

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Immunologie

Direktor Prof. Dr. med. Marcus Altfeld

Der Nachweis des P2X7-Rezeptors im murinen Podozyten und seine Rolle in der anti-Podozyten Nephritis

Dissertation

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

vorgelegt von:

Jan Hendrik Knop aus Hamburg

Hamburg 2020

Datum der Disputation: 25.05.2020

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:
Schwesinger Prof. Dr. Catherine Meyer-

Prüfungsausschuss, Prüfer/in: Prof. Dr. Thomas Braulke

Prüfungsausschuss, stellv. Mitglied: PD Dr. Jan-Erik Turner

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. P2X7	8
1.1.1. P2X7 als Protein	8
1.1.2. Immunologische Reaktionen durch P2X7-Aktivierung	9
1.1.3. Nicht-immunologische Reaktionen durch P2X7-Aktivierung	10
1.1.4. Rolle von P2X7 in Krankheit und Niere	10
1.1.5. P2Y-Rezeptoren	11
1.2. Variable domain of the heavy-chain of heavy-chain only antibodies	11
1.2.1. Charakteristika von VHH	11
1.2.2. Vorteile der VHHs	12
1.2.3. VHHs mit erhöhter Halbwertszeit (HLE)	13
1.2.4. P2X7 Modulatoren	13
1.3. Die Niere, das Glomerulum und der Podozyt	13
1.3.1. Die Niere	13
1.3.2. Das Glomerulum	14
1.3.3. Der Podozyt	15
1.3.4. Podozytenzelllinien	16
1.3.5. ADAM17, EGF-R und ERK in kultivierten Podozyten	17
1.4. Glomeruläre Erkrankungen der Niere	17
1.4.1. Glomerulonephritis	17
1.4.2. Die membranöse Glomerulonephritis	18
1.4.3. Die Anti-Podozyten Nephritis	18
1.5. Dissertationsergebnisse von Anna Hammel	19
2. Material und Methoden	21
2.1. Material	21

2.2. Zellbiologische Methoden	28
2.2.1. Ernte von adhärenenten eukaryotischen Zellen	28
2.2.2. Kultivierung eukaryotischer Zellen	29
2.2.3. Stimulation kultivierter Podozyten	29
2.2.4. Herstellung von Milzzell-Suspensionen.....	30
2.2.5. Live-Cell Imaging des Kalzium-Einstroms	30
2.2.6. Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen.....	31
2.2.7. Nanobody-Fc Fusionsprotein Bindungs-Assay.....	31
2.2.8. Nanobody-Fc Fusionsprotein Funktionsassay	32
2.3. Immunologische und Proteinbiochemische Methoden	32
2.3.1. Immunopräzipitation mit Aminolink Matrix	32
2.3.2. Durchflußzytometrie (FACS)	33
2.3.3. Histologische Färbungen.....	34
2.3.4. Messung der IL-6/MCP-1 Konzentration	36
2.3.5. Messung der Albuminurie.....	36
2.3.6. Westernblot.....	37
2.4. Tierexperimentelle Methoden	40
2.4.1. Allgemeine Maus-Haltung	40
2.4.2. Organentnahme	40
2.4.3. Isolation von Glomeruli aus der Niere mittels Dyna-Beads	41
2.4.4. Herstellung von Gefrierschnitten	43
2.4.5. Anti-Podozyten Nephritis Mausstaffel	43
3. Ergebnisse.....	45
3.1. Expression von P2X7 in der gesunden und kranken Niere	45
3.1.1. P2X7 wird in der Niere exprimiert.....	45
3.1.2. P2X7 kann histologisch im Glomerulum angefärbt werden.....	46
3.1.3. P2X7 Expression ist glomerulär im APN-Modell erhöht	50

3.2. Expression und Funktion von P2X7 in kultivierten Podozyten.....	52
3.2.1. P2X7 wird von kultivierten Podozyten exprimiert	52
3.2.2. P2X7 kann aus kultivierten Podozyten immunpräzipitiert werden ...	53
3.2.3. Podozyten reagieren auf ATP Stimulation mit Kalzium-Einstrom	55
3.2.4. Podozyten reagieren auf ATP Stimulation mit ERK1/2 Phosphorylierung	57
3.3. P2X7 als therapeutisches Ziel in der Anti-Podozyten Nephritis (APN)	59
3.3.1. Nanobody-Fc Fusionsproteine binden an mP2X7 in vitro	60
3.3.2. 13A7 und 14D5 Nanobodies beeinflussen die P2X7-Aktivität in vitro	61
3.3.3. P2X7 Hemmung verringert die Albuminurie in der APN	63
3.3.4. P2X7 Hemmung verbessert die Nierenfunktion in der APN	65
3.3.5. Zytokinproduktion bei P2X7 Hemmung	66
3.3.6. P2X7 Hemmung verringert den histologischen Schaden in der APN	67
4. Diskussion	72
4.1. Die P2X7-Expression in der Niere	72
4.1.1. P2X7 wird in der Mausniere exprimiert.....	72
4.1.2. Glomeruläre P2X7 Expression steigt in der APN an	73
4.1.3. Nicht nur Podozyten exprimieren P2X7	74
4.2. P2X7 im kultivierten Podozyten	75
4.2.1. P2X7 wird von kultivierten Podozyten exprimiert	75
4.2.2. P2X7 in kultivierten Podozyten ist funktionell aktiv.....	76
4.2.3. Effekt von P2X7 Aktivierung im Podozyten	78
4.3. P2X7-Modulation in der anti-Podozyten Nephritis	79
4.3.1. P2X7 Modulation beeinflusst die Albuminurie	79
4.3.2. P2X7 Modulation beeinflusst die Zytokine im Serum und Urin	80
4.3.3. P2X7 Modulation verringert den podozytären Schaden	80
5. Zusammenfassung	82

6. Anhang	84
6.1. Abkürzungen.....	84
6.2. Literatur.....	86
6.3. Danksagungen.....	94

Titel

Der Nachweis des P2X7-Rezeptors im murinen Podozyten und seine Rolle in der anti-Podozyten Nephritis

Arbeitshypothese

P2X7 ist ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal, welcher von einem breiten Spektrum an Immunzellen exprimiert wird, einschließlich Makrophagen und Lymphozyten (**Burnstock 2009**). Eine Aktivierung von P2X7 durch ATP kann in Zellen durch Porenbildung zum Zelltod führen (**Solle et al. 2001**). Ebenso kann eine Aktivierung von P2X7 mittels ATP, welches aus zerstörtem Gewebe stammt, eine Kalzium-Einstrom vermittelte Zytokinfreisetzung auslösen und so die immunvermittelte Schädigung in Geweben verstärken (**Rawat et al. 2010**). In der Niere wurde bereits eine erhöhte Expression von P2X7 mRNA und Protein sowohl in Mesangialzellen als auch in Makrophagen, welche die Glomeruli in einem Tiermodell der Antikörper-medierte Nephritis infiltrieren, nachgewiesen (**Taylor et al. 2009**). Kultivierte Podozyten hingegen exprimieren mRNA von P2X7 und reagieren auf Benzoyl ATP, einem selektiven P2X7 Agonisten (**Fischer et al. 2001**). Sowohl ein P2X7 knock-out Status als auch eine Inhibition von P2X7 durch anti-P2X7 Nanobody-Alb Konstrukte konnten im Tiermodell der Antikörper-medierte Anti-Podozyten Nephritis den Krankheitsverlauf mildern (**Anna Hammel 2013**).

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von P2X7 im Podozyten auf Zellkulturebene sowie in histologischen Präparaten von Mausnieren nachzuweisen. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob P2X7 in kultivierten Mauspodozyten funktionell aktiv ist. Im Tiermodell soll darüber hinausgehend untersucht werden ob eine Modulation den Krankheitsverlauf positiv beeinflusst.

Fragestellung / Ziele

- Wo wird P2X7 in der Niere exprimiert?
- Ist P2X7 in kultivierten Zellen funktionell aktiv?
- Stellt P2X7 ein mögliches therapeutisches Ziel in der Antikörper medierte Glomerulonephritis dar?

1. Einleitung

1.1. P2X7

1.1.1. P2X7 als Protein

P2X7 gehört zu der Familien der P2X-Rezeptoren (P2X₁₋₇), ist ein purinerge homotrimerer ligandengesteuerter Kationen-Kanal, bei dem jedes Monomer eine Größe von ca. 72 kDa besitzt und aus 595 Aminosäuren besteht. P2X7 wird hauptsächlich von Immunzellen exprimiert, vor allem in Lymphozyten und Makrophagen (**Burnstock 2009**). Weiterhin wird P2X7 von nicht-immunologischen Zellen exprimiert, wie Pneumozyten (**Amarjit Mishra et al. 2011**) und erregbaren Zellen wie Muskelzellen (**Rawat et al. 2010**) und Neuronen (**Manago et al. 2005**). Die Aktivierung von P2X7 kann einerseits durch Vorhandensein des Purins ATP im umgebenen Milieu stattfinden oder andererseits über ADP-Ribosylierung mittels NAD durch die ADP-Ribosyltransferase ART 2 laufen, ein Ektoenzym der Maus-Lymphozyten (**Seman et al. 2003**). Eine Aktivierung von P2X7 führt zum Einstrom von Kalzium und Natrium in die Zelle, zu einem Ausstrom von Kalium aus der Zelle, sowie zum Anstoß von Signalkaskaden die auf immunologischer und auch nicht immunologischer Ebene eine wichtige Rolle spielen.

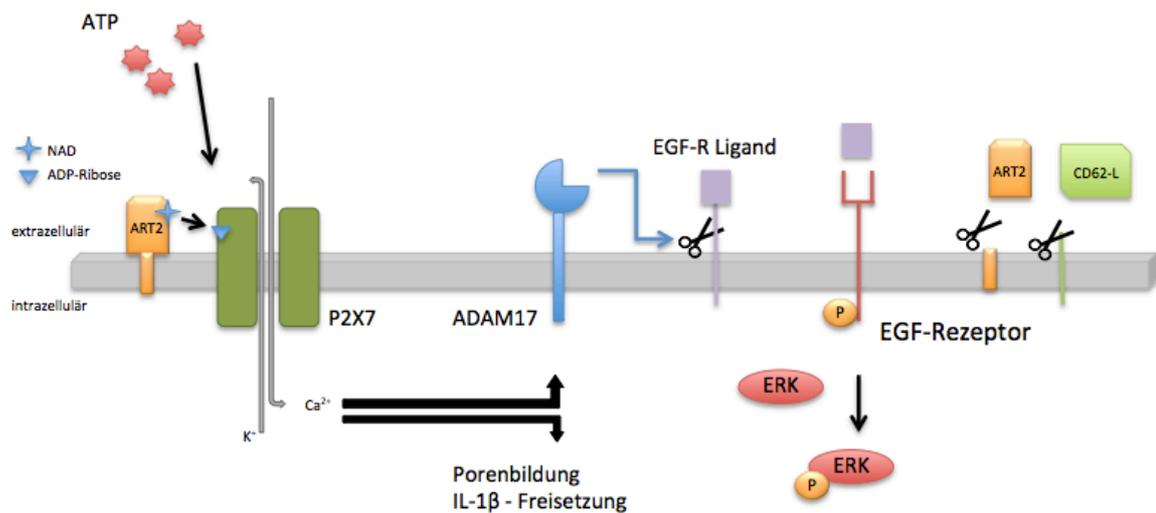


Abb. 1.1.1. Aktivierung von P2X7. P2X7 wird durch ATP in der Umgebung oder durch NAD-Ribosylierung aktiviert und führt zum Einstrom von Kalzium und Natrium sowie zum Ausstrom von Kalium. Über die gefolgte Aktivierung der ADAM 17 (TACE) werden Oberflächenproteine wie ART2, CD62L und einem EGF-R Ligand von der Zelloberfläche abgespalten. Der EGF-R Ligand aktiviert den EGF-Rezeptor, was zur Phosphorylierung von ERK führt.

Eine Signal-Kaskade von Mellitin, einem Bestandteil von Bienengift, die über die Aktivierung von P2X7 gestartet wird, und eine Phosphorylierung von ERK und dem EGF-Rezeptor zur Folge hat, wird in Keratinozyten der Maus diskutiert (**Sommer et al. 2012**).

1.1.2. Immunologische Reaktionen durch P2X7-Aktivierung

Auf T-Zellen führt eine P2X7 Stimulation zu der Aktivierung der Metallo-Protease ADAM17 (TACE) (**Seman et al. 2003**) was an der Zellmembran von Lymphozyten zur Abspaltung von vielen Oberflächenproteinen wie z.B. CD62L, CD27 oder ART2 führt. ADAM17 spaltet darüber hinaus auch proinflammatorisches TNF- α in die aktive Form und setzt dieses durch Abspaltung von der Lymphozyten- und Makrophagen-Membran frei. Abgespaltenes TNF- α nimmt dann an der Perpetuierung des Entzündungsgeschehen teil. In Makrophagen und Monozyten führt eine P2X7 Aktivierung über die Zusammensetzung des NALP-3 Inflammasom-Komplexes zur Prozessierung und Freisetzung von IL-1 β . P2X7 kann auch Poren in der Zellmembran bilden wodurch es zum Ausstrom von ATP oder anderen Nukleotiden kommt, welche als Gefahrensignale für andere Zellen dienen. Eine dauerhafte Aktivierung von P2X7 führt durch Bildung von Pannexin Kanälen und durch

Zerstörung der Membran-Integrität zum Zelltod von zum Beispiel Lymphozyten (**Solle et al. 2001**). Populationen regulatorischer T-Zellen reagieren sehr empfindlich auf eine Aktivierung von P2X7 durch NAD⁺ (**Hubert et al. 2010**) und gehen bei Aktivierung zugrunde. So kann eine Immunreaktion durch die Veränderung der Homeostase einzelner Zelllinien in verschiedene Bahnen gelenkt werden.

1.1.3. Nicht-immunologische Reaktionen durch P2X7-Aktivierung

Neben den immunologischen Effekten einer P2X7-Aktivierung wurde auch von nicht-immunologischen Effekten berichtet. So führt eine Aktivierung von P2X7 durch mechanischen Zug auf AEC Typ I (Alveoläre endotheliale Zellen Typ I) Zellen zur Freisetzung von ATP und somit zur parakrinen Stimulation von AEC Typ II Zellen, welche daraufhin Surfactant sezernieren (**Mishra et al. 2011**). Eine andere P2X7 abhängige nicht-immunologische Reaktion ist ein ATP getriggelter Strom in Neuronen, welcher zu einer Freisetzung von Neurotransmittern führen kann. Somit spielt P2X7 ebenfalls eine Rolle in der neurologischen Kommunikation (**Manago et al. 2005**).

1.1.4. Rolle von P2X7 in Krankheit und Niere

P2X7 spielt eine wichtige pro-inflammatorische Rolle in entzündlichen Erkrankungen. So konnte im Tier-Modell der multiplen Sklerose EAE (**Sharp et al. 2008**) oder im nephrotoxischen Nephritis Modell der Maus (NTN) (**Taylor et al. 2009**) gezeigt werden, dass P2X7-defiziente Mäuse einen abgeschwächten Krankheitsverlauf zeigen. Abseits von Inflammation scheinen P2X-Rezeptoren auch regulatorische Funktionen in der Niere zu übernehmen. In *in vivo* Studien, bei denen Kaninchen α,β -methylene ATP (P2X-Rezeptoragonist) injiziert wurde, konnte eine Reduktion der Nierendurchblutung festgestellt werden (**Eppel et al. 2006**), was auf eine Rolle von P2X-Rezeptoren bei der Regulierung der Nierendurchblutung deutet. In Modellen der Hypertension in "Dahl salt-sensitive" Ratten konnte gezeigt werden, dass nach Injektion von P2X7-Antagonisten die Ausprägung der Hypertension, des Nierenschadens sowie die Infiltration von inflammatorischen Zellen verringert war (**Ji et al. 2012**). In Podozyten wurde die mRNA Produktion von P2X7 (**Fischer et al. 2001, Hou et al. 2018**) und in Mesangialzellen des Glomerulums P2X7 als mRNA mittels RT-PCR und als Protein mittels immunfluoreszenz nachgewiesen (**Harada et al. 2000**). Die normalerweise sehr geringe P2X7 Expression im humanen Nierengewebe ist in der humanen Glomerulonephritis (**Turner et al. 2007**) im

Glomerulum hochreguliert. Diese Erkenntnisse deuten auf eine funktionelle Rolle von P2X7 in der Niere und im Podozyten hin, welche bei pathophysiologischen Vorgängen von Bedeutung sein könnte.

1.1.5. P2Y-Rezeptoren

P2Y-Rezeptoren gehören ähnlich wie P2X7 zu der Gruppe der P2-Rezeptoren. Anders als P2X7, der einen Liganden-gesteuerten Ionen-Kanal ausbildet, sind P2Y-Rezeptoren G-Protein gekoppelte Rezeptoren (**Lustig et al. 1993, Webb et al. 1993**). P2Y-Rezeptoren bilden eine Sub-Familie, bei der beim Menschen 12 Subtypen bekannt sind (**Abbrachio et al. 2006, Harden et al. 2010**) und jeweils durch unterschiedliche Agonisten aktiviert werden können. Darunter befinden sich ebenfalls ATP und UDP. Einige dieser P2Y-Rezeptoren, wie zum Beispiel P2Y₁₄, reagieren auf ihren Agonist UDP mit einer Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ (**Skelton et al. 2003**). Der in dieser Arbeit verwendete Inhibitor 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB, Sigma) inhibiert die IP₃ vermittelte Freisetzung von intrazellulären Kalzium-Speichern. Während geringe Dosen von 2APB zur Freisetzung von Ca²⁺ führt, wird diese Freisetzung ab einer IC₅₀ Konzentration von 42 µM für 100 nM IP₃ verhindert (**Maruyama et al. 1997**). Somit kann der Einfluss von P2Y unter Verwendung des Inhibitors neutralisiert werden und der Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ z.B. durch P2X7 untersucht werden.

1.2. Variable domain of the heavy-chain of heavy-chain only antibody

1.2.1. Charakteristika von VHH

Die Abkürzung VHH steht für "Variable domain of the Heavy-chain of Heavy-chain only antibody" (hcAbs) welche von Kameliden wie Lamas gebildet werden. Im Gegensatz zum Menschen sind Lamas in der Lage zwei verschiedene Antikörper-Typen zu bilden. Neben den konventionellen Antikörpern, die aus zwei schweren und zwei leichten Ketten bestehen und auch vom Menschen gebildet werden, bilden Lamas eine Sonderform aus, die aus nur zwei schweren Ketten besteht.

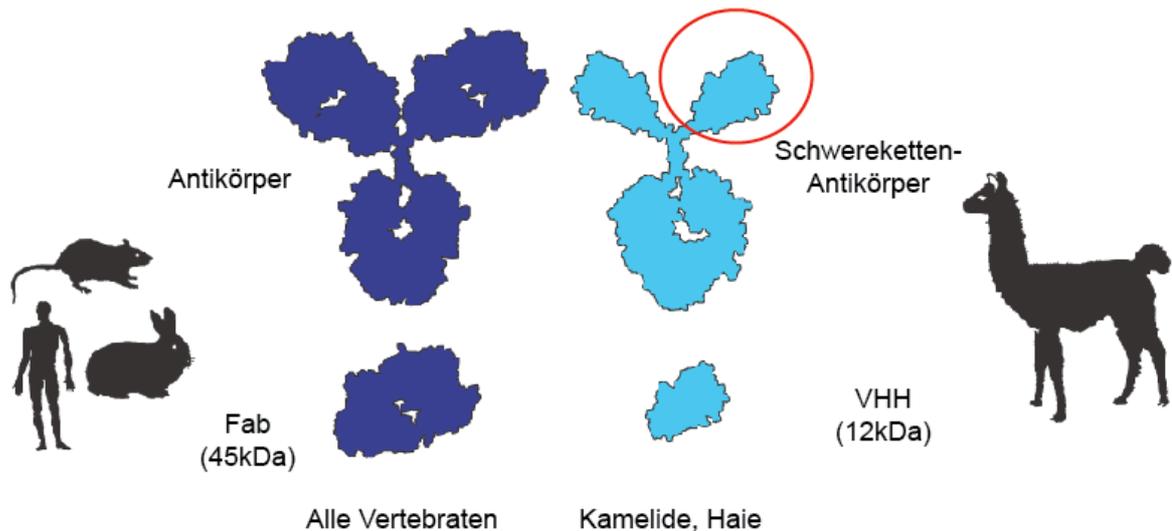


Abb. 1.2.1. Vergleich konventioneller Antikörper mit Schwereketten-Antikörper. Vertebraten besitzen konventionellen Antikörper, die variable Domäne ist hierbei die Fab Region mit einer Größe von 45 kDa. Lamas besitzen zusätzlich Schwereketten-Antikörper, denen die leichte Kette fehlt. Die variable Domäne (VHH) ist nur 12 kDa groß. *Bild modifiziert aus Progressreport Stephan Menzel Kiel.*

Die VHHs sind der variable Teil dieser schweren Ketten. **(Abb. 1.2.1.)** Eigenständig, als Monomer geklont, gehören sie zu der Gruppe der “single domain antibody” (sdAbs).

1.2.2. Vorteile der VHHs

Konventionelle Antikörper, bei denen die Antigen bindende Stelle aus dem variablen Teil der leichten und schweren Kette zusammengesetzt ist, können nur plane Epitope binden. Schwereketten-Antikörper hingegen binden nur mit dem variablen Teil der schweren Kette und können durch diese kleinere Form eine fingerartige CDR3 (complementary determine region) Struktur ausbilden und so auch Epitope in Einbuchtungen von Enzymen wie z.B. dem katalytischen Zentrum binden **(Desmyter A. et al. 1996)**. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass ein gebildeter Antikörper die Funktion des Enzyms beeinflussen kann. Kamelide besitzen eine Präferenz dafür, inhibierende hcAbs zu bilden **(De Genst E et al. 2006)**. Neben diesem funktionellen Vorteil sind VHHs im Gegensatz zu konventionellen Antikörper einfacher zu klonieren und in E.coli Bakterien, Hefen oder Säugetier-Zellen zu produzieren. Sie besitzen aufgrund ihrer geringen Größe eine gute Löslichkeit sowie Stabilität **(Harmsen MM et al. 2007)**. VHH können als einzelner Monomer oder umklont als Multimer hergestellt werden. Als Multimer erhalten sie bivalente

Eigenschaften. Als Multimer werden ihren Eigenschaften zur Penetration bestimmter Gewebe (**Wu TT et al. 1993, Muyldermans S 2001, Dumoulin M et al. 2003**) und die Serum-Halbwertszeit *in vivo* beeinflusst, ohne dass sie ihre spezifische Funktion verlieren. Ein Monomer, welches als identischer Dimer geklont wird, zeigt eine erhöhte Affinität zum Ziel (**Conrath EK et al. 2000**).

1.2.3. VHHs mit erhöhter Halbwertszeit (HLE)

Aufgrund ihrer kleinen kompakten Struktur ist die Serum-Halbwertszeit von VHHs gering und sie werden innerhalb von Stunden über die Niere eliminiert. Um die Serum-Halbwertszeit zu erhöhen kommen verschiedene Ansätze in Frage. Klont man die VHHs als bivalenten Dimer z.B. mit einem VHH der an Serum-Albumin bindet, erhöht sich die Halbwertszeit *in vivo* (**Coppieters K et al. 2006**). Ein anderer Ansatz ist es, eine Fc Region an die VHH zu klonieren, durch die die Größe und die Fähigkeit an Fc-Rezeptoren zu binden, gesteigert wird. Dadurch erhöht sich ebenfalls die Serum-Halbwertszeit ähnlich wie bei konventionellen Antikörpern, ohne dass die Funktionsfähigkeit der VHH beeinflusst wird.

1.2.4. P2X7 Modulatoren

Die in dieser Arbeit verwendeten VHH Konstrukte gegen P2X7 wurden von Dr. rer. nat. Welbeck Danquah in Kooperation mit Ablynx Genf im Rahmen seiner PHD Thesis produziert und analysiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte waren 13A7, welches spezifisch murines P2X7 (mP2X7) bindet und die Schwelle zur Aktivierung durch ATP erhöht, sowie 14D5, welches ebenfalls spezifisch mP2X7 bindet, jedoch durch allosterische Aktivierung den Schwellenwert für eine ATP und NAD bedingte Aktivierung von P2X7 senkt und somit die Sensitivität für ATP erhöht. A438079 als "small molecule inhibitor" wirkt als kompetitiver P2X7 Antagonist und wurde als nicht-VHH zum Vergleich verwendet.

1.3. Die Niere, das Glomerulum und der Podozyt

1.3.1. Die Niere

Die Niere ist als paariges Organ angelegt und wird in Mark und Rinde unterteilt. Die Niere ist für die Ausscheidung wasserlöslicher Substanzen sowie für die Regulation des Salz-, Wasser- und Säure-Base-Haushaltes zuständig. Weiterhin besitzt die

Niere eine endokrine Funktion durch die Bildung von Hormonen wie Renin, Calcitriol und Erythropoetin, wodurch sie an der Blutbildung und am Knochenbau beteiligt ist. (Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch Histologie, S.437)

1.3.2. Das Glomerulum

Die Urinfiltration findet im rindennahen (kortikalen) Bereich der Niere statt und wird von den Filtrationseinheiten, den Nephronen, übernommen.

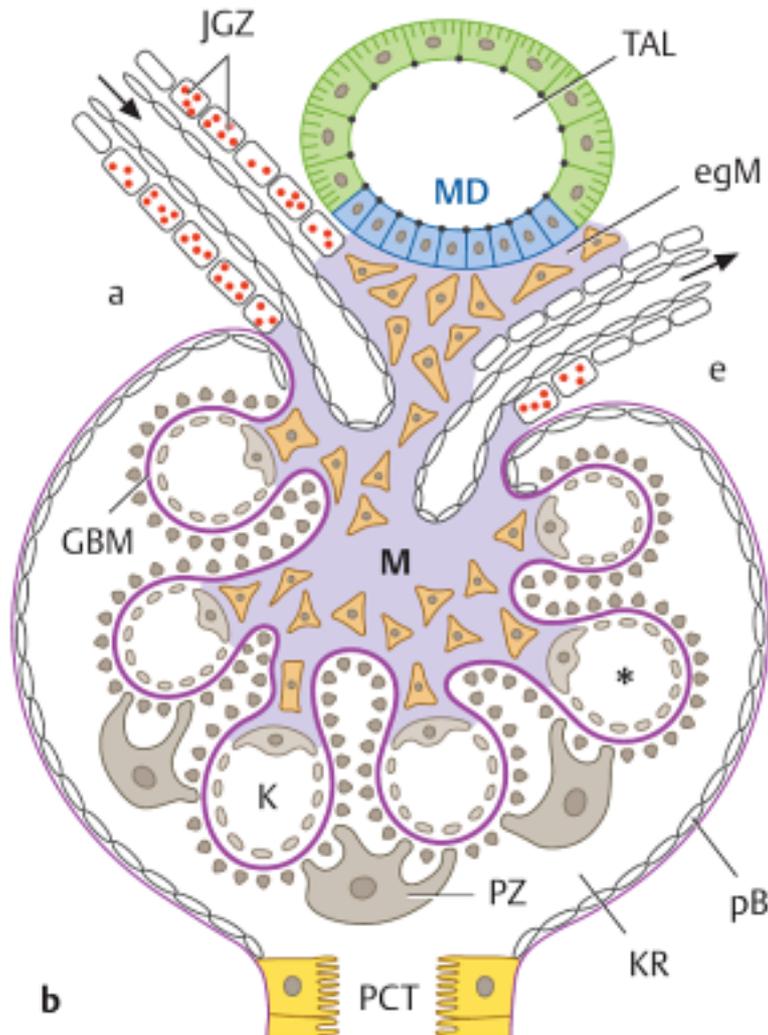


Abb. 1.3.2. Schematische Darstellung eines Glomerulums. GBM = Glomeruläre Basalmembran, K = Kapillare, M = Mesangium, PZ = Podozyten, pB = parietales Blatt, KR = Kapselraum, egM = extraglomeruläres Mesangium, MD = Macula Densa, TAL = Dicker aufsteigender Schenkel, JGZ = Juxtaglomeruläre Zellen. Taschenlehrbuch Histologie 2. Auflage, Renate Lüllmann-Rauch, Friedrich Paulsen (Thieme Verlag), Seite 446.

Ein Nephron besteht aus einem Nierenkörperchen, der Bowmannschen Kapsel samt Glomerulum, sowie dem angeschlossenen tubulären System (Nierenkanälchen). Die

im Raum innerhalb der Bowmannsche Kapsel verlaufenden Gefäße bilden eine knäuelartige Struktur welche als Glomerulum bezeichnet wird. Die Bowmannsche Kapsel wird innen von einer Hülle aus Epithelzellen, welche als Parietalzellen bezeichnet werden, ausgekleidet. Parietalzellen grenzen ein Kompartiment zur Sammlung des Primärharns ab, den sogenannten Bowmannschen Kapselraum. Die Bowmannsche Kapsel besitzt zwei einander gegenüberliegende Pole. Am Gefäßpol treten die Blutgefäßen ein und aus. Am gegenüberliegenden Harnpol ist das tubuläre System an den Kapselraum angeschlossen, durch das der Primärharn aus der Bowmannschen Kapsel abfließt. Am Gefäßpol geht das parietale Blatt der Parietalzellen in das viszerale Blatt der Epithelzellen über, welche als Podozyten (PZ) bezeichnet werden. Die Podozyten sitzen den Gefäßschlingen auf und werden von den Endothelzellen durch die glomeruläre Basalmembran (GBM) getrennt. Die Endothelzellen, Podozyten und GBM bilden die glomeruläre Filtrationsbarriere und fungieren als Blut-Harn-Schranke, welche die spezifische Filtration von Ionen sicherstellt, beziehungsweise Proteine und andere Moleküle im Blut zurückhält. Zwischen den Gefäßschlingen befindet sich das Mesangium, welches die Mesangialzellen enthält und dem Gefäßschlingen-System Stabilität gibt. Bei der Urinfiltration wird unter Druck Wasser zusammen mit gelösten harnpflichtigen Substanzen aus dem Blut in den Primärharn filtriert. Im angeschlossenen tubulären System der Nierenkanälchen wird 99% des Wassers und ein Teil der Elektrolyte rückresorbiert, sowie Substanzen die ausgeschieden werden sollen, in den Urin sezerniert. (Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch Histologie)

1.3.3. Der Podozyt

Die Podozyten sind, wie in 1.3.2 erwähnt, epitheliale Zellen, die den Gefäßschlingen innerhalb der Bowmannschen Kapsel aufsitzen. Sie sind terminal differenzierte Zellen, die mehrere Fortsätze ausbilden und um die Gefäße schlingen. Diese Fortsätze treten in Verbindung mit den Fortsätzen anderer Podozyten und bilden so eine Membran mit Schlitzten ("Schlitzmembran"). Ein wichtiges Proteine bei diesen interzellulären Zell-Zell-Verbindungen ist das transmembranäre Fußfortsatzprotein Nephrin (Kestilä *et al.* 1998, Holzman *et al.* 1999), welches mit seinen extrazellulären Bestandteil eine Bindung zum extrazellulären Bestandteil des Nephrins des Nachbarfortsatzes ausbildet. Die Filtration über die Schlitzmembran führt zur Größen-Spezifität der Filtration. Kommt es im Rahmen von Entzündungen, wie zum Beispiel der membranösen Glomerulonephritis, zu einem podozytären

Schaden, folgt ein Anschwellen der Podozyten und ein Verschmelzen der Fußfortsätze (**Asanuma K et al. 2003**). Ein Zeichen dieses Schaden ist eine Abnahme der Nephrexpression in Bereichen der Fußfortsatzverschmelzung (**Huh et al. 2002**). Dadurch wird die Schlitzmembran und die Filtrationsbarriere durchlässig, was zu einem Verlust an körpereigenem Protein aus dem Blut führt. Proteine wie Albumin sind nun im Urin messbar.

