von Podozyten sezerniertes CFH war funktionell aktiv	48
Abbildung 8: Humane kultivierte Podozyten exprimierten verschiedene aktivierende Komplement-Faktoren auf mRNA-Ebene .....	49
Abbildung 9: Kultivierte humane Podozyten exprimierten die aktivierenden Komplement-Komponenten C2, C3 und C5.....	50
Abbildung 10: Kultivierte humane Podozyten sezernierten Komplement-Komponenten in den Überstand.....	51
Abbildung 11: Die Produktion und Sekretion von Komplement-Faktoren war durch Interferon Gamma (IFN $\gamma$ ) induzierbar .....	54
Abbildung 12: Abhängigkeit der Sekretion von CFH und C3 vom Golgi-Apparat .....	56
Abbildung 13: Die Speicherung und der Transport der Komplement-Komponente C3 im Podozyten erfolgte in Neuronen-ähnlichen Vesikeln.....	58
Abbildung 14: Podozyten exprimierten den Komplement-Faktor C3 und den Komplement-Inhibitor CFH auf mRNA-Ebene <i>in vivo</i> .....	59
Abbildung 15: Erhöhte Expression von glomerulärer mRNA für C3 und CFH in der Puromycin-Aminonukleosid-induzierten Nephropathie (PAN) in der Ratte.....	61
Abbildung 16: Expression von CFH in der Adriamycin (ADR)-induzierten Nephropathie (ADR) der Maus .....	64

## 13 Abkürzungsverzeichnis

ADR	Adriamycin = Doxorubicin
aHUS	atypisches hämolytisch-urämisches Syndrom
AL	Alabama
AP	alternative pathway
AUT	Austria
BEL	Belgien
BFA	Brefeldin A
BOEC	Blood outgrowth endothelial cell
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
CA	California
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary Desoxyribonucleic acid
CFH	Komplement-Faktor H
CFI	Komplement-Faktor I
CH	Schweiz
Cox	Cytochrom C Oxidase
CR	Komplement-Regulator
CR1	Complement Regulator 1
d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethyl Sulfoxide



DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Nukleotide
DTT	Dithiothreitol,
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure,
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting,
FBS	fetal bovine serum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GER	Germany
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
huPo	humane Podozyten
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
IF	Immunfluoreszenz
iFD	integrierte Fluoreszenzdichte
IFN $\gamma$	Interferon Gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Illinois
IL	Interleukin

ITS	insulin, transferrin, selenium
Ktrl.	Kontrolle
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MA	Massachusetts
MCP	Membrane-Cofactor-Protein
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MGN	Membranöse Glomerulonephritis
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPGN	Membrano-proloferative Glomerulonephritis
mRNA	messenger Ribonucleic acid
MS	Missouri
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NaF	Natriumfluorid
NaVO <sub>3</sub>	Natriumvanadat
NB	Nebraska
NB	Nebraska
NHS	normales Humanserum
NJ	New Jersey
OH	Ohio
PA	Pennsylvania
PA	Puromycin Amino Nukleosid

PAN	Puromycin assoziierte Nephropathie
PBS	phosphat buffered saline
PBST	phosphat buffered saline + tween
PCR	Polymerase chain reaction
PDI	Protein-Disulfid- Isomerase
PFA	Paraformaldehyd
Pos.-Ktrl	Positiv-Kontrolle
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
r	Recombinant
RNA	Ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
-RT	Negativkontrolle PCR (ohne reverse Transkriptase)
rtPCR	Reverse Transkriptase polymerase chain reaction
SDS	Natriumlaurylsulfat
SFM	Serum-freies Medium
TAE	Tris Acetat EDTA
TCC	Terminaler Komplement-Komplex
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor-Necrose Factor
T-PER	tissue extraction buffer
Tris	Trisaminoethan
TX	Texas

UK	United Kingdom
USA	United states of America
VEGF	vascular endothelial growth Factor
WA	Washington
z.B.	zum Beispiel

## 14 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe 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.

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

Unterschrift: .....