

Colin Manuel Friedrich
Dr. med.

Über die Wirkung laminarer Flüssigkeitsströmung auf Podozyten

Geboren am 15.11.1979 in Marl

3. Staatsexamen am 07.05.2007 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Dipl. -Phys. Karlhans Endlich

Die Podozyten bilden zwischen ihren Aktin-reichen, interdigitierenden Fußfortsätzen die Schlitzmembran aus. Sie gilt als eine entscheidende Einheit der glomerulären Filtrationsbarriere. Störungen der Integrität des glomerulären Filters führen zum Selektivitätsverlust in der Ultrafiltratbildung und folglich zur Proteinurie. Dabei wird dem Zytoskelett der Podozyten eine große Bedeutung beigemessen. Das Mikrofilamentnetzwerk bestimmt wesentlich sowohl die Morphologie der Fußfortsätze, als auch die Stabilität der Schlitzmembran. Ein gestörter Aktinumsatz oder ein gestörtes Zusammenspiel zwischen Mikrofilamenten und Proteinen der Fokaladhäsionen resultiert in pathomorphologischen Veränderungen und Integritätsverlust des glomerulären Filterapparates.

Podozytenschäden, im Extremfall Podozytenverlust von der GBM führen zur Entwicklung von Glomerulosklerose und letztendlich zum Nierenversagen.

Sowohl wegen der mit dem Blutdruck variierenden Kapillardrucke im Glomerulus, als auch wegen der enormen Filtrationsleistung der menschlichen Nieren sind die Podozyten unentwegt mechanischer Beanspruchung ausgesetzt. Durch den Filtratfluss überträgt sich aufgrund der Viskosität der Flüssigkeit ein Teil ihrer Bewegungsenergie auf die Podozytenoberfläche. Diese parallel zur Oberfläche in Strömungsrichtung angreifende Kraft ist als Wandschubspannung definiert. Die möglichen Auswirkungen von Schubspannung auf die Physiologie der Podozyten sind bisher nicht untersucht worden.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde ein Flusskammersystem etabliert, mittels dessen sich definierte Schubspannungsraten auf Podozyten *in vitro* übertragen lassen. In den Flusskammerexperimenten zeigte sich, dass Podozyten äußerst sensibel auf Flüssigkeitsströmungen reagieren. Mit ansteigenden Schubspannungsraten ($0,015 \text{ dyne/cm}^2$ – $0,5 \text{ dyne/cm}^2$) offenbarte sich ein zunehmender Podozytenverlust, das Monolayer brach auf und mehr und mehr Zellen lösten sich vom Substrat. Im Gegensatz dazu wiesen die als Kontrollzellen ausgewählten Nierentubulusepithelien (LLC-PK1) keinen Zellverlust bei vergleichbaren hydrodynamischen Kräften auf. Kerndarstellung der Podozyten zeigte, dass der Zellverlust bei den angewendeten Schubspannungsraten nicht auf Apoptose beruhte. Mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen wurde ein scherkraftinduzierter, Verlust von Stressfasern bei gleichzeitiger kortikale Verdichtung des Aktin-Gerüsts beobachtet. Parallel wurden wichtige Proteine von Fokaladhäsionen und Zell-Zell- Kontakten umverteilt. In immunhistochemischer Darstellung zeigte sich eine deutliche Änderung des Vinculinverteilungsmusters. Die in statischen Kontrollen typische Kolokalisation von Vinculin mit F-Aktin im Bereich von Fokaladhäsionen ging unter Schubspannung verloren. Ferner konnte eine durch Schubspannung induzierte Anreicherung von α -Actinin an Zell-Zell-Kontakten festgestellt werden. Durch erhöhte Nachweisbarkeit von Cortactin und vermehrtes Auftreten von Lamellipodien ergaben sich Anhaltspunkte auf eine zunehmende Zellmotilität unter Flussbedingungen.

Um diese Befunde weiter verifizieren zu können wurden Zeitrafferaufnahmen durchgeführt. In Lebendexperimenten im Phasenkontrast bestätigten sich die Hinweise und eine verstärkte

Zell-Migration konnte beobachtet werden. Gleichzeitig erwies sich Schubspannung als potenter Auslöser von dorsalen Membrankrausen (*engl.*: ruffles), sowie Makropinozytose. Um die Reaktionen des Aktin-Zytoskeletts noch detaillierter untersuchen zu können, wurde anschließend mittels Lipofektion ein GFP-Aktin-Vektor in die Zellen eingeschleust. In Zeitrafferaufnahmen ließen sich schubspannungsinduzierte zytoskelettale Umbauvorgänge in den Podozyten verfolgen. Stressfasern wurden reduziert, zeitgleich traten vielfache Ruffles auf.

Im Weiteren wurde der Mechanismus der Signaltransduktion von Schubspannung mit Hilfe von Inhibitorexperimenten untersucht. Dabei zeigte sich, dass die vergleichsweise unspezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren Genistein und AG82 den Podozytenverlust in der Flusskammer dramatisch erhöhten, während unter statischen Bedingungen keine Alterationen nachweisbar waren. Auch nahm das inaktive Genisteinanalogen Daidzein keinen Einfluss auf die Podozyten. Dies macht eine Bedeutung von Tyrosinkinasen wahrscheinlich, wobei durch die Inhibitoren PP2 und PD 153035, die keinen Effekt hatten, eine Beteiligung der Src-Kinase bzw. der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase ausgeschlossen werden konnte.

Diese Arbeit ist der erstmalige Ansatz experimentell die Auswirkungen von Schubspannung auf die Podozytenphysiologie zu beleuchten und im Hinblick auf eine mögliche Relevanz für renale Erkrankungen zu interpretieren. Die Podozyten erwiesen sich als äußerst sensibel gegenüber mechanischer Beanspruchung. Sie reagieren auf Schubspannung mit Umbau ihres Zytoskeletts, sowie einer gesteigerten Motilität. Ferner erfolgt eine scherratenabhängige Ablösung der Podozyten vom Substrat. Tyrosinkinasen spielen bei der Adaptation der Podozyten gegenüber Schubspannung eine wesentliche Rolle.