1.3.4. Podozytenzelllinien

1.3.4.1. Die Podozytenzelllinie E11

Die in den meisten Experimenten dieser Arbeit verwendete murine Podozyten-Zelllinie E11 wurde 2004 von Karlhans Endlich (**Schiwek et al. 2004**) beschrieben. Die von Endlich et al. entwickelte Podozytenzelllinie wurde aus den Glomeruli einer "Immorto-Mouse® Maus (Charles River, St. Louis, MO, USA)" isoliert. Diese Maus trägt das "SV40 large-T Antigen"-Gen in allen Körperzellen. Dieses Antigen fungiert als Onkogen, welches zur Immortalisierung vieler Zelllinien verwendet wird. Die isolierten Podozyten proliferieren durch das SV40 large T Antigen in Gegenwart von Interferon- γ bei 33°C wodurch das Onkogen aktiv ist. In dieser Zelllinie wurde eine thermo-labile Form des SV40 large T-Antigen verwendet, welches unter der Kontrolle des Interferon- γ Promotors steht. Somit führt die Erhöhung der Temperatur auf 38°C und der Entzug des Interferon- γ zu der Inaktivierung des Onkogens und zur Differenzierung der Zellen. Diese Zelllinie formt einen epithel-typischen Monolayer inklusive vieler, der Schlitzmembran ähnlichen Zell-Zell Kontakte, über Fortsätze aus. Die Zelllinie wurde positiv als Podozyten über den Nachweis von WT-1 (Tumorsuppressor Gen und Transkriptionsfaktor) und Podocalyxin (Sialoprotein der epithelialen Podozyten Membran) identifiziert. Das für die Zellverbindung der Schlitzmembran wichtige Protein Nephrin wird von diesen Zellen ebenfalls in den Zell-Zell Kontakten exprimiert. Daher eignet sich diese Zelllinie für *in vitro* Versuche an Podozyten.

1.3.4.2. Die Podozytenzelllinie MPZ

Die Podozytenzelllinie, welche von **Mundel et al. (1997)** etabliert wurde, wird in dieser Arbeit als MPZ (Mundel Podozyt) abgekürzt. Diese Zelllinie ist ähnlich wie die E11 Zelllinie mit dem "SV40 large-T Antigen" immortalisiert. In den Experimenten dieser Arbeit dient sie als vergleichende Podozytenzelllinie, um in einigen

Experimenten zu zeigen, dass die gewonnenen Daten nicht auf eine spezifische Podozytenzelllinie beschränkt sind.

1.3.5. ADAM17, EGF-R und ERK in kultivierten Podozyten

Die Metallo-Protease ADAM17 kann neben, wie in 1.1.2 beschrieben durch P2X7 (Seman et al. 2003), in kultivierten murinen Podozyten auch durch den Bradikinin-2-Rezeptor aktiviert werden, und führt über den EGF-Rezeptor zur Phosphorylierung von ERK (**Dey et al. 2010**). Die "extracellular signal-regulated kinase 1 und 2" (ERK1/2) sind zwei ähnliche Proteinkinasen im MAP-Kinase Signalweg (**Boulton et al. 1991**). Der Bradikinin-2-Rezeptor führt zum Anstieg von Ca^{2+} in Podozyten (**Mundel et al. 1997**) und darüber hinaus konnten Dey et al. (2010) zeigen, dass die Aktivität des Bradikinin-2-Rezeptors die Permeabilität von Podozyten für Albumin beeinflusst und so ein mögliches therapeutisches Target chronischer Nierenerkrankungen darstellt.

1.4. Glomeruläre Erkrankungen der Niere

1.4.1. Glomerulonephritis

Der Begriff Glomerulonephritis (GN) bezeichnet immunologisch bedingte Nierenerkrankungen, welche mit einer intraglomerulären Inflammation einhergehen. Es gibt verschiedene krankheitsauslösende Substanzen wie z.B. Proteine und Proteinteile des eigenen Organismus, welche strukturell verändert oder unter normalen Bedingungen keinen Kontakt zu Entzündungszellen oder Antikörper haben. Kommt es im Rahmen von pathologischen Prozessen zu einem Kontakt dieser Proteine mit dem Immunsystem, kann dies zu einer autoimmunen Glomerulonephritis führen. Die meisten Glomerulonephritiden sind Antikörper gesteuert. In der Anti-GBM Glomerulonephritis bildet der Körper Auto-Antikörper gegen das sogenannte Goodpasture-Antigen ($\alpha 3$ -Kette des Typ 4 Kollagens), ein Protein welches unter normalen Umständen ein Teil der glomerulären Basalmembran bildet und nicht erreichbar für Immunzellen ist. Kommt es zu einer Bildung dieser Auto-Antikörper, bilden diese eine lineare Ablagerung an der Basalmembran des Glomerulums, was zu einem glomerulären Schaden durch Komplement-Aktivierung und Stimulation von Immunzellen führt. Diese Form der GN wird somit durch spezifische Antikörper ausgelöst, die gegen die Filtrationsbarriere gerichtet sind. Neben spezifischen

Antikörpern gibt es auch Formen der GN, bei der Antikörper einen Schaden verursachen, welche nicht speziell gegen ein Antigen des Glomerulums gerichtet sind. In der Post-Streptokokken GN oder der IgA-Nephritis zum Beispiel, bilden Antikörper große Antikörper-Komplexe, die sich im Glomerulum ablagern und durch lokale Reaktion mit dem Immunsystem einen Schaden verursachen (Herold, Innere Medizin 2010).

1.4.2. Die membranöse Glomerulonephritis

Die membranöse Glomerulonephritis ist der häufigste Grund für das nephrotische Syndrom bei Erwachsenen (starke Proteinurie > 3 g/Tag, Hypoproteinämie, Hyperlipidämie, hypalbuminurische Ödeme). Der Auslöser der Endzündungsreaktion ist hierbei in 75% der Fällen idiopathisch und in 25% sekundär durch Infektionen (Hepatitis B oder C, HIV, Syphilis, Malaria) oder durch Autoimmunerkrankungen (Systemischer Lupus Erythematoses) bedingt. Als Auslöser für die idiopathische Form wurden von **Beck et al. (2010)** Auto-Antikörper gegen PLA₂R (Phospholipase A₂ Rezeptor) in den Immunkomplex-Ablagerungen nachgewiesen. Im Rahmen der Entzündung kommt es zu subepithelialen Ablagerungen von Immun-Komplexen und Komplement-Komplexen an der Basalmembran (Herold Innere Medizin, 2010). Da die Podozyten terminal differenzierte Zellen sind, können diese den Schaden wahrscheinlich nicht durch Proliferation und/oder durch Podozytenersatz ausgleichen. Die Folge des Schadens ist ein Anschwellen der Podozyten und ein Verschmelzen ihrer Fußfortsätze, was die Funktion der Filtrationsbarriere beeinflusst. Der massive Verlust an Protein führt im Anschluss zum nephrotischen Syndrom. Neben der Hypoproteinämie, die durch die starke unselektive Proteinurie verursacht wird, vermindert sich der kolloidosmotische Druck im Blut wodurch es zur Verschiebung von Flüssigkeit aus dem Plasma ins Interstitium kommt. Die damit verbundene Hypovolämie aktiviert das Renin-Angiotensin-Aldosteron System, was zu Wasser- sowie Elektrolyt-Retention und so zur Ausbildung von Ödemen führt (Herold Innere Medizin, 2010). Um den Verlust an kolloidosmotisch aktiven Substanzen auszugleichen, kommt es durch eine kompensatorisch gesteigerte Synthese von Lipoproteinen zur Hyperlipidämie des Organismus.

1.4.3. Die Anti-Podozyten Nephritis

Die anti-Podozyten Nephritis (APN) ist ein experimentelles Krankheitsmodell zur Simulation einer Antikörper induzierten membranösen Glomerulonephritis in der

Maus (**Meyer Schwesinger et al. 2011**). Das Immuneserum eines mit kultivierten Maus-Podozyten immunisierten Schafes wird der Maus injiziert und führt zur Fußfortsatz-Verschmelzung sowie zur Formation von subepithelialen Immunkomplex-Ablagerungen. Die Maus entwickelt daraufhin ebenfalls eine nicht selektive Proteinurie und ein nephrotisches Syndrom. Immunogold Elektronenmikroskopie- und Immunfluoreszenz-Untersuchungen deuten auf Podozyten als eines der Hauptziele der injizierten Antikörper hin.

1.5. Dissertationsergebnisse von Anna Hammel

Anna Hammel (2013) hat bereits Experimente zur Rolle von P2X7 in der APN im Rahmen ihrer Dissertationsarbeit durchgeführt. In ihrem Versuchsaufbau wurde C57BL/6 Mäusen APN-Serum oder die gleiche Menge Prä-Immuneserum (PIS) als Kontrolle injiziert. Die Mäuse wurden durch Injektion mit anti-P2X7 VHH-Alb HLE behandelt (**Abb. 1.5.1**). Zusätzlich wurde eine Gruppe von C57BL/6 P2X7 KO Mäusen mit APN-Serum behandelt. Alle 3 Tage wurde das P2X7 inhibierende VHH-Alb Konstrukt injiziert und anschließend Urin gesammelt. Am Tag 14 wurde das Experiment beendet und den Mäusen Plasma sowie Organe entnommen. Der Versuchsaufbau beinhaltete 6 Gruppen von Mäusen: 1.) C57BL/6 wt Mäuse injiziert mit PIS 2.) C57BL/6 wt Mäuse injiziert mit APN und einem P2X7 agonistisch wirkendem 14D5-Alb 3.) C57BL/6 wt Mäuse injiziert mit APN und einem P2X7 antagonistisch wirkendem 13A7-Alb 4.) C57BL/6 wt Mäuse injiziert mit APN und einem dummy VHH-ALb 5.) C57BL/6 P2X7 KO Mäuse injiziert mit PIS sowie 6.) C57BL/6 P2X7 KO Mäuse injiziert mit APN-Serum.

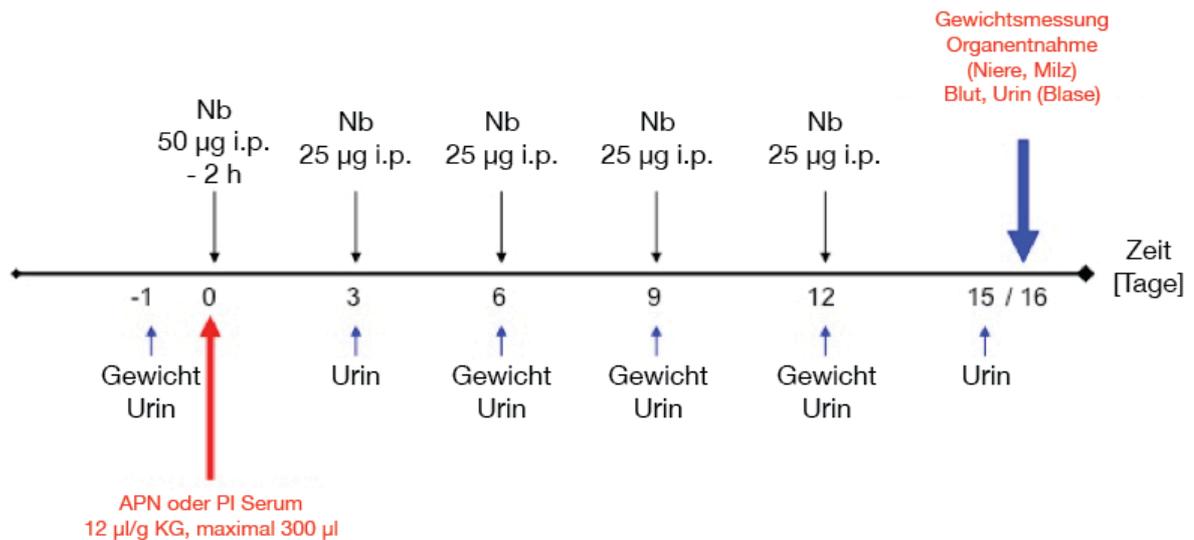


Abb. 1.5.1. Experimenteller Versuchsaufbau von Anna Hammel. An Tag -1 wurde Urin gesammelt und das Gewicht gemessen. An Tag 0 wurde durch Injektion von 12 µl/ g KG APN-Serum die APN in den Mäusen induziert. Zwei Stunden zuvor und dann alle 3 Tage wurde den Mäusen 50 µg VHH-Alb injiziert sowie Urin gesammelt und Gewicht gemessen. An Tag 15/16 wurde das Experiment beendet sowie Blasenurin, Blut und Nieren entnommen.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass P2X7-defiziente Mäuse im Vergleich zu wildtyp Mäusen einen abgeschwächten Verlauf der APN haben. Eine Behandlung von C57BL/6 wildtyp Mäusen mit P2X7 antagonistisch wirkenden VHHs hatte ebenfalls einen protektiven Effekt, wohingegen die Behandlung mit P2X7 agonistischen VHHs die Krankheit verschlimmerte (**Abb. 1.5.2**).

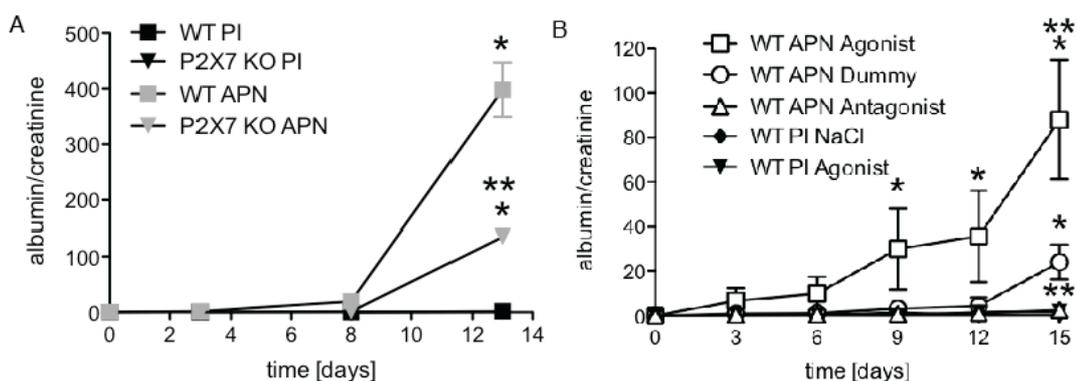


Abb. 1.5.2. P2X7 defiziente Mäuse sowie P2X7 inhibierte Mäuse haben einen abgeschwächten Krankheitsverlauf. Proteinurie-Daten aus dem Experiment aus der Dissertation von Anna Hammel. A) APN behandelte P2X7 KO Mäuse haben eine geringere Proteinurie an Tag 13 im Vergleich zu WT APN Behandelten Mäusen. B) APN behandelte P2X7 inhibierte Mäuse (Dreiecke) haben eine geringere Proteinurie an Tag 15 im Vergleich zu Dummy + APN behandelten Tieren (Kreise). Eine Behandlung mit APN und einem P2X7 Agonisten führte zu einer Verstärkung der Proteinurie (Vierecke).

Diese Daten deuten auf eine Rolle von P2X7 in der anti-Podozyten Nephritis hin und machen P2X7 zu einem möglichen therapeutischen Ziel bei podozytären Schäden im Rahmen der Glomerulonephritis.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Zellen

Tabelle 1: Kultivierte Zellen

Zellname	Spezies	Zelltyp	Eigenschaft
DC27.10	Maus	T-Zell Hybridoma	exprimiert endogen mP2X7, dient als positiv Kontrolle
HEK 293	Human	Niere, Embryo	keine Expression von mP2X7
HEK-T mP2X7	Human	Niere, Embryo	mit mP2X7 stabil transfiziert
E11-PZ	Maus	Podozyt	Zelllinie etabliert von Endlich et al. SV40-Large T Ag immortalisiert, exprimieren Podozytenmarker u.a. WT-1 und Nephrin
MPZ	Maus	Podozyt	Zelllinie etabliert von Mundel et al. SV40-Large T Ag immortalisiert, exprimieren Podozytenmarker u.a. WT-1 und Nephrin

Zellname	Spezies	Zelltyp	Eigenschaft
YAC-1	Maus	Lymphoma	exprimiert mP2X7 sowie CD62-L (wird von Zelloberfläche Abgespalten nach P2X7 Aktivierung)

Antikörper

Tabelle 2: Antikörper im Westernblot

Antigen	Konjugat	C l o n / Lot.#	Spezies	Hersteller	Cat.No	Verdünnung
primär						
P2X7		AN-11	Kaninchen	Alomone	APR-004	1:1000
ERK1/2			Kaninchen	Cell Signaling	9102	1:1000
pERK1/2			Kaninchen	Cell Signaling	9101	1:1000
MHC-II		IBL-5/22	Ratte	Dianova	DLN-131 16	1:1000
β -Actin			Maus	Sigma	A5441	1:3000
sekundär						
Kaninchen IgG	HRP	102102	Esel	Jackson ImmunoResearch	711-035-152	1:10000
Ratte IgG	HRP	57778	Ziege	Jackson ImmunoResearch	112-035-044	1:20000
Maus IgG	HRP	82328	Esel	Jackson ImmunoResearch	715-035-150	1:40000

Tabelle 3: Antikörper in der Immunfluoreszenz

Antigen	Konjugat	Clon / Lot.#	Spezies	Hersteller	Cat.No	Verdünnung
Alkalische Phosphatase (AP), E.coli spezifisch		polyklonal	Kaninchen	Abcam	AB354	1:400
DNA				Hoechst/Topro III		1:1000
DNA, Draq 5				Molecular Probes		1:1000
f-actin (Phalloidin)	AF568			Molecular Probes	A12380	1:300
Kaninchen IgG	AF488	104878	Esel	Jackson ImmunoResearch	711-545-152	1:200
Meerschweinchen IgG	Cy3			Jackson ImmunoResearch		1:200
Nephrin		polyklonal	Meerschweinchen	Acris		1:100
P2X7	AP	WD1c81	E.Coli	AG Nolte		1:100

Tabelle 4: Antikörper in der Immunhistochemie

Antigen	Konjugat	Clon / Lot.#	Spezies	Hersteller	Cat.No	Verdünnung
Ly6G		monoklonal	Ratte	Hycult Biotech	HM1039	1:400

Antigen	Konjugat	Clon / Lot.#	Spezies	Hersteller	Cat.No	Verdünnung
Kern				Merck		

Tabelle 5: Immunopräzipitations-Säulen

Antigen	Clon	Spezies	Bezeichnung	Hersteller	Typ
P2X7	RH24	Ratte	MN#8	Labor Nolte	Aminolink-Matrix

Tabelle 6: FACS-Antikörper

Antigen	Clon	Fluorochrom	Hersteller
mIgG		PE	Dianova
CD62L	MEL-14	PE	BD

Tabelle 7: Nanobodys/Inhibitoren

Name	Ziel	Eigenschaft
A438079	P2X7	P2X7 Antagonist, Small Molecule Inhibitor
1067	hCD38	Inhibiert humanes CD38, dient in Experimenten mit Mauszellen als Dummy
13A7	mP2X7	Antagonist Monomer
13A7.Alb	mP2X7	Antagonist, gekoppelt an Nb der Albumin bindet, erhöhte Halbwertszeit
13A7-Dimer	mP2X7	Antagonist, Dimer aus zwei 13A7 Nb, erhöhte HWZ
13A7.mFc	mP2X7	13A7 an mFc gekoppelt, erhöhte HWZ, mFc Fragment detektierbar

Name	Ziel	Eigenschaft
14D5	mP2X7	Agonist, senkt Schwellenwert für ATP zur Aktivierung, Monomer
14D5.Alb	mP2X7	Agonist, gekoppelt an Nb der Albumin bindet, erhöhte HWZ
14D5-Dimer	mP2X7	Agonist, zwei 14D5 Nb gekoppelt, erhöhte HWZ
14D5.mFc	mP2X7	14D5 an mFc gekoppelt, erhöhte HWZ, mFc Fragment detektierbar
WD1c81	mP2X7, hP2X7	Antagonist
WD1c81.AP	mP2X7, hP2X7	Antagonist, gekoppelt an eine alkalische Phosphatase für Färbeexperimente in der Histologie

Chemikalien

A438079	Abcam
AEBSF	Merck
Aqua ad iniectabilia	Braun
ATP, Natrium Salz	Sigma-Aldrich
Bovines Serum Albumin, BSA	Merck
Carbenicillin	Serva
DMEM medium	Gibco
DNA Typing Grade Agarose	Gibco
dNTPs	Invitrogen
Ethidium bromid	Molecular probes
EDTA	Merck
Fetal calf serum, FCS	PAA
HEPES, 1M	Gibco
jetPEI	Polyplus
L-Glutamin, 200mM	Gibco

MEM, non essential amino acids, 10 mM	Gibco
NAD+	Sigma-Aldrich
PBS	Gibco
RPMI 1640 medium	Gibco
Natrium Chlorid	Merck
Natrium Pyruvat, 100 mM	Gibco
Stripping Buffer	Thermo Scientific, Prod# 21059
T-PER® Tissue Protein Extraction Reagent	Thermo Scientific
Tris-HCL	Sigma
Trypsin 10x	Invitrogen
HBSS	Invitrogen
Dyna-Beads	Dynal
Entwickler-Lösung 1	Pierce
Femto Entwicklerlösung	Pierce

Puffer

FACS Assay-Puffer

PBS +/-

2% FCS

Blot-Puffer

Glyzin

192mM

Tris (Trizma Base) 50mM

MOPS-Puffer

MOPS

50mM

Tris (Trizma Base) 50mM

SDS

0,1%

EDTA

1mM

MES-Puffer

MES

50mM

Tris (Trizma Base) 50mM

SDS

0,1%

EDTA

1mM

Lyse-Puffer	Na-Vanadat	1mM
	NaF	1mM
	Complete 25x	1x
	Caliculin A	100nM
		in T-PER®
LDS-Laufpuffer 4x	LDS Invitrogen	4x
	DTT	0,4M
Westernblot-Waschpuffer	Tris pH7,4	100mM
	NaCl	5mM
	Tween	0,005%
		in Aqua dest.
ECS-Puffer	HEPES pH 7.4	15mM
	NaCl	140mM
	KCl	5mM
	MgCl ₂	1mM
	Glucose	10mM
	CaCl ₂	1,8mM
HCl-Alkohol	Ethanol 100%	1l
	25N HCl	1ml

Kulturbedien eukaryotischer Zellen

Podozyten:

Complete RPMI, 10% FCS

500 ml RPMI 1640
5 ml Glutamin
5 ml Natrium Pyruvat
5 ml Hepes
50 ml FCS
INF-γ

HEK Zellen:

Complete DMEM, 5% FCS

500 ml DMEM

5 ml Glutamin
 5 ml Natrium Pyruvat
 5 ml Hepes
 5 ml MEM, non essential
 25 ml FCS

Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Artikel	Ref. No.	Hersteller
Cell Strainer 100 µm		BD Falcon
Cell Strainer 70 µm	REF 352350	BD Falcon
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel	NP0323BOX	Novex
Spritze 2 ml	REF 4606027V	Braun

Kits

Tabelle 9: Verwendete Hersteller-Kits

Antigen	Cat. No	Hersteller
Maus Albumin ELISA	E90-134	Bethyl
Kreatinin	888891	Axiom Diagnostics
IL-6 ELISA	431301	BioLegend
MCP-1 ELISA	MJE00	R&D
ZytoChem Plus AP Polymer	POLAP-006	Zytomed Systems

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1. Ernte von adhärennten eukaryotischen Zellen

Das Zellmedium wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit vorgewärmten PBS (**Gibco**) in der Zellkulturflasche vorsichtig gewaschen. Durch Inkubation mit 0,05% Trypsin für 5 Minuten wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche unter gelegentlichem Klopfen gelöst. Nach dem Trypsinieren wurde das Trypsin durch die

Zugabe der vierfachen Menge an frischem Zellkulturmedium inaktiviert, die Zellsuspension in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C bei 1600 rpm für 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde in frischem gekühltem PBS +Ca²⁺ resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorftube überführt und erneut durch Zentrifugation bei 4°C 1600 rpm pelletiert. Sofern das Pellet nicht im Anschluss weiterverarbeitet wurde, wurde es in flüssig Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen wie die Podozyten wurden bei 32°C 5% CO₂ in Zellkulturflaschen der Größe TC-25, TC-75 oder TC-175 mit Filterkappen (Sarstedt) im luftfeuchtigkeitsgesättigtem Brutschrank gehalten. Als Medium wurde "complete RPMI" verwendet. Bei einer Zelldichte von 80-90% wurden die Zellen alle 3 - 4 Tage 1:5, 1:10 oder 1:20 geteilt. Zum Teilen wurden die Zellen mit sterilem PBS (Lonza) gewaschen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur trypsiniert (Invitrogen, 10x). Das Trypsin wurde mit der vierfachen Menge Medium inaktiviert und die gewünschte Menge Zellen mit frischem Medium in eine neue Zellkulturflasche überführt und weiter kultiviert. Um die Podozyten für Experimente auszdifferenzieren, wurden diese bei 38°C 5% CO₂ unter IFN-γ Entzug für 14 Tage kultiviert. Zellen wie HEK-T Zellen wurden bei 37°C 5% CO₂ in "complete DMEM" kultiviert und alle 2-3 Tage in Abhängigkeit der Zelldichte geteilt.

2.2.3. Stimulation kultivierter Podozyten

Für Stimulationsexperimente wurden 2*10⁴ ausdifferenzierte Podozyten pro Well in eine 24-Well-Platte ausplattiert und über Nacht kultiviert, um Adhärenz zu erreichen. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 2 ml pro Well mit vorgewärmten PBS gewaschen und mit 500 µl serumfreien Medium überdeckt. Die Zellen wurden unter Hinzugabe von 10 µM A438079 (ein "small molekule inhibitor" gegen P2X7) für 15 Minuten bzw 50 µM 2-APB (P2Y Inhibitor) für 5 Minuten bei 38°C 5% CO₂ im Brutschrank vorinkubiert. Ansätzen ohne Inhibitoren wurde eine äquivalente Mengen des Lösungsmittels DMSO hinzugefügt. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Zugabe von 1 mM oder 50 µM ATP pro Well bei 38°C im Brutschrank für 5 Minuten stimuliert. Am Ende der Stimulation wurde das Medium abgesaugt und die Wells mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und die 24-Well Platte auf

Eis gestellt. Die Lyse wurde mit 50 µl T-PER-Lysepuffer-Mix (Pierce) im Well auf Eis durchgeführt. Die Platte wurde 20 Minuten unter gelegentlichen Klopfen bei 4 °C auf Eis inkubiert. Nach der Lyse wurde der Boden mit dem Lysat abgespült und die Lysat-Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge bei 4°C für 30 Minuten zentrifugiert, um Zellreste zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und als Lysat für Westernblot-Analysen verwendet, beziehungsweise bei -80 °C gelagert.

2.2.4. Herstellung von Milzzell-Suspensionen

Milzen wurden grob zerkleinert und vorsichtig mit der sterilen Seite eines 2 ml Spritzen-Stempel durch ein 70 µm Zellsieb (BD Falcon) in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gerieben. Im Anschluß wurde das Sieb mit 5 ml kaltem PBS nachgespült. Die Zellsuspension wurde bei 1600 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und in 5 ml kaltem ACK-Puffer (zur Erythrozyten-Lyse) resuspendiert. Die Erythrozyten-Lyse wurde auf Eis für 5 Minuten durchgeführt und mit 45 ml kaltem PBS abgestoppt. Es folgte die Zentrifugation bei 1600 rpm bei 4°C für 5 Minuten mit Verwerfen des Überstandes und Resuspension im gewünschten Medium und Volumen.

2.2.5. Live-Cell Imaging des Kalzium-Einstroms

FURA-2 ist ein Farbstoff, welcher als Chelator in Verbindung mit Calcium Komplexe bildet. Durch diese Bindung kommt es zu einem Shift in der Wellenlänge (**Grynkiewicz et al.1985**) und somit zu einer Signalveränderung in der fluoreszenz Mikroskopie. Durch Inkubation von Zellen mit FURA-2 wird der Farbstoff von den Zellen aufgenommen. Kommt es nun durch einen Reiz zu Veränderungen des Kalziumgehaltes intrazellulär, kann diese Veränderung mittels eines Fluoreszenzmikroskops anhand der Signalveränderung des FURA-2 gemessen werden. In den Experimenten dieser Arbeit wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen auf Petrischalen mit 10 mm Bohrung und Glasboden ausplattiert und über Nacht kultiviert, um eine Adhärenz zu erlangen. Am nächsten Tag wurde das alte Medium abgesaugt und 1 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben. Zum Medium wurde Fura-2 in einer Endkonzentration von 4 µM hinzu pipettiert und die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, um die Zellen mit Fura-2 zu beladen. Anschließend wurde das Medium abpipettiert und die Zellen mit 1 ml ECS-Puffer gewaschen. Nach dem Waschen wurde 1 ml frischer ECS-Puffer auf die Zellen gegeben. Zum Messstart wurde gegebenenfalls 2-ABP in einer Endkonzentration von

50 μ M hinzugegeben, die Petrischale zum Mischen geschwenkt, ein Bildausschnitt im Mikroskop eingestellt und die Messung gestartet. Ein Messpunkt bestand aus der Aufnahme eines Bildes bei 340 nm und ein Bild bei 380 nm Wellenlänge im Intervall von 5 Sekunden zum nächsten Messpunkt. Nach 10 Intervallen zur Ermittlung des Basislevels wurde das ATP als 10 μ l Stock (Konzentration so verdünnt, dass die erwünschten Endkonzentrationen in der Petrischale nach Zugabe erreicht wurden) in einem Tropfen hinzupipettiert und per Diffusion verteilt. Die ATP Konzentration wurde, wenn benötigt, durch erneute Zugabe weiterer 10 μ l Tropfen gesteigert. Die Zugabe des ATP erfolgte bei laufender Messung.

2.2.6. Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

HEK-T 293 Zellen wurden transient mit Jet pEI[©] (polyethylenimin) transfiziert. Eine Ko-Transfektion mit GFP als Transfektionskontrolle, als auch mit pAdvantage um die Expression zu verbessern wurde durchgeführt. 4 μ g Plasmid, 1 μ g GFP Plasmid und 0,5 μ g pAdvantage wurden zu 150 μ l NaCl 0,9% gegeben. Der Mix wurde zu einer Mischung aus 150 μ l NaCl und 11 μ l Jet pEI (doppelte DNA Masse als Volumen) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 - 30 Minuten, wurde das gesamte Volumen zum Medium einer TC-25 Zellkulturflasche mit HEK-T 293 Zellen hinzugegeben und diese über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Transfektion wurde am nächsten Tag mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops durch Visualisierung der GFP Expression überprüft.

2.2.7. Nanobody-Fc Fusionsprotein Bindungs-Assay

Der Bindungs-Assay wurde durchgeführt, um die korrekte Bindung der Nanobodies an mP2X7 zu zeigen. Der Bindungs-Assay wurde mit Überständen von nanobodieproduzierenden transient transfizierten HEK-T 293 Zellen durchgeführt. Im Überstand befanden sich die sezernierten 13A7mFc, 14D5mFc Nanobody-Fc Fusionsproteine, beziehungsweise 1067mFc als nicht bindende Isotyp-Kontrolle. Weitere HEK-T 293 Zellen wurden transient mit mP2X7 transfiziert, am nächsten Tag geerntet und in eine 96-Well Platte mit V-Boden überführt. Die Zellen wurden bei 1600 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 50 μ l Nanobody-Fc Fusionsprotein Überstand pro Well resuspendiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und mit fluorochromkonjugiertem anti-mIgG.PE AK auf Eis 20 Minuten im Dunkeln inkubiert

und mittels Durchflußzytometrie analysiert. Ein Signal im PE Kanal korrelierte mit dem Vorhandensein von mIgG Fc-Domänen an den Zellen und somit mit der Bindung von VHH-Fc Fusionsproteinen.

2.2.8. Nanobody-Fc Fusionsprotein Funktionsassay

Der Funktionsassay wurde durchgeführt, um den agonistischen bzw. antagonistischen Effekt der Nanobody-Fc Fusionsproteine zu untersuchen. Der Funktionsassay wurde mit aufgereinigten Nanobody-Fc Fusionsproteinen auf Yac-1 Lymphomazellen durchgeführt. Yac-1 Zellen sind ursprünglich Mauszellen und bilden endogen mP2X7 sowie CD62-L und eignen sich daher für den Read-Out mittels CD62-L shedding. Yac-1 Lymphomazellen wurden in 96-Well Platten mit V-Boden überführt, bei 1600 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und gewaschen. Die Zellen wurden in 100 µl PBS mit 500 ng aufgereinigtem Nanobody-Fc Fusionsprotein pro Well resuspendiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 30 µM bzw. 100 µM ATP pro Well (Endkonzentration im Well) hinzugefügt und die Platte bei 37°C für 30 Minuten inkubiert um P2X7 mittels ATP zu aktivieren. Die Aktivierung führt zum Abspalten von mCD26-L von der Oberfläche der Zellen durch ADAM17 (TACE) (Li *et al.* 2006). Die Platte wurde anschließend auf Eis gekühlt und im Dunkeln mit Zugabe eines fluorochromkonjugierten anti-CD62L.PE AK für 20 Minuten inkubiert. Die Proben wurden mittels Durchflußzytometrie analysiert. Ein Signal im PE Kanal korrelierte mit der Menge an mCD62-L an der Zell Oberfläche und kann als Read-Out für die P2X7 Aktivierung bzw. dessen Modulation dienen.

2.3. Immunologische und Proteinbiochemische Methoden

2.3.1. Immunopräzipitation mit Aminolink Matrix

2.3.1.1. Vorbereitung der Matrix

Die Matrix wurde mit anti-P2X7 Antikörper gekoppelt (von Marion Nissen, AG Nolte) und lag als 50% Slurry vor. Die doppelte Menge vom gewünschten Matrixvolumen wurde in ein 1,5 ml Eppendorftube überführt und in der Tischzentrifuge für 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Matrix 3 mal mit PBS gewaschen. Ein Waschschriff bestand aus der Resuspension der Matrix mit Lysepuffer im 10-fachen Volumen gefolgt von Zentrifugation. Der Überstand wurde

verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand verworfen und die einsatzbereite Matrix blieb als Pellet im Eppendorftube zurück.

2.3.1.2. Präzipitation des Proteins

Die Matrix wurde im Lysat der gewünschten Probe resuspendiert. Auf 20 µl Matrix wurden 2 ml Lysat verwendet. Die resuspendierte Matrix wurde in einem 2 ml Eppendorftube unter kontinuierlicher langsamer Rotation bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Matrix für 5 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Matrix an der das zu präzipitierende Protein gebunden hat, wurde 3 mal im 10-fachen Volumen eines frischen Lysepuffers gewaschen (wie in 2.3.1.1 beschrieben). Um das Protein von der Matrix zu lösen, wurde die Matrix in gleichem Volumen mit 2x LDS + 0,2M DTT Laufpuffer bei 72°C für 15 Minuten denaturiert. Nach der Denaturierung wurde die Probe abschließend für 5 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert und der Überstand, welcher das gelöste immunopräzipitierte Protein enthält, abgenommen und im Westernblot auf das gewünschte Protein untersucht.

2.3.2. Durchflußzytometrie (FACS)

Das erste fluoreszenzbasierte Durchflußzytometer (Fluoreszenz activated cell sorter, kurz FACS) wurde 1968 von Wolfgang Göhde an der Universität Münster entwickelt und ist ein computergestütztes Verfahren zum Analysieren von einzelnen Zellen innerhalb von Zellpopulationen anhand von Oberflächenproteinen (**Givan, 2011**). Dafür werden Oberflächenproteine mittels fluorochromkonjugierter Antikörper markiert. Beim Saugen der Zellen durch eine Kapillare am Durchflußzytometer werden die Fluorochrome durch einen Laser angeregt, woraufhin diese Licht emittieren. Diese Emission wird vom Durchflußzytometer gemessen. Je stärker ein Protein an der Oberfläche vorhanden ist, desto höher ist die Menge an gebundenem Fluorochrom, umso stärker ist die gemessene Emission. Unterscheiden sich die Expressionsmengen verschiedener Zellpopulationen kann so eine Population anhand ihrer Emission von anderen Zellpopulationen separiert werden. Moderne Durchflußzytometer verfügen über mehrere Laser, die in der Lage sind, verschiedene Fluorochrome anzuregen. Durch die unterschiedliche Emission der verschiedenen Fluorochrome ist es möglich, Zellen anhand mehrerer Merkmale aus Zellpopulationen innerhalb eines Messdurchgangs zu analysieren. In dieser Arbeit

wurde die Durchflusszytometrie dazu verwendet, die Bindung von VHHmFc Konstrukten durch das Vorhandensein des mFc Teils an der Oberfläche der Zellen zu messen, sowie die P2X7 abhängige Expressionsänderung des Zelloberflächenproteins mCD62L zu detektieren.

2.3.2.1. Vorbereitung der Zellen

Um die Zellen zum Färben vorzubereiten, wurden sie zunächst als Einzelzellsuspension geerntet und nach Zentrifugation bei 1600 rpm bei 4°C für 5 Minuten in PBS resuspendiert und in Näpfe einer 96-Well-Platte mit V-Boden überführt. Zum Waschen wurden die Zellen im Napf bei 1600 rpm bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 100 µl PBS+0,1% BSA resuspendiert. Alle weiteren Schritte fanden auf Eis statt.

2.3.2.2. Anfärben der Zellen

Zum Anfärben der gewünschten Proteine wurden fluorochromkonjugierte Antikörper hinzugefügt und die Zellen für 20 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach der Anfärbung wurden die Zellen drei mal gewaschen (siehe 3.2.2.1), in 150 µl PBS resuspendiert, in micro FACS Röhrchen überführt und bis zur Messung dunkel auf Eis gelagert.

2.3.2.3. Messen

Die Zellen wurden vor dem Messen durch kurzes Vortexen vereinzelt und dann am FACS Calibur gemessen.

2.3.3. Histologische Färbungen

2.3.3.1. Färbung von P2X7 auf Gefrierschnitten

Die in **2.6.4.** vorbereiteten Gefrierschnitte wurden für 30 Minuten in 5% Pferdeserum in PBS geblockt um unspezifische Bindungen zu blockieren. Anschließend wurde 50 µl Primärantikörper (WD1c81.AP Periplasmalysat aus E.Coli, Welbeck Danquah, Gruppe Nolte, 1:100 verdünnt) in 5% Pferdeserum in PBS auf den Schnitt pipettiert und dieser bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte drei mal 5 Minuten mit PBS gewaschen und 50 µl Sekundärantikörper (#134 Kaninchen anti E.Coli AP, 1:400 in 5% Pferdeserum in PBS) auf die Schnitte pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur folgten drei Waschschriffe à 5 Minuten mit PBS. 50 µl fluorochrom konjugierter Tertiärantikörper (Dylight, AF488 gekoppelter

anti Kaninchen IgG, 1:100) in 5% Pferdeserum in PBS wurden auf die Schnitte pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach drei Waschschritten à 5 Minuten mit PBS wurden eine Kernfärbung mit Hoechst (Fluoreszenzmikroskopie) und Topro III (konfokale Mikroskopie) (Verdünnung 1:1000) in PBS für 5 Minuten durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte zwei mal 5 Minuten mit PBS gewaschen und in Fluoromount G mit einem Deckglas eingedeckt.

2.3.3.2. PAS-Färbung

Die PAS-Färbung wurde auf Paraffinschnitten durchgeführt und diese zunächst in mehreren Bädern entparaffiniert. Die Paraffinschnitte wurden dafür in drei Bäder Xylol jeweils für 5 Minuten, zwei Bäder Ethanol 100% für 5 Minuten, zwei Bäder Ethanol 96% für 5 Minuten, zwei Bäder Ethanol 70% für 5 Min und abschließend drei Bäder Aqua dest. für jeweils 5 Minuten gebadet. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 15 Minuten in 1% Perjodsäure bei Raumtemperatur inkubiert, 3 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen und danach mit Aqua dest. gespült. Im nächsten Schritt wurden die Gewebeschnitte 40 Minuten in Schiff'sche Reagenz bei Raumtemperatur getaucht und anschließend 7 Minuten mit warmen Leitungswasser gewaschen und mit Aqua dest. abgespült. Die Schnitte wurden anschließend 1 Minute in Hämatoxylin nach Böhmer getaucht und ebenfalls 3 Minuten unter fließendem warmen Leitungswasser gespült. Die Differenzierung der Gewebeschnitte erfolgte in HCL-Alkohol für 1 Minute. Zum Abschluss wurden die Schnitte in aufsteigender Alkohol-Reihe (1x 70% 2 Minuten, 3x 96% 2 Minuten, 3x 100% 5 Minuten) und drei Mal in Xylol für 5 Minuten gebadet. Die Schnitte wurden in Eukitt eingedeckt und waren bereit, mikroskopisch untersucht zu werden.

2.3.3.3. Immunfluoreszenzfärbung des Nephrens

Die Nephrintfärbung wurde auf 2 µm dicken Paraffinschnitten durchgeführt und diese zunächst in mehreren Bädern entparaffiniert. Die Paraffinschnitte wurden dafür in drei Bäder Xylol jeweils für 5 Minuten, drei Bäder Ethanol 100% für 5 Minuten, zwei Bäder Ethanol 96% für 5 Minuten, zwei Bäder Ethanol 70% für 5 Minuten und abschließend zwei Bäder Aqua dest. für jeweils 5 Minuten gebadet. Die Gewebeschnitte wurden anschließend in Citratpuffer pH 6,1 für 30 Minuten bei 98 °C im Dampfgerar gekocht und 15 Minuten bei RT abgekühlt und zwei Mal für 5 Minuten in Wasser gebadet. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Fettstift auf dem Objektträger umrandet und in 5% normalem Pferdeserum (Vector) mit 0,05% TX-100

(Sigma) für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Die Färbung mit Primärantikörper gegen Nephryn (Meerschweinchen α Nephryn (Acris) 1:100 verdünnt in Blocklösung) wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Die Schnitte wurden am nächsten Tag drei Mal mit PBS gewaschen und der Sekundärantikörper (Cy3 α Meerschweinchen (Jackson Immunoresearch Lab), 1:200 in 5% Pferdeserum mit TX-100) für 30 Min bei RT auf die Gewebeschnitte pipettiert. Anschließend wurde drei Mal für 5 Minuten gewaschen, eine DNA-Färbung mit Draq 5 (Molecular Probes, 1:1000) durchgeführt und erneut drei Mal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden in Fluoromount G eingedeckt und die Schnitte anschließend mit dem konfokalen Mikroskop (LSM Meta 5, Zeiss) betrachtet und mit der LSM Software analysiert.

2.3.3.4.I Immunhistochemie von Ly6G-Zellen

Die Immunhistochemische Färbung von Ly6G-Zellen wurde auf 2- μ m dicken Paraffinschnitten durchgeführt. Die Paraffinschnitte wurden dafür in drei Bäder Xylol jeweils für 5 Minuten, drei Bäder Ethanol 100% für 5 Minuten, zwei Bäder Ethanol 96% für 5 Minuten, zwei Bäder Ethanol 70% für 5 Minuten und abschließend zwei Bäder Aqua dest. für jeweils 5 Minuten gebadet. Das Antigen wurde mittels Proteaseverdau für 15 Minuten bei 37°C freigelegt (Protease XXIV (5mg/ml, Sigma)). Anschließend erfolgte die Blockung mit 5% Pferdeserum (Vector) in PBS 0.05% Triton X-100 für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Färbung mit dem Primärantikörper Ratte anti-Ly6G (1:400, Hycult Biotech) wurde über Nacht bei 4°C in Blockpuffer durchgeführt. Die Färbung wurde dargestellt mittels ZytoChem Plus AP Polymer Kit (Zytomed Systems) nach Anleitung des Herstellers unter Verwendung von Neufuchsin (Merck). Die Kernfärbung erfolgte mittels Hemalaun (Merck).

2.3.4. Messung der IL-6/MCP-1 Konzentration

Der Gehalt an IL-6 aus Mausplasma (IL-& ELISA Kit, BioLegend), bzw. MCP-1 Gehalt im Urin (MCP-1 ELISA Kit, R&D), wurde mittels ELISA gemäß des Herstellerprotokolls aus unverdünnten Proben gemessen.

2.3.5. Messung der Albuminurie

Zur Bestimmung der Albuminurie wurde im Urin mittels Sandwich ELISA der Gehalt an Albumin gemessen. Dazu wurde das "mouse Albumin ELISA Quantification

Set" (Bethyl) gemäß des Protokolls des Herstellers verwendet. Die gemessenen Werte für Albumin wurden gegen den zugehörigen Kreatininwert verrechnet, welcher mit dem Kreatininkit der Firma WAK gemessen wurde. Für die Kreatininbestimmung wurden unverdünnte Urine verwendet. Die Urine für die Albuminbestimmung wurden im Bereich von 1:1000 - 1:100.000 für die Messung verdünnt.

2.3.6. Westernblot

Die Westernblot Methode wurde ursprünglich 1979 von Georg R. Stark an der Stanford Universität entwickelt und ist ein Verfahren zum Übertragen von Proteinen auf eine Membran und dem anschließenden Nachweis und Identifizierung der aufgetrennten Proteine. Dazu werden die Proteine aus dem gewünschten Material mittels Lyse isoliert, denaturierte Proteine der Größe nach mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und anschließend mittels spezifischer Antikörper angefärbt. Die Visualisierung erfolgt mittels Lumineszenz, welche einen Röntgenfilm belichtet, oder direkt mittels Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und einem computergestütztem Lesegerät welches das Signal der Fluorochrome detektiert.

2.3.6.1. Zelllyse

Das Zellmaterial wurde in ein 1,5 ml Eppendorftube überführt und zellzahladaptiert mit 4°C vorgekühltem T-PER-Lysepuffer-Mix gemischt (500 µl Lysepuffer / 10⁷ Zellen). Die Lyse der Zellen erfolgte auf Eis für die Dauer von 20 Minuten unter gelegentlichem Vortexen der Probe. Trümmer von Zellmembranen und Zellkerne wurden durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 4°C 16.000 rcf pelletiert. Das Lysat, welches den Überstand bildet, wurde in ein neues vorgekühltes 1,5 ml Eppendorftube überführt. Wenn nicht sofort verwendet, wurden die Lysate bei -80°C gelagert.

2.3.6.2. Gewebelyse

Gewebeproben wurden in ein 1,5 ml Eppendorftube überführt und gewichtsadaptiert (10 µl Lysepuffer / 1 mg Gewebe) mit vorgekühltem Lysepuffer versetzt. Gewebestücke wurden mittels Stößel zerrieben und anschließend wie in **2.3.6.1** beschrieben lysiert.

2.3.6.3. Denaturierung

Damit die Proteine mittels Elektrophorese aufgetrennt werden, wurde das Lysat im Verhältnis 3:1 mit 4x LDS + DTT versetzt und für 20 Minuten bei 72 °C im Heizblock denaturiert. Nach der Denaturierung wurden die vorbereiteten Proben kurz zentrifugiert und auf Raumtemperatur gekühlt.

2.3.6.4. Auftrennung mittels Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Gel-Elektrophorese wurden fertige 4%-12% Bis-Tris Gele (Novex) verwendet, welche in MOPS oder MES Laufpuffer überführt wurden. Die denaturierten Proben wurden in die Taschen geladen und die Elektrophorese bei 60 mA für 60 Minuten durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel herausgelöst.

2.3.6.5. Blotten der Proteine auf eine Membran

Die Proteine wurden in einer Blot-Kammer mittels elektrischer Spannung vom Gel auf eine PVDF Membran übertragen. Die Membran wurde zur Vorbereitung für 2 Minuten in 100% Methanol aktiviert und anschließend mit dem Gel in die Blot-Kammer überführt. Membran und Gel befanden sich dabei in Blotpuffer und die Blot-Kammer wurde von außen gekühlt. (**Aufbau siehe Abb. 2.3.6**). Das Blotten wurde bei 30 Volt für 60 Minuten durchgeführt.

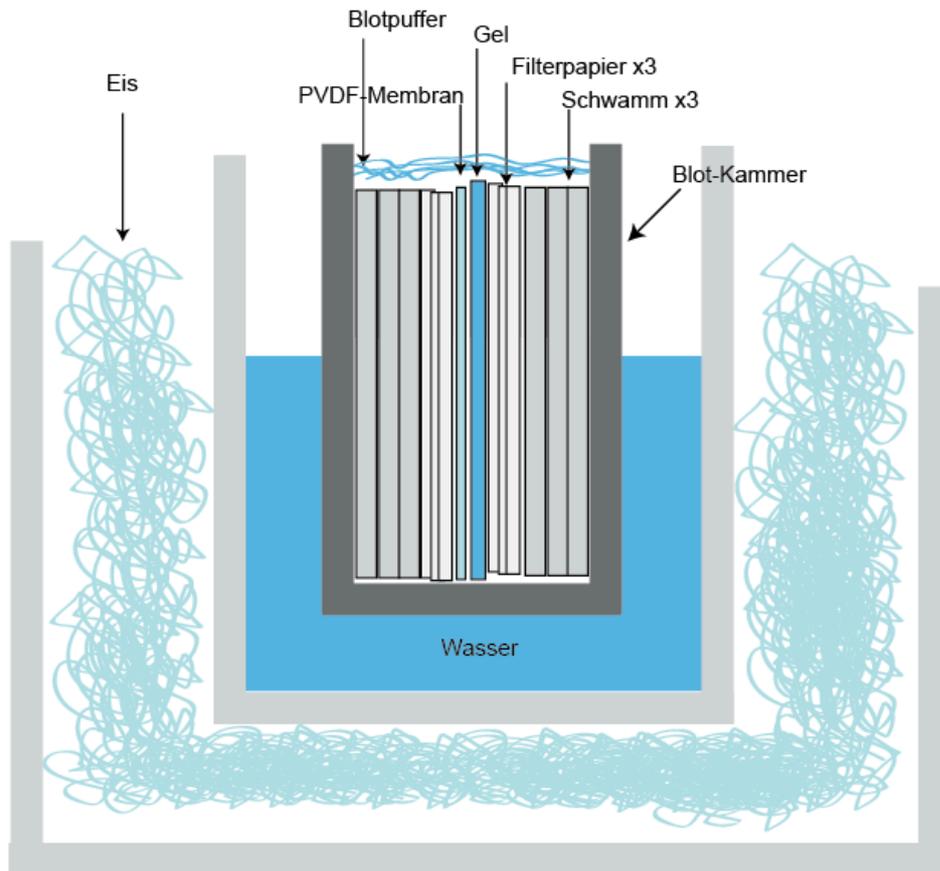


Abb. 2.3.6. Aufbau der Blotkammer. Die PVDF-Membran befindet sich zwischen Filterpapieren und Schwämmen in der Blotkammer. Die Blotkammer wird während des Blot-Vorgangs von außen mit Wasser und Eis gekühlt.

2.3.6.6. Anfärben der Proteine mittels Antikörper

Die gebloottete PVDF Membran wurde in Waschpuffer gewaschen und anschließend in 3% Magermilch gelöst in TBS-T bei Raumtemperatur für 1 h geblockt, um unspezifische Antikörperbindung an die Membran zu verhindern. Nach vier Waschschritten mit TBS-T für jeweils 10 Minuten wurde die Membran in primär-Antikörper-Lösung (gelöst in Blocklösung) bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran vier Mal für 10 Minuten in TBS-T gewaschen und anschließend in HRP-konjugierten sekundär-Antikörper-Lösung (gelöst in Blocklösung) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach vier weiteren Waschschritten wurde die Membran zur Entwicklung verwendet.

2.3.6.7. Entwicklung des Films

Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde die Membran in ECL-Substratlösung 5 Minuten inkubiert und in eine Entwicklerkassette überführt. Im Dunkelraum wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und je nach Stärke des Signals unterschiedlich lang belichtet. Der Röntgenfilm wurde in einer Entwicklermaschine für Röntgenfilme (**Agfa**) automatisch entwickelt.

2.3.6.8. Reprobe auf der Membran

Um weitere Proteine auf derselben Membran zu untersuchen, wurde die Membran nach dem Entwickeln drei mal für 5 Minuten in TBS-T gewaschen und wie in 2.3.6.6 beschrieben erneut mit Antikörpern inkubiert. Um Signalinterferenzen mit Antikörpern welche die gleiche Spezies als Sekundärantikörper verwenden, zu vermeiden, wurde die Membran für 7 Minuten in Strippingbuffer (Thermo Scientific, Prod# 21059) bei Raumtemperatur "gestrippt", was die Antikörper-Proteinverbindung des Primärantikörpers lösen soll und im Anschluss erneut 1 h bei Raumtemperatur geblockt und wie in 2.3.6.6 erneut behandelt.

2.4. Tierexperimentelle Methoden

2.4.1. Allgemeine Maus-Haltung

Balb/c und C57BL/6 Mauslinien wurden in der Tierhaltung des UKE in separat belüfteten Käfigen unter Einhaltung der lokalen Tierexperiment-Richtlinien gehalten.

2.4.2. Organentnahme

Zur Organentnahme wurden die Tiere mittels Isofluran-Begasung narkotisiert und durch zervicale Dislokation geopfert. Die Organe wurden anschließend entnommen und entsprechend der jeweiligen Experimente weiterverarbeitet und gelagert.

2.4.2.1. Nierenpräparation für Westernblot

Die Nieren wurden auf eine sterile Petrischale überführt. Nach Entfernung der Nierenkapsel wurden die Nieren in Viertel oder Achtel aufgeteilt, wobei auf eine gleichmäßige Verteilung der Nierenareale geachtet wurde, und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Westernblotanalyse wurden die Nierenstücke bei -80°C gelagert.

2.4.3. Isolation von Glomeruli aus der Niere mittels Dyna-Beads

2.4.3.1. Vorbereitung der Dyna-Beads

Pro Tier wurden $8 \cdot 10^7$ Dyna-Beads (Dyna) in Suspension in ein 1,5 ml Eppendorftube überführt. Die Beads wurden mittels "Magnetic particle concentrator" (MPC) am Boden gesammelt und der Überstand verworfen. Die Beads wurden zwei mal gewaschen. Ein Waschschrift bestand aus Resuspendieren in 1 ml PBS (Lonza), sammeln am MPC und Verwerfen des Überstandes. Die Beads wurden nach dem Waschen in 200 μ l Puffer (0,2M Tris pH 8,5; 0,1% BSA) pro Ansatz resuspendiert und 4 Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert, ohne dass die Beads sedimentierten. Anschließend wurden die Beads zwei mal gewaschen (s.o), in 200 μ l PBS pro Ansatz resuspendiert und bei 4°C bis zur Verwendung gelagert.

2.4.3.2. Perfusion der Nieren

Die Mäuse wurden mittels Isofluran-Begasung narkotisiert und während des gesamten Eingriffes in Narkose gehalten. Das Maus-Abdomen sowie der Thorax wurden eröffnet. Mittels kleiner Bulldoggen-Klemmen wurde die Aorta oberhalb und unterhalb der A. renalis abgeklemmt und die V. Cava für einen besseren Abfluss inzidiert. Die Nierenarterie wurde über die Aorta zunächst mit 5 ml PBS perfundiert gefolgt von $8 \cdot 10^7$ Dyna-Beads in 20 ml PBS mit 1% Procain Suspension. Bei korrekter Perfusion ist eine helle Verfärbung der Niere zu beobachten und das PBS bzw. die Dyna-Beads Suspension fließen durch die V. cava ab. Die Dyna-Beads, welche durch die Glomeruli fließen, bleiben aufgrund ihrer Größe von 50 μ m im Gefäßkonvolut hängen. Um die restlichen Beads die sich in den großen und nicht-glomerulären Gefäßen der Niere befinden, zu entfernen, wurde die Niere abschließend mit 5 ml PBS perfundiert. Die Nieren wurden entnommen und in kleine ca. 1 mm große Stücke zerkleinert und in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube auf Eis bis zur Glomerulus-Isolation im Anschluss gelagert.

2.4.3.3. Isolierung der Glomeruli

Zu den zerkleinerten perfundierten Nierenstückchen wurde pro Ansatz 1 ml Verdauungslösung hinzugegeben (1 ml HBSS; Kollagenase 1 mg/ml; DNase I 100 U/ml) und 30 Minuten bei 37°C Schütteln inkubiert. Der Verdauung wurde auf einen 100 μ m Zellsieb überführt, mit der sterilen Seite eines 2 ml Spritzen-Stempels vorsichtig durch das Sieb gerieben und mit 5 ml HBSS nachgespült. Das gesiebte Material wurde dabei in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt, welches auf Eis gekühlt

wurde. Das gesiebte Material wurde auf einem neuen 100 µm Zellsieb mit neuem 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben und ohne Druck durch das Sieb laufen gelassen. Das Sieb wurde mit 5 ml HBSS nachgespült. Das Glomerulimaterial wurde bei 200 g für 5 Minuten bei 4°C mittels Zentrifugation sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 4 ml HBSS resuspendiert und auf 2 mal 2ml Eppendorf-Tubes aufgeteilt und am magnetischen Partikelsammler gesammelt. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das gesammelte Material wurde drei mal gewaschen, wobei ein Waschschrift aus Resuspension in 1 ml HBSS gefolgt von Sammeln am magnetischen Partikelsammler und Verwerfen des Überstandes bestand. Nach dem Waschen wurden die gesammelten Glomeruli, welche als bräunlich, weißer Niederschlag am Rand des Eppendorf-Tubes erkennbar waren, in 1ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Tubes überführt. 10 µl der Suspension wurden entnommen, um am Mikroskop die Glomeruli zu zählen sowie die Reinheit abzuschätzen. Als rein wurde ein Isolat bezeichnet, welches pro 10 Glomeruli maximal 1 Stück Tubulus-Trümmer enthielt. Die Zahl der Glomeruli wurde auf 1 ml hochgerechnet und das Material durch Zentrifugation (Tischzentrifuge 3000 rpm bei 4°C für 5 Minuten) pelletiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

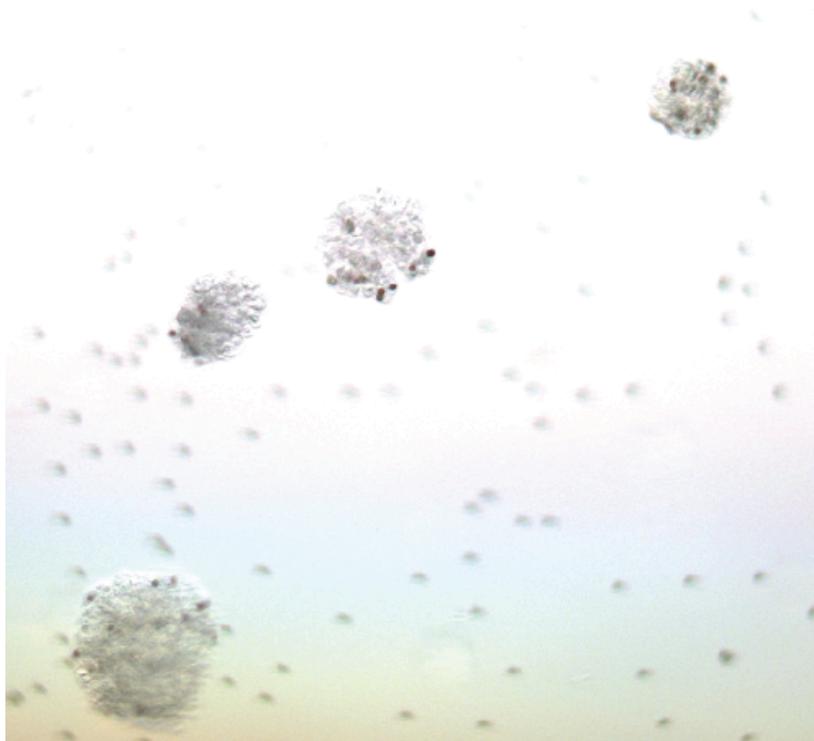


Abb. 2.4.3. Repräsentatives Isolat aus einer C57BL/6 P2X7 KO Maus. Zu sehen sind vier Glomeruli die Dyna-Beads enthalten. Die unscharfen Punkte im Hintergrund sind freie Beads.

2.4.4. Herstellung von Gefrierschnitten

2.4.4.1. Herstellung gefrorener Gewebeblöcke

Die Organe wurden entnommen, in Hälften geteilt, auf einen streifen Filterpapier gelegt und mit "Tissue Tek" überzogen. Die Organhälfte auf dem Filterstreifen wurde in n-Hexan in einem 50 ml Falcon getaucht und mit diesem in flüssigen Stickstoff für 10 Sekunden zum Gefrieren gehalten. Der in "Tissue Tek" gefrorene Gewebeblock wurde bei -80°C gelagert, bis Gefrierschnitte angefertigt wurden.

2.4.4.2. Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Gefrierblöcke wurden mit einem Tropfen "Tissue Tek" an den vorgekühlten Gewebehalter des Kryotoms befestigt und im Halter des Kryotoms eingespannt. Bei -27°C wurden die Gefrierschnitte mit einer Schnittdicke von 5 µm angefertigt und auf einen Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden bei -80°C gelagert oder für die Färbung sofort weiterverarbeitet. Bei 38°C wurden die Schnitte für 30 Minuten getrocknet, mit einem DAKO Fettstift umrandet, für 5 Minuten in 100% Aceton bei -20°C fixiert und anschließend mit PBS gewaschen.

2.4.5. Anti-Podozyten Nephritis Mausstaffel

2.4.5.1. Versuchsaufbau

Für das Experiment zur Induktion der anti-Podozyten Nephritis mit therapeutischer Modulation von P2X7 wurden insgesamt 35 C57BL/6 Mäuse in 4 Gruppen aufgeteilt. 5 Kontrollmäuse wurden mit 300 µl Präimmenserum (PIS) i.v. injiziert und im Intervall mit 1 ml 0,9% NaCl ohne Nanobody (Nb) i.p. . Drei Gruppen mit jeweils 10 Mäusen wurde 300 µl APN Serum i.v. injiziert und zur Therapie alle 3 Tage 25 µg Nb-Alb Konstrukte in 1 ml 0,9% NaCl-Lösung i.p. verabreicht. Eine Gruppe erhielt ein Dummy-Nb-Alb Konstrukt, welches nicht an P2X7 bindet, eine Gruppe das P2X7 inhibierende 13A7Nb-Alb Konstrukt sowie eine Gruppe das P2X7 agonistisch wirkende 14D5Nb-Alb Konstrukt. Die Injektion und Probengewinnung verlief nach folgendem Plan:

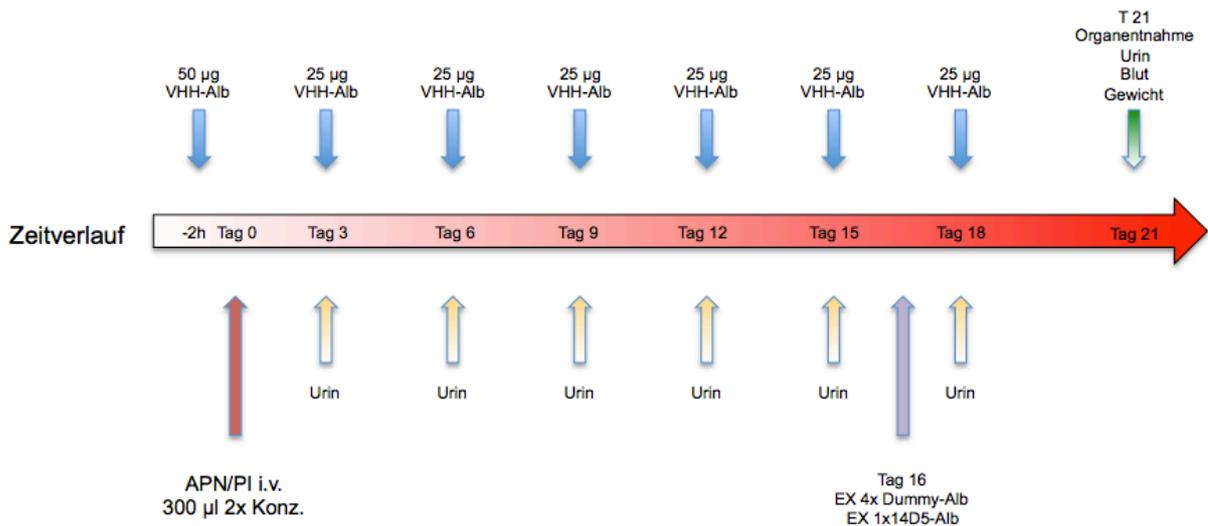


Abb. 2.4.5. Versuchsaufbau der Mausstaffel. 35 Mäuse aufgeteilt in 4 Gruppen wurden gewogen und 2 Stunden vor Induktion der anti-Podozyten Nephritis mit 50 µg Nb-Alb in 1 ml 0,9% NaCl i.p. injiziert. Prä-Immunsereum (PIS) injizierte Mäuse erhielten 1 ml NaCl ohne Nb-Alb. 5 Mäuse in der Kontrollgruppe erhielten Präimmunsereum (PIS+ 0,9% NaCl), 10 Mäuse APN + DummyNb-Alb, 10 Mäuse APN+13A7Nb-Alb, 10 Mäuse APN+14D5Nb-Alb. Alle 3 Tage (gerechnet ab Tag 0 der APN Induktion) wurden 25 µg Nb-Alb in 1 ml 0,9% NaCl i.p. als Erhaltungsdosis gespritzt, sowie im Laufe des Tages Urin zur Albuminuriebestimmung gesammelt. An Tag 16 mussten 5 Mäuse aufgrund des Allgemeinzustandes vorzeitig aus dem Experiment entfernt werden. An Tag 21 wurde das Experiment beendet und Organe, Urin sowie Blut entnommen und das Gewicht bestimmt.

Das Nb-Alb Konstrukt wurde in 1 ml 0,9% NaCl gelöst und intra peritoneal (i.p.) gespritzt. Das über eine VNaspin Konzentrationssäule 2x konzentrierte APN-/PI-Serum wurde in einem Volumen von 300 µl intravenös (i.v.) verabreicht.

Der Aufbau wurde mit einer ähnlichen Anzahl an Mäusen zweimal wiederholt.

2.4.5.2. Urinsammlung

Zur Sammlung des Urins wurden die Mäuse für bis zu 6 Stunden in Stoffwechsellkäfigen mit Wasserversorgung gehalten. Nach Ablauf der 6 Stunden wurden die Mäuse zurück in ihre Käfige gesetzt und der Urin in 1,5 ml Eppendorf-Tubes gesammelt. Ein Urinstix zur schnellbestimmung des Albumingehalts wurde angefertigt und der Urin bis zur Albumin-/Kreatininbestimmung bei -20°C gelagert.

2.4.5.3. Plasmagewinnung

An Tag 21 wurde bei Beendigung des Experimentes durch finale Blutung unter Narkose den Mäusen ca. 1 ml Blut entnommen und mit Heparin versetzt. Das Blut

wurde bei 3000 rpm bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und das Plasma im Überstand abgenommen und bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

2.4.5.4. Organentnahme für Histologie

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Nieren nach der Entnahme des Blutes unter Narkose entnommen und in Viertel geteilt. Die Nierenstücke wurden für 24 h in 4% Formalin eingelegt und am nächsten Tag in PBS eingebettet und durch die Histologieabteilung der III. Med, UKE in Paraffinblöcke gegossen.

3. Ergebnisse

Der Abschnitt Ergebnisse gliedert sich in 3 Teile. In Abschnitt **3.1** wurde die Expression von P2X7 in der gesunden und kranken Mausniere untersucht, in **3.2** wurde eine Podozytenzelllinie auf P2X7-Expression sowie dessen Funktionalität überprüft und im Abschnitt **3.3** wurde untersucht, ob eine Modulation der P2X7 Aktivität den Verlauf eines Podozytenschadens im Rahmen der anti-Podozyten-Nephritis beeinflusst.

3.1. Expression von P2X7 in der gesunden und kranken Niere

3.1.1. P2X7 wird in der Niere exprimiert

Zu Anfang konnte gezeigt werden, dass P2X7 in der Mausniere exprimiert wird. Dazu wurde ein Stück Niere einer Maus präpariert (beschrieben in **2.4.2.1.**) und mittels Westernblot (beschrieben in **2.3.6.**) auf P2X7 Expression untersucht.

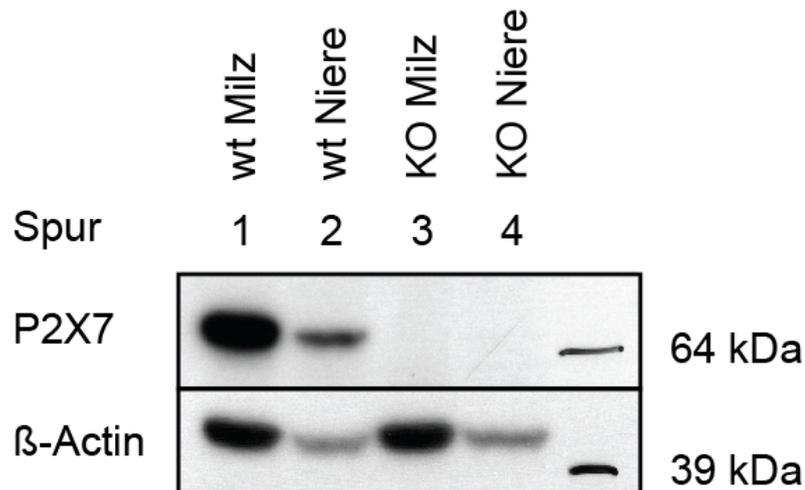


Abb. 3.1.1. P2X7 wird in der Niere exprimiert. Gewebe in T-PER Lysepuffer Mix lysiert. Proteine in Lysaten aus Milz und Niere wurden mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und auf eine PVDF Membran geblottet (je Spur 10 μ l Lysat aus 1 mg Gewebe). P2X7 wurde mit einem polyklonalen Antikörper (Kaninchen anti-P2X7 C-term, Alomone) und einem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (Esel anti-Kaninchen IgG) detektiert. Die Lysate stammen aus Spur 1: C57BL/6 WT Milz, Spur 2: C57BL/6 WT Niere, Spur 3: C57BL/6 P2X7KO Milz, Spur 4: C57BL/6 P2X7KO Niere. Die Lage der 64 kDa und 39 kDa Marker-Bande (Seebblue®Plus 2 Prestained Standard, Invitrogen) ist durch einen Strich markiert.

In **Abbildung 3.1.1** ist ein repräsentativer Westernblot aus Milz- und Gesamtnierenlysat zu sehen. Als Positivkontrolle für P2X7 wurden Lysate aus Milzen verwendet. Als negativ Kontrolle wurden Lysate einer P2X7KO Maus aufgetragen. Zur Detektion wurde der Alomone anti-C-terminale-P2X7 Antikörper verwendet. Die positiv Kontrolle zeigt eine starke Bande bei etwas über 64 kDa, welche bei der negativ Kontrolle fehlt. Die selbige Bande ist bei den Proben aus der Gesamtniere zu erkennen. P2X7 kann mittels Westernblot in der Niere einer C57BL/6 Maus nachgewiesen werden und die Größe liegt im Westernblot bei etwas über 64 kDa.

3.1.2. P2X7 kann histologisch im Glomerulum angefärbt werden

Mittels eines Nanobody-Alkalische-Phosphatase Fusionsproteins (Nb.AP) gerichtet gegen mP2X7, wurde zunächst auf HEK Zellen sowie auf Gefrierschnitten aus der Milz einer C57/B6 Maus die Färbung getestet (**Abb. 3.1.2.1**). Im Anschluss wurden Nieren von unbehandelten sowie von APN behandelten Mäusen angefärbt (Abb. 3.1.2.2.).

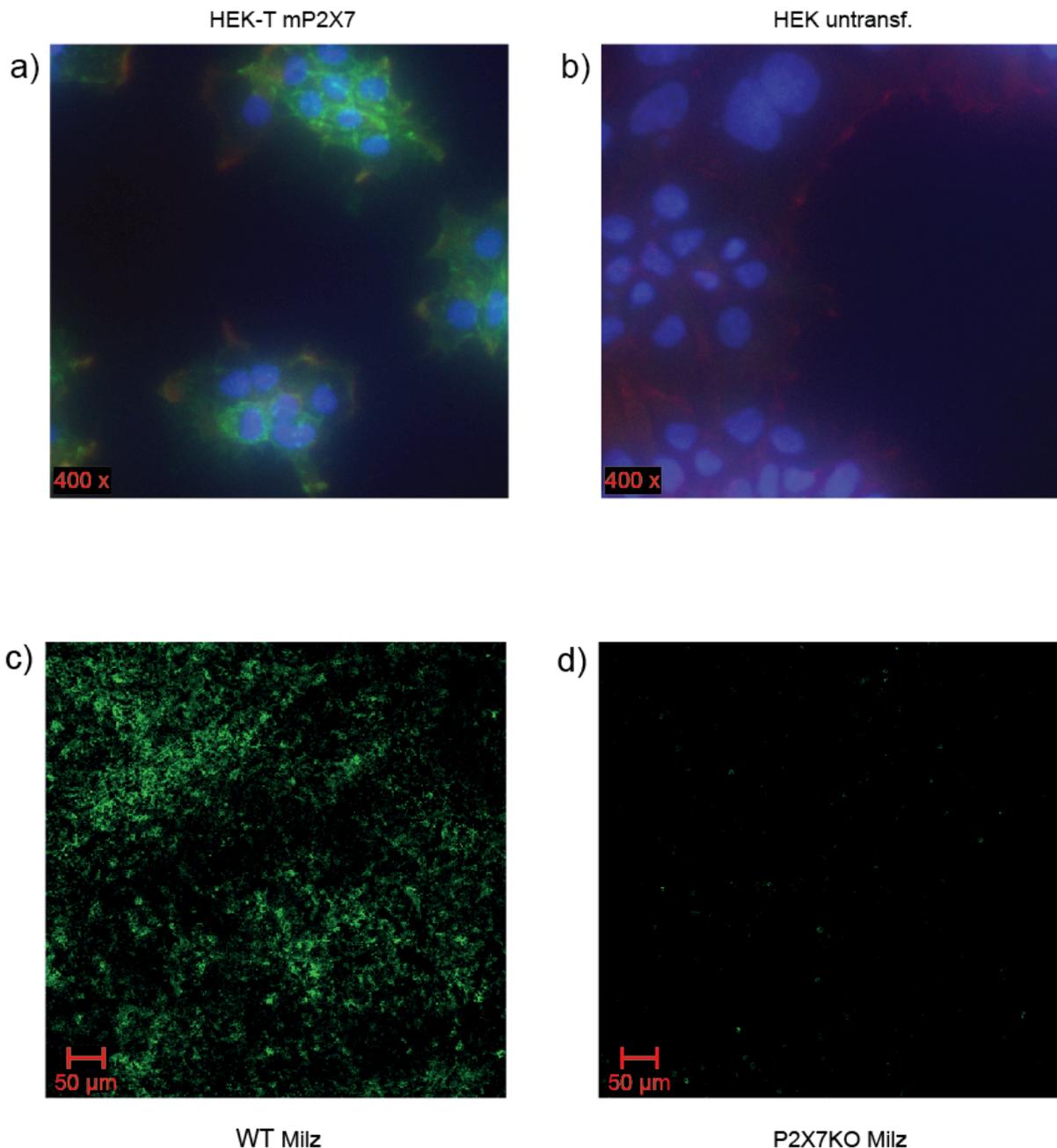


Abb. 3.1.2.1. Nanobody-alkalische-Phosphatase Fusionsprotein färbt P2X7 an. Nb.AP Fusionprotein wurde in E.Coli produziert und die Färbung mit periplasma-Lysat als primär AK in 1:100 Verdünnung durchgeführt. Als sekundär AK wurde ein Kaninchen anti- E.coli-AP (Abcam) verwendet und mittels eines AF488 gekoppelten anti-Kaninchen-IgG AK detektiert (grün). Block und Färbung wurde in 5% Pferdeserum in PBS durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einem Immunfluoreszenzmikroskop (**a**), **b**) Axiovert Zeiss) bzw. mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen (**c**), **d**) LSM Meta 510). **a**) stabil mP2X7 transfizierte HEK Zellen bzw. **b**) untransfizierte HEK Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und mit 4% PFA in PBS fixiert. Die Färbungen wurden mit primär-AK über Nacht bei 4°C sowie sekundär-AK und tertiär-AK jeweils für 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. P2X7 wurde in grün dargestellt sowie filamentäres (f)-Aktin in rot (Phalloidin) und Kernfärbung in blau (Hoechst). **c**) Milz einer unbehandelten WT Maus sowie **d**) Milz einer unbehandelten P2X7KO Maus wurden entnommen und in "Tissue-Tek" in n-Hexan in flüssig

Stickstoff gefroren. Mittels eines Kryotoms wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von 5 μ M angefertigt, 30 Minuten bei 37°C luftgetrocknet und 7 Minuten in 4% PFA fixiert. Die Färbungen wurden mit primär-AK über Nacht bei 4° sowie sekundär-AK und tertiär-AK jeweils für 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. P2X7 ist in grün dargestellt.

In **Abbildung 3.1.2.1 a)** ist eine deutliche membranäre Färbung in grün in den stabil mP2X7 transfizierten HEK-Zellen zu erkennen, welche in den in **b)** dargestellten untransfizierten HEK Zellen nicht vorhanden ist. *In vitro* erkennt das WD1c81.AP Fusionsprotein spezifisch mP2X7 membranär auf transfizierten Zellen. Auf im **c)** dargestellten Gefrierschnitt einer Milz von einer WT Maus ist ebenfalls eine am ehesten folliculäre Grünfärbung zu erkennen, welche in einer P2X7KO Milz **d)** fehlt. Die Anfärbung der vereinzelt leuchtenden Zellen in der P2X7 Ko Milz ist wahrscheinlich auf eine Hintergrund oder noch nicht geklärte Antikörperaufnahme/ -bindung zurück zu führen. Somit färbt WD1c81.AP auch *in vivo* mP2X7 in der Milz an.

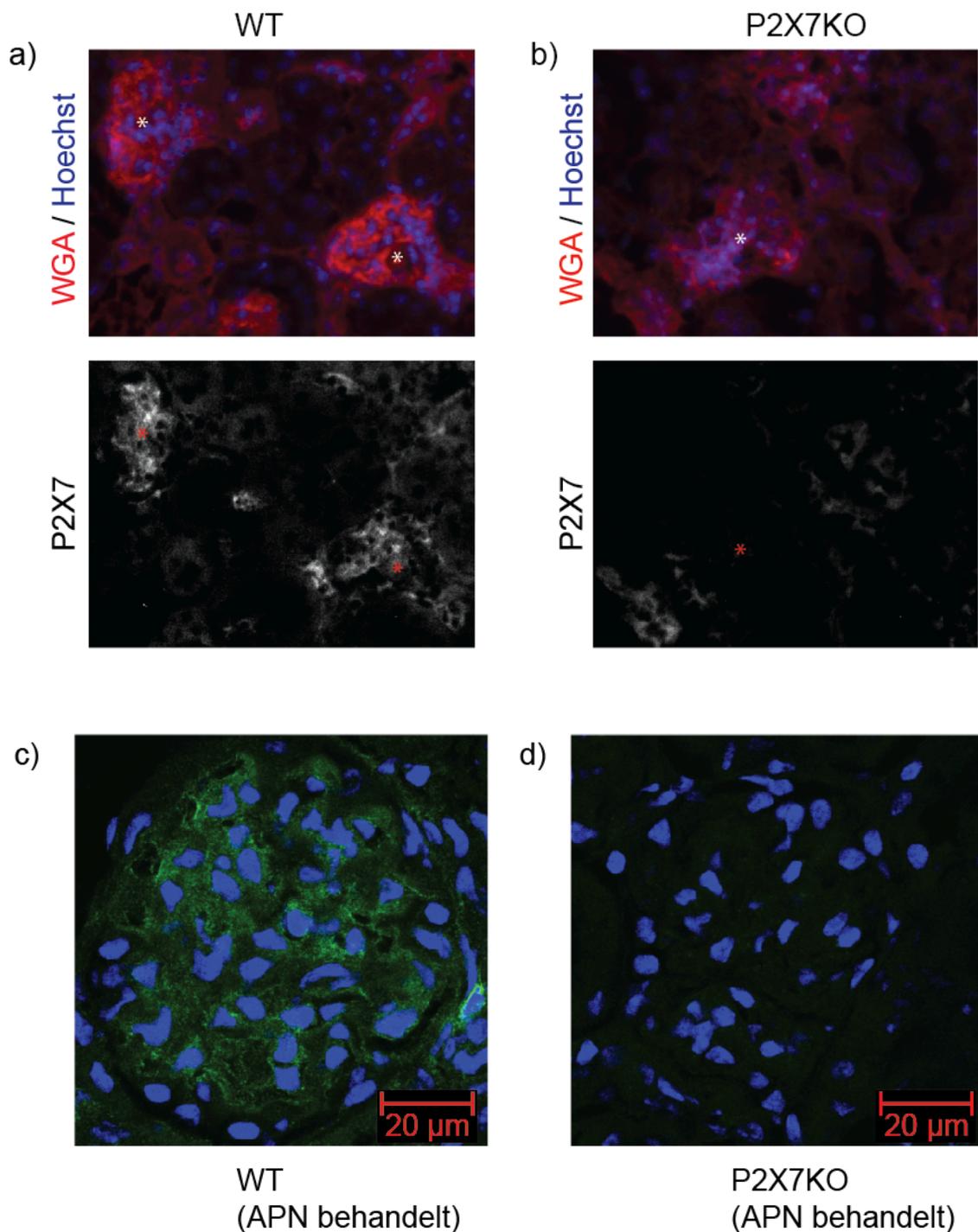


Abb. 3.1.2.2. P2X7 wird in der Niere glomerulär exprimiert. Gefrierschnitte wurden mit Nb.AP Fusionsproteinen gefärbt. Das Nb.AP Fusionsprotein wurde in E.Coli produziert und die Färbung mit periplasma Lysat als primär AK 1:100 verdünnt durchgeführt. Als sekundär AK wurde ein Kaninchen anti- E.coli AP AK (Abcam) verwendet und mittels einem AF488 gekoppelten anti Kaninchen-IgG AK detektiert (grün). Block und Färbung wurde in 5% Pferdeserum in PBS durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einem Immunfluoreszenzmikroskop (a), b) Axiovert Zeiss) bzw. mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen (c), d) LSM Meta 5, Zeiss). a) Niere einer unbehandelten WT Maus bzw. b) einer P2X7KO Maus im Gefrierschnitt angefärbt. Im oberen Bild wurde eine Färbung mit wheat germ agglutinin (WGA) in rot (Glykoproteine) und der Kerne in blau (Hoechst) zur

Glomeruliidentifizierung durchgeführt. mP2X7 wurde im unteren Bild in weiß dargestellt. Die Asterisks liegen im Bereich eines Glomerulum. c) Glomerulum einer mit APN behandelten WT bzw. d) einer APN behandelten P2X7 KO Maus. Grün = P2X7 und Blau = Kernfärbung mit TOPRO III.

Im Nierengewebe auf **Abbildung 3.1.2.2. a)** zeigt sich eine leichte Anfärbung glomerulär die in der P2X7KO Maus **b)** fehlt. Das schwache Signal ist jedoch, bedingt durch die tubuläre Autofluoreszenz im Nierengewebe, schwer zu differenzieren. Nach APN Behandlung der Mäuse ist die glomeruläre Färbung auch sehr deutlich in der WT-Maus **c)** zu erkennen, welche in der APN behandelten P2X7KO Maus fehlt. Die P2X7 Färbung ist im Glomerulum am deutlichsten und lässt sich nach APN Behandlung gut von der P2X7 KO Maus differenzieren. Welche glomerulären Zellen P2X7 positiv sind, kann zurzeit noch nicht geklärt werden. Das Färbemuster in der konfokalen Mikroskopie zeigt mehr eine membranäre als eine zytoplasmatische Färbung, und geht über einen spezifischen Zelltyp hinaus, da die gefärbten Zellen an verschiedenen Orten im Glomerulum lokalisiert sind. Somit exprimieren möglicherweise neben Podozyten auch Mesangialzellen und weitere Zellen mP2X7.

3.1.3. P2X7 Expression ist glomerulär im APN-Modell erhöht

Um eine P2X7 Expression im Glomerulum genauer zu untersuchen und den Expressionsgehalt unter Einfluss von Entzündung zu untersuchen, wurde in einer Gruppe von Mäusen eine Glomerulonephritis mittels Injektion von anti-Podozyten-Nephritis Serum induziert. Der Kontrollgruppe wurde Prä-Immunsereum verabreicht. Nach 14 Tagen, bei mittels U-Stix nachweisbarer beginnender Proteinurie, wurden Glomeruli mittels magnetische Dyna-Beads isoliert (siehe **2.4.3.**) und anschließend im Westernblot (**2.3.6.**) auf mP2X7 Gehalt untersucht.

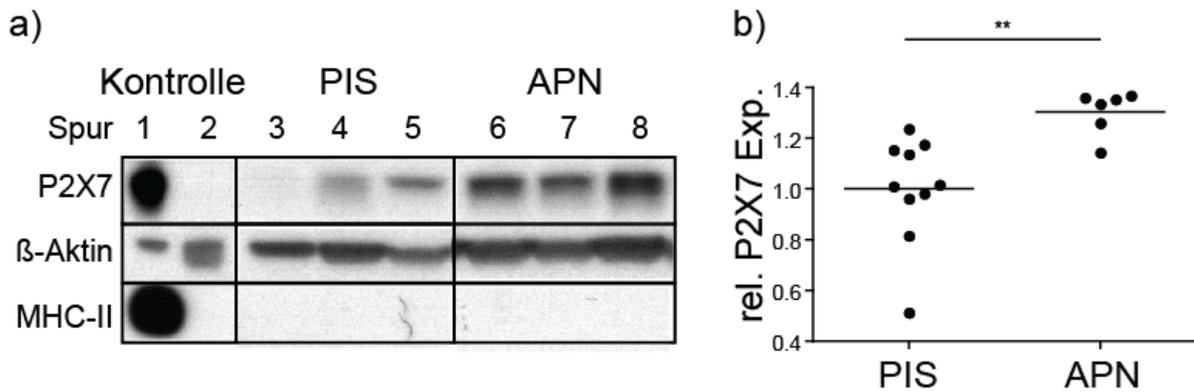


Abb. 3.1.3. Erhöhte glomeruläre P2X7 Expression nach APN Behandlung. Zellen und Gewebe wurde mittels T-PER Lysepuffer Mix lysiert. Proteine aus Lysaten wurden mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und auf eine PVDF Membran geblottet (je Spur 10 μ l Lysat (enthält 1 mg lysiertes Gewebe) (Milz-Kontrolle), 104 HEK Zellen, bzw. aus 250 Glomeruli). P2X7 wurde mit einem polyklonalen Antikörper (Kaninchen anti-P2X7 C-term, Alomone) und einem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (Esel anti-Kaninchen IgG) detektiert. MHC-II wurde mit einem polyklonalen Antikörper (Ratte anti MHC-II , Dianova) und einem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (Ziege anti-Ratte-IgG) detektiert. a) Repräsentativer Blot auf P2X7 sowie MHC-II. Die Lysate stammen aus Spur 1: Milz wt Maus; Spur 2: untransf. HEK Zellen; Spur 3 - 5: Glomeruli PIS behandelte WT Mäuse; Spur 6 - 8: Glomeruli APN behandelte WT Mäuse. b) vereinigte P2X7 Densitometrie-Daten aus 2 Experimenten, normalisiert auf den Mittelwert der PIS behandelte Mäuse = 1. ** = $p < 0.01$ two-tailed t-Test

In **Abbildung 3.1.3.** sind die Ergebnisse aus den Westernblot-Untersuchungen zu sehen. **Abbildung 3.1.3. a)** zeigt einen repräsentativen Blot aus isolierten Glomeruli. Es ist zu sehen, dass das P2X7-Signal unter APN-Behandlung deutlich zunimmt. Als einen Marker für möglicherweise in den entzündeten Glomeruli eingewanderte Immunzellen wurden die Proben auf MHC-II untersucht. Da kein Signal im Westernblot für MHC-II zu erkennen ist, kann davon ausgegangen werden, dass das P2X7-Signal nicht von möglicherweise MHC-II exprimierenden Zellen stammt. In **Abbildung 3.1.3. b)** sind die Densitometriedaten aus 2 Experimenten vereinigt und auf den Mittelwert der jeweiligen PIS Gruppe normalisiert. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der P2X7-Expression in den isolierten Glomeruli der APN behandelte Tiere im Westernblot.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass P2X7 mittels Westernblot und Immunfluoreszenz-Färbung im Glomerulum nachgewiesen werden kann und dass die Expression glomerulär nach APN-Behandlung ansteigt.

3.2. Expression und Funktion von P2X7 in kultivierten Podozyten

Um die Expression genauer zu lokalisieren und die mögliche Funktion von P2X7 in der Niere bzw. im Podozyten zu untersuchen, wurden weitere Experimente mit einer Podozyten-Zelllinie *in vitro* durchgeführt. Es folgen in 3.2 die Ergebnisse der Experimente, welche mit der E11 Endlich Podozyten-Zelllinie erhoben wurden.

3.2.1. P2X7 wird von kultivierten Podozyten exprimiert

Zum Nachweis von P2X7 Protein in kultivierten ausdifferenzierten Podozyten wurden Westernblots (wie in 2.3.6 beschrieben) aus Zelllysaten durchgeführt. Zellpellets wurden wie in 2.2.1 beschrieben gewonnen. P2X7 wurde mittels eines polyklonalen Antikörpers (Kaninchen anti-P2X7 C-term, Alomone) detektiert. Als Ladekontrolle wurde das Housekeeper-Protein β -Aktin mittels Maus anti- β -Aktin primär-AK als Reprobe auf der selben Membran detektiert. Die Positivkontrolle wurde 1:1000 verdünnt, da eine sehr starke Expression in den mP2X7 transfizierten HEK-Zellen bereits bekannt war.

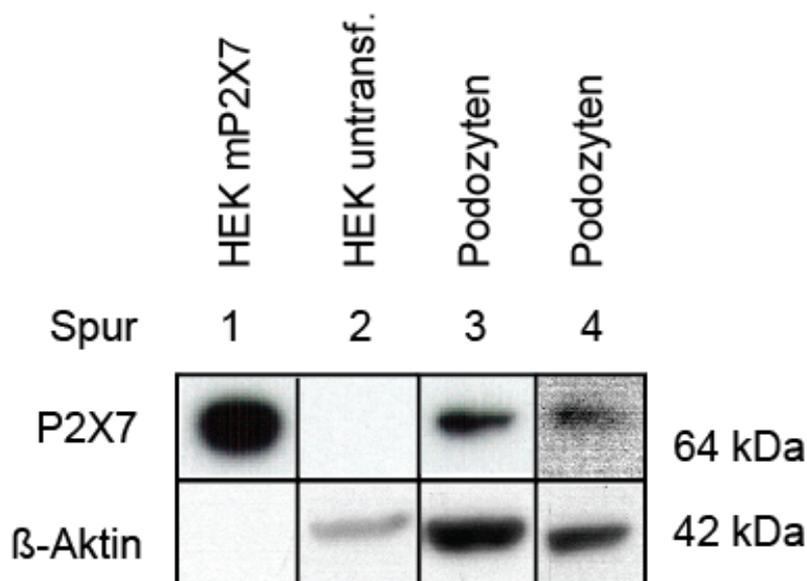


Abb. 3.2.1. P2X7 wird in kultivierten Podozyten exprimiert. Zellen wurden in T-PER Lysepuffer Mix lysiert. Proteine aus Lysaten wurden mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und auf eine PVDF Membran geblotet (je Spur 10 μ l Lysat aus $2 \cdot 10^3$ HEK mP2X7, 10^5 untransfizierte HEK und $2 \cdot 10^5$ PZ Zellen). mP2X7 wurde mit einem polyklonalen Antikörper (Kaninchen anti-P2X7 C-term, Alomone) und einem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (Esel anti-Kaninchen IgG) detektiert. Die Lysate stammen aus Spur 1: HEK-T stabil transfiziert mit mP2X7; Spur 2: untransfizierte HEK Zellen; Spur 3: kultivierte E11-Podozyten; Spur 4: kultivierte Mundel Podozyten.

Abbildung 3.2.1. zeigt einen repräsentativen Westernblot. Die positiv Kontrolle aus stabil mit maus P2X7 transfizierten HEK-T Zellen zeigt eine prominente Bande über 64 kDa welche bei der negativ Kontrolle (untransf. HEK-Zellen) nicht vorhanden ist. Auf gleicher Höhe ist ebenfalls eine Bande bei der Probe aus kultivierten E11 Podozyten und Mundelpodozyten zu sehen. Die Ladekontrolle ist bei der Positivkontrolle aufgrund der Verdünnung nicht zu sehen. In verschiedenen kultivierten Podozyten-Zelllinien ist mP2X7-Protein mittels Westernblot nachweisbar und läuft knapp über 64 kDa.

3.2.2. P2X7 kann aus kultivierten Podozyten immunpräzipitiert werden

Um sicherzustellen, dass das im Westernblot in **3.2.1** nachgewiesene Protein mP2X7 ist, wurde das Protein mittels einer in unserem Labor bereits etablierten Immunopräzipitations-Methode via einer Aminolink-Matrix, an die ein Antikörper gegen mP2X7 gekoppelt ist, präzipitiert. Das präzipitierte Protein wurde mittels Westernblot auf mP2X7 untersucht.

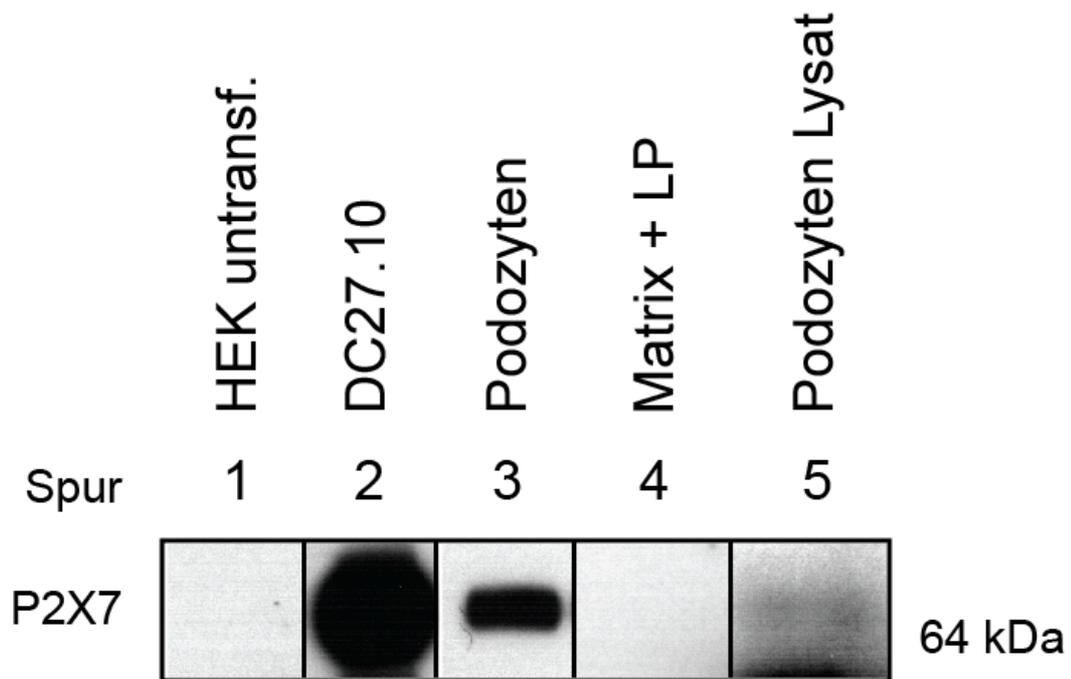


Abb. 3.2.2. P2X7 kann aus EPZ immunopräzipitiert werden. Zellen wurden in T-PER Lysepuffer Mix lysiert. 1,5 ml Lysat aus 10^7 Zellen bzw $0.5 \cdot 10^7$ DC27.10 Zellen wurde über Nacht mit 15 μ l Aminolink Matrix, gekoppelt mit anti-P2X7-AK (RH24), inkubiert. Das gebundene Protein wurde durch Kochen der Matrix mit 15 μ l 2xLDS+DTT Laufpuffer bei 72°C für 15 Minuten gelöst. Mittels SDS-Page wurde das präzipitierte Protein größenfraktioniert und auf eine PVDF-Membran geblottet. P2X7 wurde mit einem polyklonalen Antikörper (Kaninchen anti-P2X7 C-term, Alomone) und einem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (Esel anti-Kaninchen IgG) detektiert. Die Lysate stammen aus Spur 1: untransf. HEK Zellen; Spur 2: DC27.10 Zellen; Spur 3: E11 Podozyten; Spur 4: Matrix, die mit reinem Lysepuffer inkubiert wurde; Spur 5: E11 Podozyten Zelllysate vor Immunopräzipitation.

In **Abbildung 3.2.2.** ist ein repräsentativer Westernblot aus dem Präzipitationsmaterial dargestellt. In Spur 2 (DC27.10) sowie Spur 3 (Podozyten) ist eine starke mP2X7-Bande bei etwas über 64 kDa zu erkennen. Die Höhe entspricht dem Westernblot in 3.1.1. Die Bande stammt weder von der Matrix oder dem Lysepuffer (Spur 4). Bei längerer Belichtung ist die Bande ebenfalls im Podozyten-Lysat zu erkennen, welche jedoch durch die höhere Verdünnung nur schwach sichtbar ist. Das Präzipitat der Negativkontrolle in Spur 1 ist negativ. Die Präzipitation erhöht die Spezifität des Westernblotverfahrens und bestätigt, dass es sich bei dem in 3.2.1 nachgewiesene Protein um mP2X7 handelt.

3.2.3. Podozyten reagieren auf ATP Stimulation mit Kalzium-Einstrom

Um eine Aktivierung von P2X7 direkt darzustellen, wurde mittels Live-Cell-Imaging der ATP getriggerte Einstrom von Calcium in FURA-2 beladenen E11 Podozyten gemessen. Das Imaging-Experiment wurde wie in 2.2.5. beschrieben in Kooperation mit Dr. Ralf Fliegert AG Guse durchgeführt.

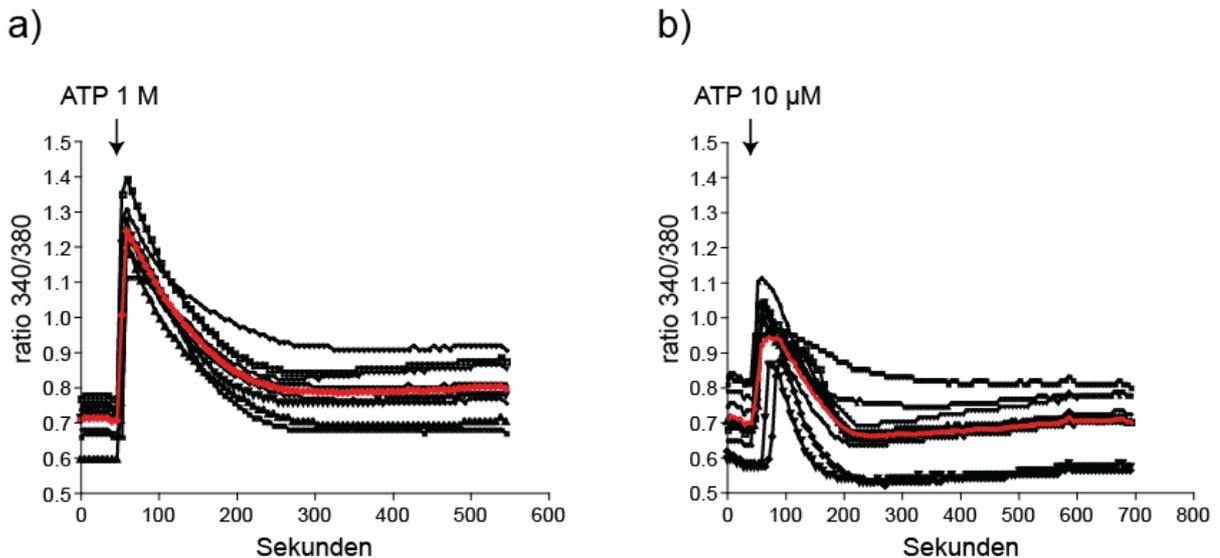


Abb. 3.2.3.1. Podozyten reagieren auf niedrige ATP Konzentration über P2Y-Rezeptoren. $5 \cdot 10^4$ E11 Podozyten wurden in einer Petrischale mit Glasboden über Nacht kultiviert. Im Medium wurden die Podozyten 15 - 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur durch Zugabe von $4 \mu\text{M}$ FURA-2 beladen. Im Anschluss wurden die Zellen mit ECS Puffer gewaschen und die Messung in ECS durchgeführt. Durch Zugabe von 1 mM bzw. $10 \mu\text{M}$ ATP zum Zeitpunkt, der mit einem Pfeil markiert ist, wurde die Stimulation gestartet und der Einstrom mittels Messung der Veränderung der Fluoreszenz in den Wellenlängen 340/380 nm gemessen. Die schwarzen Linien stellen einzelne Zellen als Individuum während der Messung dar, die rote Linie bildet den Mittelwert aus allen Zellen innerhalb des Messdurchgangs. **a)** Stimulation mit 1 mM ATP **b)** Stimulation mit $10 \mu\text{M}$ ATP.

Abbildung 3.2.3.1 zeigt die Messwerte des Calcium-Einstroms. **Abbildung 3.2.3.1 a)** zeigt die Reaktion auf Stimulation mit 1 mM ATP. Die Zellen reagierten mit einem kurzen, starken Einstrom von Calcium, welcher nach dem initialen Höhepunkt innerhalb von ca. 100 Sekunden wieder abnahm. Um zu überprüfen, ob dieser Einstrom P2Y-Vermittelt aus intrazellulären Calcium-Reservoirs stammt, wurden die Zellen in **3.2.3.1 b)** mit $10 \mu\text{M}$ ATP stimuliert, eine Konzentration die P2Y aktiviert, für P2X7 jedoch zu gering ist um den Schwellenwert zur Aktivierung zu überschreiten. Auch hier zeigt sich ein, wenn auch geringerer, Einstrom von Calcium, welcher auf einen starken Effekt des P2Y schließen lässt.

Um den P2Y Effekt auszuschalten, wurden die Zellen vor ATP Stimulation mit 2-ABP, einem irreversiblen P2Y-Antagonist vorinkubiert.

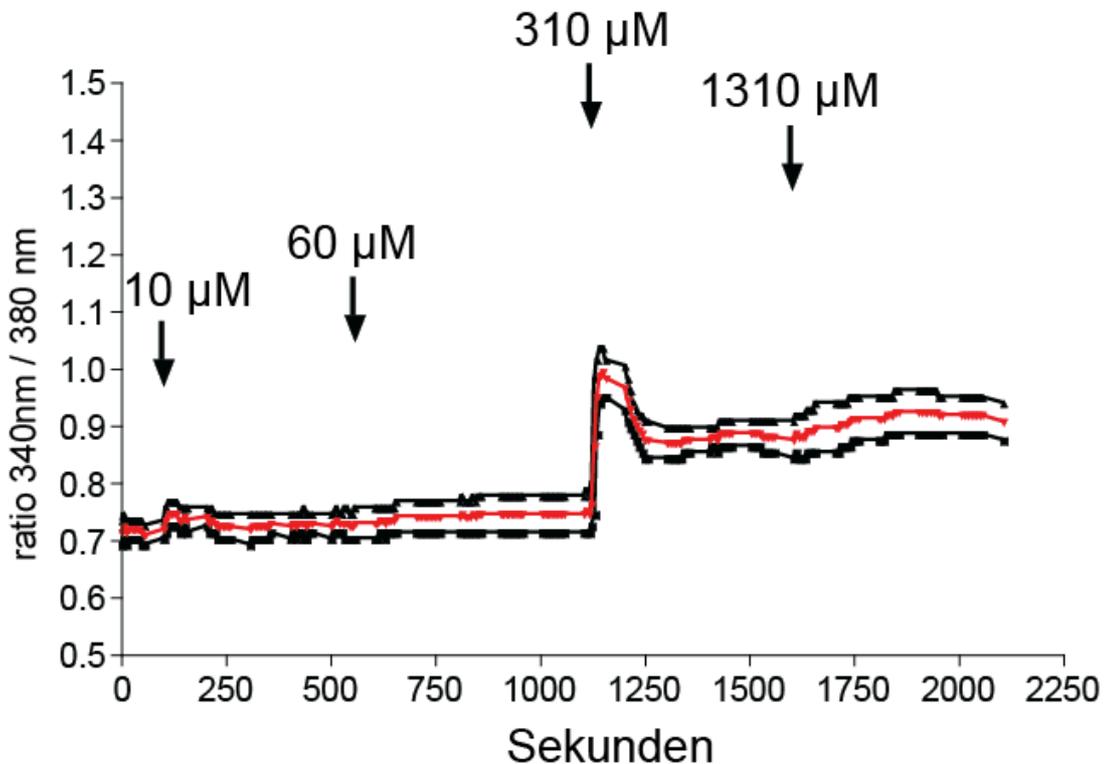


Abb. 3.2.3.2. Podozyten reagieren auf ATP Stimulation über nicht-P2Y Rezeptoren. $5 \cdot 10^4$ E11 Podozyten wurden in einer Petrischale mit Glasboden über Nacht kultiviert. Im Medium wurden die Podozyten 15 - 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur durch Zugabe von $4 \mu\text{M}$ FURA-2 beladen. Im Anschluss wurden die Zellen mit ECS Puffer gewaschen und die Messung in ECS durchgeführt. Vor Zugabe des ATP wurde durch Zugabe von $50 \mu\text{M}$ 2-ABP P2Y irreversibel inhibiert. Durch Zugabe von steigenden Konzentrationen ATP zum Zeitpunkt, der mit einem Pfeil markiert, ist wurde die Stimulation gestartet und der Einstrom mittels Messung der Veränderung der Fluoreszenz in den Wellenlängen 340/380 nm gemessen. Die schwarzen Linien Stellen einzelne Zellen als Individuum während der Messung dar, die rote Linie bildet den Mittelwert aus allen Zellen innerhalb des Messdurchgangs.

Abbildung 3.2.3.2 zeigt die Messung des Calcium-Einstroms in kultivierten Podozyten nach P2Y-Inhibition. Es ist zu erkennen, dass nach Inkubation mit 2-ABP sowohl nach Stimulation mit $10 \mu\text{M}$ als auch $60 \mu\text{M}$ kein Einstrom von Calcium zu beobachten war. Bei Stimulation mit $310 \mu\text{M}$ war ein Calcium-Einstrom zu beobachten, welcher kurz darauf abnimmt und bei einem Plateau verweilt. Dieser Einstrom wurde durch erneute Hinzugabe von höheren Konzentration von ATP erneut minimal verstärkt. Eine Stimulation bei diesen ATP Konzentrationen entspricht

eher einem P2X7-vermitteltem Calcium-Einstrom. Podozyten reagieren auf ATP-Stimulation mit einem Calcium-Einstrom, welcher nicht durch P2Y vermittelt wird.

3.2.4. Podozyten reagieren auf ATP Stimulation mit ERK1/2 Phosphorylierung

Als indirekter Parameter zur Funktionsmessung von mP2X7 in E11 Podozyten wurde die Phosphorylierung der MAP-Kinasen p42/44 (ERK1/2) nach Stimulation mit ATP im Westernblot gemessen. Kultivierte Podozyten wurden wie in 2.2.3. beschrieben, unter Inhibition der P2Y-Rezeptoren durch 2-APB, mit ATP stimuliert und der Effekt des P2X7 Antagonisten A438079 untersucht. Lysate der Zellen wurden im Westernblot auf ERK1/2 und pERK1/2 untersucht.

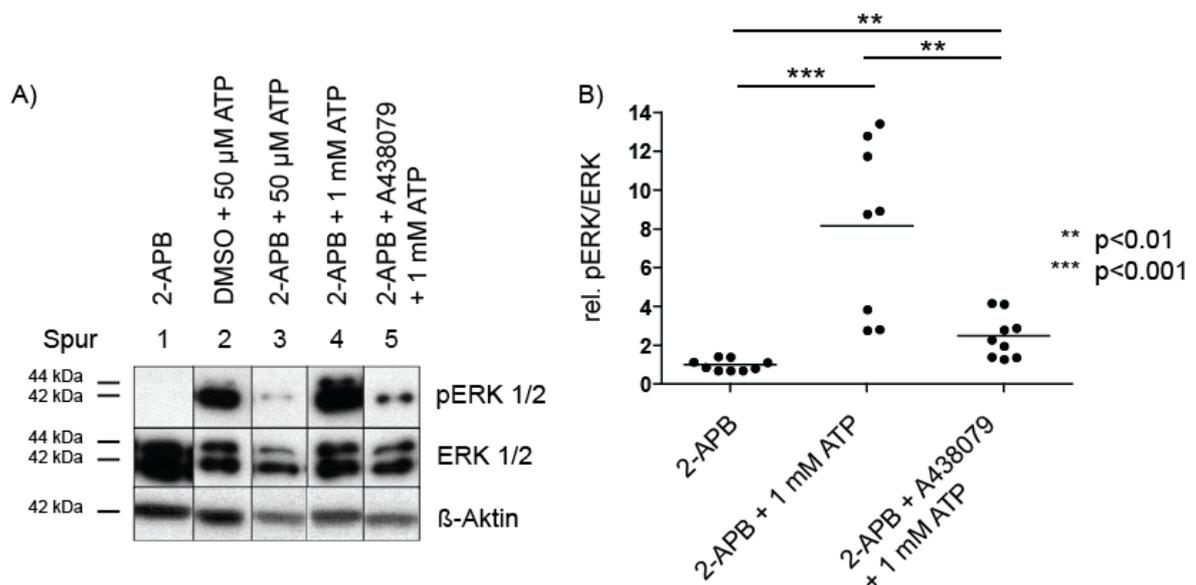


Abb. 3.2.4.1. E11-Podozyten reagieren auf ATP mit verstärkter ERK1/2 Phosphorylierung. Kultivierte Podozyten wurden bei 38°C ausdifferenziert und 104 Zellen pro well in eine 24-well Platte überführt. Die Zellen wurden zum Experiment in 500 μl pro well serumfreien Medium gehalten. Anschließend wurden die Zellen 15 Minuten mit 10 μM A438079 (Abcam) bzw. 5 Minuten mit 50 μM 2-APB (Sigma) bei 38°C im Brutschrank vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurden die Zellen durch Zugabe von 50 μM bzw. 1 mM ATP bei 38°C im Brutschrank für 5 Minuten stimuliert. Nach Beendigung der Stimulation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und die Lyse mit 50 μl T-PER Lysepuffer erfolgte im Well auf Eis für 20 Minuten. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Eppi überführt und bei 13.000 rpm 30 Minuten runterzentrifugiert um ggf. vorhandene Zellreste zu entfernen. Das Lysat wurde anschließend vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppi überführt. Das Lysat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. A) Repräsentativer Westernblot: Das im Lysat vorhandene Protein wurde mittels SDS-Page größenfraktioniert und auf eine PVDF-membran geblottet. pERK wurde mittels anti-p-

p42/44 (Cell Signalling) und einem peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (Esel anti Kaninchen) detektiert. ERK wurde mittels anti-p42/44 (Cell Signalling) und einem peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (Esel anti Kaninchen) detektiert. Spur 1: E11-PZ + 2-APB only; Spur 2: E11-PZ + DMSO + 50 μ M ATP; Spur 3: E11-PZ + 2-APB + 50 μ M ATP; Spur 4: E11-PZ + 2-APB + 1mM ATP; Spur 5: E11-PZ + 2-APB + A438079 + 1mM ATP. B) Densitometrische Auswertung der Westernblots n=26. Asterisks ** = $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ two tailed t-test

In **Abbildung 3.2.4.1 A)** sind repräsentative Banden aus den Westernblots dargestellt. Spur 1 zeigt den Grad der Phosphorylierung von ERK1/2 ohne Stimulation mit ATP. In Spur 2 und 3 ist zu erkennen, dass eine Phosphorylierung bei 50 μ M ATP stattfindet (Spur 2), welche durch Inhibition der P2Y Kanäle mittels Zugabe von 50 μ M 2-APB verhindert werden kann (Spur 3). Spur 4 zeigt, dass eine Steigerung der ATP Konzentration auf 1 mM ATP in Anwesenheit von 2-APB erneut zu einer Phosphorylierung führt. Diese Phosphorylierung ist durch den spezifischen P2X7-Antagonisten A438079 (Abcam) inhibierbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass kultivierte E11 Podozyten ein funktionell aktives P2X7 besitzen, welches durch Stimulation mit ATP zur Phosphorylierung von ERK1/2 führt.

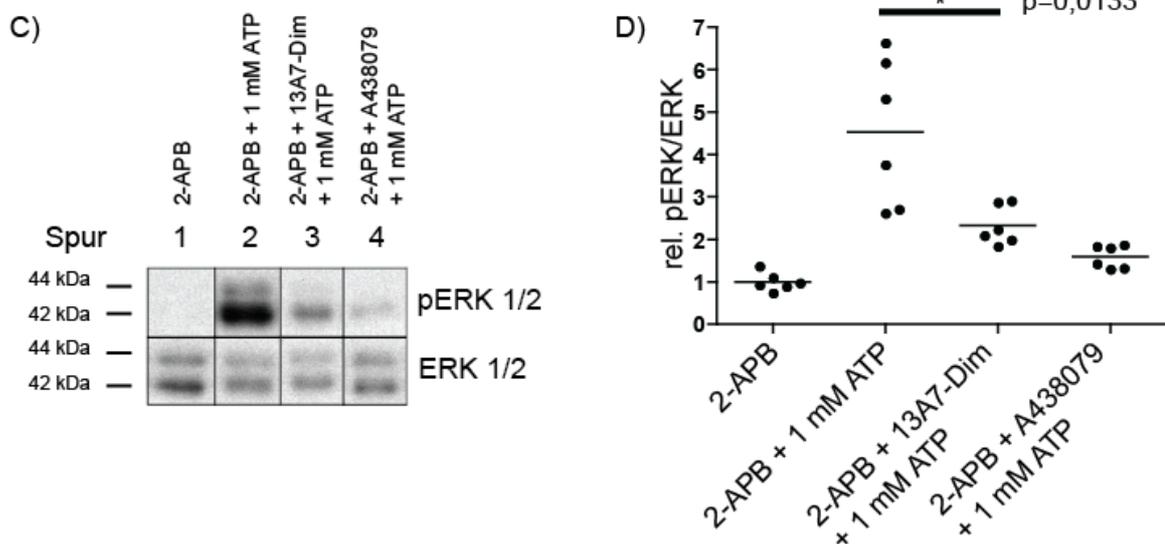


Abb. 3.2.4.2. MPZ haben ein funktionell aktives P2X7 das durch 13A7 ebenfalls inhibiert werden kann. Kultivierte MPZ wurden bei 38°C ausdifferenziert und 5*10³ Zellen pro well in eine 24-well Platte überführt. Die Zellen wurden zum Experiment in 500 μ l pro well serumfreien Medium gehalten. Anschließend wurden die Zellen 15 Minuten mit 10 μ M A438079 (Abcam) oder 2 μ g/ml 13A7Nb-Dimer (Ag Nolte) und 50 μ M 2-APB (Sigma) bei 38°C im Brutschrank vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurden die Zellen durch Zugabe von 1 mM ATP bei 38°C im Brutschrank für 5 Minuten stimuliert. Nach Beendigung der Stimulation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und die Lyse mit 50 μ l T-PER Lysepuffer erfolgte im Well auf

Eis für 20 Min. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Eppi überführt und bei maximaler Geschwindigkeit 30 Minuten runterzentrifugiert um ggf. vorhandene Zellreste zu entfernen. Das Lysat wurde anschließend vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppi überführt. Das Lysat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. A) repräsentativer Westernblot: Das im Lysat vorhandene Protein wurde mittels SDS-Page größenfraktioniert und auf eine PVDF-membran geblottet. pERK wurde mittels anti-p-p42/44 Cell Signalling und einem peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (Esel anti Kaninchen) detektiert. ERK wurde mittels anti-p42/44 Cell Signalling und einem peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (Esel anti Kaninchen) detektiert. Spur 1: MPZ + 2-APB only; Spur 2: MPZ + 2-APB + 1 mM ATP; Spur 3: MPZ + 2-APB + 13A7Nb-Dimer + 1 mM ATP; Spur 4: MPZ + 2-APB + A438079 + 1 mM ATP. B) Densitometrische Auswertung des Westernblots n=1. Asterisk * = $p < 0.05$, two tailed t-test

Der gleiche Versuchsaufbau in Abbildung 3.2.4.2 wie in Abbildung 3.2.4.1 soll zeigen, dass die Reaktion der Podozyten auf ATP nicht nur auf eine spezifische Podozytenzelllinie beschränkt ist. **Abbildung 3.2.4.2 C)** zeigt, dass kultivierte MPZ auf ATP Stimulation ebenfalls mit einer Phosphorylierung von ERK1/2 reagieren (Spur 2). Diese Phosphorylierung ist mit A438079 deutlich hemmbar (Spur 3). Zusätzlich wurde 13A7-Nb als Dimer eingesetzt. Wie A438079 führte dieser spezifische mP2X7 Antagonist zu einer deutlichen Reduzierung der ERK1/2 Phosphorylierung (Spur 4). **D)** zeigt die densitometrische Auswertung eines Versuches in dem 3 Ansätze als Tripletten untersucht wurden. Diese Daten zeigen, dass neben E11-Podozyten auch MPZ ein funktionell aktives P2X7 besitzen, welcher neben A438079 auch mit 13A7-Nb-Dimeren inhibiert werden kann.

3.3. P2X7 als therapeutisches Ziel in der Anti-Podozyten Nephritis (APN)

In diesem Abschnitt geht es um mP2X7 als mögliches therapeutisches Ziel in der anti-Podozyten Nephritis. In diesem Tiermodell wurde der Einfluss von mP2X7 Modulation durch HLE Nanobody Konstrukte, in diesem Fall Nanobody-anti-Albumin Fusionsproteine, untersucht. Als Erstes wird die Wirkung von HLE Nanobodys *in vitro* demonstriert. Dazu wurden selbst hergestellte HLE Konstrukte verwendet, die mit einer mFc Domäne fusioniert wurden, um eine Steigerung der Serum-Halbwertszeit zu erhalten. Im Anschluss wird die Wirkung im Krankheitsmodell analysiert. Dazu wurde die APN und Behandlung wie in Material und Methoden beschrieben induziert und verschiedene Krankheitsparameter untersucht, die einen Rückschluss auf den podozytären Schaden erlauben.

3.3.1. Nanobody-Fc Fusionsproteine binden an mP2X7 in vitro

Der Bindungs-Assay soll untersuchen ob die Nanobody-mFc Fusionsproteine als Form von HLE Nanobodys an mP2X7 binden. Die Nanobody-mFc Fusionsproteine wurden in transient transfizierten HEK-T 293 Zellen produziert. Die Nanobody-mFc Fusionsproteine aus dem Überstand wurden mit transient mP2X7 transfizierten HEK-T 293 Zellen inkubiert und die Bindung anschließend mittels fluochromkonjugierten anti-mIgG.PE AK im FACS detektiert.

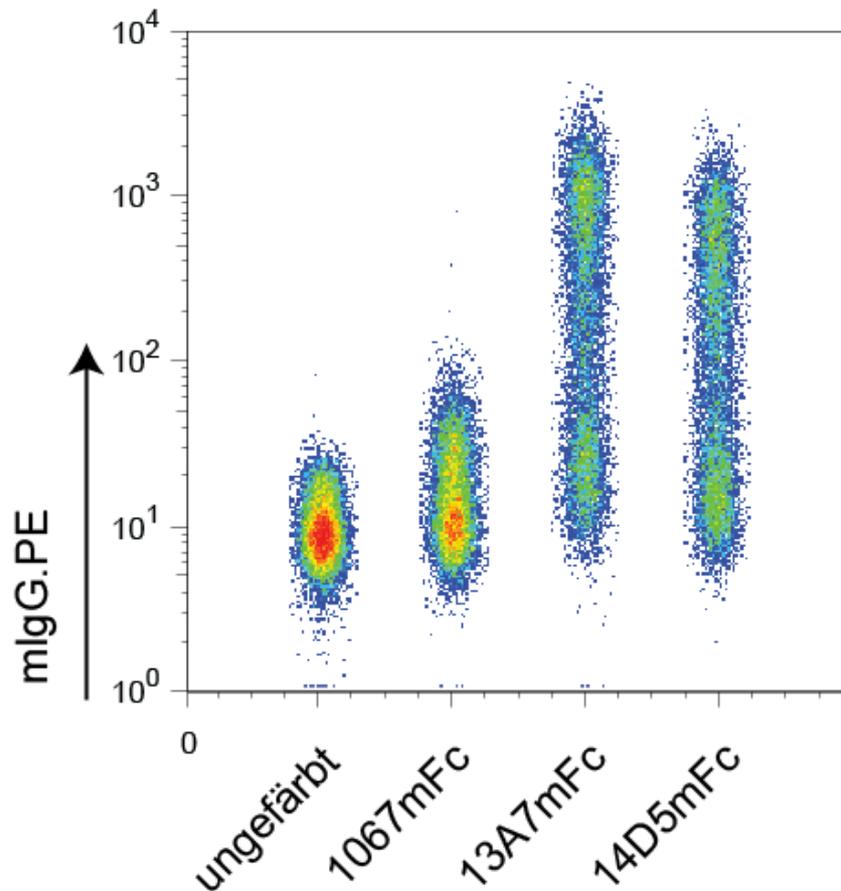


Abb. 3.3.1. Nanobody-mFc Fusionsproteine binden an mP2X7. Transient mit mP2X7 transfizierte HEK Zellen wurden 20 Minuten mit Überständen Nanobody-Fc Fusionsprotein produzierender Zellen inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS+FCS wurde eine Bindung des Nanobody-mFc Fusionsproteins an mP2X7 durch Anfärbung des mFc-Teils mittels fluorochrom-konjugiertem anti-mIgG-PE AK für 20 Minuten im Dunkeln auf Eis und anschließender Analyse im FACS detektiert. Die X-Achse zeigt das verwendete Nanobody-mFc Fusionsprotein bzw. ungefärbt zeigt eine Probe, welche ohne Antikörper inkubiert wurde und als negativ Kontrolle diente. Die Y-Achse zeigt die Intensität auf PE welches hier die Anfärbung auf mIgG darstellt.

Die FACS-Analyse in **Abbildung 3.3.1** zeigt vier repräsentative Proben in ihrer Anfärbung gegen mIgG aufgetragen auf der Y-Achse. Die "unstained" Probe zeigt die Autofluoreszenz von HEK Zellen ohne Behandlung mit anti-mIgG.PE AK. Die Probe "1067mFC" zeigt, dass die Population von transient mit mP2X7 transfizierten HEK-T Zellen bei Inkubation mit der 1067mFc-Isotyp Kontrolle, einem Nb.mFc Konstrukt welches nicht an mP2X7 binden soll, sich kaum von der unstained Probe unterscheidet und als negativ für mIgG Bindung angesehen werden kann. Die Proben 13A7mFc und 14D5mFc zeigen jeweils eine negative und eine positive Subpopulation. Die negative Subpopulation erklärt sich durch die Transfektionseffizienz, welche nicht 100% betrug. Die mIgG.PE positive Subpopulation zeigt die erfolgreiche Bindung des Nanobody-mFc Fusionsproteins an mP2X7 und damit verbundene Anfärbbarkeit mittels anti-mIgG.PE AK. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die Fusionsproteine 13A7mFc und 14D5mFc an mP2X7 binden.

3.3.2. 13A7 und 14D5 Nanobodies beeinflussen die P2X7-Aktivität in vitro

Der Funktions-Assay wurde durchgeführt (beschrieben in **2.2.8**) um den agonistischen bzw. antagonistischen Effekt der neu klonierten Nanobodies zu zeigen. Kultivierte YAC-1 Lymphomzellen (besitzen viel funktionell aktives mP2X7) wurden mit aufgereinigtem Nanobody-mFc Fusionsprotein vorinkubiert und anschließend mit ATP bei 37°C weiterinkubiert. Die durch ATP ausgelöste, P2X7-abhängige Abspaltung des Oberflächenproteins CD62L, wurde als readout verwendet, um die Modulation von P2X7 durch die Nanobodies zu messen.

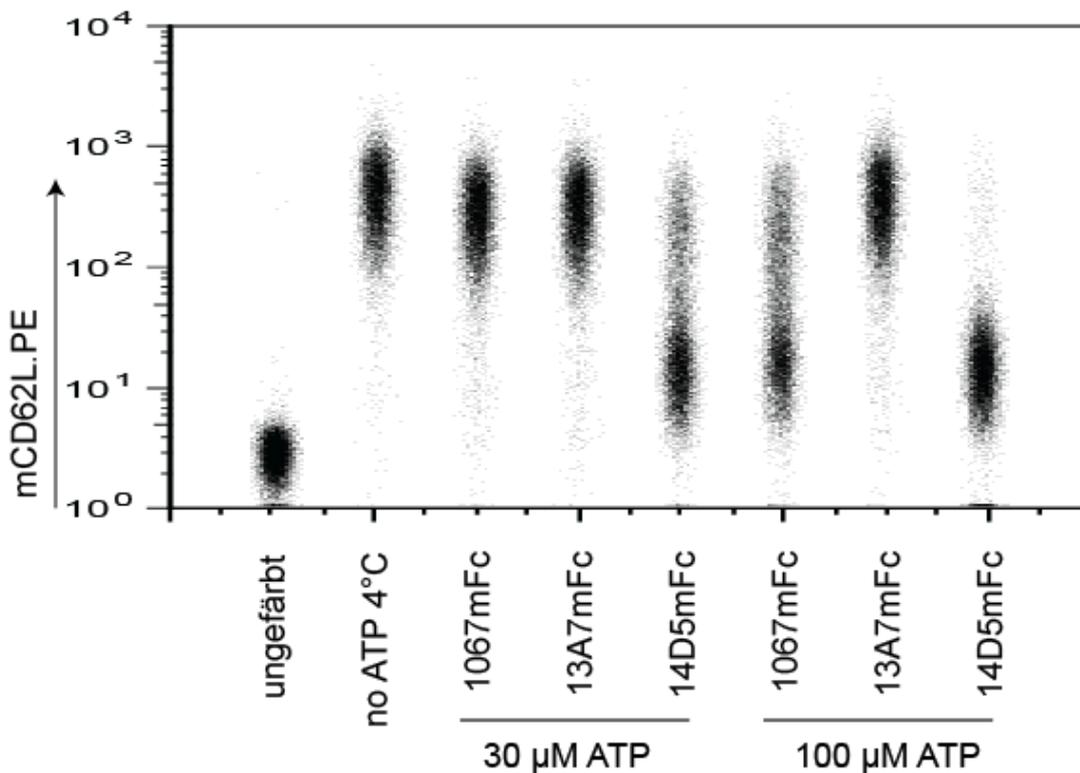


Abb. 3.3.2. 13A7 und 14D5 Nanobodies blockieren bzw. verstärken die ATP-induzierte Aktivierung von P2X7 auf YAC-1 Lymphomzellen. YAC-1 Zellen wurden mit Nanobody-mFc Fusionsproteinen für 20 Minuten vorinkubiert (5 µg Nb-mFc, 10⁶ Zellen in 100 µl RPMI Medium). Nach Zugabe von ATP (30 µM, 100 µM) wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C weiterinkubiert. Zelloberflächen L-Selektin (CD62L) wurde mit einem fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörper (MEL14-PE, BD) detektiert und die Zellen dann mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Abbildung 3.3.2 zeigt die Intensität verschiedener Proben für das Fluorochrom PE, welches in diesem Experiment der Expression von mCD62L auf der Oberfläche der YAC-1 Lymphoma Zellen entspricht, da die Zellen mit einem PE-konjugierten anti-mCD62L Antikörper angefärbt wurden. Die Probe "ungefärbt" zeigt die Autofluoreszenz der YAC-1 Zellen. Die Anfärbung "no ATP 4°C" zeigt eine Probe, welche nicht mit ATP behandelt wurde. Durch Kühlung der Probe bei 4°C soll darüber hinaus eine Aktivierung von P2X7 durch mechanisch freigesetztes ATP und NAD⁺ aus toten Zellen verhindert werden. Die Probe zeigt das normale Expressionslevel der YAC-1 Lymphomazellen für mCD62L. Die Behandlung der Zellen mit der Isotypkontrolle 1067mFc (gleicher Aufbau des Nanobodies, jedoch mit einem nicht vorhandenen Ziel-Epitop, demnach nicht bindend) gefolgt von 30 µM ATP zeigt, dass die Schwellenkonzentration von ATP nicht erreicht wurde, um mP2X7 zu aktivieren, da das Expressionslevel von CD62L unverändert bleibt. Auch durch

Vorbehandlung mit dem antagonistisch wirkenden Nanobody-Fusionsprotein 13A7mFc findet bei anschließender Behandlung mit 30 μ M ATP keine Abnahme der CD62L Expression statt. Bei Behandlung mit dem agonistisch wirkendem 14D5mFc reicht die geringe Konzentration von 30 μ M ATP aus, um eine Abnahme des mCD62L durch Aktivierung von mP2X7 auszulösen. Durch Behandlung der mit Nanobody-mFc vorinkubierten YAC-1 Lymphomazellen mit höheren Konzentration von 100 μ M ATP zeigt sich eine Abnahme der mCD62L-Expression bei den mit der 1067mFc Isotyp-Kontrolle vorinkubierten Zellen. Die Wirkung von 1 mM ATP kann erfolgreich durch Vorinkubation mit dem antagonistisch wirkenden Nanobody-mFc Fusionsprotein 13A7mFc verhindert werden. Eine Vorinkubation mit dem agonistisch wirkenden 14D5mFc bewirkt im Vergleich zur Isotypkontrolle 1067mFc eine Verstärkung der normalen endogenen Reaktion auf das ATP. Das Experiment zeigt die agonistische Wirkung von 14D5mFc, sowie die antagonistische Wirkung von 13A7mFc auf mP2X7 *in vitro*.

3.3.3. P2X7 Hemmung verringert die Albuminurie in der APN

Am Tag der Induktion der anti-Podozyten Nephritis, sowie alle 3 Tage im Verlauf, wurde von den Mäusen Urin gesammelt und mittels ELISA der im Urin befindliche Albumin-Gehalt bestimmt. Der Grad der Albuminurie wurde auf den jeweiligen Kreatinin-Gehalt normalisiert.

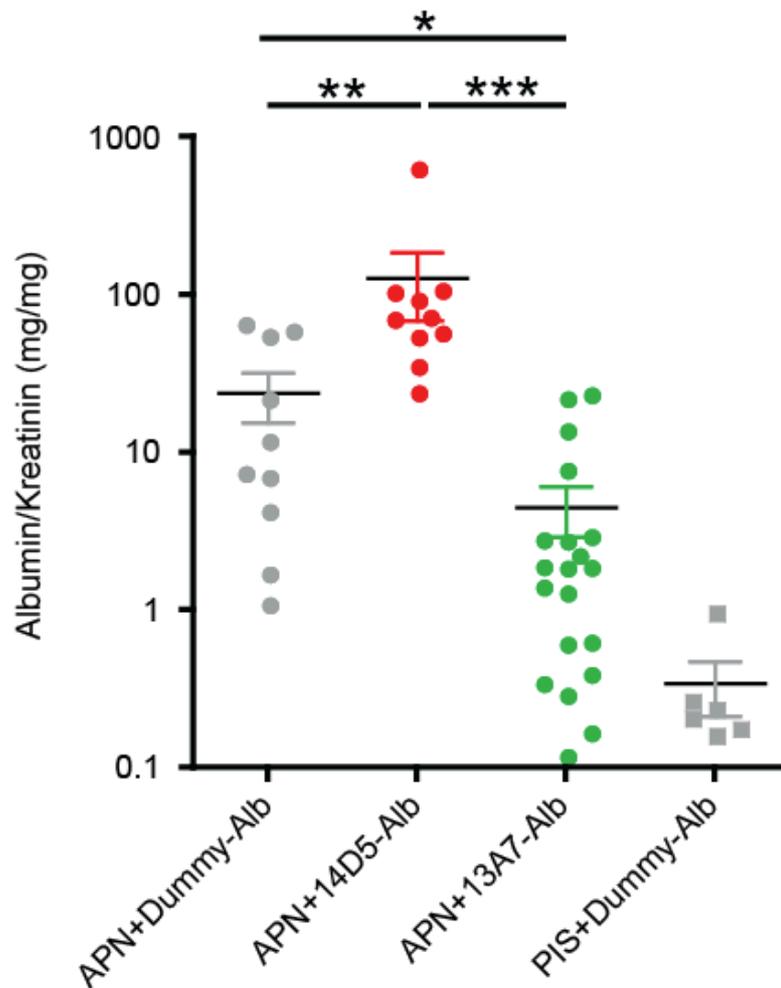


Abb. 3.3.3. Gesteigerte Albuminurie nach APN Induktion. Mäuse wurden unter Versorgung mit Wasser an Tag 16 und 21 auf Stoffwechself Käfigen gehalten. Nach bis zu 6 Stunden wurden die Mäuse zurück in die Käfige überführt, der Urin eingesammelt und anschließend die Albumin und Kreatinin Konzentration bestimmt. Die verschiedenen Behandlungen sind auf der X-Achse aufgeführt. Die PIS behandelten Mäuse wurden mit Prä-immune Serum statt anti-Podozyten Nephritis Serum behandelt. Dummy behandelte Tiere erhielten zur Therapie einen nicht an P2X7 bindenden Nb-Alb Konstrukt. Die Albuminurie wurde anhand des jeweiligen Kreatiningehaltes des Urins normalisiert. Gepoolte Daten aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

Abbildung 3.3.3 zeigt die Albuminurie der verschieden behandelten Mausgruppen an Tag 21. Die PIS injizierten Mäuse dienen als Kontrolle zu den APN injizierten Mäusen und zeigen keine Albuminurie. An Tag 21 konnte ein signifikanter Unterschied in der Stärke der Albuminurie festgestellt werden. Die 14D5-Alb behandelten Mäuse zeigen eine stärkere und die 13A7-Alb behandelten Mäuse eine schwächere Albuminurie im Vergleich zu den Dummy-Alb behandelten Mäusen, welche das APN Serum erhielten.

3.3.4. P2X7 Hemmung verbessert die Nierenfunktion in der APN

Aus dem Plasma, welches aus dem Blut der Tiere nach Beendigung des Experimentes gewonnen wurde, wurden die Nierenfunktionsparameter (Kreatinin, Harnstoff im Blut und Parameter die auf die Entwicklung eines nephrotischen Syndroms hinweisen (Triacylglycerol (TAG)), Cholesterin) bestimmt.

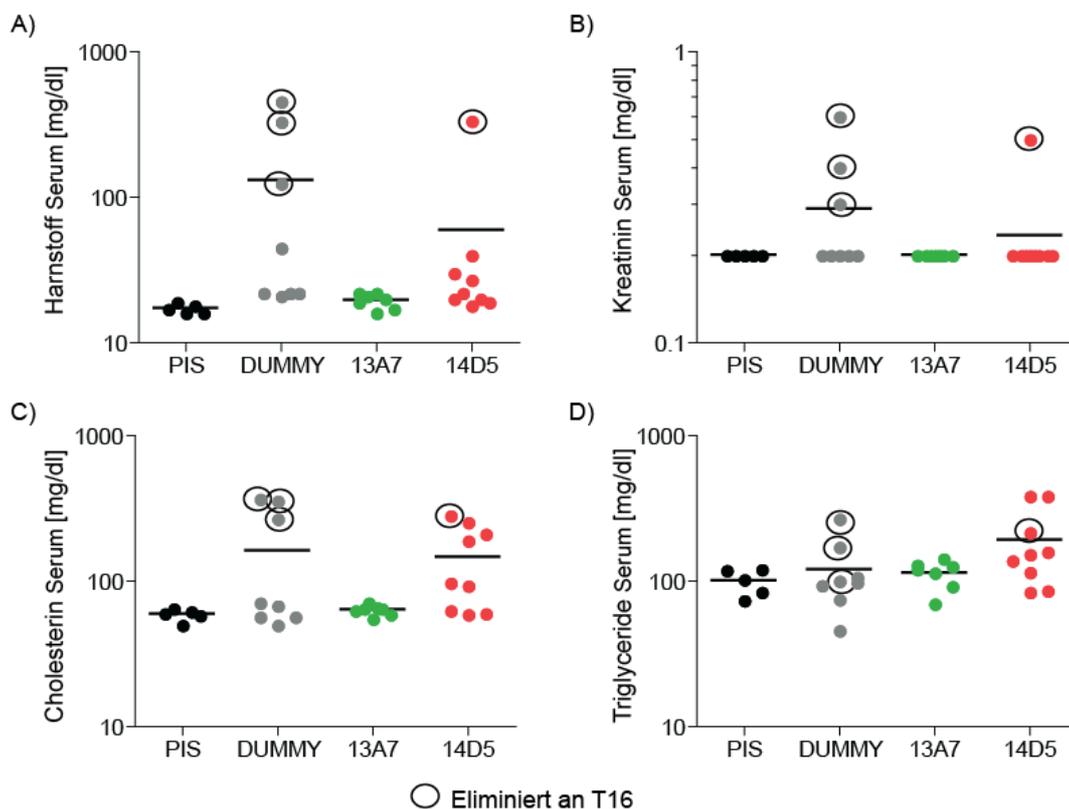


Abb. 3.3.4. Plasmaparameter unterscheiden sich nicht durch die Behandlung. Nach Beendigung des Experimentes wurden die Mäuse geopfert und Blut entnommen. Zur Gewinnung des Plasmas wurde dieses für 10 Minuten bei 4°C 3000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Plasma im Überstand wurde abpipettiert und bei -20°C gelagert. Einkreiste Werte stammen von Tieren, bei denen krankheitsbedingt an Tag 15 das Experiment beendet werden musste. Harnstoff, Cholesterin, Kreatinin und Triglyceride (TAG) im Serum wurden durch das Zentral Labor am UKE bestimmt. Die Daten stammen aus einem Experiment.

Abbildung 3.3.4 zeigt die im Zentrallabor des UKE bestimmten Parameter des Serums. In **a)** ist der Harnstoff im Plasma dargestellt. Ein Anstieg dieser harnpflichtigen Substanz im Blut erfolgt durch verminderte Filtration aus dem Blut als Resultat einer Nierenschädigung. Harnstoff dient so als Parameter für die Nierenfunktion. Tendenziell, aber nicht signifikant, präsentieren sich die Dummy und

die 14D5-Alb behandelten Tiere kränker als die 13A7-Alb und PIS behandelten Tiere. Der in **b)** analysierte Kreatininwert gibt die Funktion der glomerulären Filtration wieder. Der Wert steigt an, sobald die Filtrationsfunktion zu einem gewissen Grad eingeschränkt ist. Hier zeigen sich die 13A7-Alb Tiere tendenziell niedriger als die 14D5-Alb und Dummy behandelten Tiere. In **c)** ist der Cholesterinwert im Plasma dargestellt. Zusammen mit dem Triglyceridwerten aus **d)** ist er ein Parameter, der bei nephrotischem Proteinverlust ansteigt, da durch die Leber versucht wird, durch vermehrte Synthese den kolloid-osmotischen Druck aufrecht zu erhalten. Hier zeigt sich eine Korrelation mit den Werten der Albuminurie, bei dem die 14D5-Alb behandelten Mäuse deutlich mehr Protein über den Urin verlieren und auch tendenziell höhere Triglycerid-Werte im Plasma haben. Alles in Allem zeigen die Plasmawerte einen tendenziellen schwereren Verlauf der 14D5-Alb behandelten Tiere im Vergleich zu den 13A7-Alb und Prä-Immunsrum behandelten Tieren sowie einen leicht schwereren Verlauf im Vergleich zu den Dummy behandelten Tieren, welcher jedoch nicht signifikant ist. Die 13A7-Alb behandelten Tiere entsprechen den Prä-Immunsrum behandelten Tieren. Das entspricht tendenziell einem Schutz der Tiere in der anti-Podozyten Nephritis, der jedoch nicht signifikant ist.

3.3.5. Zytokinproduktion bei P2X7 Hemmung

IL-6 und MCP-1 wurden als Parameter für die Aktivität immunologischer Zellen mittels ELISA untersucht. Das IL-6 wurde aus dem Serum als allgemeiner inflammatorischer Parameter bestimmt und MCP-1 als ein Chemokin, welches vor allem von Makrophagen produziert wird. MCP-1 als Parameter aus dem Urin bestimmt lässt eine Abschätzung über die Aktivität und Rekrutierung von Makrophagen ins Glomerulum zu.

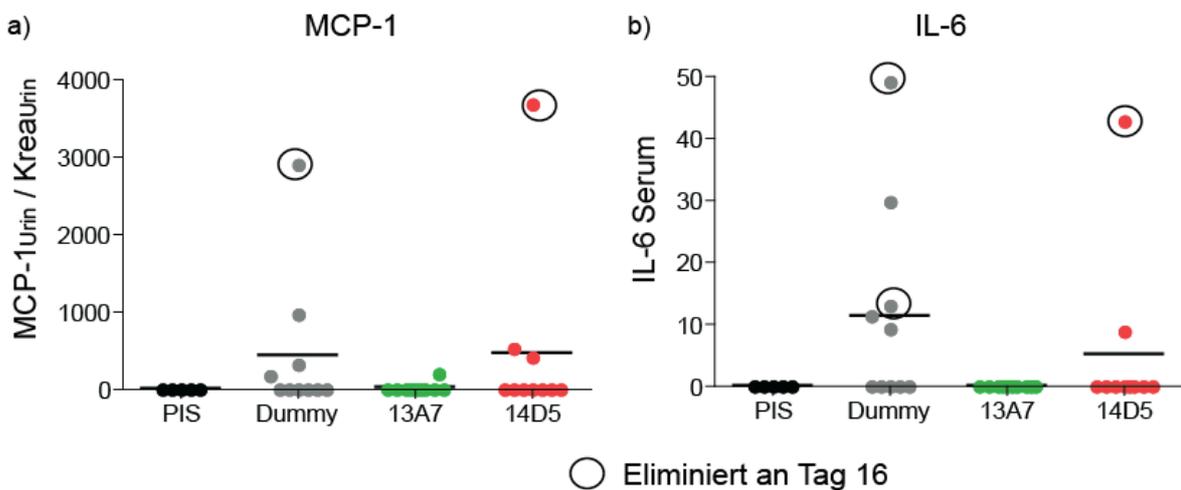


Abb. 3.3.5. Kein signifikanter Unterschied in der Zytokinproduktion. Die Quantifikation von MCP-1 aus dem Urin bzw. IL-6 aus dem Plasma per ELISA wurde anhand des Herstellerprotokolls durchgeführt. **a)** MCP-1 gemessen via ELISA im Urin an Tag 21 bzw. Tag 15 (Kreis) und normalisiert zum Kreatininwert des jeweiligen Urins. **b)** Plasma IL-6 gemessen via ELISA an Tag 21 bzw. Tag 15 (Kreis). Die Daten stammen aus einem Experiment.

Abbildung 3.3.5 zeigt die im ELISA erhobenen Zytokin- bzw. Chemokin-Daten. Werte auf der 0 Achse waren nicht detektierbar. **a)** positive "Ausreißer"-Werte stammen von den an Tag 15 getöteten Tieren. Es zeigten nur vereinzelt Tiere, hauptsächlich aus der Gruppe der Dummy-Nb und 14D5-Nb behandelten Tiere, nachweisbare Mengen MCP-1 im Urin. Es findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. **b)** Bei den IL-6 Werten aus dem Serum zeigte sich auch hier in der Dummy-Gruppe, dass 2 der 5 positiven Tiere von den schwer erkrankten Tieren stammen, welche an Tag 15 geopfert werden mussten. Bei der 14D5 Gruppe stammt 1 von 2 positiven Tieren aus dieser Gruppe. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Gruppen messbar. Es zeigte sich lediglich eine tendenziell verstärkte Entzündungsreaktion (IL-6) bzw. Makrophagenaktivierung (MCP-1) der Dummy bzw. 14D5-Alb behandelten Gruppe. Jedoch zeigte keines der 13A7-Alb behandelten Tiere eine solche Reaktion. Diese entsprechen alle den Prä-Immuns serum behandelten Tieren.

3.3.6. P2X7 Hemmung verringert den histologischen Schaden in der APN

Histologisch wurden die Nieren qualitativ mit verschiedenen Färbungen auf Paraffinschnitten der Nieren analysiert.

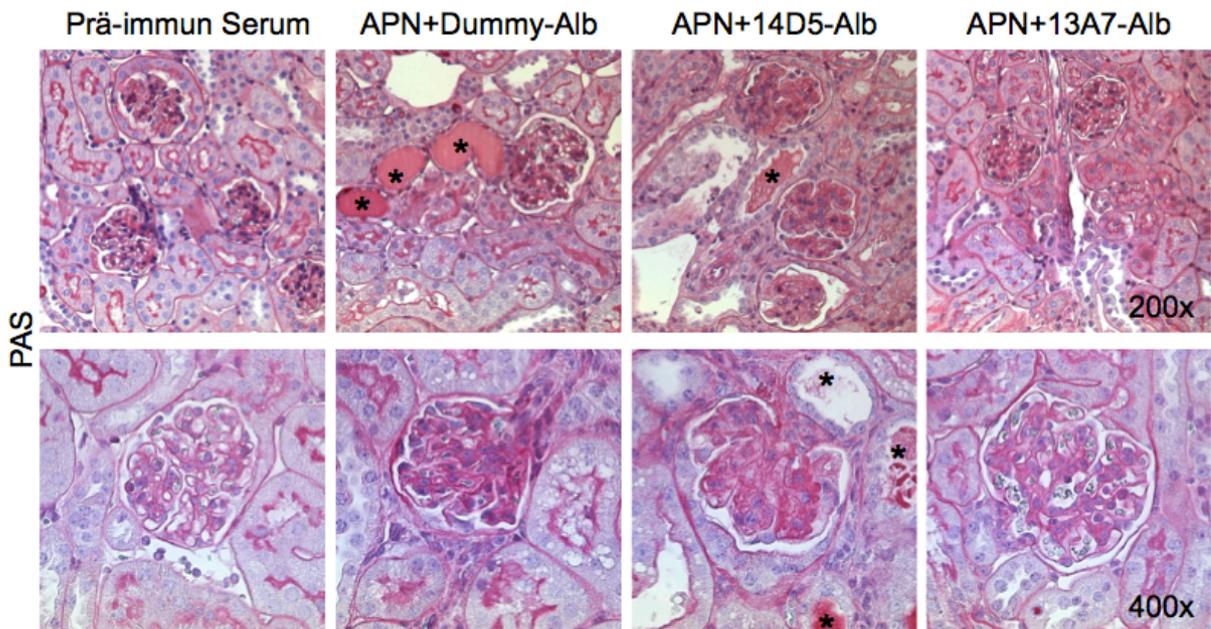


Abb. 3.3.6.1. PAS Färbungen zeigen unbeschadete Glomeruli bei P2X7-inhibierten Tieren. Danquah et al. (2016) PAS Färbung aus Nierengewebe von Tag 21. Paraffinschnitte wurden in Xylol bzw. Alkoholbädern mit absteigender Konzentration entparaffinisiert. Inkubation jeweils gefolgt von Spülung unter fließendem Leitungswasser und Aqua dest. in 15 Minuten RT Perjodsäure 1%, 40 Minuten Schiff'sches Reagenz bei RT, 1 Minute Hämatoxylin nach Böhmer. Differenzierung erfolgte in HCL-Alkohol gefolgt von einem Bad in aufsteigender Konzentration von Alkohol und Xylol (s. 2.3.3.2). Die Schnitte wurden in Eukitt eingedeckt. Asteriske deuten auf Proteinzyylinder im Tubuluslumen.

Zur Beurteilung des glomerulären Schadens wurde eine PAS-Färbung durchgeführt, welche in **Abbildung 3.3.6.1** dargestellt ist. Die PAS-Färbung der PIS behandelten Tiere zeigt den Normalzustand von gesunden Tieren, ohne Proteinzyylinder und schmaler glomerulärer Basalmembran. Die 13A7-Alb behandelten (P2X7-Inhibierten) Tiere zeigen ebenfalls keine tubulären und glomerulären Schäden. Sowohl die Dummy-Nb als auch die 14D5-Nb behandelten Tiere haben tubuläre Proteinzyylinder sowie ein ausgeprägtes tubulointerstitielles Entzündungszellinfiltrat, wobei die 14D5-Nb Tiere stärker betroffen sind. Die Färbung bei 400-facher Vergrößerung in den Glomeruli zeigt bei den 14D5-Alb und Dummy behandelten Tieren eine deutlich verdickte Basalmembran, geschwollene Podozyten sowie okkludierte Kapillarlumina, was auf einen glomerulären Schaden schließen lässt.

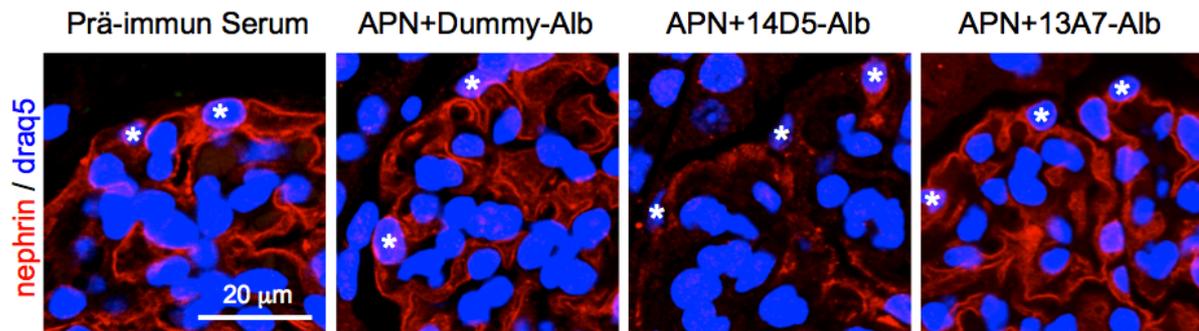


Abb. 3.3.6.2. Nephrin-Färbung zeigt stärkeren Schaden der Dummy-Alb bzw. 14D5-Alb behandelten Tiere. Danquah et al. (2016) Immunfluoreszenz-Färbung von Nephrin auf Paraffinschnitten. Entparaffinisierung mit Xylol und Ethanolbädern, Block mit 5% Pferdeserum mit TX-100, Färbung mit polyklonalem Antikörper (Meerschweinchen anti-Nephrin, Acris) (rot) und fluorochromkonjugierten Zweitantikörper (Esel anti-Meerschweinchen, Cy3). Die Mäuse wurde an Tag 21 geopfert. Ko-Färbung mit DRAQ5 (Kernfärbung in blau). Weisse Asteriske zeigen Zellkörper von Podozyten.

Die Immunfluoreszenz des Schlitzmembranproteins Nephrin in **Abbildung 3.3.6.2** zeigt bei den PIS behandelten Tieren das Normalbild eines Glomerulums mit einer linearen kontinuierlichen Färbung entlang der Filtrationsbarriere. Die APN+13A7-Alb behandelten Tiere zeigen ebenfalls ein intaktes Nephrin Färbemuster, wohingegen das Nephrin des APN+Dummy-Alb behandelten Tieres ein leicht diskontinuierliches Muster zeigen. Die Verbreiterung des Nephrinmusters deutet auf einen Schaden der Podozyten hin. Die APN+14D5-Alb behandelten Tiere präsentieren ein stark diskontinuierliches, granuläres und reduziertes Nephrin Signal, welches einem starken Schaden der Filtrationsbarriere entspricht. Zusammengefasst besitzen die 13A7-Nb behandelten Tiere histologisch eine intakte Filtrationsbarriere, wohingegen die APN+Dummy-Alb behandelten Tieren einen glomerulären Schaden und die APN +14D5-Alb einen massiven glomerulären Schaden zeigen.

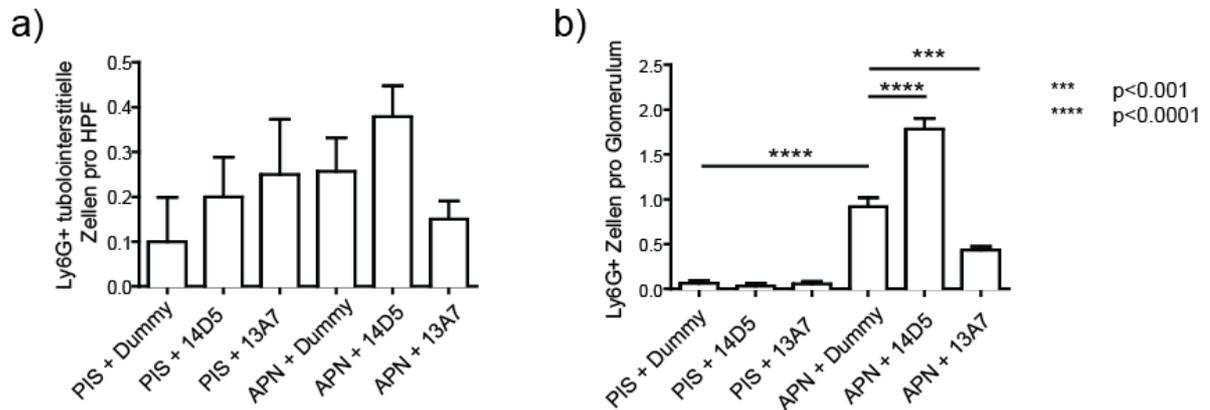


Abb. 3.3.6.3 Ly6G+ Zellen in Glomerulum und tubulointerstitiellen Zellen. Ly6G+ Zellen wurden mittels Immunhistochemie dargestellt und per Mikroskop ausgezählt. a) zeigt die Menge Ly6G+ Zellen im tubulointerstitiellen Gewebe im Vergleich zu den unterschiedlichen Behandlungsformen. b) zeigt die Menge an Ly6G+-Zellen im Vergleich im Glomerulum. Immunhistochemie von Ly6G-Zellen auf 2-µm dicken Paraffinschnitten. Entparaffinisierung mit Xylol und Ethanolbädern und in Wasser rehydriert. Das Antigen wurde mittels Proteaseverdau freigelegt (Protease XXIV (5mg/ml, Sigma), 15 Minuten bei 37°C). Block mit 5% Pferdeserum (Vector) in PBS 0.05% Triton X-100 für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Primärantikörper Ratte anti-Ly6G (1:400, Hycult Biotech) wurde über Nacht bei 4°C in Blockpuffer inkubiert. Die Färbung wurde dargestellt mittels ZytoChem Plus AP Polymer Kit (Zytomed Systems) nach Anleitung des Herstellers unter Verwendung von Neufuchsin (Merck). Kernfärbung mittels Hemalaun (Merck). Ly6G+ Zellen in den Glomeruli wurden in 10 high-power visual fields (400×) pro Niere in 6 bis 10 Mäusen pro Gruppe ermittelt.

Die Daten in **Abbildung 3.3.6.3.** zeigen das Verhältnis der Ly6G positiven Entzündungszellen im tubulointerstitiellen Gewebe (a)) und im Glomerulum (b)) in Abhängigkeit zu der Behandlungsart. In **a)** zeigt sich, dass es keinen signifikanten Unterschied im interstitiellen Gewebe der unterschiedlich Behandelten Mäuse gibt. In **b)** zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Zahl der Entzündungszellen. Es gibt einen signifikanten Anstieg der Zellen im Vergleich von PIS zu APN. In der Gruppe der APN behandelten Mäuse zeigt sich eine signifikante Reduktion der Ly6G positiven Zellen im Vergleich Dummy zu 13A7 und eine signifikante Steigerung im Vergleich 14D5 zu 13A7.

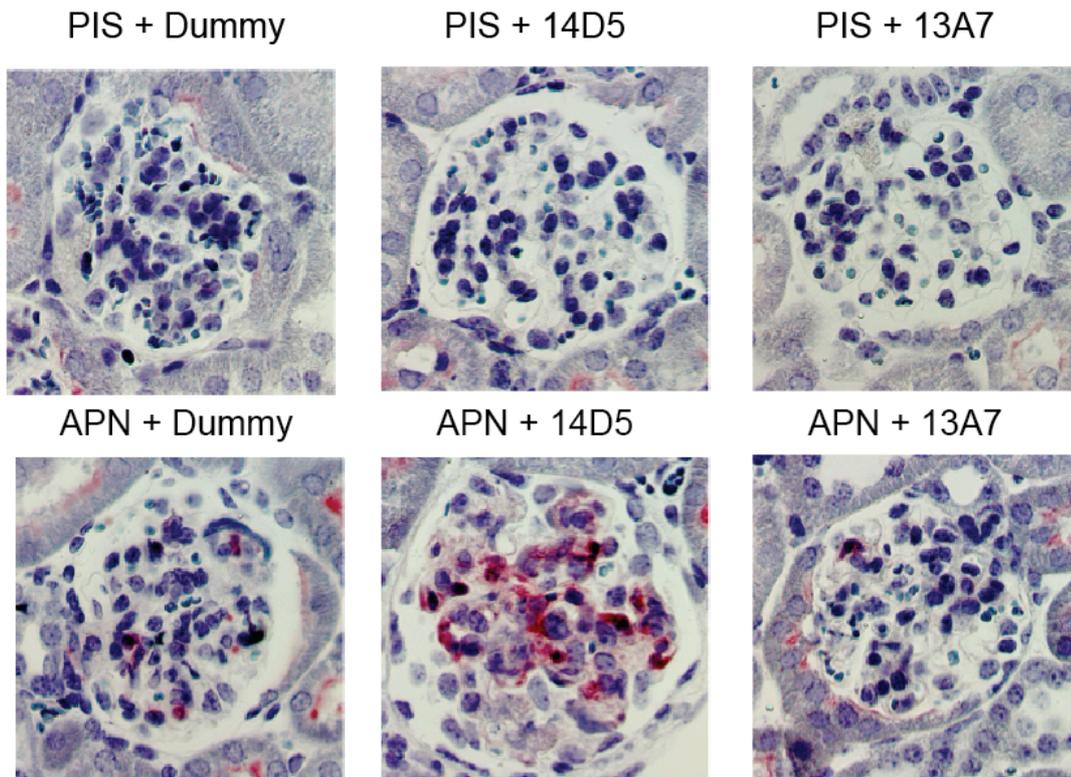


Abb. 3.3.6.4 Histologie der Ly6G-Färbung. Danquah et al. (2016) Immunhistochemie von Ly6G-Zellen auf 2- μ m dicken Paraffinschnitten. Entparaffinisierung mit Xylol und Ethanolbädern und in Wasser rehydriert. Das Antigen wurde mittels Proteaseverdau freigelegt (Protease XXIV (5mg/ml, Sigma), 15 Minuten bei 37°C). Block mit 5% Pferdeserum (Vector) in PBS 0.05% Triton X-100 für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Primärantikörper Ratte anti-Ly6G (1:400, Hycult Biotech) wurde über Nacht bei 4°C in Blockpuffer inkubiert. Die Färbung wurde dargestellt mittels ZytoChem Plus AP Polymer Kit (Zytomed Systems) nach Anleitung des Herstellers unter Verwendung von Neufuchsin (Merck). Kernfärbung mittels Hemalaun (Merck). Ly6G+ Zellen in den Glomeruli wurden in 10 high-power visual fields (400 \times) pro Niere in 6 bis 10 Mäusen pro Gruppe ermittelt.

Die Immunhistochemie in **Abbildung 3.3.6.4** zeigt repräsentative Bilder der Unterschiedlich behandelten Tiere. Die Prä-Immunsersum behandelte Gruppe zeigt durchgehend keine positiven Zellen. Die APN Behandelte Gruppe zeigt vereinzelt positive Zellen im Glomerulum der Dummy behandelten Mäuse. Im Vergleich dazu ist die Färbung im Glomerulum der zusätzlich mit 14D5 behandelten Maus deutlich stärker. Im Vergleich dazu ist das Gewebe des 13A7 behandelten Tieres deutlich reduziert.

Zusammengenommen deuten die histologischen PAS und Immunfluoreszenz-Untersuchungen in Zusammenschau mit den Serum-Untersuchungen darauf hin, dass die PIS Tiere gesund, die 13A7-Alb behandelten Tiere geschützt und die Dummy und 14D5-Alb behandelten Tiere erkrankt sind. Die 14D5-Alb behandelten Tiere scheinen stärker betroffen zu sein, als die Dummy behandelten Tiere. Die Ly6G Immunhistochemie-Ergebnisse unterstützen diese Ergebnisse und zeigen den selben Effekt der Nanobodys auf Ebenen der Entzündungszellen. Darüber hinaus zeigt sich, dass der Entzündungseffekt glomerulär und nicht interstitielle besteht.

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine P2X7 Expression in der Niere und dort spezifisch im Glomerulum der Maus im Westernblot nachgewiesen werden kann. Darüber hinaus kann P2X7 mittels Nanobody-Immunfluoreszenzfärbung dargestellt werden. Die Expression steigt im Glomerulum bei Induktion der anti-Podozyten Nephritis an. *In vitro* exprimieren kultivierte murine Podozyten-Zelllinien P2X7 als Protein, was bisher von **Fischer et al. (2001)** nur auf mRNA Ebene bzw. von **Hou et al. (2018)** darüber hinaus auch im Westernblot auf Proteinebenen gezeigt werden konnte. Funktionell reagieren kultivierte Podozyten-Zelllinien darüber hinaus auf ATP sowohl mit einem Calcium-Einstrom, als auch mit einer gesteigerten Phosphorylierung von ERK. Im Krankheitsmodell der anti-Podozyten Nephritis bewirkt eine Inhibition von P2X7 einen reduzierten histologischen Schaden in der Niere sowie einen attenuierten Krankheitsverlauf.

Die Diskussion gliedert sich im Folgenden in drei Abschnitte. Abschnitt 4.1 behandelt die gesteigerte glomeruläre Expression von P2X7 im APN-Modell. Abschnitt 4.2 beleuchtet die Expression von P2X7 in kultivierten Podozyten und Abschnitt 4.3 die Auswirkung der P2X7 Modulation im murinen Krankheitsmodell APN.

4.1. Die P2X7-Expression in der Niere

4.1.1. P2X7 wird in der Mausniere exprimiert

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.1 zeigen eine nachweisbare Expression von P2X7 in der Niere und besonders im Glomerulum (3.1.1 - 3.1.2). Andere Gruppen konnten

bereits zeigen, dass P2X-Rezeptoren und speziell auch P2X7 in der Niere und dort auch im Glomerulum exprimiert werden. So zeigten **Crawford et al. (2011)** durch mRNA RT-qPCR und pharmakologische Analysen, dass P2X1, P2X7 und P2Y4 eine Rolle bei der Regulation der Durchblutung durch Perizyten in den Vasa Recta spielen. Die in 3.1.1. im Gesamtnierenlysat gefundene P2X7 Expression kann unter anderem auch aus diesen Zellen stammen, da komplette Nieren zur Analyse verwendet wurden. Auch **Fischer et al. (2001)** beschreiben den Nachweis von P2X7 in isolierten murinen Glomeruli durch RT-PCR Verfahren. Diese Ergebnisse decken sich mit der glomerulären Anfärbung in dieser Arbeit. Auch **Turner et al. (2007)** zeigten eine P2X7 Expression in der Niere, teils in eingewanderten Makrophagen, jedoch auch in tubulären Zellen und im murinen Glomerulum, letztere jedoch erst nach Krankheitsinduktion. Wir können in dieser Arbeit zeigen, dass auch im gesunden Nierengewebe und speziell Glomerulum P2X7-Protein exprimiert wird.

4.1.2. Glomeruläre P2X7 Expression steigt in der APN an

Die Färbungen in 3.1.2 deuten auf eine schwache Expression von P2X7 im gesunden Glomerulum hin, welche nach APN Behandlung deutlicher erkennbar war. Ebenso ist in Westernblot-Analysen (3.1.3) die P2X7 Expression in den APN behandelten murinen Glomeruli stark ausgeprägt. Die über das gesamte Glomerulum verteilte Färbung zeigt, dass das detektierte P2X7 nicht nur in den Perizyten der Gefäße vorhanden ist und somit über die von Crawford *et al.* beschriebene Expression in Perizyten hinaus geht. Die Gruppe **Vonend et al. (2004)** konnte in der Ratte zeigen, dass eine P2X7 Expression glomerulär durch chronische Schäden wie Diabetes oder Hochdruck nachweisbar wird. Das stimmt mit den in dieser Arbeit angefertigten Färbungen in 3.1.2. überein, jedoch konnten wir in der gesunden Niere ebenfalls eine leichte Färbung zeigen. Auch die von Vonend *et al.* gezeigten Westernblotanalysen zeigen einen Anstieg der glomerulären P2X7 Expression von der gesunden zur kranken Ratte, was mit den in 3.1.3 dieser Arbeit gezeigte Westernblot-Analysen in Prä-Immunserum und APN behandelten Glomeruli übereinstimmt. Gleiches gilt für den von **Turner et al. (2007)** im Mausmodell der Nephrotoxischen Nephritis (NTN) gezeigten Anstieg von P2X7 sowie der messbaren Expression von P2X7 in Biopsien von humanen Patienten mit autoimmuner Glomerulonephritis. Turner *et al.* zeigten mittels Immunfluoreszenz jedoch, dass in gesundem Nierengewebe keine P2X7 Expression nachweisbar ist. Die Daten dieser Arbeit in 3.1.1 - 3.1.3 zeigen jedoch, dass auch in gesundem murinen Nierengewebe

und speziell im Glomerulum P2X7 nachweisbar ist. Die negative Immunfluoreszenzfärbung von Turner et al. muss nicht zwingend die Abwesenheit von mP2X7 im gesunden Mausglomerulum bedeuten. In den Färbungen ist der Hintergrund durch die Autofluoreszenz der Tubuli recht hoch, wodurch die im Vergleich zu krankem Gewebe geringere Expression von mP2X7 möglicherweise verschwindet. Der Nachweis einer geringen Expression zeigt sich in unseren Färbungen von gesunden Mäusen aus 3.1.2 mit mP2X7-defizienten Mäusen als negativ Kontrolle. Die Methoden in dieser Arbeit und denen von Turner et al. unterscheiden sich also in den verwendeten Antikörpern und den Negativkontrollen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bezüglich einer mP2X7-Expression im gesunden Glomerulum decken sich mit der nachweisbaren mP2X7-Expression Westernblot-Analysen aus Glomeruliisolaten von gesunden Tieren bzw. den PIS behandelten Mäusen (3.1.3).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sind ein weiteres Beispiel für einen Anstieg der glomerulären P2X7 Expression im akuten Krankheitsgeschehen der Maus und reihen sich in die aus Ratten und Menschen bekannten Daten der anderen Gruppen ein. Darüber hinaus zeigen die Daten eine Expression von P2X7 auch im gesunden Glomerulum, was z.B. den Daten von Turner et al. bezüglich der P2X7 in gesundem Nierengewebe widerspricht.

4.1.3. Nicht nur Podozyten exprimieren P2X7

Die in 3.1.2. gezeigte Färbung legt durch die weitläufige Anfärbung im Glomerulum nahe, dass die intraglomeruläre Färbung sowohl Podozyten als auch Mesangialzellen einschließt, da die Färbung keiner einzelnen Zellpopulation zuzuordnen ist und andere Gruppen, wie z.B. Harada *et al.* (2000) und Voned *et al.* (2004), zeigten, dass Podozyten und Mesangialzellen von Ratten P2X7 exprimieren. Die Daten von **Harada *et al.* (2000)**, die zeigen das Mesangialzellen der Ratte P2X7 exprimieren und dieses auch funktionell aktiv ist, könnte ein Hinweis sein, dass in der Maus ebenfalls Mesangial Zellen P2X7 exprimieren. Vonend *et al.* beschreiben anhand von Ko-lokalisations-Färbungen mit dem Podozytenmarker WT-1, dass hauptsächlich Podozyten und weniger Mesangialzellen die P2X7 exprimierenden Zellen im kranken Ratten-Glomerulum seien. Die von Vonend et al. gezeigten Bilder zeigen ein Färbemuster welches über das gesamte Glomerulum verteilt ist, und stimmen mit den in dieser Arbeit gezeigtem Färbemuster der Immunfluoreszenzfärbung in 3.1.2 überein. Die Lokalisierung der P2X7 Expression in

unserem Krankheitsmodell konnte jedoch nicht allein auf Podozyten wie bei Vonend et al. in der Ratte zurück geführt werden, da Ko-Lokalisations-Färbungen in der Maus in dieser Arbeit nicht erfolgreich waren. Zum einen war das Signal der Nb als Färbeagens möglicherweise zu schwach, zum anderen die Morphologie in den Gefrierschnitten zu schlecht für genauere Lokalisationen. Die starke Färbung im gesamten Mausglomerulum schließt Podozyten als P2X7 exprimierende Zellen sicherlich ein, schließt jedoch eine Beteiligung der anderer glomerulärer Zellen nicht aus. Die Ko-Lokalisation von P2X7 und WT-1 die Vonend et al. in der Ratte zeigen, ist nicht so stark wie beschrieben und die ebenfalls von Vonend et al beschriebene minimale Ko-lokalisierung mit Thy-1, einem Mesangialzellmarker, scheint in den gezeigten Bildern stärker als von Vonend *et al.* gezeigt. Hinzu kommt, dass die Immunogoldelektronen-Mikroskopie laut Vonend et al. eine Expression im Podozyten demonstrieren, die angegeben war, stärker zu sein, als in den nicht gezeigten Mesangialzell-Daten. Demnach war eine Immunogoldelektronen-Mikroskopie von Mesangialzellen ebenfalls positiv und würde bestätigen, dass Mesangialzellen P2X7 exprimieren. Darüber hinaus spricht gegen eine alleinige Expression im Podozyten das bereits von Harada *et al.* (2000) nachgewiesene, funktionell aktive P2X7 in Mesangialzellen der Ratte. Demnach wäre es wahrscheinlicher, dass in der Ratte P2X7 sowohl im Podozyten als auch in Mesangialzellen bei Krankheit nachweisbar wären. Das würde zu der von uns beobachteten glomerulären P2X7 Färbung in APN behandelten Mäusen dieser Arbeit passen und lässt vermuten, dass auch Podozyten und Mesangialzellen unter den angefärbten Zellen der Maus sind.

4.2. P2X7 im kultivierten Podozyten

4.2.1. P2X7 wird von kultivierten Podozyten exprimiert

Die in dieser Arbeit gezeigten *in vivo* Daten zeigen eine Expression von P2X7-Protein in im Glomerulum. Daher muss überprüft werden, ob P2X7 auch in podozytären Zelllinien exprimiert wird. Die mRNA Expression von P2X7 wurde bereits durch **Fischer et al. (2001)** in kultivierten Mauspodozyten gezeigt. Patch-Clamp Versuche zeigten eine Reaktion der Podozyten auf BzATP, einem selektiven P2X7 Agonisten. Fischer *et al.* konnten diese Reaktion jedoch nicht auf ein funktionell aktives P2X7 zurück führen, sondern erklären die Reaktion durch die Aktivität von P2Y Rezeptoren, da die Reaktion auf BzATP schwächer war als die

Reaktion auf ATP oder UDP (P2Y-Agonist). Darüber hinaus zeigte sich laut Fischer *et al.* ein sowohl zeitlich als auch morphologisch nahezu identisches Muster des Calciumeinstromes mit dem von P2Y-Rezeptoren. Ausserdem verursachte BzATP weder einen zusätzlichen Calciumeinstrom bei gleichzeitiger UDP Stimulation, was für eine separate P2X7 Aktivität spräche, noch einen LDH Anstieg innerhalb von 8 Stunden, was für einen zytotoxischen Effekt von P2X7 sprechen würde. Dadurch folgerten Fischer *et al.*, das zwar mRNA von P2X7 produziert wird, jedoch kein funktionell aktives mP2X7 als Protein exprimiert wird. Hou *et al.* (2018) konnten ebenfalls P2X7 in mRNA Form in kultivierten Podozyten messen. Die Expression war in Anwesenheit von Leptin, einem vermuteten Auslöser des glomerulären Schadens in Modellen des Übergewicht bedingten Nierenschadens, zusammen mit NLRP3 und NLRP3 Inflammasonkomponenten gesteigert. Eine Rolle von P2X7 im Entzündungsprozess zusammen mit dem NLRP3 Inflammasom liegt nahe, da in den Experimenten von Hou *et al.* (2018) die Anwesenheit von P2X7 Antagonisten KN-62 und A438079 die gesteigerte Expression antagonisieren konnten. Der Einsatz der Antagonisten hatte jedoch bereits eine verminderte Expression von P2X7 auf mRNA Ebene zur Folge. Eine Aktivität von P2X7 auf Proteinebene konnte hier ebenfalls nicht gezeigt werden. In dieser Arbeit konnte eine deutliche Expression von P2X7 in Form von Protein in kultivierten Podozyten mittels Westernblot und mittels Immunopräzipitation (3.2.1 und 3.2.2) nachgewiesen werden. P2X7 ist demnach über die low-level Expression als mRNA hinaus auch als Protein in kultivierten Podozyten nachweisbar.

4.2.2. P2X7 in kultivierten Podozyten ist funktionell aktiv

Fischer *et al.* (2001) gehen davon aus, dass P2X7 in kultivierten Podozyten inaktiv sei, da die Zellen bei bestehender Stimulation mit dem P2Y Agonisten UTP keine stärkere Reaktion durch Hinzufügen vom P2X7 Agonist BzATP zeigen. Nach Fischer *et al.* sei die Reaktion von kultivierten Podozyten demnach auf P2Y-Rezeptoren zurückzuführen. In den Messungen des Calcium-Einstroms in dieser Arbeit (3.2.3) konnten wir zeigen, dass ein Calcium-Einstrom auf ATP-Zugabe bereits bei einer Konzentration von 50 μ M ATP einsetzt. Diese Konzentration ist zu gering um auf einer P2X7 Aktivierung zu beruhen, reicht jedoch aus, um P2Y Rezeptoren zu stimulieren. Eine Aktivität von P2Y-Rezeptoren in kultivierten Podozyten ist somit auch in den Experimenten dieser Arbeit wahrscheinlich und stimmt mit den Erkenntnissen von Fischer *et al.* (2001) überein. Die im Rahmen dieser Arbeit

gemessene Reaktion nach P2Y Inhibition deutet darüber hinaus jedoch auf funktionell aktive Rezeptoren neben P2Y hin. Da wir eine Expression und Aktivität von P2X7 im Westernblot zeigen konnten, gehen wir davon aus, dass diese Reaktion unter Anderem P2X7 vermittelt sein könnte. Versuche mit P2X7-Inhibitoren in der Calcium-Messung stehen jedoch noch aus und können diese Vermutung im Ca²⁺-Imagingversuch noch nicht belegen. Möglicherweise spielt P2X7 bei kultivierten Podozyten erst bei höheren ATP Konzentrationen eine Rolle, die lokal entstehen könnten, sobald umliegende Zellen krankheitsbedingt (z.B. im Rahmen einer Glomerulonephritis) zugrunde gehen. Die in **3.2.4** gezeigten Ergebnisse der ATP induzierten Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 zeigen, dass kultivierte Podozytenzelllinien ein funktionell aktives P2X7 besitzen, da dieses durch zwei spezifische Antagonisten gehemmt werden konnte. Diese Erkenntnis steht im Widerspruch zu der Aussage von Fischer *et al.* (2001), dass kultivierte Podozyten ein funktionsloses P2X7 besitzen und deckt sich mit den Erkenntnissen von Hou *et al.* (2018), dass P2X7 in Podozyten exprimiert wird und durch Aktivierung inflammatorische Kaskaden z.B. über das NLRP3 Inflammasom auslösen könnte. Die schwache Phosphorylierung, die trotz P2X7 Inhibition stattfindet, deutet auf eine Wirkung von ATP über weitere Rezeptoren als P2X7 und den gehemmten P2Y-Rezeptoren hin oder kann mit einer nicht vollständigen Hemmung dieser erklärt werden. Darüber hinaus ist A438079 der P2X7 Antagonist, der von Taylor *et al.* (2009) in den NTN-Rattenexperiment eingesetzt wurde. Da A438079 somit Wirkung auf kultivierte Podozyten hat, ist eine Wirkung auf glomeruläre Podozyten *in vivo* durchaus vorstellbar. Zusätzlich deutet die vergleichbare Wirkung von 13A7 auf kultivierte Podozyten ebenfalls auf eine Wirkung auf glomeruläre Podozyten *in vivo* hin.

Welchen Effekt eine P2X7 Aktivierung auf die Podozyten hat und ob eine P2X7 Aktivierung der Podozyten einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf renaler Erkrankungen hat bleibt ungeklärt. Denkbar ist, dass die Aktivierung von P2X7 als Gefahrensignal dienen könnte, welches durch weitere Signal-Kaskaden zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Molekülen führt, ähnlich wie es bei Myozyten gezeigt werden konnte (**Rashmi Rawat *et al.* 2010**). Dies könnte einen positiven Effekt durch Hemmung von P2X7 im Krankheitsverlauf von autoimmunen Nierenerkrankungen erklären, der ursächlich dem milderen Krankheitsverlauf von P2X7-defizienten Mäusen in der NTN-Nephritis ähnelt, sowie die Tatsache der

verstärkten Expression in Biopsien von humanen Nieren von Patienten mit Glomerulonephritis erklären (Taylor *et al.* 2009).

4.2.3. Effekt von P2X7 Aktivierung im Podozyten

Amarjit Mishra *et al.* (2011) konnten zeigen, dass eine durch Schärstress ausgelöste Stimulierung von alveolären epithelialen Zellen Typ I (AEC Typ I) zur Aktivierung von P2X7 und ATP Freisetzung führt. AEC Typ II Zellen werden so parakrin über P2Y-Rezeptoren zur Surfactantfreisetzung angeregt. Eine parakrine Stimulierung von Podozyten durch ATP oder eine Freisetzung von ATP durch P2X7 zur parakrinen Stimulation anderer glomerulärer Zellen wäre ähnlich wie bei Pneumozyten denkbar. Auch eine auf P2X7 Stimulation folgende immunologische Antwort durch Zytokinfreisetzung durch Podozyten als eine nicht primär immunologische Zelle wäre möglich. Ähnliches konnten **Rashmi Rawat *et al.* (2010)** in ihrer Publikation zeigen, in der Myozyten auf P2X7 Stimulation mit IL-1 β Freisetzung reagieren. Eine IL-1 β oder TNF- α Freisetzung von kultivierten Podozyten auf ATP Stimulus konnte im Rahmen dieser Arbeit bisher nicht gezeigt werden. Die Gruppe von **Okamura *et al.* (2013)** konnte jedoch im Rahmen von Versuchen mit kultivierten humanen Podozyten zeigen, dass diese nach Endozytose von Albumin proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF bilden und freisetzen. Ebenso konnte die Gruppe von **Rosa *et al.* (2012)** zeigen, dass Stimulation mit Angiotensin II über 6 Tage zur Bildung von TNF- α in kultivierten humanen Podozyten führt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch murine Podozyten Zytokine bilden können und dass eine Stimulation von wenigen Stunden wie im Rahmen dieser Arbeit versucht, nicht ausreicht um eine messbare Zytokinproduktion auszulösen. Somit wäre auch eine Rolle im inflammatorischen System für Podozyten in der Glomerulonephritis vorstellbar. Neben aktiver Funktion im inflammatorischem System ist jedoch auch ein P2X7 vermittelter Podozyten-Tod durch Porenbildung denkbar. Dies könnte ein Faktor des massiven podozytären Schaden bei Glomerulonephritiden erklären. Erste Hinweise lassen sich dafür in den Ergebnissen von Fischer *et al.* (2001) finden, welche zeigen konnten, dass es nach 24h Inkubation mit BzATP zu einem signifikanten LDH Ausstrom aus kultivierten Podozyten kommt. Dieser setzt nicht so schnell ein wie der zytotoxische Effekt von ATP in Mesangialzellen (Schulze-Lohoff *et al.* 1998), könnte jedoch trotzdem eine Rolle im Krankheitsgeschehen von Podozyten spielen. Ein anderer Gedanke wäre, dass ein P2X7 getriggertes Ca²⁺ Einstrom zum zytoskelettalen Umbau führt, was die Ausbildung der Schlitzmembran der

Fußfortsätze beeinflusst, und einen Beitrag zur Verschmelzung dieser liefert. Die Fußfortsatzverschmelzung ist ebenfalls ein Merkmal nephrotischer Glomerulonephritiden. Eine durch P2X7-Inhibition oder Defizienz bedingte Verminderung dieser könnte eine Milderung des Krankheitsverlaufes bedeuten. Die Annahme würde zu den Ergebnissen von Taylor *et al.* (2009) sowie zu den Ergebnisse aus 3.3.6 passen, dass in der anti-Podozyten Nephritis das Nephrin der P2X7-inhibierten Mäuse, als Marker für den podozytären Schaden und Protein der Schlitzmembran, weniger beschädigt ist. Das ein Ca^{2+} Einstrom Einfluss auf die Permeabilität von kultivierten Podozyten hat, konnte **Dey *et al.* (2010)** zeigen. In ihren Experimenten führte die Aktivierung vom Bradikinin-2-Rezeptor über Signalwege, die ADAM17, den EGF-Rezeptor und ERK einschließen, zu einer verminderten Permeabilität von Albumin durch ein Podozyten-Monolayer. Der Effekt steht zwar im Gegensatz zu den durch Inhibierung eines Ca^{2+} Einstroms in unseren Experimenten vermuteten positiven Effektes, belegt jedoch, dass Proteine in möglichen Signalwegen von P2X7, wie z.B. ADAM17, EGF-R und ERK, eine Rolle in der Permeabilität von kultivierten Podozyten spielen können.

4.3. P2X7-Modulation in der anti-Podozyten Nephritis

Das P2X7 eine proinflammatorische Rolle in immunologisch bedingten Krankheiten spielt, konnte bereits in verschiedenen Tiermodellen belegt werden. So konnten **Scharp *et al.* (2008)** im experimentellen autoimmunen enzephalomyelitis Modell für Multiple Sklerose zeigen, dass P2X7-defiziente Mäuse einen abgeschwächten Krankheitsverlauf aufweisen. Gleiches gilt für renale Erkrankungen wie im Modell der NTN-Nephritis (**Taylor *et al.* 2009**). Auch Anna Hammel konnte im Rahmen ihrer Dissertationsarbeit zeigen, dass P2X7-defiziente Mäuse ebenfalls in der anti-Podozyten Nephritis einen milderen Verlauf zeigen als die Kontrollmäuse.

4.3.1. P2X7 Modulation beeinflusst die Albuminurie

Taylor *et al.* (2009) konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass eine Inhibition von P2X7 mit dem pharmakologischen P2X7 Antagonisten A-438079 in der NTN-Nephritis der Ratte eine Reduktion der Proteinurie bewirkt. Auch Anna Hammel konnte im Rahmen ihrer Dissertation zeigen, dass eine Modulation des P2X7 den Krankheitsverlauf der anti-Podozyten Nephritis in Wildtyp Mäusen ebenfalls beeinflusst. Der gleiche

Versuchsaufbau wurde in dem APN Experimenten dieser Arbeit verwendet. In der Arbeit von Anna Hammel zeigten die P2X7 inhibierten Mäuse in signifikantem Maße einen milderen Verlauf sowie die Mäuse, welche mit dem P2X7 Agonisten behandelt, wurden einen schwereren Verlauf als die Dummy behandelten Kontrollmäuse. Wie in **3.3.3** gezeigt, konnte im Albuminurie-Zeitverlauf, bei dem ein ähnlicher Effekt durch die Modulation des P2X7 erwartet wurde, dieser erneut dargestellt werden. In den **3.3.4** dargestellten Serum-Parameter des nephrotischen Syndroms zeichnet sich eine ähnliche, jedoch nicht signifikante, Tendenz ab. Der signifikant verstärkte glomerulären Schaden bei de APN und 14D5 behandelten Mäusen, bzw. verringerte Schaden bei 13A7 behandelten Mäusen, zeigt den positiven Effekt einer P2X7 Inhibierung in der anti-Podozyten Nephritis.

4.3.2. P2X7 Modulation beeinflusst die Zytokine im Serum und Urin

Zusätzlich zu dem signifikanten Unterschied der Albuminurie und der Tendenz der Serumwerte, sind die im Urin und Serum gemessenen Zytokin-/Chemokin-Werte IL-6 und MCP-1 aus **3.3.5** nicht signifikant unterschiedlich. Hier konnte Anna Hammels ebenfalls einen positiven Effekt der P2X7-Inhibierung feststellen. Dazu ist zu beachten, dass von den meisten Mäusen im Experiment dieser Arbeit kein messbarer Wert vorlag. Anna Hammel konnte in ihrer Dissertation zeigen, dass sowohl IL-6 als auch MCP-1 signifikant in den Agonist-behandelten Mäusen anstiegen. Die in 3.3.5 messbaren IL-6 Werte stammten hauptsächlich aus den mit P2X7 Agonist behandelten Mäusen, daher ist eine passende Tendenz zu erkennen, jedoch aufgrund der kaum messbaren Werte nicht signifikant zu belegen. Dieser Unterschied wäre durch den insgesamt milden Verlauf der Krankheit in dem Experiment im Rahmen dieser Arbeit erklärbar. Möglicherweise bedeutet dies jedoch auch, dass die Inhibition von P2X7 in diesem Experiment einen nicht so starken Einfluss auf die Entzündungsreaktion selbst hatte, sondern auf anderer Ebene wie z.B. dem zytoskelettalen Umbau der Podozyten Fuß-Fortsätze. Denkbar wäre, dass durch Inhibition des Ca²⁺-Signalings oder durch Modifikation des ERK-Pathways ein schützender Effekt des podozytären Zytoskelettes entstand, der auch histologisch nachweisbar ist.

4.3.3. P2X7 Modulation verringert den podozytären Schaden

Betrachtet man die histologischen Bilder aus **3.3.6** sieht man, dass eine P2X7-Inhibierung mit 13A7.Nb die Filtrationsbarriere in der APN deutlich schützt und eine

Behandlung mit 14D5.Nb zu einer deutlich verstärkten Schädigung führt (**Danquah et al. 2016**). Diese Ergebnisse des Krankheitsverlaufes passen zu Erkenntnissen aus anderen Krankheitsmodellen, sowie aus Erkenntnissen aus Biopsien von human Patienten. Die Gruppe von **Doublier et al. (2001)** konnte bereits in Biopsien aus Nierengewebe von Menschen mit unterschiedlichen erworbenen Nierenerkrankungen (unter anderem auch Patienten mit membranöser Glomerulonephritis) zeigen, dass eine Granulierung des Nephrins bei erkrankten Patienten zu finden ist. Das Färbemuster des Nephrins deckt sich somit mit Färbemustern aus humanen Biopsien und zeigt ähnliche Muster bei gesunden Patientin und Prä-Immunsrum bzw. P2X7-Inhibierten Mäusen aus dieser Arbeit, sowie ein granuliertes Nephrin Färbemuster bei erkrankten Patienten und in dieser Arbeit 14D5-Nb bzw. Dummy-Nb behandelte Mäuse.

Auch die Ratten in dem NTN Experiment von Taylor *et al.* (2009) zeigten einen histologischen Schaden, sowie eine Makrophageninfiltration, welche durch Behandlung mit dem P2X7 Antagonisten A-438079 reduziert waren. Somit decken sich die Ergebnisse aus dieser Arbeit mit den Ergebnissen von Taylor *et al.* und Anna Hammel, dass eine P2X7-Inhibition positiv auf den Krankheitsverlauf von renalen Erkrankungen auswirkt. Diese Ergebnisse auf histologischer Ebene passen in Verbindung mit den Nachweis, dass kultivierte Podozyten funktionell aktives P2X7 exprimieren, zu der Vorstellung, dass die P2X7-Inhibition direkt am Podozyten ansetzen könnte und diesen vor zytoskelettalen Umbauvorgängen, Anschwellen und Zelltod bewahrt.

5. Zusammenfassung

P2X7 ist ein liganden-gesteuerter nicht selektiver Ionenkanal, welcher durch extrazelluläres ATP aktiviert wird und von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems stark expliziert wird. Ziel dieser Arbeit war es, P2X7 in der gesunden und kranken Niere zu lokalisieren und insbesondere Podozyten als betroffene Zellen der Antikörper-mediierten Nephritis auf eine mögliche P2X7 Expression hin zu untersuchen. Zusätzlich sollte die Modulation von P2X7 als ein mögliches therapeutisches Ziel bei der Anti-Podozyten Nephritis untersucht werden. In dieser Arbeit konnte P2X7 in der Niere und besonders im Glomerulum nachgewiesen werden und gezeigt werden, dass die Expression im Rahmen der Anti-Podozyten Nephritis zunimmt (**3.1**). In kultivierten Podozyten gelang es, P2X7 als Protein nachzuweisen und es konnte gezeigt werden, dass Podozyten P2X7-abhängig auf ATP reagierten (**3.2**). Mäuse, welche mit einem P2X7 antagonistisch wirkenden Nanobody behandelt wurden, zeigten einen milderen Krankheitsverlauf in der Anti-Podozyten Nephritis (**3.3, Danquah et al. 2016**). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass P2X7 bei der Entwicklung des podozytären Schadens eine Rolle spielen könnte. Die bekannte P2X7 Expression in Mesangialzellen und die hier dargestellte Steigerung der P2X7 Expression im kranken Glomerulum, sowie der Nachweis einer P2X7-abhängigen Reaktion in kultivierten Podozyten, deuten auf einen möglichen therapeutischen Nutzen einer P2X7 Inhibition bei Antikörper-medierter Glomerulonephritis hin.

Ausblick

- Ko-Lokalisationsfärbung zusammen mit dem in dieser Arbeit verwendeten VHH-AP Konstrukt mit dem Podocytenkernmarker WT-1 um die P2X7 Expression in der APN glomerulär zu lokalisieren.
- Eine ATP Freisetzung nach P2X7 Stimulation in kultivierten Podozyten überprüfen, ob eine parakrine Aktivierung von P2Y anderer Zellen stattfindet.
- Podozytenspezifische P2X7-Knockout Mäuse erzeugen und überprüfen, ob diese mit generalisiertem P2X7 KO Mäusen und/oder P2X7 Modulation durch VHH vergleichbare Ergebnisse in der APN zeigen.

Summary

P2X7 is a ligand-gated ion channel belonging to the purinergic type 2 receptor family, which is highly expressed on inflammatory cells of the innate and adaptive immune system and is activated by extracellular ATP. Aim of this thesis was to localize P2X7 in the healthy and damaged kidney and in particular to investigate whether podocytes, a resident glomerular epithelial cell targeted by antibodies in the context of anti-podocyte nephritis, expressed and regulated P2X7 upon injury. In addition, the aim of this thesis was to investigate P2X7 as a possible therapeutic target in anti-podocyte nephritis.

In summary, we were able to detect a P2X7 expression in the glomerulum and to show that the expression of P2X7 was increased in anti-podocyte nephritis (**3.1**). We were able to detect a P2X7 expression at the protein level in cultivated podocytes and to demonstrate a P2X7-dependent reaction to ATP (**3.2**). Mice which were treated with an antagonistic antibody against P2X7 showed an alleviated course of anti-podocyte nephritis (**3.3, Danquah *et al.* 2016**).

These results suggest that P2X7 could play a role in the development podocyte injury. The known expression of P2X7 in mesangial cells and the shown increased expression of P2X7 in the damaged glomerulum as well as the confirmation of an ATP dependent reaction in cultivated podocytes indicate a possible therapeutic use of P2X7 inhibition in antibody-mediated glomerulonephritis.

Outlook

- Co-localization of the used P2X7-VHH-AP construct with the podocyte nuclear marker WT-1 to enable a cellular localization of P2X7 within glomerular cells.
- ATP release after P2X7 stimulation in cultivated podocytes to assess the existence of a paracrine activation of P2Y in other cells.
- Generation of podocyte-specific P2X7-Knockout mice and evaluation whether they exhibit an attenuated course of anti-podocyte nephritis, as was observed in constitutive P2X7 knockout mice and VHH treated wild type mice following anti-podocyte nephritis.

6. Anhang

6.1. Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ADAM17	“A Disintegrin And Metalloproteinase 17”
AF488	Alexa Fluor 488
AP	Alkalische Phosphatase
APN	anti-Podozyten Nephritis
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
BSA	Bovines Serum Albumin
BzATP	2'(3')-O-(4-Nezoyl-benzoyl) adenosin-5' triphosphat
E11-PZ	E11-Podozyten
EGF	Epidermal Growth Factor
EGF-R	Epidermal Growth Factor Rezeptor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FACS	flourescence-activated cell sorting
GBM	Glomeruläre Basalmembran
HEK	“human embryonal kidney” Zellen
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HWZ	Halbwertszeit
IL	Interleukin
IL-1 β	Interleukin -1 β
IL-6	Interleukin - 6
kDa	kilodalton

Abkürzung	Bedeutung
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1
MOPS	3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
mP2X7	murines P2X7
MPZ	Mundel Podozyten
mRNA	messenger Ribonucleic acid
NaCl	Natrium Chlorid
Nb	Nanobody
NTN	Nephrotoxic Nephritis
PAS	Periodic acid-Schiff
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIS	prä-Immun Serum
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TNF	Tumor Necrose Faktor
TNF- α	Tumor Necrose Faktor - α
VHH	Variable Domäne der "heavy chain" von "heavy chain only antibody"
WT	Wildtyp
WT-1	Wilms tumor protein 1

6.2. Literatur

- Abbracchio**, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.-M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K.A., et al. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacol. Rev.* 58, 281–341.
- Abbracchio** MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA, et al. (2003) Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:52–55.
- Asanuma** K, Mundel P. (2003) The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol* 2003;7:255–259.
- Beck** LH, Bonegio RGB, Lambeau G, et al. (2009) M-Type Phospholipase A2 Receptor as Target Antigen in Idiopathic Membranous Nephropathy. *The New England journal of medicine.* 2009;361(1):11-21. doi:10.1056/NEJMoa0810457.
- Boulton** TG, Cobb MH. (1991) Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regulation.* 1991;2(5): 357-371
- Burnstock**, G. (2009). Purinergic signalling: past, present and future. *Braz J Med Biol Res.* 42(1):3-8
- Conrath** EK, Lauwereys M, Wyns L, Muyldermans S (2000) Camel single-domain antibodies as modular building units in bi-specific and bivalent antibody constructs. *J Biol Chem* 276(10):7346–7350. doi:10.1074/jbc.M007734200

Coppieters K, Dreier T, Silence K, De Haard H, Lauwereys M, Casteels P, Beirnaert E, Jonckheere H, Van de Wiele C, Staelens L, Hostens J, Revets H, Remaut E, Elewaut D, Rottiers P (2006) Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 54(6):1856–1866. doi:10.1002/art.21827

Crawford, C., Kennedy-Lydon, T. M., Callaghan, H., Sprott, C., Simmons, R. L., Sawbridge, L., Syme, H. M., Unwin, R. J., Wildman, S. S. P. and Peppiatt-Wildman, C. M. (2011), Extracellular nucleotides affect pericyte-mediated regulation of rat in situ vasa recta diameter. *Acta Physiologica*, 202: 241–251. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02310.x

Welbeck **Danquah**, Catherine Meyer-Schwesinger, Björn Rissiek, Carolina Pinto, Arnau Serracant-Prat, Miriam Amadi, Domenica Iacenda, Jan-Hendrik Knop, Anna Hammel, Philine Bergmann, Nicole Schwarz, Joana Assunção, Wendy Rotthier, Friedrich Haag, Eva Tolosa, Peter Bannas, Eric Boué-Grabot, Tim Magnus, Toon Laeremans, Catelijne Stortelers, Friedrich Koch-Nolte (2016) Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation, *Sci. Transl. Med.* 8, 366ra162

De Genst E, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne J, Muyldermans S, Wyns L (2006) Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(12):4586–4591. doi:10.1073/pnas.0505379103

Desmyter A, Transue TR, Ghahroudi MA, Thi MH, Poortmans F, Hamers R, Muyldermans S, Wyns L (1996) Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat Struct Biol* 3(9):803–811. doi: 10.1038/nsb0996- 803

Dey M, Baldys A, Sumter DB, et al. (2010) Bradykinin Decreases Podocyte Permeability through ADAM17-Dependent Epidermal Growth Factor Receptor Activation and Zonula Occludens-1 Rearrangement. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2010;334(3):775-783. doi:

10.1124/jpet. 110.168054.

Sophie **Doublier**, Vesa Ruotsalainen, Gennaro Salvidio, Enrico Lupia, Luigi Biancone, Pier Giulio Conaldi, Paula Reponen, Karl Tryggvason, and Giovanni Camussi.(2001). Nephrin Redistribution on Podocytes Is a Potential Mechanism for Proteinuria in Patients with Primary Acquired Nephrotic Syndrome. *American Journal of Pathology*, Vol. 158, No. 5, May 2001

Dumoulin M, Last AM, Desmyter A, Decanniere K, Canet D, Larsson G, Spencer A, Archer DB, Sasse J, Muyldermans S, Wyns L, RedWeld C, Matagne A, Robinson CV, Dobson CM (2003) A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid Wbrils by human lysozyme. *Nature* 424(6950):783–788. doi:10.1038/nature01870

GA **Eppel**, S Ventura and RG Evans. (2006) Regional vascular responses to ATP and ATP analogues in the rabbit kidney in vivo: roles for adenosine receptors and prostanoids. *British Journal of Pharmacology* (2006) 149, 523–531

Karl-Georg **Fischer**, Ulrich Saueressig, Claudius Jacobshagen, Arndt Wichelmann and Hermann Pavenstädt (2001). Extracellular nucleotides regulate cellular functions of Podozytes in culture. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:1075-1081

Givan, A.L. (2011). Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol. Biol.* 699, 1–29.

Grzegorz **Grynkiewicz**, Martin Poenie, and Roger Y. Tsien (1985). A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *The journal of biological chemistry*. Vol. 260, No. 6 , Issue of March 25, pp. 3440-3450,1385

Anna **Hammel** (2013), UCH-L1 and P2X7 in experimental Glomerulonephritis, *Med. Dissertation*. Universität Hamburg

Hitoshi **Harada**, Choong Meng Chan, Andrew Loesch, Robert Unwin and Geoffrey Burnstock. (2000) Induction of proliferation and apoptotic cell death

via P2Y and P2X receptors, respectively, in rat glomerular mesangial cells. *Kidney International* 57, 949–958; doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00911.x

K. **Harden**, J. I. Sesma, I. P. Fricks, and E. R. Lazarowski. (2010) Signalling and pharmacological properties of the P2Y₁₄ receptor. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010 June ; 199(2): 149–160. doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02116.x.

Harmsen MM, De Haard HJ (2007) Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol* 77(1): 13–22. doi:10.1007/s00253-007-1142-2

Gerd **Herold**, *Innere Medizin*, Auflage 2018, Verlag Herold, Gerd

Lawrence B **Holzman**, Patricia L ST John, Iulia A Kovari, Rakesh Verma, Harry Holthofer and Dale R Abrahamson. (1999) Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell: *Kidney International* (1999) 56, 1481–1491; doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00719.x

Xiao-Xia **Hou**, Hong-Rui Dong, Li-Jun Sun, Min Yang, Hong Cheng, Yi-Pu Chen (2018) Purinergic 2X7 Receptor is Involved in the Podocyte Damage of Obesity-Related Glomerulopathy via Activating Nucleotide-Binding and Oligomerization Domain-Like Receptor Protein 3 Inflammasome, *Chinese Medical Journal* | November 20, 2018 | Volume 131 | Issue 22

Sandra **Hubert**, Björn Rissiek, Katjana Klages, Jochen Huehn, Tim Sparwasser, Friedrich Haag, Friedrich Koch-Nolte, Olivier Boyer, Michel Seman, and Sahil Adriouch. (2007) Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2–P2X7 pathway. *J. Exp. Med.* Vol. 207 No. 12 2561-2568 www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20091154

Wooseong **Huh**, Dae Joong Kim, Mi-Kyung Kim, Yoon Goo Kim, Ha-Young Oh, Vesa Ruotsalainen, and Karl Tryggvason. (2002) Expression of nephrin in acquired human glomerular disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2002) 17 (3): 478-484 doi:10.1093/ndt/17.3.478

Xu **Ji**, Yukiko Naito, Go Hirokawa, Huachun Weng, Yumiko Hiura, Rie Takahashi and Naoharu Iwai. (2011) Receptor antagonism attenuates the hypertension and renal injury in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension Research* 35, 173-179 (February 2012) | doi:10.1038/hr.2011.153

Marjo **Kestilä**, Ulla Lenkkeri, Minna Mannikko, Jane Lamerdin, Paula McCready, Heli Putaala, Vesa Ruotsalainen, Takako Morita, Marja Nissinen, Riitta Herva, Clifford E. Kashtan, Leena Peltonen, Christer Holmberg, Anne Olsen, and Karl Tryggvason. (1998) Positionally Cloned Gene for a Novel Glomerular Protein —Nephrin—Is Mutated in Congenital Nephrotic Syndrome *Molecular Cell* , Volume 1 , Issue 4 , 575 - 582

Ying **Li**, Jennifer Brazzell, Amy Herrera, and Bruce Walcheck. (2006) ADAM17 deficiency by mature neutrophils has differential effects on L-selectin shedding. *Blood* 108, 2275–2279.

Lustig KD, Shiau AK, Brake AJ, Julius D. (1993) Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:5113–5117.

Renate **Lüllmann-Rauch** (2006) Taschenlehrbuch Histologie, 2. Auflage, Thieme Verlag

Yoshimasa **Manago**, Yoshiko Kanahori, Aki Shimada, Ayumi Sato, Taiju Amano, Yae Sato-Sano, Rieko Setsuie, Mikako Sakurai, Shunsuke Aoki, Yu-Lai Wang, Hitoshi Osaka, à Keiji Wada and Mami Nodaa (2005). Potentiation of ATP-induced currents due to the activation of P2X receptors by ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1. *Journal of Neurochemistry*, 2005, 92, 1061–1072. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02963.x

Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K. (1997) 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5) P3-induced Ca²⁺ release. *J. Biochem. (Tokyo)*, 122(3), 498-505 (1997).

C Meyer-Schwesinger, TN Meyer, S Münster, P Klug, M Saleem, U Helmchen and RAK Stahl (2009). A new role for the neuronal ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) in Podozyte process formation and Podozyte injury in human glomerulopathies: *J Pathol* 2009; 217: 452–464

C Meyer-Schwesinger, Silke Dehde, Philipp Klug, Jan U. Becker, Sabrina Mathey, Kazem Arefi, Stefan Balabanov, Simone Venz, Karl-Hans Endlich, Marcela Pekna, J. Engelbert Gessner, Friedrich Thaiss and Tobias N. Meyer. (2011) Nephrotic Syndrome and Subepithelial Deposits in a Mouse Model of Immune-Mediated Anti-Podozyte Glomerulonephritis. *J Immunol*;187;3218-3229; Prepublished online 15 August 2011; doi:10.4049/jimmunol.1003451

Amarjit **Mishra**, Narendranath Reddy Chintagari, Yujie Guo, Tingting Weng, Lijing Su and Lin Liu (2011). Purinergic P2X7 receptor regulates lung surfactant secretion in a paracrine manner. *Journal of Cell Science* 124, 657-668

Mundel P, Reiser J, Zúniga Mejía Borja A, Pavenstädt H, Davidson GR, Kriz W, and Zeller R (1997) Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 236:248–258.

Muyldermans S (2001) Single domain camel antibodies: current status. *J Biotechnol* 74 (4):277–302

Kayo **Okamura**, Patrick Dummer, Jeffrey Kopp, Liru Qiu, Moshe Levi, Sarah Faubel, Judith Blaine (2013). Endocytosis of Albumin by Podocytes Elicits an Inflammatory Response and Induces Apoptotic Cell Death. *PLoS ONE*, 8(1), e54817. doi:10.1371/journal.pone.0054817

Rashmi **Rawat**, Tatiana V. Cohen, Beryl Ampong, Dwight Francia, Andrea Henriques-Pons, Eric P. Hoffman, and Kanneboyina Nagaraju. (2010). Inflammasome Up-Regulation and Activation in Dysferlin- Deficient Skeletal Muscle. *The American Journal of Pathology*, Vol. 176, No. 6

- Arianna Carolina **Rosa**, Lorenza Rattazzi, Gianluca Miglio, Massimo Collino, Roberto Fantozzi. (2012). Angiotensin II induces tumor necrosis factor- α expression and release from cultured human podocytes. *Inflamm. Res.* (2012) 61:311–317 DOI 10.1007/s00011-011-0412-8
- Daniel **Schiwek**, Nicole Endlich, Lawrence Holzman, Harry Holthofer, Wilhelm Kriz, and Karlhans Endlich (2004). Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine Podozyte cell lines. *Kidney International*, Vol. 66 (2004), pp. 91–101
- Jurgen **Schnermann**. (2011) Maintained tubuloglomerular feedback responses during acute inhibition of P2 purinergic receptors in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 300:F339-F344, 2011. First published 8 December 2010; doi:10.1152/ajprenal.00637.2010
- Schulze-Lohoff**, Christian Hugo, Sylvia Rost, Susanne Arnold, Angela Gruber, Bernhard Brune, and Ralf Bernd Sterzel. (1998). Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* Dec 1998,275(6)F962-F971;
- Seman**, M., S. Adriouch, F. Scheuplein, C. Krebs, D. Freese, G. Glowacki, P. Deterre, F. Haag, and F. Koch-Nolte. (2003). NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* 19:571-582
- Anthony J Sharp**, Paul E Polak, Vittoria Simonini, Shao X Lin, Jill C Richardson, Ernesto R Bongarzone and Douglas L Feinstein (2008) P2x7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroinflammation* 2008, 5:33! doi:10.1186/1742-2094-5-33
- Solle**, M., J. Labasi, D.G. Perregaux, E. Stam, N. Petrushova, B.H. Koller, R.J. Griffiths, and C.A. Gabel. (2001). Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J. Biol. Chem.* 276:125–132

Anselm **Sommer**, Anja Fries, Isabell Cornelsen, Nancy Speck, Friedrich Koch-Nolte, Gerald Gimpl, Jörg Andrä, Sucharit Bhakdi and Karina Reiss. (2012). Melittin Modulates Keratinocyte Function through P2 Receptor-dependent ADAM Activation. *J. Biol. Chem.* 2012, 287:23678-23689. doi: 10.1074/jbc.M112.362756

Justyna **Sosna**, Susann Voigt, Sabine Mathieu, Dieter Kabelitz, Ahmad Trad, Ottmar Janssen, Catherine Meyer-Schwesinger, Stefan Schütze and Dieter Adam. (2013) The proteases HtrA2/Omi and UCH-L1 regulate TNF-induced necroptosis

Simon R.J. **Taylor**, Clare M. Turner et. al. (2009) P2X7 Deficiency Attenuates Renal Injury in Experimental Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2009: 1275–1281, 2009. doi: 10.1681/ASN.200806055

Clare M. **Turner**, Frederick W. K. Tam, Ping-Chin Lai, Ruth M. Tarzi, G. Burnstock, Charles D. Pusey, H. Terence Cook and Robert J. Unwin (2007) Increased expression of the pro-apoptotic ATP-sensitive P2X7 receptor in experimental and human glomerulonephritis, *Nephrol Dial Transplant* (2007) 22: 386–395 doi:10.1093/ndt/gfl589

Vonend, O., Turner, C. M., Chan, C. M., Loesch, A., Dell'anna, G. C., Srail, K. S., et al. (2004). Glomerular expression of the ATP-sensitive P2X receptor in diabetic and hypertensive rat models. *Kidney Int.* 66, 157–166. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00717.x

Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock G, Barnard EA. (1993) Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett.* 1993; 324:219–225.

Wu TT, Johnson G, Kabat EA (1993) Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins* 16(1):1–7. doi:10.1002/prot. 340160102

6.3. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte und Prof. Dr. Catherine Meyer-Schwesinger für das spannende Thema dieser Doktorarbeit und die herausragende Unterstützung im gesamten Verlauf der Arbeit.

Ich danke Marlies Sachs für die Einarbeitung in die Arbeitstechniken und das Teilen Ihrer langjährigen Erfahrungen.

Mein Dank gilt ausserdem Dr. Welbeck Danquah für die bereichernde Zusammenarbeit und Unterstützung.

Ebenfalls danke ich meinen Laborkollegen Sebastian Guhr, Frithjof Lohmann, Victoria Radon, Björn Rissiek und Stefan Menzel.

Großer Danke gilt auch dem IRTG des SFB 877 des Biochemischen Institutes der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, welche diese Arbeit gefördert hat.

Ich danke meiner Familie für die Unterstützung im Studium und darüber hinaus, sowie meiner Partnerin Sandra für das Korrekturlesen.

Danke an meinen Freund Jirka für das Begleiten auf dem Weg ins Medizinstudium.

Diese Doktorarbeit wurde im Rahmen eines Stipendiums des Graduiertenkolleg des CRC 877 "Proteolysis and Pathophysiology" der Christian-Albrecht-Universität in Kiel gefördert.

Ein Teil der hier präsentierten Ergebnisse wurde in folgenden Fachzeitschriften publiziert:

Welbeck Danquah, Catherine Meyer-Schwesinger, Björn Rissiek, Carolina Pinto, Arnau Serracant-Prat, Miriam Amadi, Domenica Iacenda, Jan-Hendrik Knop, Anna Hammel, Philine Bergmann, Nicole Schwarz, Joana Assunção, Wendy Rotthier, Friedrich Haag, Eva Tolosa, Peter Bannas, Eric Boué-Grabot, Tim Magnus, Toon Laeremans, Catelijne Stortelers, Friedrich Koch-Nolte

Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation
Science Translational Medicine 8, 366ra162 (2016)

Curriculum Vitae

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

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: