

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Podoptose-
eine bisher unbekannte Ursache
für akutes Nierenversagen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Kristina Teresa Fleckinger

aus Ingolstadt

2022

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Ulrich Dendorfer

Univ. Prof. Dr. rer. nat. Alexander Dietrich

PD Dr. med. Michael Schmolke

Mitbetreuung durch die

promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Dana Thomasova, Ph.D.

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 06.10.2022

Für meinen Pa

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	S.4
Zusammenfassung	S.8
Abstract	S.10
Abbildungsverzeichnis	S.12
Tabellenverzeichnis	S.13
Formelverzeichnis	S.13
Abkürzungsverzeichnis	S.14
1. Einleitung	S.16
1.1 Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau der Nieren.....	S.16
1.2 Tubulussystem.....	S.17
1.2.1. Aufbau des Tubulussystems.....	S.17
1.2.2. Funktionen des proximalen Tubulus.....	S.17
1.2.3 Regenerationsfähigkeit der Tubuluszellen.....	S.18
1.3 Akutes Nierenversagen.....	S.19
1.3.1 Definiton des akutes Nierenversagens.....	S.19
1.3.2 Ursachen des akuten Nierenversagens.....	S.21
1.3.3 Reaktion der Tubulusepithelzellen (und Rolle der Progenitorzellen).....	S.22
1.4 Zelltodformen in Tubulusepithelzellen bei akutem Nierenversagen.....	S.24
1.4.1 Autophagie.....	S.25
1.4.2 Apoptose.....	S.26
1.4.3 Nekrose.....	S.28
1.4.4 Nekroptose.....	S.29
1.4.5 Mitochondriale Permeabilitäts-Pore.....	S.30
1.5 Die Molekül MDM2 und p53.....	S.32
1.5.1 Die Entdeckung und Funktion von MDM2.....	S.32
1.5.2 Die Entdeckung und Funktion von p53.....	S.33
1.5.3 Die MDM2-p53-Interaktion	S.35
1.5.4 Die Rolle von MDM2 bei akutem Nierenversagen.....	S.36
1.5.5 Die Rolle von p53 bei akutem Nierenversagen.....	S.37
1.5.6 Therapieansätze zur Modulierung von MDM2 und p53.....	S.38
2. Hypothese	S.40
3. Materialien und Methoden	S.41
3.1 Materialien.....	S.41

3.1.1 Instrumente.....	S.41
3.1.2 Materialien für molekularbiologische Methoden.....	S.41
3.1.3 Materialien für immunologische Methoden.....	S.43
3.1.4 Materialien für histologische Methoden.....	S.44
3.1.5 Materialien für <i>in vivo</i> Mausexperimente.....	S.44
3.1.6 Materialien für Zellkulturexperimente.....	S.45
3.1.7 Histologie und Mikroskopie.....	S.45
3.1.8 Elektronenmikroskopie.....	S.46
3.1.9 Sonstiges.....	S.46
3.1.10 Softwares.....	S.46
3.2 Tierexperimente.....	S.46
3.2.1 Tierunterbringung.....	S.46
3.2.2 Generierung der <i>Pax8rtTA-Cre;Mdm2^{flox/flox}</i> Mauslinie sowie der Doppelknockout Mauslinie <i>Pax8rtTA-Cre;Mdm2/p53</i> dKO.....	S.47
3.2.3 Doxycylin Behandlung zur Gendelektion.....	S.49
3.2.4 Behandlung mit Zelltodinhhibitoren.....	S.49
3.2.5 Genotypisierung.....	S.50
3.2.6 Blutabnahme und –sammeln.....	S.51
3.2.7 Urinabnahme.....	S.51
3.2.8 Nierenentnahme.....	S.51
3.2.9 Transkutane Messmethode der glomerulären Filtrationsrate.....	S.51
3.3 Molekularbiologische Methoden.....	S.52
3.3.1 Isolation von Tubulusepithelzellen.....	S.52
3.3.2 Isolation von Glomerula.....	S.53
3.3.3 RNA Isolation.....	S.53
3.3.4 RNA Qualitätsprüfung mittels Gel-Elektrophorese.....	S.54
3.3.5 cDNA-Synthese.....	S.54
3.3.6 Quantitative Echtzeit-Polymerasenkettenreaktion.....	S.55
3.3.7 Bestimmung der Nierenfunktionsparameter Kreatinin und Harnstoff.....	S.56
3.4 <i>In vitro</i> Methoden.....	S.57
3.4.1 Zellkultur der pTEC-Linie.....	S.57
3.4.2 Zellkultur der mTEC-Linie.....	S.58
3.4.3 Stimulation der TECs.....	S.58
3.4.4 MTT Assay.....	S.58

3.4.5 Zytotoxitätsassay.....	S.60
3.4.6 Transfektion mittels siRNA.....	S.60
3.5 Histopathologische Untersuchungen.....	S.61
3.6 Statistische Analyse.....	S.64
4. Ergebnisse	S.66
4.1 Erhöhte p53 Expression nach MDM2 Knockout reduziert die Überlebensrate von mTECs <i>in vitro</i>	S.66
4.2 Verminderte MDM2 Expression in Tubularepithelialzellen <i>in vivo</i>	S.68
4.3 Etablierung einer „reinen“ Zellkultur von Tubulusepithelzellen mit spezifischem <i>Mdm2</i> Knockout.....	S.70
4.4 Erhöhte p53 mRNA Expression als Folge des induzierten MDM2 Knockouts trägt zur Tubulusschädigung <i>in vivo</i> bei.....	S.71
4.5 <i>Mdm2</i> Knockout in Tubulusepithelzellen verschlechtert die Nierenfunktion <i>in vivo</i>	S.73
4.6 <i>MDM2/p53</i> Doppelknockout schützt vor Tubulusschädigung <i>in vivo</i>	S.77
4.7 Nekroptose, eine Form der regulierten Nekrose, schützt vor <i>Mdm2</i> KO-induzierten Tubulusepithelzelltod.....	S.83
4.8 RIPK1 ist nicht für den <i>Mdm2</i> Knockout-induzierten Tubulusepithelzelltod verantwortlich.....	S.87
4.9 RIPK3 spielt bei der Podoptose von Tubulusepithelzellen eine Rolle.....	S.89
4.10 MDM2-induzierter Zelltod von Tubulusepithelzellen ist unabhängig von Mitochondriale Permeabilität-Transitions-Pore Zelltod.....	S.93
5. Diskussion	S.95
5.1 Überblick.....	S.95
5.2 Die MDM2-p53-Interaktion in TECs während der Homoöstase.....	S.95
5.3 Der proximale Tubulus als Hauptschädigungsort bei Podoptose vermitteltem akutem Nierenversagen.....	S.96
5.4 Podoptose ist eine caspase-unabhängige Zelltodform, bei der RIPK-3 eine entscheidende Rolle spielt.....	S.98
5.5 Limitationen der experimentellen Untersuchungen.....	S.100
6. Schlussfolgerungen	S.101
7. Ausblick	S.102
8. Bibliografie	S.106
9. Danksagung	S.115

10. Affidavit	S.116
11. Publikationsliste	S.118

Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass *murine-double-minute-2* (MDM2) einen protektiven Effekt auf die Homöostase und somit das Langzeitüberleben von Podozyten hat, indem es vor Podoptose (*p53-overactivation-cell-death*) schützt. Allerdings ist wenig über die Rolle von MDM2 in Tubulusepithelzellen (TECs) bekannt. Um die Bedeutung von MDM2 in murinen Nieren zu erforschen, habe ich TEC-spezifische *Pax8rtTA-Cre;Mdm2^{flox/flox}* Mäuse (*Mdm2* KO) mit Doxycyclin bis zu 17 Tagen behandelt. Die erfolgreiche TEC-spezifische *Mdm2* Deletion und die damit verbundene Überexpression von p53 konnte mittels real-time PCR und immunhistologischer Färbungen bestätigt werden. Der Verlust von MDM2 in TECs führte zu einem akuten Nierenversagen, welches mit einer Erhöhung der mRNA Expressionwerte bekannter Tubulusschädigungsmarker, wie *KIM-1* und *L-Fabp*, einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate sowie einer Zunahme der Serumharnstoffmenge assoziiert war. Histologisch konnte man Veränderungen in der Zellpolarität, vermehrt Tubulusdilatation und Auffälligkeiten innerhalb der Lumina der Tubuli feststellen. Die Elektronenmikroskopie zeigte Veränderungen in Form von einer Vakuolenbildung.

Um die Relevanz der Interaktion von MDM2 und des Transkriptionsfaktor p53 in diesem Kontext zu untersuchen, habe ich einen TEC-spezifischen Doppelknockout von MDM2 und p53 (*Mdm2/p53* dKO) generiert. Die Deletion von p53 führte zu einer signifikanten Verminderung der Schädigungsmarker *KIM-1* und *L-Fabp*, Tubulusnekrose, Casts, Tubulusdilatation und eine verbesserte Nierenfunktion und Überlebensrate im Vergleich zu *Mdm2* KO Mäusen mit vorhandenem p53 Wildtypallel. D.h., dass die Deletion von p53 in *Mdm2/p53* dKO Mäusen vor akutem Nierenversagen schützt.

Eine Lectinfärbung der Nierenschnitte von *Mdm2* KO Mäusen zeigte, dass überwiegend proximale und nicht distale TECs im Rahmen des akuten Nierenversagens betroffen sind. Um die Zelltodform der proximalen TECs zu identifizieren, habe ich TECs mit verschiedenen Zelltodinhibitoren (Z-VAD, Necrostatin-1, Dabrafenib, Cyclosporin A und Ferrostatin) *in vitro* kultiviert. Dabei verbesserte sich signifikant die Zellviabilität der TECs bei Einsatz der Inhibitoren von RIPK1, RIPK3 sowie der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (Necrostatin-1, Dabrafenib und Cyclosporin-A), aber nicht bei dem Apoptoseinhibitor Z-VAD. Allerdings führte die *in vivo* Behandlung der *Mdm2* KO Mäuse mit Z-VAD und Necrostatin-1 nicht zu einer verbesserten Nierenfunktion im Vergleich zu DMSO-behandelten Tieren. Wohingegen Dabrafenib zu einer signifikant verbesserten Nierenfunktion beitrug, obwohl histologisch eine veränderte Zellmorphologie der TECs sowie verstopfte Tubuluslumina zu beobachtet waren. Aufgrund der verbesserten Nierenfunktion der *Mdm2*

KO Mäuse nach Dabrafenib Behandlung, generierte ich eine Mauslinie mit selektivem *Ripk3* Knockout in TECs (*Pax8rtTA-Cre;Ripk3* KO), um mehr über die Rolle von RIPK3 während des akuten Nierenversagens herauszufinden. Wie zu erwarten, zeigten *Pax8rtTA-Cre;Ripk3* KO Mäuse eine verbesserte Nierenfunktion und weniger Tubulusschaden im Vergleich zu *Mdm2* KO Tieren.

Schlussfolgernd kann ich sagen, dass erstens MDM2 für das Überleben und die Homöostase der TECs und somit der Nierenfunktion essentiell ist. Zudem führt die p53 Überexpression zu vermehrter Podoptose, wobei ich davon ausgehe, dass u.a. das Molekül RIPK3 eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielt. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um eine Interaktion von RIPK3 und Podoptose zu bestätigen.

Abstract

Murine-double-minute-2 (MDM2) is known for its protective effects in homeostasis and consequently for the survival of podocytes in preventing podoptosis (*p53-overactivation-cell-death*). However, research on the role of MDM2 in tubular epithelial cells (TECs) is limited. In order to investigate the effects of MDM2 in murine kidneys, I treated TEC-specific *Pax8rtTA-Cre;Mdm2^{flox/flox}* mice (*Mdm2* KO) with doxycycline for up to 17 days. The successful TEC specific loss of MDM2 and consequently the overexpression of p53 has been confirmed by real-time PCR and immunohistological staining. Deficiency of MDM2 in TECs contributed to acute kidney injury and failure, which was associated with an increase in the mRNA expression levels of well-known tubular injury markers such as *KIM-1* and *L-Fabp*, a decline in the glomerular filtration rate (GFR) and an elevation of serum urea. In addition, I observed histological abnormalities including changes in cell polarity, augmented tubular dilatation and transformation within the tubular lumen as well as abnormal vacuoles by electron microscopy.

To further investigate the interaction between MDM2 and the transcriptional factor p53, I generated TEC specific MDM2 and p53 double knockout mice (*Mdm2/p53* dKO). Deletion of both MDM2 and p53 prevented mice from tubular injury as indicated by reduced mRNA expression levels of *KIM-1* and *L-Fabp*, less tubular necrosis, casts and tubular dilatation, and ameliorated kidney function as compared with *Mdm2* KO mice with an existing p53 wild type allele. *Mdm2/p53* dKO mice also had a higher survival rate indicating that the deletion of p53 in *Mdm2/p53* dKO mice protects from acute kidney injury and failure.

Lectin staining of kidney sections from *Mdm2* KO mice showed that proximal but not distal TECs were predominantly affected. In order to identify the form of cell death in proximal TECs, I cultured TECs in the presence or absence of different cell death inhibitors including Z-VAD, necrostatin-1, dabrafenib, cyclosporin A and ferrostatin *in vitro*. Treating TECs with necrostatin-1 (RIPK1 inhibitor), dabrafenib (RIPK3 inhibitor) and cyclosporin-A (mitochondrial permeability transition pore inhibitor) significantly improved the viability of TECs, while the apoptosis inhibitor Z-VAD had no effect. However, blocking RIPK1 and apoptosis with necrostatin-1 and Z-VAD, respectively, *in vivo* did not prevent *Mdm2* KO mice from kidney injury as compared with DMSO-treated mice (control). Interestingly, dabrafenib treatment improved kidney function in *Mdm2* KO mice, although I observed morphological changes in TECs and clogged tubular lumen. Due to the improved kidney function in these mice after dabrafenib treatment, I generated another mouse line with a selective knockout of RIPK3 in TECs (*Pax8rtTA-Cre;Ripk3* KO) to investigate the role of

RIPK3 during acute kidney injury and failure. As expected, *Pax8rtTA-Cre;Ripk3* KO mice showed reduced tubular injury and an improved kidney function as compared with *Mdm2* KO animals.

In conclusion, the data of this thesis indicate that MDM2 is essential for the homeostasis of TECs and therefore for maintaining kidney function. Moreover, overexpression of p53 leads to increased podoptosis in TECs, wherein RIPK3 plays an important role in signal transduction. Further investigations are needed to unravel the interaction between RIPK3 and podoptosis.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Caspase-abhängige und caspase-unabhängige Zelltodformen	S.25
Abbildung 2: Extrinsischer und intrinsischer Weg der Apoptose sowie Inhibition der Apoptose durch Z-VAD.....	S.28
Abbildung 3: Nekroptose Signalweg sowie Inhibition durch Necrostatin-1 und Dabrafenib.....	S.30
Abbildung 4: mPTP („mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore“) vermittelter Zelltod.....	S.31
Abbildung 5: Einfluss von MDM2 und p53 auf mPTP sowie Cyclosporin-A als mPTP-Inhibition.....	S.32
Abbildung 6: Die Bedeutung von MDM2 und p53 im Zellzyklus.....	S.35
Abbildung 7: MDM2-p53 Interaktion	S.36
Abbildung 8: Experimentelle Mauslinie	S.48
Abbildung 9: Chemische Formeldarstellung der mitochondrialen Reduktion des MTT Farbstoffes in das wasserlösliche violett-blaue Formazan	S.59
Abbildung 10: Verminderte <i>MDM2</i> mRNA Expression bei gleichzeitigem Anstieg der <i>p53</i> mRNA Expression.....	S.66
Abbildung 11: MDM2 Knockdown führt zu verminderter Proliferationsrate muriner TECs.....	S.67
Abbildung 12: MDM2 Level durch Genknockout erfolgreich verringert.....	S.68
Abbildung 13: Tubulusspezifischer <i>MDM2</i> KO.....	S.71
Abbildung 14: Mdm2 Knockout mit Doxycyclin führt zu deutlich erhöhter p53 mRNA Expression	S.72
Abbildung 15: Erhöhte mRNA-Expression der Tubulusschädigungsmarker in Mdm2 KO pTECs.....	S.73
Abbildung 16: MDM2 Knockout führt zur Reduktion der Nierenfunktion.....	S.74
Abbildung 17: Mdm2 Knockout führt zur Tubulusnekrose und Vakuolenbildung	S.76
Abbildung 18: <i>Mdm2/p53</i> dKO Mäuse zeigen eine verminderte p53 mRNA Expression in Tubuli.....	S.78
Abbildung 19: <i>Mdm2/p53</i> dKO Mäuse weisen weniger Tubulusschaden auf	S.79
Abbildung 20: <i>Mdm2/p53</i> dKO aber nicht <i>Mdm2</i> KO/ <i>p53</i> het Mäuse weisen einen verminderten Tubulusschaden auf.	S.80

Abbildung 21: Tubulusepithelzelltod bei <i>Mdm2</i> KO/ <i>p53</i> het Mäusen findet vor allem in proximalen Tubuli statt	S.81
Abbildung 22: <i>Mdm2/p53</i> dKO Mäuse sind vor einem Decline der Nierenfunktion geschützt ..	S.82
Abbildung 23: <i>Mdm2/p53</i> dKO aber nicht <i>Mdm2</i> KO/ <i>p53</i> het Tiere haben eine höhere Lebenserwartung	S.83
Abbildung 24: Zelltodinhhibitoren und deren Einfluss auf primäre TECs von <i>Mdm2</i> KO Mäusen	S.84
Abbildung 25: Apoptose Inhibierung verhindert nicht den MDM2-Defizit-vermittelten Tubulusschaden.....	S.86
Abbildung 26: Nekroptose Inhibition mit Necrostatin-1 verhindert nicht den <i>Mdm2</i> -Defizit-vermittelten Tubulusschaden.....	S.88
Abbildung 27: Dabrafenib Therapie verbessert die Nierenfunktion der <i>Mdm2</i> KO Mäuse ohne Einfluss auf den Tubulusschaden	S.90
Abbildung 28: RIPK-3 Inhibition hat protektiven Einfluss auf <i>p53</i> -vermittelten Zelltod ...	S.92
Abbildung 29: Cyclosporin-A zeigt keinen renoprotektiven Effekt in <i>Mdm2</i> Knockout Mäusen	S.94
Abbildung 30: Zusammenfassende Graphik: Podoptose- eine bisher unbekannte Ursache für akutes Nierenversagen.....	S.105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ANV-Stadien nach KDIGO	S.20
Tabelle 2: Murine Primersequenzen	S.43
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Mauslinien.....	S.49

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der GFR. $T_{1/2}$ = Halbwertszeit der Fluoreszein-Isothiozyanat-Filtration (in Minuten); KG = Körpergewicht (in Gramm).....	S. 52
Formel 2: Formel zur Berechnung der (relativen) Zytotoxizität gemessen an Positivkontrolle (1% TritonX)	S.60
Formel 3: \bar{x} : Mittelwert der Versuchsreihe; n: Größe der Versuchsreihe; S: Standardabweichung; SEM: Standardfehler	S.65

Abkürzungsverzeichnis

ANV	Akutes Nierenversagen
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokase
ATN	Akute Tubulusnekrose
BUN	Blood urea nitrogen/Harnstoff
cDNA	Complementary DANN
CKD	Chronic Niereninsuffizienz
Cre	Cause recombination
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoxyribonucleic acid
EMT	Epithelial-mesenchymal-transition
EPO	Erythropoetin
FSGN	Focal segmental glomerulonephritis
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
IL	Interleukin
kDa	Kilo Dalton
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
Kim-1	Kidney Injury Molecule-1
LDH	Laktatdehydrogenase
L-FABP	Liver-type fatty acid-binding protein
LoxP	Locus of crossing over of P1 phage
mRNA	Messenger RNA
Mdm2	Murine double minute 2
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
MPTP	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
mTEC	murine tubular epithelial cell
NF- κ B	Nuclear factor-kappa-light-enhancer of activated B-cells
PAS	Periodic acid-Schiff
PCR	Polymerase chain reaction
PEC	parietal epithelial cell
Podoptose	p53-overactivation related cell death
pTEC	primary tubular epithelial cell

RNA	Ribonucleid acid
ROS	Reactive oxygen species
RT	Reverse transcriptase
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction
SEM	Standard error of the mean
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
TEC	Tubular epithelial cell
TEM	Transelectronenmikroskopie
Timp-2	Tissue inhibitor of metalloproteinases 2
TNF	Tumor necrosis factor
TUNEL	Terminal Deoxytranserase Uridine Triphosphate Nick End Labeling

1 Einleitung

1.1 Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau der Niere

Die paarig angelegten retroperitoneal liegenden Nieren erfüllen eine Vielzahl an Aufgaben. Durch die tägliche Ausscheidung von circa 1,4 Liter Urin wird der Körper von harnpflichtigen Substanzen wie u.a. chemischen Abbauprodukten gereinigt. Dadurch ist eine Balance des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts ,als auch eine Regulierung des Blutdrucks und des Säure-Basenhaushalts sichergestellt [1, 2]. Daneben spielen die Nieren eine wesentliche Rolle in der Regelung des Knochenstoffwechsels sowie in der Bildung der Erythrozyten durch das Glykoprotein-Hormon Erythropoetin. Das Gewicht der Nieren entwickelt sich proportional zur Körperoberfläche, sodass die Nieren der Neugeborenen zwischen 13 bis 44 Gramm wiegen, während das durchschnittliche Nierengewicht eines ausgewachsenen Mannes zwischen 125 bis 170 Gramm und das der Frauen zwischen 115 bis 155 Gramm liegt. Die Zahl der Glomeruli (Gefäßkonvolute) ist während dieses physiologischen Prozesses durchgehend konstant, sodass die Zunahme der Nierensubstanz vor allem durch die Expansion der tubulären Masse zu erklären ist. Mit dem Alter beobachtet man einen kontinuierlichen Abfall sowohl der Nierenmasse als auch des Nierengewichts. Die Rate des Nierenfunktionsverlustes variiert abhängig vom Geschlecht, der ethnischen Zugehörigkeit und Komorbiditäten, wie Diabetes mellitus und arterielle Hypertension. Doch ist bewiesen, dass sogar ohne Vorliegen einer Nierenstörung oder Präsenz von Komorbiditäten eine kontinuierliche Nierenfunktionseinschränkung mit einer geschätzten glomeruläre Filtrationsrate (GFR)-Abnahme von 0,75ml/min pro Jahr stattfindet. Diese Entwicklung erfolgt bereits nach dem 2. Lebensjahrzehnt [3, 4]. Folglich zeigt dies die Relevanz der Erforschung eines adäquaten Umgangs und Managements klinisch auffälliger Nierenstörungen.

Mikroskopisch verfügt jede Niere über bis zu zwei Millionen funktionellen Einheiten, den sogenannten Nephronen, welche den Harn bilden [1, 5]. Jedes Nephron selbst wiederum besteht aus zwei anatomischen und funktionellen Einheiten: dem Nierenkörperchen ,als auch einem komplexen Tubulusapparat. Die Nierenkörperchen sind wiederum zusammengesetzt aus der Bowman-Kapsel und dem Glomerulus, einem Kapillarschlingenknäuel, das für die Ultrafiltration des Primärharns und für die Blut-Harn-Schranke verantwortlich ist.

1.2 Tubulussystem

1.2.1 Aufbau des Tubulussystems

Das am Harnpol des Glomerulus beginnende Tubulussystem eines Nephrons gliedert sich in vier anatomisch sowie funktionell voneinander abhängige Abschnitte: dem proximalen Tubulus mit dem Pars convoluta und dem Pars recta, der Henle-Schleife mit den drei Abschnitten: dünner absteigender Schenkel, dünner aufsteigender Schenkel, dicker aufsteigender Schenkel, dem distalen Tubulus bestehend aus Pars recta (entspricht dem aufsteigenden dicken Schenkel der Henle-Schleife), Macula densa und Pars convoluta und dem Sammelrohr. All diese Nephronabschnitte haben gemein, dass sie eine komplexe Zytoarchitektur aufweisen: Mikrovilli vergrößern die luminalen Membranoberfläche der Tubulusepithelzellen, die Vergrößerung der basolateralen Zellmembranoberfläche wird durch tiefe Membraneinfaltungen erreicht. Zudem sind die stoffwechselaktiven Tubulusepithelzellen mit einer Vielzahl von Mitochondrien ausgestattet und die Interaktion der Zellen wird in Form von Desmosomen und an der luminalen Zellpolseite von der Schlussleiste gewährleistet [5, 6]. Jedem Nephronabschnitt können bestimmte Kardinalfunktionen zugeordnet werden: so findet im proximalen Tubulus der Großteil der Resorption an Elektrolyten, Aminosäuren und Zuckern statt. Im darauffolgenden dünnen absteigenden Teil der Henle-Schleife wird vornehmlich Wasser, im dünnen aufsteigenden Teil Natrium und Chlorid resorbiert. Der dicke aufsteigende Abschnitt der Henle-Schleife und der distale Tubulus dienen vornehmlich der Resorption von weiteren Ionen und von Wasser. Abschließend erfolgt die Urinkonzentrierung im Sammelrohr [7].

1.2.2 Funktionen des proximalen Tubulus

Der proximale Tubulusabschnitt beginnt am Urinpol des Glomerulums, ist ca. 14 mm lang, 50 µm dick und seine Lumenweite beträgt 20-40 µm. Die proximale Tubuluszelle besteht aus einem einschichtigen Epithel, wobei jede einzelne Epithelzelle wiederum über 6000-7000 Mikrovilli verfügt und somit an der Ausbildung der Bürstensaummembran beteiligt ist, welche für die gute Resorptionsfähigkeit in diesem Nephronabschnitt verantwortlich ist. Die Kommunikation untereinander wird mithilfe der Tight Junctions (Zonula occludens) ermöglicht, die sich an den lateralen apikalen Oberflächen der proximalen Tubuluszellen befinden [5].

Die anatomische Grundlage für die enorme reabsorptive Kapazität der proximalen Tubuluszelle stellt die Oberflächenvergrößerung dar, welche durch die apikalen Mikrovilli sowie den basolateralen Membraneinfaltungen gewährleistet wird. Dadurch werden 60% der

im glomerulären Filtrat vorhandenen Stoffe tubulär rückresorbiert. Zu diesen Stoffen zählen mannigfaltige Salze und Elektrolyte. Neben ca. 65% der Natrium- und Chlorid- Bestände, werden im proximalen Tubulus vor allem die Elektrolyte wie unter anderem Kalium, Calcium, Magnesium sowie Phosphat mithilfe des Bürstensaums resorbiert und wieder ins Blutplasma entlassen. Diese aktiven Transportvorgänge werden durch die Na^+ - K^+ -ATPase in Gang gehalten, die wiederum abhängig von dem hohen basalen Mitochondrienreichtum der proximalen Tubulusepithelzellen ist [6]. Wenn nun die Tubulusepithelzellen ihre Funktionen verlieren, wird dies als mögliche Ursache des Beginns eines akuten Nierenversagens (ANV) gesehen. Wobei dieser Prozess seinen primären Ausgangspunkt im proximalen Tubulussegment hat.

1.2.3. Regenerationsfähigkeit der Tubuluszellen

Die Fähigkeit der reifen Niere zu wachsen um „verloren gegangenes Nierengewebe“ zu ersetzen, wurde zum ersten Mal von Aristoteles (384-322 BC) erkannt. Er beobachtete, dass Tiere, die mit nur einer Niere geboren wurden ein, im Vergleich zu Artgenossen mit beiden funktionsfähigen Nieren, größeres Organ aufwiesen. Diese Beobachtung wurde bis heute durch eine Vielfalt von Studien bestätigt. Und obgleich die Nieren unter normalen Umständen eine im Vergleich zu anderen Organen ,wie dem Darm oder der Haut, niedrigeren Zellumsatz („cell turnover“) zeigt, beobachtet man bei einer Vielzahl pathologischer Nierenschädigungen Veränderungen in der Zellzahl (Proliferation und Apoptose) als auch der Zellgröße (Hypertrophie) [8]. Auch die Tubulusepithelzellen unterliegen unter physiologischen Bedingungen einer nur geringen Anzahl an Zellteilungen. Die Mehrheit der Zellen befindet sich im quieszenten Zustand, dem G₀-Stadium des Zellzyklus, in dem keine Zellteilung stattfindet. Bei Schädigung verlassen die Zellen jedoch die G₀ Phase und treten in das G₁-Stadium ein. Allerdings sind bis heute nicht alle Mechanismen und Faktoren der Tubuluszellhomöostase vollständig verstanden [9].

Jedoch fand man heraus, dass es eine Möglichkeit eines Reparaturprozesses innerhalb geschädigter Nierentubuli mit dem Ergebnis neuentwickelter Tubulusepithelzellen gibt. Sodass es unter anderem im Rahmen eines ANV durch die funktionelle Wiederherstellung intakter Nephrone sowie intrinsische Reparaturvorgänge geschädigter renaler Strukturen zu einem Wiedererlangen der Nierenfunktion kommen kann. Weiterhin ist bekannt, dass die Migration neuer Zellen in geschädigte Regionen am Neuaufbau eines funktionsfähigen Tubuluszellepithels maßgeblich beteiligt ist. Jedoch wird seit langem über den Ursprung

dieser neuen Epithelzellen debattiert, wobei drei mögliche Quellen der Zellen postuliert werden.

- 1, Proliferation und Differenzierung tubulärer Stamm- oder Progenitorzellen;
- 2, Differenzierung beschädigter Tubuluszellen zu Mesenchymzellen im Rahmen der EMT (epithelial-mesenchymal-transition) sowie
- 3, die Immigration spezifischer Knochenmarkstammzellen [10-12].

In den Fokus der Forschung rücken vor allem die eben erwähnten Progenitorzellen. Diese Zellen sind Vorläuferzellen somatischer Zellen, hervorgehend aus der asymmetrischen Zellteilung multipotenter Stammzellen. Sie sind zur Proliferation fähig und zeigen ein unipotentes Potential zur Differenzierung, welches ihre weitere Entwicklung begrenzt. In der Niere befinden sich die Progenitorzellen für gewöhnlich im quieszenten Zustand. Erst nach aktiver Nierenschädigung können sie detektiert werden: nun proliferieren und migrieren sie zum Ort des Schadens und beginnen neue Tubulusepithelzellen zu bilden [13, 14].

1.3 Akutes Nierenversagen

1.3.1 Definition des akuten Nierenversagens

Das ANV ist definiert als plötzlich einsetzende, rasch fortschreitende Abnahme der Nierenfunktion, welche über Tage anhält und in der Regel reversibel ist. Dadurch verlieren die Nieren ihre Fähigkeit harnpflichtige Substanzen wie Harnstoff (BUN) und Kreatinin aus dem Blut zu filtern, was wiederum zu einer Urämie führen kann. Des Weiteren tritt eine Störung des Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Säure-Base-Haushalts auf und die GFR nimmt akut ab. Somit sinkt ebenso das Flüssigkeitsvolumen, das die Niere pro Zeiteinheit filtrieren kann. Der treibende Faktor für den plötzlichen Funktionsverlust der Nieren ist das Fortschreiten der Tubulusschädigung [15].

KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes), eine internationale Organisation, deren Ziel es ist eine für den klinischen Alltag taugliche Leitlinie für Patienten mit Nierenerkrankungen zu etablieren, veröffentlichte im März 2012 die offizielle Leitlinie zur Evaluation sowie zum Management des ANV. In dieser wird das ANV durch das Vorliegen eines der folgenden drei Kriterien definiert [16] :

- a**, der absolute Anstiegs des Serumkreatinins $\geq 0,3$ mg/dl innerhalb von 48 Stunden.
- b**, die Zunahme des Serumkreatinins um das 1,5-fache des Ausgangswertes im Zeitraum der vergangenen sieben Tage, welcher entweder bekannt oder vermutet wird.
- c**, die Verminderung der Urinausscheidung $< 0.5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ / $0,5 \text{ ml/kg/h}$ über mehr als sechs Stunden.

Das ANV entwickelt sich bevorzugt bei Patienten nach größeren Operationen, aber ebenso bei Patienten mit septischem oder kardiogenem Schock und/oder Vorliegen eines SIRS. Eine internationale Multicenterstudie von Uchino et al [17] mit über 29.000 Intensivpatienten ergab, dass bei der Hälfte aller Patienten eine Sepsis der Hauptauslöser für ANV war. Bei Patienten mit gleichzeitigem Vorliegen einer Sepsis und eines ANV liegt die Mortalitätsrate bei bis zu 70% [18]. Deshalb sind die Risikokonstellation und die Ätiologie bei Patienten von besonderer Relevanz für die weiterführende Betreuung. Unabhängig von der Ätiologie kann man das ANV laut der aktuellen Leitlinie der KDIGO in drei Stadien einteilen (siehe Tabelle 1). Das ANV ist mit einer hohen Mortalität, der Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung und einer Dialysepflicht assoziiert [19, 20]. Zudem ist die Inzidenz des dialysepflichtigen ANV in den letzten Jahren angestiegen und über die vergangenen 10 Jahre hinweg hat sich die Anzahl der Todesfälle in Hinblick auf den Zusammenhang von dialysepflichtigen Patienten mit ANV mehr als verdoppelt [21]. Aus diesem Grund versucht man in der Forschung den Fokus bereits auf die Prävention des ANV zu legen und somit eine Verbesserung der derzeitigen Situation zu erreichen.

Tabelle 1: ANV Stadien nach KDIGO

AKI Stadium	Serum-Kreatinin	Urinausscheidung
Stadium I	1,5- bis 1,9 facher Anstieg innerhalb von 7 Tagen oder Anstieg >0,3 mg/dl innerhalb von 48 Stunden	<0,5 ml/kg/h über mehr als 6 Stunden
Stadium II	2,0-bis 2,9-facher Kreatininanstieg	<0,5 ml/kg/h über mehr als 12 Stunden
Stadium III	>3-facher Kreatininanstieg oder Serumkreatinin > 4 mg /dl mit akutem Anstieg > 0,5 mg/dl	< 0,3 ml/kg/h über mehr als 24h oder fehlende Urinausscheidung (Anurie) für > 12 Stunden

Im Prozess des ANV kommt es initial zwar zur Schädigung der Niere, wobei die Tubulusfunktion als auch die Diurese vorerst noch unbeeinträchtigt bleiben. Darauf folgend entwickelt sich eine fortschreitende Reduzierung der GFR in Form einer Oligurie bzw. Anurie (unter 500 ml pro Tag) mit einem progredienten Anstieg der Retentionswerte. Als Komplikationen können sich eine Hyperkaliämie, eine metabolische Azidose, eine Urämie sowie eine Überwässerung, eine Linksherzinsuffizienz, ein Lungenödem sowie ein Hirnödem entwickeln. Danach geht die Niere in die Phase der Oligurie über mit einer täglichen Harnmenge von über 2000 ml. Hauptgefahren hierbei sind der Verlust von Wasser als auch der beiden Elektrolyte Natrium und Kalium. Als Komplikationen können sich Exsikkose,

Hypokaliämie mit Herzrhythmusstörungen und Muskelschwäche sowie Infektionen einschließlich Pyelonephritis zeigen. Letzten Endes kommt es im Rahmen des ANV nach mehreren Wochen bis Monaten zu einer Restitution. Folglich heilen die Nierenschäden zum Teil ab, allerdings bleiben Einschränkungen der Nierenfunktion zurück. Die Urinausscheidung ist wiederum normal [29].

ANV ist sowohl mit einer erheblichen Morbidität als auch mit Mortalität assoziiert. Beispielsweise tritt in über 5% schwerkranker multimorbider Patienten ein schweres ANV auf, welches mit einer Mortalitätsrate von 40-70% assoziiert ist [30-32]. Obgleich bei der Mehrheit der überlebenden Patienten nach Abklingen der akuten Episode des ANV eine Wiederherstellung der Nierenfunktion zu beobachten ist, bleibt ein nicht unwesentlicher Teil der Patienten dialysepflichtig oder ist von schweren renalen Funktionseinschränkungen betroffen. Des Weiteren wurde vor kurzem bekannt, dass Patienten, deren Nierenfunktion nahezu vollständig bzw. vollständig wiederhergestellt wurde, ein signifikant erhöhtes Risiko für die Etablierung einer chronisch progressiven Nierenerkrankung aufweisen und es bei einer Überlagerung eines ANV auf Boden einer chronischen Nierenerkrankung (CKD) zu einer Beschleunigung der Progression der end-stage-Nierenerkrankung kommt [33, 34]. Aufgrunddessen ist es von großem Interesse die Regeneration der Niere in ihren Einzelheiten zu verstehen, um daraus therapeutisch sinnvolle Strategien zu entwickeln.

1.3.2 Ursachen des akuten Nierenversagens

Je nach Ätiologie lässt sich das ANV in drei Kategorien zuordnen: prärenales, intrarenales und postrenales Nierenversagen. Im Rahmen des prärenalen Nierenversagens ist die (renale) und glomeruläre Struktur zu Beginn noch vollkommen funktionsfähig. Im Vordergrund steht hier eine verminderte Perfusion, die als Ursache des Funktionsverlusts der Nieren gilt. Die Ursachen bzw. Risikofaktoren für die reduzierte renale Durchblutung sind wiederum mannigfaltig: Abnahme des zirkulierenden Blutvolumens, möglicherweise im Rahmen einer Dehydratation, zudem eine systemische Vasodilatation als Folge einer beginnenden Sepsis oder die renale Vasokonstriktion beim hepatorenenalen Syndrom. Die Ursache für das im Vergleich zum prärenalen Nierenversagen verhältnismäßig eher selten auftretende postrenale Nierenversagen (5% der Fälle des ANV) ist hingegen eine Behinderung des Harnabflusses. So können etwa angeborene oder erworbene Abflusshindernisse z.B. in Form von Nierensteinen, Tumoren und eine Prostatavergrößerung den Harnabfluss stören und so ein ANV verursachen. Ein renal bedingtes ANV wird durch eine direkte Schädigung des Nierengewebe ausgelöst. Solche Schädigungen kommen u.a. durch Ischämie sowie toxische Substanzen zustande.

Auch tubulointerstitielle Erkrankungen in Form einer allergischen interstitiellen Nephritis durch Medikamente (β -Laktame, NSAR, Thiazide, ACE-Hemmer, Allopurinol), Infektionen wie einer schweren bakteriellen Pyelonephritis, virale Erkrankungen wie CMV oder leukämische Infiltrationen können für das Auftreten eines intrarenalen ANV verantwortlich sein. Einen weiteren Stellenwert im pathologischen Prozess des ANV haben makro- und mikrovaskuläre Erkrankungen. Wobei unter renalen makrovaskulären Erkrankungen die Vaskulitis, die Nierenarterienembolie (Atheroembolien) und die Nierenvenenthrombosen (Thrombembolien) fallen und bei mikrovaskulären Pathologien die rapid-progressive Glomerulonephritis, die IgA-Nephritis sowie das Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS) zu nennen sind.

1.3.3 Reaktion der Tubulusepithelzellen und die Rolle der Progenitorzellen bei akutem Nierenversagen

Das ANV ist gekennzeichnet durch eine komplexe pathophysiologische Kaskade, die sowohl glomeruläre als auch tubuläre Schädigungen beinhaltet. Einige Studien zeigen, dass vor allem ANV, welches durch ischämische oder nephrotoxische Medikamente (d.h. intrarenal) verursacht wird, von mannigfaltigen Faktoren wie unter anderem vom Ausmaß des inflammatorischen Prozesses abhängig ist. Dieser Entzündungsvorgang wiederum wird maßgeblich vom Zelltod, wie der Nekrose als auch Apoptose, des renalen Tubularepitheliums bestimmt [22-25]. Folglich liegt der Fokus in der Pathogenese der ANV vordergründig auf den Vorgängen im Tubulussystem, da sich hier das Hauptgeschehen des ANV abspielt [25]. Tierexperimente zeigten, dass vor allem die „outer strip of the medulla“ (S3-Segment) des proximalen Tubulus am Sensitivsten auf eine Schädigung reagiert, gefolgt vom dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife (Pars recta des distalen Tubulus)/ the medullary thick ascending limb [26]. Der Vorgang der Tubuluszellschädigung wiederum kann in eine reversible und eine irreversible Phase unterteilt werden. Während des reversiblen Prozesses erfolgt eine Depolarisierung der Tubuluszelle, wobei normalerweise in den Kompartimenten anzutreffende Proteine wie Integrine und die Na^+/K^+ -ATPase nun an der apikalen Membran der geschädigten Tubulusepithelzellen (TECs) vorzufinden sind [27].

Irreversible Tubulusschäden hingegen zeigen im histologischen Bild Veränderungen, die sowohl Zellnekrosen als auch apoptotische Vorgänge sowie die Ablösung der TECs von der Tubulusbasalmembran ins Lumen der Tubuluszelle beinhalten [25]. Nach den ersten drei Stadien des ANV, die hauptsächlich durch Änderungen der Urinausscheidung sowie Elektrolytverschiebungen gekennzeichnet sind, kommt es nach einigen Wochen bis Monaten

zur klinischen Phase der Restitution. Hier erfolgt die Regeneration des Nierengewebes und in erster Linie der Tubuli, sodass die Nierenfunktion entweder vollkommen oder nur teilweise wiederhergestellt werden kann. Für diese Regeneration der geschädigten Tubuli formen unter anderem sogenannte Progenitorzellen, über deren Ursprung noch diskutiert wird, Tubulusstrukturen und stellen somit die Funktion des Tubulussystems zum Teil wieder her [22], [25].

Ogleich erst vor Kurzem renale Stammzellen bzw. Progenitorzellen in humanen Nieren identifiziert werden konnten [28], ist man sich bereits zum jetzigen Zeitpunkt deren Potential als Hauptakteure im Prozess der Nierenregeneration bewusst [29]. Aus diesem Grund finden zahlreiche wissenschaftliche Auseinandersetzungen bezüglich der näheren Identifikation und des besseren Verständnisses dieser Zellpopulation statt. Auch im Rahmen des ANV nehmen renale Progenitorzellen eine zunehmende Bedeutung aufgrund ihres Regenerationspotentials nach ANV ein. Dieses Regenerationspotential äußert sich in Form multipler Mechanismen. Die Hauptfunktionen tubulärer Progenitorzellen bestehen vorwiegend darin durch verstärkte Proliferation sowie Differenzierung in funktionsfähiges Tubulusepithel beschädigte Zellen zu ersetzen. Gleichzeitig interagieren die Progenitorzellen mit Zellen des Immunsystems durch parakrine Sekretion von Molekülen und fungieren folglich als Vermittler sowie Koordinatoren des Regenerationsprozesses [30]. Dank der zellspezifischen Eigenschaft der Progenitorzellen sogar schwersten Schädigungen trotzen zu können, stellt die Zellpopulation die letzte Instanz dar, welche für die Aufrechterhaltung der Nierenfunktion unter anderem bei akutem Schaden verantwortlich ist [31].

2009 identifizierte Langworthy et al [32] eine Subpopulation renaler Progenitorzellen im proximalen Tubulussegment, welche fähig war die Regeneration zu Schaden gekommener proximaler Tubuluszellen einzuleiten. In den darauffolgenden Jahren berichtete eine Forschungsgruppe über eine Subpopulation renaler Progenitorzellen namens CD133+CD24+CD106-, die spezifisch im proximalen Tubulus als auch in unterschiedlichen Abschnitten des distalen Tubulus lokalisiert ist. Diese Subpopulation verfügt über eine verstärkte Kapazität neue TECs zu generieren und somit die Nierenfunktion maßgeblich zu verbessern [33]. Die CD133+CD24+CD106- Subpopulation gehört zur Gruppe der ARPCs (adult resident progenitor cells), eine renale Zellformation/-gruppe, die nicht nur eine im Vergleich zu anderen differenzierten Nierenzellen, starke Widerstandsfähigkeit bezüglich jeglicher Schädigungsnoxen zeigt, sondern sich ebenso durch eine hohe und schnelle Proliferationsrate auszeichnet, die maßgeblich am klinischen Outcome der Patienten beteiligt ist [34]. Beispielsweise berichtet Sallustio et al [35], dass ARPC's TEC's im Rahmen einer

akuten Cisplatin-induzierten toxischen Nierenschädigung schützen durch verstärkte Proliferation der überlebenden Zellen und durch Inhibition der Apoptose. Mit der Funktion der ARPC's in humanen Geweben wiederum vergleichbar, ist die im Mausorganismus/-modell vorkommenden MKPC's (mouse kidney progenitor cells). Dabei verbessern sie ebenfalls die Nierenfunktion und erhöhen die Überlebenschancen signifikant [36]. Es scheint als wäre dies auf die Eigenschaft der MKPC's zurückzuführen, antiapoptotische, angionesesfördernde sowie mitotische Faktoren für die Epithelzellen während der Nierenfunktionsreparatur zu liefern [36].

All die oben aufgeführten Forschungsergebnisse stützen die Hypothese, dass tubuläre Stamm- bzw. Progenitorzellen eine signifikante Rolle im Rahmen des ANV spielen hauptsächlich aufgrund ihrer Eigenschaft die Regeneration der TECs zu unterstützen. Jedoch ist trotz der oben genannten Regenerationsmöglichkeiten während des ANV die Sterblichkeit immens hoch (50-70%). Aus diesem Grund liegt es in der Hand der Forschung die Prozesse des ANV besser zu verstehen und auf dem Boden der Forschungsergebnisse wirksame therapeutische Strategien zu entwickeln.

1.4 Zelltodformen in Tubulusepithelzellen bei akutem Nierenversagen

Zelltod als essentieller Prozess, der uns durch das gesamte Leben begleitet, wird bereits seit einigen Jahrzehnten intensiv erforscht. Die historische Klassifikation des Zelltodes unterscheidet dabei drei Formen: die Apoptose, besser bekannt als der programmierte Zelltod, die Autophagie, ein ebenfalls hochkomplexer und regulierter Mechanismus und die Nekrose als unkoordinierte Zelltodform [37]. Indes hat man herausgefunden, dass all diese erwähnten Mechanismen neben einer Vielzahl weiterer Prozesse in der Pathogenese des ANV involviert sind. Pathologisch kann man die Diagnose eines ANV unter anderem durch den auftretenden Tubulusschaden festmachen. Die Verletzung oder gar der Tod der Tubuluszellen sind als die auslösenden Faktoren für das Fortschreiten des ANV erkannt. Wiederum haben neueste Studien belegt, dass während des ANV komplexe oftmals sich überschneidende Formen des Zelltodes involviert sind und folglich auch in der Schädigung des Tubulussystems bei ANV mitwirken. Die histologische Basis einer Vielzahl vor allem intrarenaler Formen des akuten Nierenversagens ist die akute Tubulusnekrose (ATN) [38]. Sie ist charakterisiert durch den TEC Zelltod und die daraus resultierende Dysfunktion der Tubulussegmente [39]. Die Tubuluszellfunktion ist hierbei das auslösende Ereignis in ATN, das zur Nierenfunktionseinschränkung z.B. in Form einer reduzierten GFR und zu Nierenversagen führt.

In den letzten Jahrzehnten wurden neben den drei traditionellen Mechanismen Autophagie, Apoptose und Nekrose immer mehr Zelltodsotypen in der Pathogenese des akuten Nierenversagens entdeckt und näher charakterisiert [40, 41], u.a. die breite Gruppe der regulierten Nekrose (siehe Abbildung 1). Sie zeichnet sich zwar durch die morphologischen Attribute der Nekrose aus, läuft allerdings im Gegensatz dazu auf kontrollierte Weise ab [42].

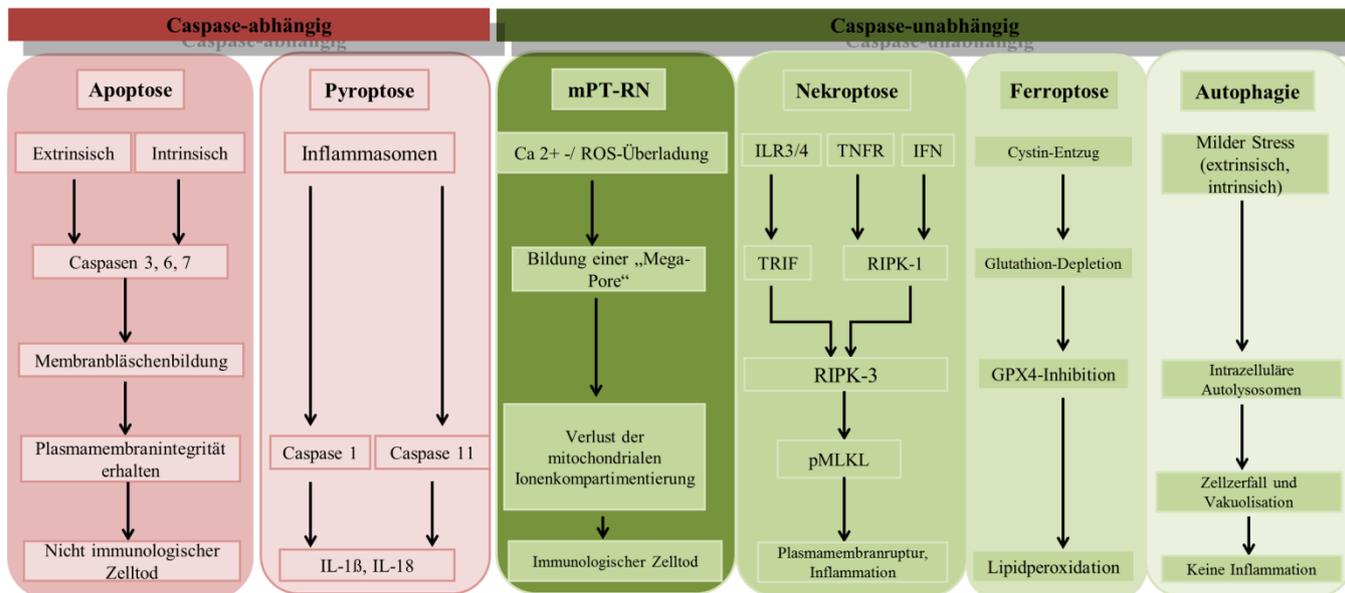


Abbildung 1: Caspase-abhängige und caspase-unabhängige Zelltodformen. Regulierte Zelltodformen können in „caspase-abhängig“ sowie „caspase-unabhängig“ klassifiziert werden. Die klassische Apoptose ist caspase-abhängig und wird mit langanhaltender Plasmaintegrität assoziiert. Als solche stellt sie eine nicht immunologische Form des Zelltods dar. Apoptose Signalwege können als „extrinsisch“ und „intrinsisch“ beschrieben werden, je nachdem ob mitochondriale Signale involviert sind oder nicht. Die Formen der regulierten Nekrose: Nekroptose, Ferroptose und mitochondriale Permeabilitäts-Transition-abhängige regulierte Nekrose (mPT-RN) sind caspaseunabhängige Formen des Zelltods und sind immunologisch. Ebenso verhält es sich mit der Autophagie. Die Pyroptose ist zwar caspase-abhängig, jedoch zählt sie gleichzeitig zu den immunologischen Zelltodformen. IL: Interleukin, ILR: Interleukin-Rezeptor, TNFR: TNF alpha-Rezeptor, IFN: Interferon, TRIF: TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β , GPX4: Glutathion Peroxidase.

1.4.1 Autophagie

Autophagie ist ein intrazellulärer hoch konservierter Prozess in Eukaryonten, bei welchem zelleigene Bestandteile wie beschädigte Zellorganellen abgebaut werden. Dabei wird das zelluläre Material in ein spezialisiertes Organell, das Autophagosom, aufgenommen. Das Autophagosom wiederum verschmilzt mit Lysosomen, dadurch entstehen sogenannte Autophagolysosomen. Anschließend wird das zytosolische Material aus den Autophagosomen durch die Enzyme der Lysosomen abgebaut. *De novo* werden Autophagosomen aus dem sogenannten Phagophore gebildet [43]. Folglich werden auf diesem Weg negative Auswirkungen auf die Zellvorgänge verhindert. Auch für TECs ist der

„Selbstverdauungsprozess“ zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase und als passende Antwort auf mannigfaltige Stressoren von großer Bedeutung [44]. Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass eine Induktion der Autophagie während des ANV stattfindet und das insbesondere in proximalen TECs [45]. Der autophagische Signalweg wird unter verschiedenen zellulären Stresssituationen hochreguliert, darunter fallen Hypoxie, Mangel an Nährstoffen und nicht zuletzt durch ER-Stress. Die meisten der Faktoren sind in der Pathogenese des ANV involviert [41]. Bis heute wird jedoch die pathophysiologische Rolle der Autophagie in TECs während ANV kontrovers diskutiert. Es gibt sowohl Hinweise darauf, dass die Autophagie einen positiven und ebenso einen determinierenden Effekt auf das Überleben der Zellen haben kann.

1.4.2. Apoptose

Caspase-abhängige Apoptose

Die Apoptose kann über zwei mögliche Signalwege eingeleitet werden: den Intrinsischen und den Extrinsischen. Der extrinsische Weg wird dabei unter anderem von Liganden wie FAS/CD95 Ligand (FASL/CD95L) und Zytokinen wie dem Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder der TNF Superfamilie angehörenden Molekülen (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) initiiert, die an verschiedene transmembrane Todesrezeptoren binden. Dies führt nach Oligomerisierung der Todesrezeptoren zur Bildung des Komplexes namens DISC („death-inducing signaling complex“) und damit zur Einleitung der Caspasen-Kaskade [46]. Als Erstes werden die Adaptercaspasen, insbesondere die Caspasen 8 und 10, aktiviert. Die Effektorcaspasen, die danach folgen, sind für die eigentlichen morphologischen Veränderungen der Zelle nach Induktion der Apoptose verantwortlich. Unter den Effektorcaspasen spielen vor allem die Caspasen 3, 6 und 7 eine entscheidende Rolle [47].

DNA Schäden, oxidativer Stress, die Akkumulation ungefalteter Proteine im ER und viele andere intrazelluläre Stressfaktoren führen stattdessen zur intrinsischen Aktivierung der Apoptose. Allen gemeinsam ist die Wirkung auf die Mitochondrien [48]. Wenn letale Signale an Oberhand gewinnen, kommt es zur mitochondrialen Außenmembranpermeabilität (MOMP), was einen Zusammenbruch des mitochondrialen transmembranen Potentials und eine Hemmung der mitochondrialen ATP-Synthese zur Folge hat. Die Atmungskette wird unterbrochen und es resultiert daraus eine Überproduktion an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).

Trotz positiver Effekte hat Cyclosporin auch eine vasokonstriktorische Eigenschaft, die Nierenschäden durch reduziertes Sauerstoffangebot verstärkt und keine nützliche Option zur

Therapie des ANV darstellt [49]. Zudem werden Proteine ins Zytosol freigesetzt, die normalerweise an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran sitzen. Ein Beispiel ist der Elektronentransporter Cytochrom c der Atmungskette [50]. Nach Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol wird Caspase 9 aktiviert. Diese kommt ihrer Aufgabe als Adaptercaspase nach und aktiviert die Effektorcaspase 3, welche dann die Zelle in die Apoptose treibt [51]. Schumer et al [52] zeigten, dass die Apoptose am Prozess der ANV beteiligt ist. Seither hat man in einer Vielzahl von Modellen des ANV tubuläre Apoptose nachweisen können.

Ein Apoptose-induzierender Faktor stellt die Gruppe der Nephrotoxine mit dem Beispiel des nierenschädigenden Zytostatikums Cisplatin dar [53]. Aber auch bei Sepsis-vermitteltem ANV wird Apoptose induziert [54]. Die von Apoptose betroffenen Zellen sind sowohl in der Nierenrinde als auch im Nierenmark verteten. Im Tubulussystem tritt diese Form des programmierten Zelltods im proximalen, distalen Segment als auch in den Tubuluszellen der Henleschleife auf [52]. Das biologische Phänomen ist gekennzeichnet durch Zellmembranausstülpungen (blebbing), das Schrumpfen der Zelle, Chromatinkondensation und DNA Fragmentierung ohne Ruptur der Zellmembran [55].

Caspase-unabhängige Apoptose (CIA)

Neben der caspase-abhängigen Apoptose kann auch caspase-unabhängiger apoptotischer Zelltod auftreten, der zwar typische Merkmale der Apoptose wie u.a. DNA-Fragmentierung und das Wegfallen einer immunologischen Antwort zeigt, allerdings ohne das Mitwirken von Caspasen ausgelöst werden kann. Akteure in dem Signalweg sind die mitochondrialen proapoptotischen Proteine AIF (Apoptosis Inducing Factor) und Endonuklease G. Diese werden aus dem mitochondrialen Intermembranraum freigesetzt nach Induktion der Apoptose und können in den Zellkern translozieren. Dort erfolgt die Induktion der internukleosomalen DNA-Fragmentierung und DNA-Kondensation ohne Mitbeteiligung aktivierter Caspasen [56-58].

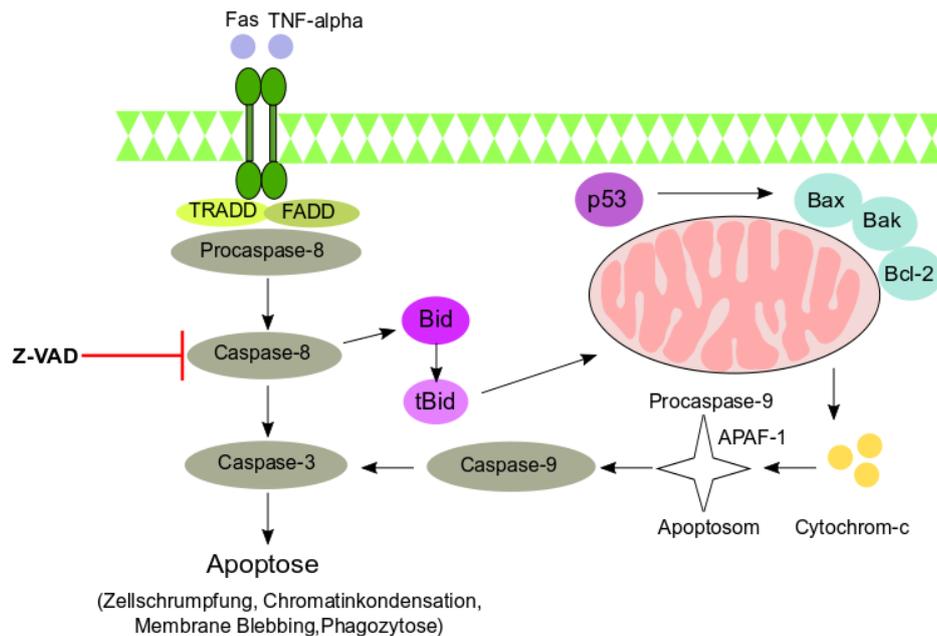


Abbildung 2: Extrinsischer und intrinsischer Weg der Apoptose sowie Inhibition der Apoptose durch Z-VAD Apoptose wird via zwei Signalkaskaden initiiert: dem Extrinsischem Weg und dem Intrinsischen. Beim intrinsischen Pathway stimuliert p53 die Expression proapoptotisch wirkender Mitglieder der Bcl-2 Familie (z. B. Bak, Bax). Nachfolgend kommt es zur Ausschüttung der proapoptotischen Faktoren (z.B. Cytochrom c) aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Es erfolgt eine Konformitätsänderung des Proteins aufgrund der Bindung von Cytochrom c an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1). Nun kann die Procaspase 9 binden. Es bildet sich im Verlauf das Apoptosom. Analog zu Caspase 8 läutet die aktive Caspase 9 die Caspase-Kaskade ein. Der extrinsische Signalweg wird ausgelöst von Zelltodliganden (z.B. Fas, TNF-alpha etc.) und aktiviert FADD („Fas assoziierte Protein mit Todesdomäne“), welches nachfolgend Procaspase-8 in Caspase-8 spaltet. Caspase-8 wiederum triggert die Effektorcaspasen u.a. Caspase-3. **Z-VAD** ist ein irreversibler Pancaspasen-Inhibitor, welcher u.a. die Caspase-8 blockiert und somit Apoptose drosselt.

1.4.3. Nekrose

Nekrose als Zelltodform wurde bereits 1970 erwähnt. Bei der Nekrose ist eine Zelle so stark geschädigt, dass sie nicht mehr fähig ist, eine geordnete Apoptose einzuleiten. Die Folgen sind mannigfaltig. Es beginnt im Gegensatz zum Zellschrumpfen im Rahmen der Apoptose mit einem Anschwellen sowohl der Zelle selbst als auch der Organellen. Zudem kann es zur kompletten Zellyse und der Ruptur der Plasmamembran kommen. Und während bei der Apoptose eine Chromatinverdichtung im Nucleus zu beobachten ist, findet man in nekrotischen Zellen einen geschwollenen Zellkern. Gleichzeitig wird die Nekrose häufig von extensiven entzündlichen und immunologischen Reaktionen begleitet, während die Apoptose nur minimale inflammatorische Konsequenzen zeigt.

Aus diesem Grund sind die beobachteten akuten Tubulusepithelzellschäden während des ANV als akute tubuläre Nekrose, kurz ATN bezeichnet worden, obgleich dies nur auf histologische Beobachtungen ohne weitere Beweise gestützt wurde [59]. Im Jahre 1998 haben

Lieberthal et al [60] die Koexistenz von Apoptose und Nekrose in TECs bei ANV durch Versuche in akut ischämisch und nephrotoxisch geschädigten Nieren nachgewiesen. Die regulierte Nekrose kann abermals in die Untergruppen Nekroptose, mitochondriale Permeabilitäts-Transition-abhängige regulierte Nekrose, Ferroptose und Parthanatos eingeteilt werden. Man fand heraus, dass die regulierte Nekrose sowohl bei physiologischen Ereignissen unter anderem während der Embryogenese als auch bei pathologischen Prozessen wie dem ANV eine bedeutende Rolle spielt [61].

1.4.4 Nekroptose

Als einer der am besten erforschten Subtypen der regulierten Nekrose stellt die Nekroptose, gekennzeichnet durch Apoptose und Nekrose, auch eine entscheidende Zelltodform in TECs dar [62]. Nekroptose zeichnet sich durch die Aktivierung ähnlicher Todesrezeptoren beispielsweise des Fas-Rezeptors wie bei der Apoptose aus, allerdings gehen die Zellen nachfolgend via Nekrose zugrunde. Yuan und Kollegen stellten die Vermutung auf, dass abgesehen von FADD, Caspase 8 und TRADD noch weitere Moleküle mit den intrazellulären Teilen der Todes-Rezeptoren assoziiert sind. Eines dieser Signalmoleküle ist RIPK (*receptor-interacting serine/threonine-protein kinase*)-1. Die Aktivität von RIPK-1 wird von Caspase 8 beeinflusst. Caspase 8 fungiert als Apoptoseinitiator und hemmt gleichzeitig die Nekroptose. Aus diesem Grund kann in den meisten Fällen nach Aktivierung der Todesrezeptoren lediglich Apoptose, jedoch keine Nekroptose festgestellt werden [62]. Linkermann et al identifizierte das Enzym RIPK-1 im Kontext der Nekroptose als vermittelnden Faktor, der durch das Molekül Necrostatin-1 gehemmt werden kann [63].

Der Zelltodmechanismus kann allerdings auch durch andere mannigfaltige Stimuli ausgelöst werden. Hierunter fallen die Toll-like-Rezeptoren, Interferone und das intrazelluläre Protein DIA (DNA-dependent activator of IFN regulatory factors), das als Antwort auf virale Erreger freigesetzt wird. Unter den Trigger ist das TNF-alpha-Modell der Nekroptose bei gleichzeitiger Caspasenhemmung/Apoptosehemmung, das am besten charakterisierte. Nach Bindung von TNF-alpha an seinen Rezeptor TNFR1 sorgen einige Moleküle für die Rekrutierung von RIP1. RIP1 und RIP3 formen dann einen Komplex, das Nekrosom [64], das eine intrazelluläre Amyloidähnliche Struktur hat [65]. Es kommt zur Autophosphorylierung und dadurch zur Aktivierung von RIP3, das nun mit der Pseudokinase MLKL (mixed lineage kinase domain-like protein) interagiert und letztlich die Nekroptose einleitet [66]. Durch die Freisetzung von sogenannten DAMPs (cell damage-associated molecular patterns) aus nekrotischen Zellen kann es zu einer Mitbeteiligung des Immunsystems kommen, was auch

als Necroinflammation bezeichnet wird [67-69]. Beide Moleküle, RIPK1 und RIPK3, werden für die Initiation der Nekroptose benötigt, allerdings haben unter anderem Upton et al [70] beobachtet, dass Nekroptose auch in Abwesenheit von RIPK1 stattfinden kann. Folglich kann man festhalten, dass Nekroptose ein RIPK3 abhängiger Zelltodmechanismus ist, der durch spezifische Inhibitoren wie Dabrafenib aufgehalten und so Nekroptose verhindert werden kann [42].

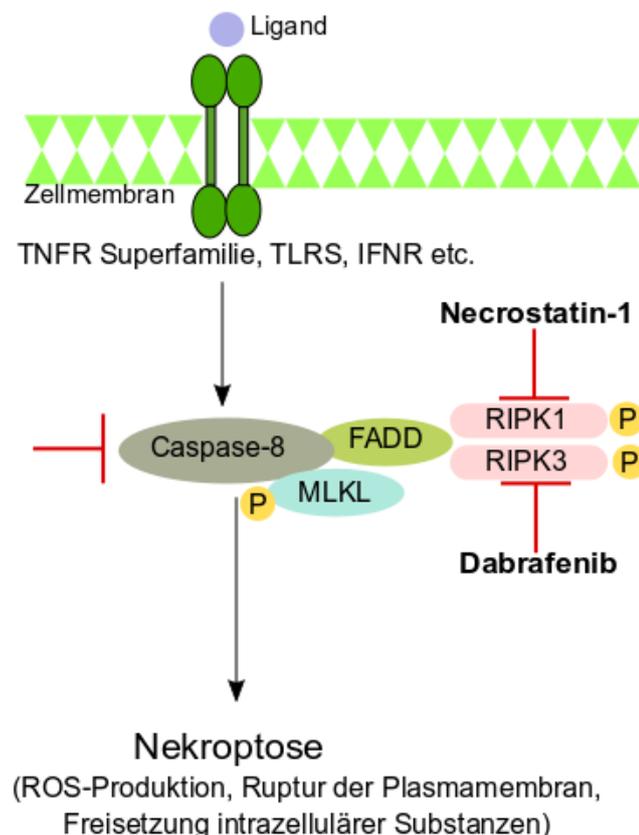


Abbildung 3: Nekroptose Signalweg sowie Inhibition durch Necrostatin-1 und Dabrafenib

Die Nekroptose ist eine RIPK3-abhängige regulierte Nekrose. Sie zeichnet sich dabei durch eine Aktivierung von Todes-Rezeptoren (z.B. des TNF-Rezeptors) wie bei der Apoptose aus, jedoch folgt im Anschluss anders als bei der Apoptose die Selbstverdauung. Wenn die Inhibition der Caspase-8 erfolgt, bilden RIP1 und RIP3 einen Komplex. RIP3 aktiviert zudem den „downstream factor“ MLKL („mixed lineage kinase domain-like protein“), welche die Nekroptose einleitet. Necrostatin-1 hemmt RIP1, während Dabrafenib selektiv RIP3 inhibiert.

1.4.5. Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore

Die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) stellt einen mitochondrialen Proteinkomplex dar. Die konkrete Struktur der mPTP ist noch ungeklärt. Nach aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen sind drei essentielle Bausteine an ihrem Aufbau beteiligt. Diese sind ein zur äußeren mitochondrialen Membran gerichteter spannungsgesteuerter Anionenkanal (VDAC), eine zur inneren mitochondrialen Membran gerichtete Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT) und Cyclophilin D (Cyp-D). Durch die Exposition des

Proteinkomplexes gegenüber zellulären Stress, z.B. in Form einer zytosolischen Ca^{2+} -Überlastung oder einer erheblichen Konzentration an reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), entwickelt sich eine sog. „Mega-Pore“ zwischen der inneren und äußeren mitochondrialen Membran aus. Sie stellt eine unspezifische Pore dar, welche für Moleküle bis 1,5 kDa permeabel ist [71]. Die Folge der mPTP-Öffnung ist ein Wegfall der mitochondrialen Ionenkompartimentierung als auch ein Zusammenbruch der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung. Des Weiteren kann sowohl ein nekrotischer als auch apoptotischer Zelltod verursacht werden [72]. Gleichzeitig spielt die mPTP bei der Autophagie eine Rolle, da sie bei der Beseitigung beschädigter Mitochondrien, Mitophagie, mitbeteiligt ist [73].

Eine Gruppe von Molekülen, die die Fähigkeit besitzt durch die Bindung an Cyclophilin D die mPTP-Öffnung zu blockieren, sind die Cyclosporine [74]. Wen und sein Forschungsteam konnten 2012 bereits nach einer Dosis Cyclosporin-A einen protektiven Effekt in Mäusen mit Folsäureinduziertem ANV sehen [75]. Zudem wurde eine reduzierte mPT in Hypoxie-exponierten Nierentubuli von Hasen entdeckt, welche mit Cyclosporinen behandelt wurde [76]. Allerdings fand man heraus, dass die Cyclosporin-Dosis einen entscheidenden Faktor darstellt. So führen niedrige Konzentrationen und eine kurze Gabe von Cyclosporin-A zu protektiven Effekten, während vor allem bei längerfristiger Therapie das Risiko nephrotoxischer Wirkungen steigt [75].

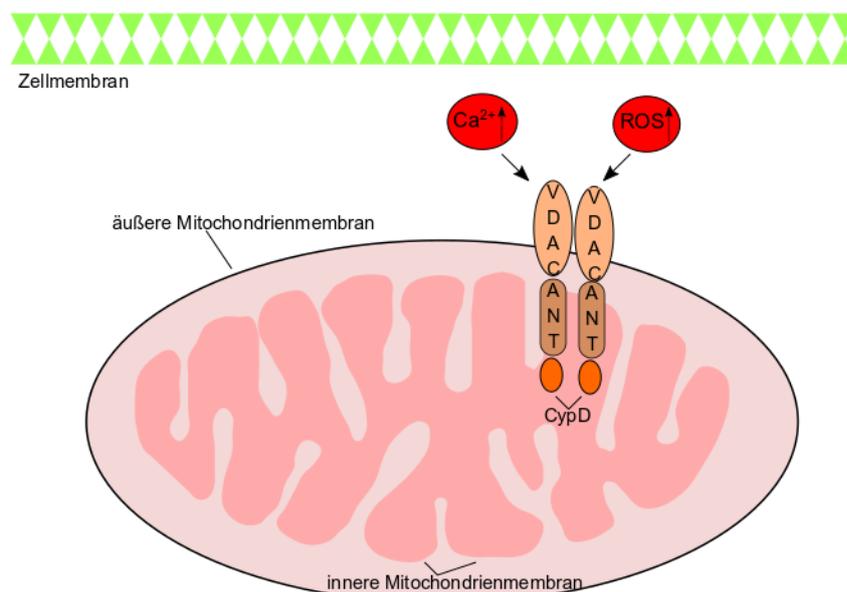


Abbildung 4: mPTP („mitochondriale Permiabilitäts-Transitions-Pore“) vermittelter Zelltod
 ROS: „reactive oxygen species“, VDAC: Voltage-dependent anion channel, ANT: Adenin-Nukleotid-Translokase, CypD: Cyclophilin D

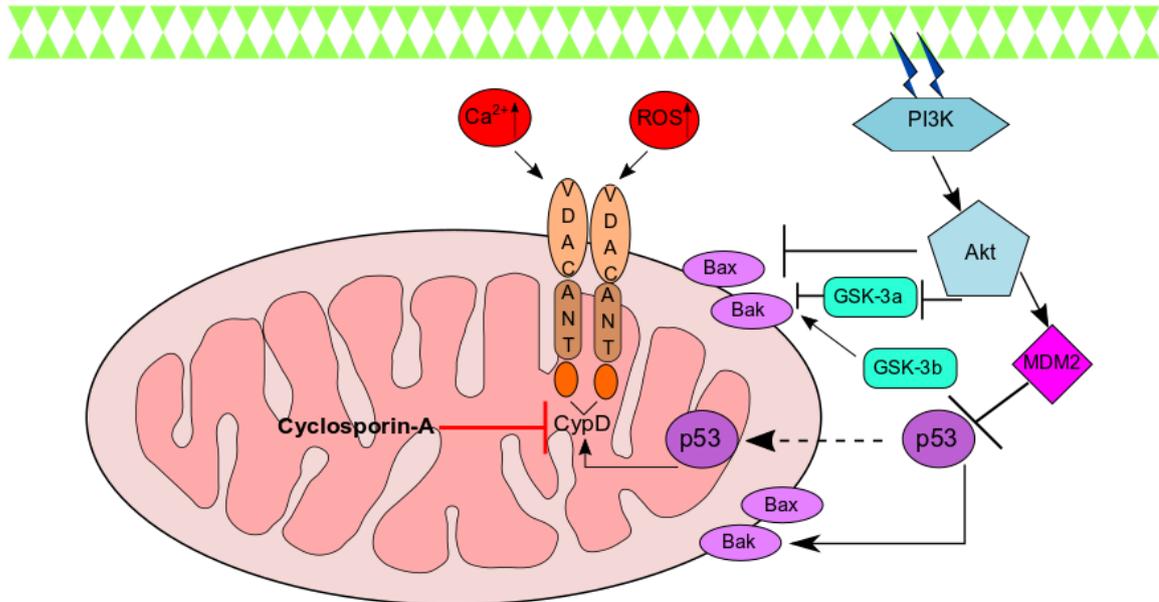


Abbildung 5: Einfluss von MDM2 und p53 auf mPTP sowie Cyclosporin-A als mPTP-Inhibition
 Die PI3K-Akt-GSK3-Achse repräsentiert die Hauptsignalkaskade der mPTP-Regulation. Sie reguliert über MDM2 vermittelte p53-Hemmung den mPTP-vermittelten Zelltod via Megapore. Cyclosporin-A fungiert als Restriktor des Cyclophilin D.

1.5 Die Moleküle MDM2 und p53

1.5.1 Die Entdeckung und Funktion von MDM2

Seit dem Jahr 1991 hat sich das Verständnis von Zellwachstum und Zelltod auch im Rahmen der Tumorgenese wesentlich verändert. In einem Tiermodell identifizierte man ein Gen, welches kanzerogenes Potential und voraussichtlich eine bedeutende Rolle in der Zellwachstumskontrolle hat, wie es Dona George, die Entdeckerin von murine-double-minute-2 (MDM2), damals ausdrückte [77]. Sowohl genetische als auch biochemische Studien haben aufgezeigt, dass MDM2 ein wichtiges intrazelluläres Protein mit einer Vielzahl unterschiedlicher Funktionen im Bereich der Tumorgenese, der Wundheilung und nicht zuletzt der Gewebsinflammation darstellt. Die Relevanz dieses Proteins wurde im Kontext der Erforschung des Tumorsuppressorgens p53 aufgezeigt [78]. Hierbei identifizierte man MDM2 als negativen Schlüsselregulator von p53. MDM2 und p53 formen dabei eine oszillierende autoregulatorische Feedbackschleife, die unter enger Kontrolle steht, um eine adäquate Antwort auf Umwelteinflüsse und somit auf die Suppression einer Tumorbildung zu ermöglichen [79]. Aber nicht nur in der Kanzerogenese nimmt MDM2 einen hohen Stellenwert ein, sondern auch bei der Embryogenese entdeckte man, dass *Mdm2* Knockout (KO) Mäuse nicht lebensfähig waren. Weiterführende Analysen bestätigten die embryonale

Letalität bei *MDM2* KO nach Implantation der Blastozyste, während man bei einem anschließenden Doppelknockout von *Mdm2* und *p53* diesen Prozess stoppen konnte [80].

1.5.2 Die Entdeckung und Funktion des Proteins p53

P53, besser bekannt als „Wächter des Genoms“ wurde im Jahre 1979 von sechs voneinander unabhängigen Arbeitsgruppen als 5400 Da schweres nicht-virales, zelluläres Protein charakterisiert, welches ein Jahr zuvor als ein Affenvirus mit dem Namen SV40 entdeckt wurde [81-84].

Das TP 53 Gen kodiert wiederum den aus 393 Aminosäuren bestehenden Transkriptionsfaktor p53 [85]. Das Molekül ist vorwiegend im Zellkern anzutreffen und wird zudem ubiquitär exprimiert [86]. Zu Beginn war der Großteil der Wissenschaftler davon überzeugt, dass das Molekül p53 ein Onkogen sei. Erst 10 Jahre später hat man seine Bedeutung als Tumorsuppressorgen in der Onkologie verstanden. In den darauffolgenden Jahren fand man heraus, dass p53 mehrere Zellprogramme reguliert. Unter diese Zellprogramme fallen unter anderem die Zellzyklusverhaftung, verschiedene Zelltodesmechanismen (Apoptose, Autophagie) sowie die Immunregulation [87]. Ein DNA-Schaden stellt einen der unzähligen Stressfaktoren dar, der zur p53-Aktivierung beiträgt [88]. Um zugleich eine Balance der p53 Expression und des proteasomalen p53-Abbaus zu erreichen, wird p53 von seinem Hauptnegativregulator MDM2 kontrolliert. Parallel hierzu wird die MDM2-Expression durch p53 aktiviert. Somit bilden die beiden interagierenden Moleküle eine negative Feedbackschleife, welche unter anderem von großer Bedeutung ist, um das p53-Protein unter zellulär normalen Bedingungen auf einem niedrigen Level zu halten [89].

Physiologische Funktionen von p53

Das Molekül p53 wird als protektiver Faktor im Rahmen der Onkogenese angesehen. Im normalen Zellzyklus sorgt der Tumorsuppressor dafür, dass sich eine Zelle nur weiter teilen kann, wenn das Erbgut der Zelle intakt ist. In einer physiologisch normalen Zelle bedeutet dies, dass die Konzentration des p53 Proteins extrem gering ist und die Halbwertszeit nur bei einem Maximum von 20 Minuten liegt [85]. Wenn jedoch die DNA größere Schäden aufweist, steigt der p53-Spiegel in der Zelle innerhalb weniger Minuten massiv an und verhindert die weitere Zellteilung bzw. leitet die Apoptose der beschädigten Zelle ein. Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass sich mutierte Zellen nicht weiter vermehren können. Diese Funktionen des Moleküls p53 als Zellzyklusrestriktor als auch als

Apoptoseinduktor werden sowohl über dessen Konzentration als auch über den Phosphorylierungsstatus gesteuert.

Folglich wird p53 konstitutiv exprimiert, bei intakter DNA aber ständig sofort wieder abgebaut. Der Abbau wird durch die Ubiquitinierung von p53 initiiert, wobei für diesen Schritt die E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 verantwortlich ist. Nach DNA-Schäden wird p53 phosphoryliert, wodurch MDM2 nicht mehr binden kann und der proteasomale Abbau ausbleibt. Als Konsequenz daraus steigt die Konzentration von p53. Nach der Akkumulation großer Mengen von p53 können nun Signalwege aktiviert werden, welche zum Ziel haben die nicht mehr intakte DNS zu reparieren. Dies findet an unterschiedlichen sogenannten „Checkpoint“-Kontrollen statt [90]. Der Zellzyklusarrest findet hierbei vor allem am G1-S-Übergang und am G2-M-Übergang statt. Der G1-Block wird durch eine vermehrte Expression von p21 bedingt, da p21 das weitere Fortschreiten des Zellzyklus durch eine Hemmung des D-Cyclin/CDK4/6-Komplexes unterbindet. Ein G2-Block tritt ein, wenn das Genom fehlerhaft oder nicht vollständig repliziert wurde oder die Schädigung erst nach der S-Phase erfolgt. Hier wird die Einleitung der Mitose blockiert, indem p53 die Aktivierung des B-Cyclin/CDK1-Komplexes verhindert. Wenn allerdings die Schäden im Genom so schwerwiegend sind, dass eine Reparatur nicht mehr möglich und sinnvoll erscheint, erfolgt die Induktion der Apoptose [91]. Eine entscheidende Rolle hierbei spielt das BAX-Gen (Bcl-2-associated X protein), der Kofaktor des Tumorsuppressor-Proteins p53. BAX wird durch den Transkriptionsfaktor p53 vermehrt exprimiert und beschleunigt die Einleitung der Apoptose [51, 92]. Die Kontrolle über den Zellzyklus und die Zellproliferation ist jedoch nicht mehr gewährleistet, wenn das Aktivitätsniveau von p53 als Folge von Mutationen eingeschränkt ist. So wurde bekannt, dass dem autosomal dominant vererbten Tumorprädispositions-Syndrom, Li-Fraumeni, eine Keimbahnmutation im für das Protein p53 kodierendem Tumorsuppressorgen am Genort 17 p13.1 zugrunde liegt. Diese veränderte Genausstattung führt dazu, dass bereits in jungen Jahren diverse Krebsarten auftreten können, darunter Sarkome, prämenopausale Mammakarzinome und sogar Hirntumore [93]. Insofern scheint es sinnvoll nach möglichen Therapien zu suchen, die im Stande sind, die Funktion von p53 wiederherzustellen. Allerdings ist das Ansprechen von Tumoren mit einer p53 Mutation im Hinblick auf Chemotherapie und Radiotherapie nur sehr schlecht. Da es nämlich der Sinn dieser Therapien ist, die DNA der Tumorzellen zu schädigen und nachfolgend die Apoptose dieser Zelle einzuleiten, können funktionsunfähige p53 Proteine die Schäden nicht registrieren. Aus diesem Grund ist die Prognose bei Patienten mit einem inaktiven p53 erfahrungsgemäß wesentlich schlechter als bei funktionsfähigem p53 [94].

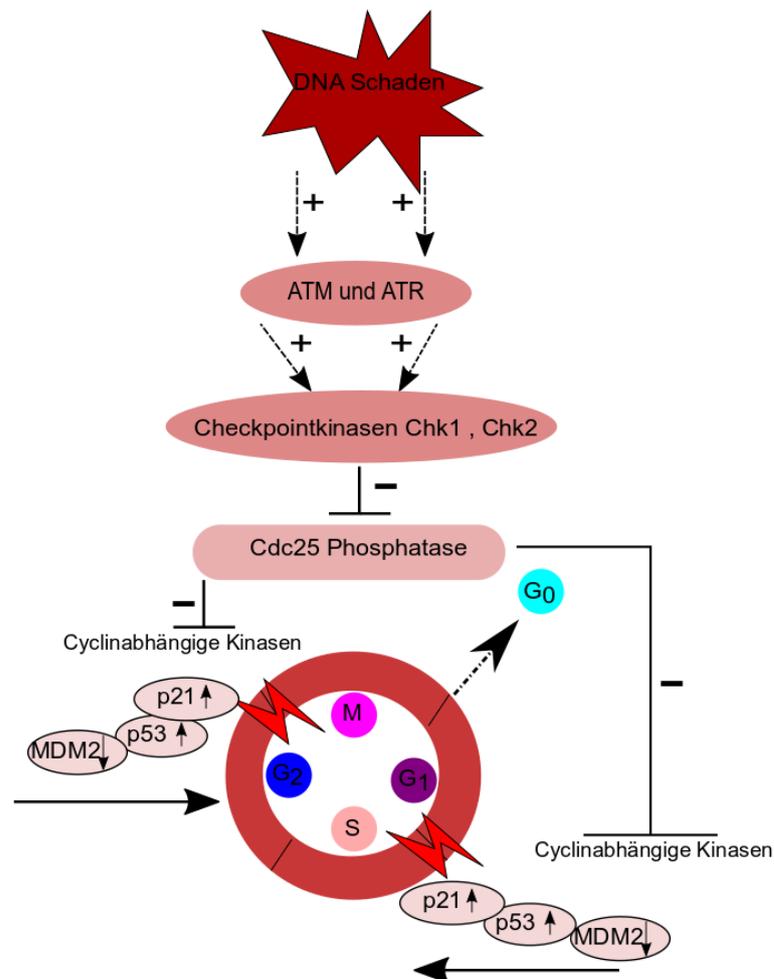


Abbildung 6: Die Bedeutung von MDM2 und p53 im Zellzyklus.

DNA-Schäden beeinflussen den Zellzyklus, indem u.a. die MDM2-p53-p21-Kaskade aktiviert wird. Die Inhibition von cyclinabhängigen Kinasen ist essentiell für die G1/S- und G2/M-Blockade. Eine Induktion der Transkription des p21 (bzw. CDK-Inhibitor 1) führt zu einem Stillstand des Zellzyklus. Ebenso trägt das verminderte MDM2-Level zur erhöhten p53 Expression bei, was wiederum mit vermehrter Apoptose assoziiert ist, welche bei zu großen, irreparablen Schäden eingeleitet wird. ATM: "Ataxia Telangiectasia Mutated", ATR: "Ataxia telangiectasia and Rad3 related" Chk1,2: Checkpointkinasen1,2, Cdc25 Phosphatase: Cell division cycle 25 Phosphatase

1.5.3 MDM2/p53 Interaktion

MDM2 ist einer der wichtigsten negativen Regulatoren von p53 und somit ein Protoonkogen. Wie zuvor erwähnt wird p53 konstitutiv exprimiert und bei intakter DNA kontinuierlich abgebaut. Oliner et al [95] zeigte, dass MDM2 durch das Andocken an das N-terminale Ende einer p53 Bindungsdomäne die Fähigkeit besitzt, die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor zu supprimieren und folglich die Transkription proapoptotischer Gene zu reduzieren [96]. Hauptaugenmerk des MDM2-abhängigen p53-Abbaus stellt jedoch das Ubiquitinierungssystem dar. Hier fungiert MDM2 als E3-Ubiquitin-Ligase und initiiert die Polyubiquitinierung von p53 mit konsekutiven Abbau im 26S-Proteasom [97-99]. Daten

zeigen, dass eine geringe Expression von MDM2 für eine Monoubiquitinierung und den darauffolgenden Export von p53 vom Nucleus ins Zytoplasma verantwortlich ist. Wobei p53 nun seine Funktion als Transkriptionsfaktor nicht mehr ausüben kann. Wohingegen ein höheres MDM2 Level zur Polyubiquitinierung mit anschließender Degradation durch das bereits erwähnte Proteasom führt [100]. P53 bewirkt hingegen eine verstärkte Expression von MDM2. Dies ist physiologisch sinnvoll, da p53 nach Zellzyklusarrest und behobenem Schaden, verstärkt abgebaut werden muss. Solange jedoch die Schädigung besteht, liegt p53 in phosphorylierter Form vor und ist dadurch vor dem Abbau geschützt [101] (Abbildung 7).

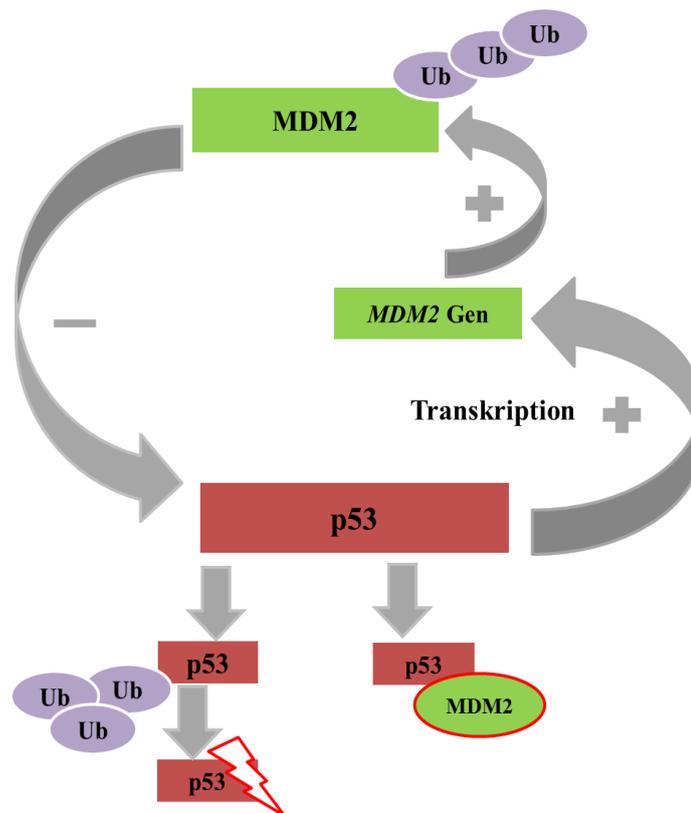


Abbildung 7: MDM2/p53 Interaktion. MDM2 stellt eine E3-Ubiquitin-Ligase dar, welche p53 mittels Ubiquitinierung negativ regulieren und somit abbauen kann. Gleichzeitig kann MDM2 seinen eigenen Abbau in Form einer proteasomalen Degradation ebenfalls durch Ubiquitinierung hervorrufen. Wiederum aktiviert p53 die Transkription der MDM2 Gene, was in erhöhten Level von MDM2 resultiert. Demnach kontrollieren p53 und MDM2 sich gegenseitig mithilfe einer autoregulatorischer Feedback-Schleife.

1.5.4 Die Rolle von MDM2 bei akutem Nierenversagen

Erst vor kurzem stellte sich heraus, dass MDM2 im Rahmen des ANV zwei unterschiedliche Funktionen erfüllt. In der frühen Phase identifizierte man einen p53-unabhängigen Effekt, welcher mit einer vermehrten sterilen Inflammationsreaktion im Nierengewebe einherging. Nach überstandener Entzündungsphase wird anschließend die Tubuluszellregeneration eingeleitet. Dies geschieht durch MDM2-vermittelte p53 Hemmung. Wobei die Induktion

proapoptotischer Gene und das Tubuluszellsterben unterbunden werden. Um diese Hypothesen zu bestätigen wurde Nutlin-3a, ein MDM2-Antagonist, in Mäusenieren mit ischämisch induziertem ANV verwendet. Die Daten zeigten, dass die Inhibition von MDM2-vermittelter p53 Degradation bei ischämisch induziertem ANV mit weniger Tubulusschaden sowohl im proximalen als auch distalen Tubulus verbunden war. Da jedoch die p53 Überexpression bekannterweise für die Tubuluszellapoptose und die Progression des ANV verantwortlich ist, musste der protektive Effekt über p53-unabhängige Effekte gewährleistet sein. Es stellte sich heraus, dass MDM2 die Expression proinflammatorisch wirkender Zytokine und Chemokine über die erleichterte Bindung von NF-κB an die Promotoren seiner Zielgene erreichte [102]. Zusammengefasst kann man sagen, dass MDM2 sowohl p53 als auch NF-κB regulieren und abhängig von der jeweiligen Situation entweder proinflammatorisch/promitogenetisch oder antiinflammatorisch/proapoptotisch bei ANV wirken kann [103].

Im gleichen Zeitraum wurde die Rolle von Nrf2 (NF-E2-related factor) erforscht. Der Proteinschalter Nrf2 wird auch Transkriptionsfaktor genannt, da er spezifische Gene, die die Zelle in bestimmten Situationen benötigt, aktiviert. So ist es nicht nur für seine Rolle in der Wundheilung und seinen Schutz gegen Induktion von Kanzerogenese bekannt, sondern wurde auch im Zusammenspiel mit MDM2 als mögliche Therapie toxischer und postischämischer ANV angeführt [104].

1.5.5 Die Rolle von p53 bei akutem Nierenversagen

Wie bereits oben ausgeführt, ist die Tubuluszellschädigung maßgeblich am Prozess des ANV beteiligt. Dabei treten innerhalb der Tubuluszellen verschiedene Arten des Zelltodes auf, unter anderem die Apoptose. Da p53 einen wichtigen Trigger für die Apoptoseeinleitung unter zellulärem Stress darstellt, trägt p53 auch während der Genese des ANV wesentlich zu dessen Fortschreiten bei [105, 106]. Dies geschieht hauptsächlich in der frühen Phase des ANV [102]. Die pathophysiologische Rolle von p53 bei ANV wird bereits seit über einem Jahrzehnt kontrovers diskutiert. Es wird vermutet, dass p53 je nach Zell- oder Gewebstyp eine individuelle, spezifische oder gar gegensätzliche Rolle in der Pathogenese des akuten Nierenversagens innehat. So hat der p53 Anstieg in Leukozyten einen antiinflammatorischen und folglich nephroprotektiven Effekt, während eine verstärkte p53-Aktivierung in Tubuluszellen einen Mediator für das ANV verkörpert.

Im Rahmen globaler Analysen bei Ischämie-induziertem ANV wurden erstmals 371 Gene im kortikalen Nierengewebe identifiziert, unter denen 31 Gene alleine dem proximalen Tubulus

zugerechnet werden konnten. Diese 31 Gene enthielten unter anderem einige Gene, die in Mechanismen, die den Zelltod und das Zellüberleben regulieren, involviert sind: darunter Bax (Bcl-2-associated x), PUMA- α (p53 upregulated modulator of apoptosis), Siva (CD27 binding protein) und p21.

1.5.6 Therapieansätze zur Modulierung von MDM2 und p53

Derzeit liegen viele therapeutische Alternativen vor, die mit MDM2 Inhibitoren in Bezug auf unterschiedliche Ziele arbeiten. Die erste Therapiemöglichkeit besteht in der Hemmung der bekannten E3-Ubiquitin-Ligase-Funktion von MDM2 [107]. Jedoch stellte sich im Rahmen einer Studie von Wade et al im Jahr 2012 heraus, dass die funktionelle Hemmung der MDM2 Ligase zu keiner suffizienten p53 Aktivierung führte [108]. Stattdessen fokussierte man sich schließlich auf die Protein-Protein-Interaktion von MDM2 und p53. Die Strategie der Unterbrechung der MDM2/p53-Proteininteraktion eignet sich gut als Tumorthherapie bei Karzinomen mit erhaltenem p53 Wildtyp. In diesem Kontext spielen kleine Moleküle namens Nutline eine wesentliche Rolle. Nutline sind cis-Imidazoline. Vassilev et al identifizierte Nutlin-1, Nutlin-2 und Nutlin-3. Sie binden mit ihrer kristallinen Struktur in die p53-spezifische hydrophobe Bindungstasche von MDM2, aktivieren somit den p53-Signalweg in Tumorzellen und führen so zu Zellzyklusarrest, Apoptose und Wachstumsrestriktion [109]. Andere Moleküle, die fähig sind die Protein-Protein-Interaktion zu blockieren sind die Spirooxindol-Inhibitoren MI-63 und MI-219. Sie zeigen eine hervorragende Spezifität für die Bindungsdomänen der angesteuerten Therapieziele und weisen gegenüber normalen, nicht entarteten Zellen eine nur minimale Toxizität auf [110-112]. Neben der hohen Potenz und Selektivität von Cis-Imidazoline und Spirooxindol-Analoga zeigen sie eine exzellente Zellpermeabilität. Besonders die Vertreter Nutlin-3 und MI-219 wurden für ihre in vitro und in vivo antitumoralen Aktivitäten hervorgehoben. Sie wurden aus den genannten Gründen als vielversprechende Therapiekandidaten angepriesen, um durch eine spezifische MDM2-p53-Interaktionsblockade eine Reaktivierung von p53 zu induzieren [113].

Allerdings stellte sich einige Jahre später heraus, dass bei Gabe von Nutlin-3a über einen längeren Zeitraum die Inzidenz von p53 Mutationen ansteigt und man diesbezüglich Bedenken aufgrund der möglichen Entstehung neuer Tumore hat [114]. Deshalb hat man in den letzten Jahren neben Nutlinen und Spirooxindole eine Reihe anderer Moleküle mit ähnlichen Wirkmechanismus als mögliche Alternative etabliert, die sich jedoch alle noch in der Anfangsphase klinischer Studien befinden [115]. RG7388, ein Pyrrolidin und ebenfalls angehöriger der Nutlin-Familie, fungiert als MDM2-Inhibitor der zweiten Generation und

zeigt ein im Vergleich zu Nultin-3a und der Erstgenerationssubstanz RG7112 eine höhere Bioverfügbarkeit und eine verbesserte Potenz.

Abschließend ist zu sagen, dass trotz der Investigation und Weiterentwicklung der MDM2-Inhibitoren mit potentiell schweren Nebenwirkungen/-effekten zu rechnen ist, da MDM2 auch in mannigfaltiger Weise mit anderen Proteinen interagiert, unter anderem durch seine Ubiquitinierungsfunktion bei Steroidhormonrezeptoren [115]. Nun muss man die weiteren Ergebnisse der klinischen Studien abwarten.

2. Hypothese

ANV ist eine in multiplen Phasen ablaufende sowie multifaktoriell verursachte Nierenstörung, die mit einem schnellen Abfall der Nierenfunktion vergesellschaftet ist. Konsequenzen sieht man durch die daraus resultierende Akkumulation von metabolischen Abfallprodukten und Toxinen, was wiederum drastische Komplikationen und Versagen anderer Organe nach sich zieht [17]. Allerdings hat die Niere ein enormes Regenerationspotential, sodass die Prognose für die Wiederherstellung der Nierenfunktion *ad integrum* oftmals gut ist.

Unter normalen Bedingungen konnten Thomasova *et al.* zeigen, dass MDM2 einen entscheidenden protektiven Effekt auf die Homöostase und somit das Langzeitüberleben der Podozyten hat, indem es vor Podoptose („p53-overactivation-cell-death“) schützt. Durch anschließende Doppeldeletion von *Mdm2* und *p53* konnte der Podozytenverlust vermieden werden [116]. Da ruhende Tubulusepithelzellen ebenso eine hohe MDM2 Expression zeigen und die Relevanz von p53 im Rahmen des ANV bekannt ist, war das nächste Ziel diesen Regelkreislauf in Tubulusepithelzellen zu erforschen und durch einen *Mdm2/p53* Doppelknockout (dKO) das ANV zu verhindern.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es zu untersuchen, ob die Deletion von MDM2 und p53 zum Tubuluszellschaden führt und somit zum ANV.

Die genauen Hypothesen dieser Doktorarbeit waren wie folgt:

1. *Mdm2* KO in TECs führt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einem p53-Überexpression-induziertem ANV namens Podoptose („p53-overactivation-related-cell-death“),
2. Podoptose stellt einen caspase-unabhängigen Zelltod dar,
3. Ein Doppelknockout von *Mdm2* und *p53* verhindert eine Verschlechterung der Nierenfunktion aufgrund eines ANV.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Instrumente

Mikroskope:

Lichtmikroskop Leica DMRBE	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Lichtmikroskop Leitz DM IL LED	Leica Microsysteme, Solms, DE
Lichtmikroskop Wild MPS 52	Leica Microsysteme, Solms, DE

Zentrifugen:

Zentrifuge Universal 16	Hettich, Bäch, CH
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Osterode, DE
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg, DE
Mini- Zentrifuge Sprout	Kisker Biotechnologie, Steinfurt, DE

Pipetten:

Pipettierhilfe EasyPet 3	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipettierhilfe Pipetus-classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipette Pipetman (2, 20, 200, 1000µl)	Gilson, Middleton, USA
Pipette Research Plus (30-300µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipette Research Pro (5-100µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
Elektrische Pipette Research Pro (0,5- 10µl und 20- 300µl Multikanal)	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettenspitzen Sapphire (10µl, 200µl, 1000µl)	Grainer Bio-One, Frickenhausen, DE
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	BD, Heidelberg, DE
Pipettenspitzen epT.I.P.S	Eppendorf AG, Hamburg, DE

Waagen:

Waage Mettler PJ 3000	Mettler Toledo, Gießen, DE
Waage BP 110S	Sartorius, Göttingen, DE
Waage Cs200	Ohaus Corporation, USA

3.1.2 Material für molekularbiologische Methoden

RNA- Isolation

Homogenisator Ultra Turrax T25	IKA-Werke, Staufen, DE
--------------------------------	------------------------

PureLink® RNA Mini Kit	ThermoFisher, Waltham, USA
RNase-Free® DNase Set	Qiagen, Hilden, DE
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
100 % Ethanol	Merck, Darmstadt, DE

cDNA- Synthese

Nano drop	PEQLAB Biotechnology, Erlangen DE
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, DE
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Linear Acrylamid	Ambion, Darmstadt, DE
DTT (0,1M)	Invitrogen, Karlsruhe, DE
dNTPs (25mM)	GE Healthcare, München, DE
5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNAsin®	Promega, Fitchburg, USA
Hexanucleotide-Mix	Roche Life Science, Basel, CH

qPCR

LightCycler 480 Multiwell-Platte 96	Roche, Basel, CH
Klebefolie	Roche, Basel, CH
LightCycler 480 Real-Time PCR System	Roche, Basel, CH
10x Taq Puffer without detergent	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
SYBR Green Dye detection	Applied Biosystems, Norwalk, USA
BioStab PCR Optimizer	Bitop, Witten, DE
10 x PE-Puffer	ThermoFisher, Waltham, USA
1,25mM dNTPs	Metabion GmbH, Planegg, DE
Taq-DNA-Polymerase	New England BioLabs, Ipswich, USA
Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Primer	Metabion GmbH, Planegg, DE

Tabelle 2: Murine Primersequenzen

Gen	Forward-Sequenz	Reverse-Sequenz
<i>18s</i>	5'-GCA ATT CCC CAT GAA CG-3'	5'-AGG GCC TCA CTA AAC CAT CC-3
<i>Mdm2</i>	5'-TGT GAA GGA GCA CAG GAA AA -3'	5'-TCC TTC AGA TCA CTC CCA CC -3'
<i>P53</i>	5'-CTA GCA TTC AGG CCC TCA TC-3'	5'-TCC GAC TGT GAC TCC TCC AT-3'
<i>KIM-1</i>	5'-TGG TTG CCT TCC GTG TCT CT-3'	5'-TCA GCT CGG GAA TGC ACAA-3'
<i>Ngal</i>	5'-TGA ACT TCT GAA AAC GGCT-3'	5'-AGC AGC AAG GGC ACA AT-3'
<i>Timp-2</i>	5'-CGT TTT GCA ATG CAG ACG TA-3'	5'-GAA TCC TCT TGA TGG GGT TG-3'
<i>Cre</i>	5'- GCA TAA CCA GTG AAA CAG CAT TGC TG-3'	5'- GGA CAT GTT CAG GGA TCG CCA GGC G-3'
<i>Pax8</i>	5'-CCA TGT CTA GAC TGG ACA AGA -3'	5'-CTC CAG GCC ACA TAT GAT TAG - 3'

Analyse- Kits

Creatinine FS	DiaSys, Holzheim, DE
Urea FS	DiaSys, Holzheim, DE

3.1.3 Materialien für immunologische Methoden*ELISA*

ELISA-Reader GENios Plus	Tecan, Crailsheim, DE
ELISA- Reader MRX TC II	Dynex Technologies, VA, USA
ELISA Microplate Strip Washer ELx50	BioTek, Bad Friedrichshall, DE
Mouse Albumin ELISA Quantitation Set	Bethyl-Lab's, Montgomery, USA
96- Well Maxisorp Elisaplatten	

Immunhistochemie und -fluoreszenz

Demaskierungs-Lösung/unmasking Solution	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Avidin/Biotin blocking kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Tris-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Nickel-(II)-Chlorid	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
DAB	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
DAB Färbelösung	200 ml TRIS-HCL (37°C), 4ml DAB, 1ml NiCl ₂ , 500 3% H ₂ O ₂
Methylgrün	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

Vecta Mount mounting medium	Vector Laboratories, Burlingame, USA
<i>Antikörper</i>	
Anti-Maus Mdm2 (Hase)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Maus Zytokeratin-7 (Hase)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Maus E-Cadherin (Hase)	Cell Signaling Technology Europe, Frankfurt,DE
Anti-Maus Vimentin (Hase)	Cell Signaling Technology Europe, Frankfurt,DE

3.1.4 Materialien für histologische Methoden

Mikrotom HM 340E	Microm, Heidelberg, DE
Einbettkassetten	Simport, St.-M.-de-Beloeil, CA
Formaldehyd	ThermoFisher, Waltham, USA
Formaldehyd 4%	Morphisto, Frankfurt, DE

3.1.5 Materialien für in-vivo-Mausexperimente

GFR-Messung

„NIC-Kidney“-GFR-Messgerät	Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim, DE
„NIC-Kidney“-Akkus+ Ladegeräte	Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim, DE
„NIC-Kidney patch“ Klebefolie	Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim, DE
FITC-Sinistrin	Fresenius-Kabi, Linz, A
Leukoplast Klebeband	BSN medical, Hamburg, DE
Rasierklingen	Wilkinson, Solingen, DE

Allgemein

Doxycyclin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Saccharose	B.Braun, Melsungen, DE

Blutabnehmen

EDTA	Biochrom, Berlin, DE
Isofluran Forene	Abbott, Chicago, USA
Mikropipetten 20 µl	Blau, Wertheim, DE

Nierenisolation

Formaldehyd	ThermoFischer, Waltham, USA
RNA-Later	Qiagen GmbH, Hilden, DE

Einbettkassetten	Simport, St.-M.-de-Beloeil, CA
Kollagenase A	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
70 m Porensiebe	BD, Franklin Lakes, NJ, USA

3.1.6 Materialien für Zellkulturexperimente

DPBS w/o Calcium, w/o Magnesium 500 ml	PAN Biotech, Aidenbach, DE
DMEM w/glucose (1x) 500ml	Gibco/Life Technologies, NY, USA
RPMI Medium 1640 (1x) 500ml	ThermoFisher Scientific, Schwerte, DE
FCS 500ml	Biochrom AG, Berlin, DE
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, Austria
HBSS	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
HEPES	Gibco/Life Technologies, NY, USA
EGF, T3, Hydrocortison, PGE-1	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Trypsin/EDTA	PAN Biotech, Aidenbach, DE
DEPC Wasser	ThermoFisher Scientific, Schwerte, DE
Opti-MEM (1x) 500ml	ThermoFisher Scientific, Schwerte, DE
Lipofectamin-RNA iMAX	ThermoFisher Scientific, Schwerte, DE
Mdm2 Silencer selected siRNA	ThermoFisher Scientific, Schwerte, DE
Negative Control siRNA	ThermoFisher Scientific, Schwerte, DE
Z-VAD-FMK 5mg	Enzo Life Sciences, Lörrach, DE
Necrostatin-1 20mg	Enzo Life Sciences, Lörrach, DE
Dabrafenib 5mg	Enzo Life Sciences, Lörrach, DE
Ferrostatin-1 5mg	MERCK Chemicals GmbH, Darmstadt, DE

3.1.7 Histologie und Mikroskopie

Mikrotom HM 340E	Microm, Heidelberg, DE
Gewebe Prozessoren	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Lichtmikroskop Leitz DM IL	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Lichtmikroskop Zeiss Axioplan 2	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, DE
LSM 510 Konfokal-Mikroskop	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, DE
Libra 120	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, DE
CCD Kamera	Tröndle, Moorenwies, DE
Axiocam HR	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, DE
JEOL 1200 EX Elektronenmikroskop	JEOL, Tokyo, Japan

3.1.8 Elektronenmikroskopie

Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natriumkakodylat (Puffer 7,4)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Propylenoxid	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Embed-812	EM Sciences, Hatfield, USA
Uranylacetat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Lead(II)Nitrat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

3.1.9 Sonstiges

Einwegküvetten 1,5ml	Brand, Gießen, DE
Eppendorf Röhren 1,5ml	TPP, Trasadingen, CH
Falkone 15ml, 50ml	BD, Heidelberg, DE
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, DE
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
pH Meter WTW	WTW GmbH, Weilheim, DE

3.1.10 Softwares

ImageJ 1.50i	National Institutes of Health, USA
Graphpad Prism 5	GraphPad Software, Inc., CA, USA
XFlour 4	Tecan, Crailsheim, DE
Nanodrop ND- 1000 V3.1.0	Thermo Scientific, Rockford, USA
LightCycler® 480 SW 1.5.1	Roche, Basel, CH
Revelation 4.25	Dynex Technologies, VA, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, WA, USA
MPD Lab	Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim, DE
Endnote X7	Thomson- Reuters, NY, USA
Adobe Illustrator CC 2017	Adobe Systems Incorporated, USA
Software LSM	Carl Zeiss, Oberkochen, DE

3.2 Tierexperimente

3.2.1 Tierunterbringung

Alle Mäuse wurden in Poly-Propylen Käfigen unter standardisierten Bedingungen mit einer Raumtemperatur von 22°C± 2°C und einem jeweils 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus

untergebracht. Zudem wurden maximal fünf Mäuse pro Käfig beherbergt. Alle Tiere bekamen normales Trinkwasser sowie die standardisierte Futterdiät (Sniff, Soest, Deutschland) *ad libitum*. Die Käfige der Tiere, das Streu, ihr Essen als auch ihr Trinkwasser wurden vor Kontakt mit den Mäusen durch Autoklavieren sterilisiert. Zudem wurden der Transfer und die Aufteilung der jungen Tiere immer unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zu jeder Zeit wurde den Leitlinien des deutschen Tiergesetzes und den europäischen Vorschriften 2010/63/EU Folge geleistet. Alle Tierexperimente wurden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt.

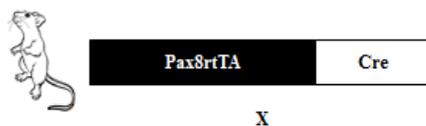
3.2.2 Generierung der *Pax8rtTA-Cre;Mdm2^{flox/flox}* Mauslinie sowie der Doppelknockout-Mauslinie *Pax8rtTA-Cre;Mdm2/p53* dKO

Es wurden induzierbare Tubuluszellspezifische MDM2 Knockout Mäuse *Pax8rtTACre;Mdm2^{flox/flox}* (*Mdm2* KO) generiert. Diese neue Mauslinie erlaubte uns die Rolle von *Mdm2* speziell in den Tubulusepithelzellen *in vivo* zu studieren. Gen-Knockouts zielen auf spezifische Zelltypen ab und erlauben eine präzise Erforschung der Genfunktionen im Organismus. Des Weiteren kann mittels induzierbarem Gen-Knockout-System das erwünschte Gen nur durch Induktion ausgelöscht werden, hierdurch verhindert man Entwicklungsstörungen und neonatale Letalität, welche durch die Knockout-Gene hervorgerufen werden könnten. Zudem erlaubt es so die Genfunktionen in der adulten Organstruktur zu erkunden. Somit stellt das induzierbare Gen-Knockout-System einen Durchbruch für die Forschung dar.

In meinem Projekt nutzte ich das Cre/loxP und Tet (Tetracyclin-abhängig) System um Tubuluszellspezifische *Mdm2* KO Mäuse zu generieren. Die Cre Rekombinase ist ein Enzym, welches ursprünglich in dem Bakteriophagen P1 gefunden wurde, einem Virus, welcher ein Bakterium infiziert und sich dort vermehrt. Cre wird vom Bakteriophagen P1 für die Integration und das Ausschneiden seiner eigenen DNA in das Genom des infizierten Bakteriums benötigt. LoxP (locus of crossing over P1 phage) stellt ein kleines DNA-Motiv dar, welches als Erkennungssignal für die Cre Rekombinase agiert. Cre katalysiert die DNA Rekombination zweier loxP Stellen, was wiederum in der Beseitigung einer DNA-Sequenz innerhalb des Genoms resultiert. Um induzierbare gewebespezifische Knockout Mäuse zu produzieren, kreuzten wir Mäuse, die die Cre Rekombinase Gene unter der Kontrolle des Pax8 Promoters (*Pax8-rtTACre*) hatten mit Tieren, deren *Mdm2* Gene von loxP (*Mdm2^{flox/flox}*) flankiert wurden. Der Promoter Pax8 wird in allen proximalen sowie distalen Tubuli und dem gesamten Sammelrohr-System sowohl in fetalen als auch adulten Nieren exprimiert. Während

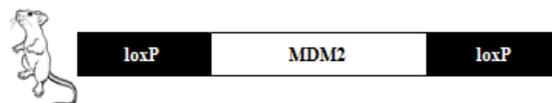
der Promoter in anderen Organen außer der Schilddrüse weitestgehend abwesend ist. Die *Pax8-rtTACre* Mäuse wurden uns von Herrn Huber (Universität Freiburg, Deutschland), die *Mdm2^{flox/flox}* Mäuse vom Labor von G.Lozano (Universität von Texas, Huston, USA) und die *p53^{flox/flox}* Mäuse von L. Rudolph (Universität Ulm, Ulm, DE) gestellt. Alle Mauslinien wurden vorher charakterisiert. Das Kreuzen der Tiere erbrachte die gewünschte Mauslinie *Pax8rtTA-Cre;Mdm2^{flox/flox}*, die zur erwarteten Zeit nach dem Mendelschen Gesetz geboren wurde. Diese transgenen Mäuse entwickelten sich normal und waren phänotypisch nicht von den Wildtyp-Mäusen zu unterscheiden. *Mdm2^{flox/flox}* Nachkommen, welchen die *Pax8rtTA-Cre* Transgene fehlten, fungierten als Kontrollen. *Pax8rtTA-Cre;Mdm2^{flox/flox}* Mäuse exprimierten Cre Rekombinase unter Kontrolle des Pax8 Promotors auf eine Tetracyclin-abhängige Weise (Abbildung 3). Unsere zweite Mauslinie bestand aus einem Doppelknockout-System. Wir induzierten einen *Pax8rtTA-Cre;Mdm2/p53* Doppelknockout (*Mdm2/p53* dKO). Wobei die Nachkommen mit nur einem intaktem p53 Allel (*Mdm2^{-/-}/p53^{wt/flox}*) als Kontrollen fungierten. Dies wurde ebenfalls mithilfe des *Pax8rtTA-Cre* Systems herbeigeführt (Abbildung 3). Die dritte und letzte Mauslinie, an der wir Experimente durchführten hatte einen selektiven Knockdown im *Ripk3* Gen. Diese Mäuse mit dem Genotypen *Pax8rtTA-Cre; Mdm2/Ripk3* dKO hat uns Vishva M. Dixit von Genentech (San Francisco, CA, USA) zur Verfügung gestellt. Alle verwendeten Mauslinien sind in Tabelle 2 aufgelistet.

1. Mauslinie



X

2. Mauslinie



X

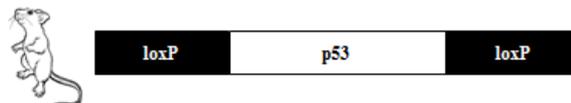


Abbildung 8: Experimentelle Mauslinie: *Pax8-rtTACre* und *Mdm2^{flox/flox}* Mäuse wurden verpaart um die doppel-transgene Mauslinie *Pax8rtTA-Cre;Mdm2^{flox/flox}* zu generieren. Diese exprimiert rtTA (reverse tetracycline-dependent transactivator) unter der Kontrolle des Promotors Pax8 in allen renalen Tubulusepithelzellen. In Abwesenheit des Induktors Doxycyclin entsteht keine genetische Alteration in den Mäusen, sodass sie weiterhin den Mdm2-Wildtyp exprimieren. Bei Doxycyclineinsatz formt Doxycyclin einen Komplex mit rtTA-Dimeren, welcher speziell an TetO (Tet Operon) bindet, der zur

Aktivierung des Promotors TATA und zur Transkription der Cre Rekombinase führt. Cre erkennt beide loxP Seiten, die die Mdm2 Gene umgeben und bedingt eine Rekombination, welche in der Exzision der Mdm2 Gene resultiert. Das gleiche Prinzip wurde zur Generierung der zweiten Mauslinie mit Doppelknockout von Mdm2 und p53 genutzt.

Tabelle 3: Übersicht der verwendete Mauslinien

Genotyp	Verwendete Nomenklatur
<i>Pax8rtTA-Cre;Mdm2 KO/p53 wt</i>	Mdm2 KO/p53 <i>wt</i>
<i>Pax8rtTA-Cre;Mdm2 wt/p53 wt</i>	Mdm2 <i>wt</i> /p53 <i>wt</i>
<i>Pax8rtTA-Cre;Mdm2 KO/p53 het</i>	Mdm2 KO/p53 <i>het</i>
<i>Pax8rtTA-Cre;Mdm2^{flox/flox}</i>	Mdm2 <i>fl/fl</i>
<i>Pax8rtTA-Cre;Mdm2^{flox/flox}</i> nach Doxycyclingabe	Mdm2 KO
<i>Pax8rtTA-Cre;Mdm2 KO/p53^{wt/flox}</i>	Mdm2/p53 dKO
<i>Pax8rtTA-Cre; Mdm2/Ripk3 dKO</i>	Ripk3 dKO

3.2.3 Doxycyclin Behandlung zur Gendeletion

Um die Cre-Rekombinasen-Expression und die darauffolgende Mdm2 Deletion in den Tubuluszellen zu induzieren, habe ich sowohl den experimentellen als auch den Kontrollmäusen die gleiche Doxycyclin-Dosis verabreicht (1 mg/ml Trinkwasser versetzt mit 5% Saccharose). Es war ein kontinuierliches Behandlungsregime, wobei den *Pax8rtTA-Cre;Mdm2^{flox/flox}* (*Mdm2 KO*) Mäusen und den Kontrollmäusen jeweils für 7-8 Tage Doxycyclin in das Trinkwasser gegeben wurde. Jede Gruppe der Versuchstiere bestand aus circa 4-6 Mäusen, welche sowohl hinsichtlich des Geschlechts als auch des Alters und des Gewichts übereinstimmte. Des Weiteren gab ich im zweiten Zyklus unserer Experimentenreihe den Tubulus-spezifischen Doppelknockout-Mäusen (*Mdm2/p53 dKO*) sowie deren Kontrollen (*Mdm2 KO/p53 het*) eine 11-13 Tage andauernde Doxycyclin Trinkwasserbehandlung. Zuletzt führte ich den gleichen Versuchsaufbau an einer Mauslinie mit selektiven RIPK-3 Knockdown durch.

3.2.4 Behandlung mit Zelltodinhibitoren

Um die Rolle verschiedener Zelltodinhibitoren in vivo zu testen, etablierten wir einen Experimentaufbau. Eine Gruppe (n = 5-7) 2-4 Monate alter Mäuse (*Mdm2 KO*, *Mdm2 wt*) wurde für einen Zeitraum von 7-8 Tagen täglich mit Doxycyclin-Trinkwasser (1 mg/ml)

gefüttert, während wir ihnen zusätzlich täglich Zelltodinhibitoren intraperitoneal spritzten (Konzentrationen: Z-VAD: 2 mg/kg KG, Necrostatin-1: 1,65mg/kg KG, Ciclosporin-A: 10mg/kg KG, Dabrafenib : 50 mg/kg KG). Als Kontrolle diente uns eine 20% Lösung des organischen Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO), die ebenfalls in die Bauchhöhle ,allerdings in die der Kontrolltiere, gespritzt wurde. Um den Verlauf und die Konsequenzen der Behandlung beurteilen zu können, wurden zu Beginn des Experiments, an Tag 4 und am Tag der Nierenentnahme jeweils einige Tropfen Serum aus dem retrobulbären Venenplexus gewonnen. Anschließend konnte mittels ELISA-Gerät die quantitative Messung des Kreatinins und des Harnstoffs in den Seren der Tiere erfolgen. Gleichzeitig wurden an Tag acht die Nieren explantiert, um PAS-Färbungen anzufertigen und danach am Mikroskop hinsichtlich Veränderungen innerhalb des Tubulussystems zu untersuchen.

3.2.5 Die Genotypisierung

Die Genotypisierung der Mäuse wurde mithilfe von 2 mm großen DNS Proben der Mäuseschwänze bestimmt. Um die Gensequenzen zu ermitteln, wurden diese durch PCR amplifiziert und anschließend mittels Gelelektrophorese evaluiert. Die Methode der Genotypisierung erfolgte in drei Schritten.

A) DNA Isolation: Das Mausgewebe wurde bei 56°C unter konstantem Schütteln für vier Stunden mit Proteinase-K Puffer lysiert, sodass Proteine hydrolysiert und die genomische DNA freigelegt wurde. Die genomische DNA wurde nach einigen Schritten, welche die Zentrifugation und der Aufreinigung mit DNA Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE) beinhaltete, eluiert.

B) Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction/ PCR): Die Gene unseres Interesses (Wildtyp und floxed Mdm2, Pax8 und Cre) wurden mithilfe der PCR vervielfältigt. 0,5 µl der isolierten DNA wurden mit je 1 µl des 1:10 verdünnten „forward“ und „reverse“ Primers und mit 2,5 µl eines Mastermix aus 10 X PE Puffer, 4.0 µl der 1,25 dNTPs, 5 µl des PCR-Optimierers, 0.2 µl der Taq-Polymerase und 13.0 µl Wasser zu einem Gesamtvolumen von 27.2 µl gemischt. Proben mit destilliertem Wasser statt der Mäuse-DNA dienten als Negativ-Kontrollen.

C) Gelelektrophorese: Die Evaluierung der amplifizierten DNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Erwartete Bandlängen waren wie folgt:

<i>Pax8</i> rtTA	640 bp
Cre Rekombinase	300 bp
<i>Mdm2</i> Wildtyp (wt)	342 bp

<i>Mdm2</i> flox	474 bp
<i>P53</i> Wildtyp (wt)	431 bp
<i>P53</i> flox	584 bp

3.2.6 Blutabnahme und –sammeln

Als Erstes wurden die Mäuse mittels 2,5% Isofluran in Sauerstoff mit einer Flussrate von 2 l/h anästhesiert. Anschließend wurde das Blut mit einer Mikrolanzette aus dem retrobulbären Plexus gewonnen und in mit EDTA (10 µl einer 0.5 M EDTA Lösung mit je 200 µl Blut) versetzten Sammelröhrchen gegeben. Die Blutproben wurden danach mit 8000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das daraufhin gewonnene Plasma wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.7 Urinabnahme

Die Urinentnahme erfolgte je nach Versuchsaufbau ungefähr drei Mal innerhalb einer Woche. Wobei der Urin in 1,5 ml Eppendorf-Tubes aufgefangen und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert wurde.

3.2.8 Nierenentnahme

Die Versuchsmäuse wurden dafür mittels zervikaler Dislokation liquidiert. Nach medialer Längslaparotomie wurden die Nieren vollständig entnommen. Während zur histologischen Weiterverarbeitung lediglich die Entnahme der Nieren ohne Säuberung in Form einer Kapselentfernung erfolgte, wurden die Nieren für die Tubuluszellisolation von ihrer umgebenden Kapsel getrennt. Für histologische Zwecke wurden die Nieren weiter in 4%-Formalin für 24 Stunden eingelegt, bevor sie danach histologisch weiter aufbereitet wurden

3.2.9 Transkutane Messmethode der glomerulären Filtrationsrate

Die GFR ist das pro Zeiteinheit von den Glomeruli der Nieren filtrierte Volumen (ml/min). Es ist einer der wichtigsten Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion. Bisher wurden die GFR-Bestimmung vorzugsweise mittels Nierenretentionsparameter wie Kreatinin sowie Harnstoff bestimmt. Jedoch steigen deren Konzentrationen im Plasma bzw. Urin erst, wenn bereits ein deutlicher Nierenschaden vorhanden ist. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die GFR zusätzlich mithilfe eines exogenen Nierenfunktionsmarkers FITC-Sinistrin ermittelt. Mittels eines kleinen transkutan befestigten Detektionsgerätes kann die Kinetik der Elimination des fluoreszierenden Farbindikators Fluoreszein-Isothiozyanat gemessen werden.

Diese transkutane, optische Messmethode erlaubt die Echtzeitbestimmung der GFR unabhängig von Plasma- oder Urinmessungen und ermöglicht somit eine Früherkennungsuntersuchung für Niereninsuffizienz. Dazu wurden die Versuchstiere zu Beginn im Bereich des Nackens rasiert, um einen guten Kontakt zwischen Haut und Detektionsgerät sicherzustellen. Nach Befestigen des Fluoreszenz-detektierenden Messgerätes im Nackenbereich des Tieres wurden anschließend 100 µl FITC-Sinistrin in den retrobulbären Venenplexus des zuvor anästhetisierten Tieres injiziert. Nach 90 minütiger Wartezeit wurde das Gerät vom Versuchstier entfernt und mithilfe des Computerprogrammes MPD Studio ausgewertet und die GFR berechnet (siehe Formel 1) [117].

$$\text{GFR } (\mu\text{l}/\text{Minute}/100\text{g KG}) = \frac{14616,8 \text{ } (\mu\text{l per } 100\text{g KG})}{t_{1/2} \text{ FITC-Sinistrin (Minute)}}$$

Formel 1: Berechnung der GFR. T_{1/2} = Halbwertszeit der Fluoreszein-Isothiozyanat-Filtration (in Minuten); KG = Körpergewicht (in Gramm)

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolation von Tubulusepithelzellen

Zur Gewinnung primärer TECs aus der Maus wurde eine spezielle Isolationsmethode im Labor Prof. Anders, Klinische Biochemie, Schillerstraße 42 etabliert. Hierfür wird nach Aufsuchen und Mobilisieren der Vena cava inferior diese durchtrennt und dadurch der große Blutkreislauf unterbrochen. Im darauffolgenden Schritt wird die Maus blutleer gemacht, indem man mithilfe einer im linken Ventrikel platzierten Butterfly-Nadel Raumtemperiertes PBS in den Körper der Maus langsam injiziert. Die in Gänze entnommenen Nieren werden von umliegendem Gewebe sowie der Nierenkapsel frei präpariert. Anschließend erfolgt die Homogenisierung und Andauung des Nierengewebes durch die 30-minütige Inkubation der mittels Skalpell zerkleinerten Nieren bei 37°C erhitzter Kollagenase A/PBS-Suspension unter leichtem Schütteln. Im nächsten Schritt werden die angedauten Nieren auf Eis gebracht und unter Spülen mit sterilem, kaltem PBS durch einen 70 µm Zellsieb gedrückt. Anschließend wird die gewonnene Nierengewebssuspension bei 1500 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der entstehende Überstand verworfen. Das Zellpellet am Reagenzglasrand wird nun in 2 ml PBS resuspendiert und auf 31%-igem Percoll pipettiert, welches als Instrument zur Dichteseparation unter anderem für Zellen und Organellen fungiert. Nach multiplen Zentrifugations- sowie Aufreinigungsschritten werden die gewonnenen

Tubulisegmente unter dem Mikroskop begutachtet und schließlich in einem speziellen Tubuli-freundlichen Nährmedium („K1-Medium“) bei 37°C im CO₂ Inkubator kultiviert.

K1-Medium (500 ml): 450 ml DMEM, 12,5 ml HEPES 1 M pH 7,55, 50 ml FCS, 5 ml Hormone mix (HBSS 50 ml + ITSS 2,5 ml + PGE-1 12,5 µl + T3 50µl + 0,5 ml Hydrocortison), 1 ml EGF.

3.3.2 Isolation von Glomeruli

Zur Gewinnung einer reineren Tubuluszellkultur wurde eine magnetische Glomeruli-Isolation durchgeführt. Hierfür wurden die Nieren mit einem Perfusionsdruck von maximal 100 mmHg mit einer Suspension aus vorgewärmten PBS und Beadsin perfundiert und en bloc entnommen. Anschließend wurden die Nieren von umliegenden Strukturen und Geweben befreit und die Kapsel entfernt. Mithilfe eines Skalpells wurden die Nieren auf Eis homogenisiert und danach zur Andauung für 30 Minuten in Kollagenase A/HBSS-Lösung (1 mg/ml) bei 37°C gegeben. Auf Eis wurde das angedaute Nierengewebe nun unter regelmäßigem Spülen mit kaltem, sterilem PBS mit einem kleinen Stempel durch einen 100 µm Zellsieb gedrückt. Die Suspension aus Beadsin-enthaltenen Glomeruli und anderweitigen Nierenzellen (u.a. Tubuluszellen) wurde anschließend mithilfe eines magnetischen Zellseparators und unter viermaligem Waschen mit sterilem PBS sauber getrennt. Direkt nach der erfolgten Glomeruli-Isolation wurde unter einem Lichtmikroskop der Erfolg der Separation der Tubuluszellen von den Glomeruluszellen beurteilt. Die gewonnenen Zellen wurden letztendlich in ein jeweils den Zellbedingungen entsprechendes Zellkulturmedium überführt und für einen Zeitraum von ca. 7-10 Tage kultiviert.

3.3.3 RNA-Isolation

Zur erfolgreichen Isolation der RNA wurde ein PureLink RNA Mini Kit der Firma ThermoFisher angewandt, welches sowohl bei der RNA-Isolation aus Proben von Nierengewebe als auch von Tubuluszellen geeignet ist. Der erste Schritt beinhaltet das Vermengen von circa 30 mg Nierengewebe bzw. 200.000 Tubulusepithelzellen mit 600 µl Lyse-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol. Anschließend werden die Tubulusepithelzellen für eine halbe Minute homogenisiert. Danach wird alles mit 70% Ethanol im Verhältnis 1:1 vermischt. Die entstehende Suspension wird nun für ca. 35 Sekunden mithilfe des Vortexers in Lösung gebracht. Aus der Mischung werden schließlich 600 µl auf eine RNA-Säule pipettiert und dann für 30 Sekunden bei 12.000 G zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wird 700 µl Wasch-Puffer I auf die Säule gebracht. Anschließend wird die

Probe wie bereits zuvor für 30 Sekunden bei 12.000 G zentrifugiert. Der folgende Schritt beinhaltet das Umsetzen der Säule in ein frisches Auffang-Röhrchen und das zweimalige Waschen der Säule mit jeweils 500 µl Wasch-Puffer II, wobei nach jeder Zentrifugation der Durchfluss verworfen wird. Nachdem die Reinigungsschritte ausgeführt wurden, wird die Membran der Säule bei 12.000 G für 2 Minuten getrocknet. Um nun die aufgereinigte RNA des Nierengewebes bzw. der TEC's, welche an der Membran haftet, zu gewinnen, wird die Säule ein weiteres Mal in ein reines Eppendorf-Röhrchen überführt, 35 µl RNase-freies Wasser in die Mitte der Membran pipettiert, für 1 Minuten inkubiert und anschließend 2 Minuten mit 12.000 G zentrifugiert. Letztendlich folgen Wiederholungen der eben beschriebenen Schritte, bis die gesamte homogenisierte Mischung aus Gewebe und Ethanol vollständig verarbeitet ist. Die dadurch gewonnene RNA wird zügig auf Eis gelagert und dann sowohl auf Reinheit als auch Quantität getestet. Dies geschieht durch die spektrometrische Messung (Analyse der optischen Dichte) der RNA Probe. Zur Bestimmung der Qualität wird mittels Photometer die Absorption der Probe bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gemessen und der Quotient aus ihnen gebildet. Bei qualitativ hochwertigen RNA Proben wird ein Quotient im Bereich zwischen 1,6 bis 2,1 erreicht. Abschließend werden die gewonnenen RNA-Proben bei -20°C gelagert.

3.3.4 RNA-Qualitätsprüfung mittels Gel-Elektrophorese

Um zu testen, ob die isolierte RNA rein ist, wird eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Hierfür werden 1 µg der gelösten RNA mit 20 µl RNA-Laufpuffer vermischt. Nachfolgend wird dies bei 65 °C für 10 bis 15 Minuten inkubiert und anschließend 2 Minuten auf Eis gelegt. Der Laufpuffer wird auf 1% Agarosegel mit *Ethidiumbromid* aufgetragen. Nun wird für 45 Minuten eine Spannung von 80V angelegt bis *Bromophenol blau* 5 cm nach proximal migriert ist. Anschließend können in einer Dunkelkammer unter UV-Licht mit der Wellenlänge 264 nm die Banden gesichtet werden, wobei deutliche, voneinander abgrenzbare Banden eine reine RNA charakterisieren.

3.3.5 cDNA-Synthese

Die complementary DNA (cDNA) wird aus der gewonnenen RNA hergestellt, indem man die RNA-Basenreihen in die entsprechenden DNA-Basenreihen umschreibt. Die cDNA wird wiederum benötigt, um mithilfe der qPCR eine Aussage über die Expressionsdichte verschiedener Gene treffen zu können. Zum Umschreiben wird ein Volumen, welches 2 µg der isolierten RNA Lösung enthält mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 13,2 µl

aufgefüllt und bei einer Temperatur von 65 °C für 5 Minuten inkubiert, mit dem Ziel die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen weitestgehend zu lösen und somit ein besseres Arbeiten der reversen Transkriptase zu ermöglichen. Dazu werden anschließend zwei unterschiedliche Reagenzmischungen angesetzt. Beide enthalten eine Gesamtmenge von 6,8 µl. Diese setzt sich zusammen aus 4 µl Fs Puffer 5x, 0,4 µl dNTPs 25 mM, 1 µl DTT, 0,25 µl LinAcril (15 µg/ml) und 0,215 µl Hexanucleotide. Wobei in der Reagenzmischung der Proben, die mittels reverser Transkriptase umgeschrieben werden zusätzlich 0,5 µl RNAsin und 0,435 µl Superscript II zugegeben werden, während die zweite Reagenzlösung die gleiche Menge RNase freies Wasser beinhaltet. Abschließend werden den beiden Gruppen (RT+ und RT-) 6,8 µl der jeweiligen Reagenzmischung zu den zuvor pipettierten 13,2 µl der RNA-Lösung hinzugegeben und für 90 Minuten bei 42°C und danach für 5 Minuten bei 85°C inkubiert, um die Reaktion zu stoppen. Die Lagerung der synthetisierten cDNA erfolgt ebenfalls bei -20°C.

3.3.6 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Echtzeit-PCR (quantitative real-time PCR) ist eine Methode für Nukleinsäuren zur Vervielfältigung. Das Prinzip, welches angewandt wird ist die bekannte Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Ebenso ermöglicht sie das zahlenmäßige Erfassen der gewonnenen DNS. Hierdurch ist es möglich Rückschlüsse auf die Expressionsdichte der für die einzelnen Fragmente verantwortlichen Gene zu ziehen. Diese Methode beinhaltet drei Schritte: in der ersten Phase erfolgt die Denaturierung der DNS, indem die DNS-Stränge auf 95°C erhitzt, dadurch die Wasserstoffbrücken zwischen den Ketten gespalten werden und letztlich die Nukleinsäuren einzelsträngig vorliegen. Danach wird die Temperatur auf 60°C gesenkt, damit die Primerhybridisierung am 3'-Ende der Gensequenz vollzogen werden kann. Anschließend erfolgt wiederum eine Temperaturerhöhung auf 72°C, wobei die hitzestabile Taq-Polymerase vom Primer aus in 5'-3'-Richtung den zur cDNA komplementären Strang synthetisiert. Zuletzt wird eine Fluoreszenz-Messung durchgeführt. Danach beginnt der Zyklus von vorne.

Über den Fluoreszenzfarbstoff kann eine Zunahme der PCR-Produkte in Echtzeit detektiert werden, wobei der Abstieg des Fluoreszenzsignals proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produkts ist. Dies kann unter anderem sequenzunspezifisch stattfinden mittels SYBR Green, ein interkalierender Farbstoff. Ausschlaggebend für die Quantifizierung der PCR-Produkte ist der sog. „Threshold-Wert“, bei dem sich die Fluoreszenzintensität deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Der CT-Wert (Cycle Threshold) wird für jede Probe

aufgezeichnet und beschreibt die Menge an Zyklen, die gebraucht werden, um diesen Grenzwert zu übersteigen. Jedoch werden lediglich Werte bis 35 zur weiteren Analysierung eingeschlossen. Als Referenzsequenz wird das Gen 18S herangezogen, welches in jeder DNS-Probe exprimiert wird. Destilliertes Wasser wird als Negativkontrolle verwendet, aufgrund der Tatsache, dass es weder 18S noch das zu untersuchende Gen beinhaltet. Die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse erfolgt nach 40 Zyklen, dabei werden die Proben von 65°C bis zu 95°C erhitzt. Mithilfe der Temperatur, bei der das Doppelstrangfragment denaturiert, kann man auf das spezifische DNS-Fragment zurückschließen, da jedes dieser Fragmente eine spezielle Änderung der Fluoreszenzintensität bewirkt.

Zur Durchführung der qPCR werden anfangs sowohl die umgeschriebene cDNA als auch die jeweiligen Primer 1:10 mittels Diethyldicarbonat-behandeltem Wasser verdünnt, bevor sie dann als Duplikate in eine 96-Well-Platte pipettiert werden. Neben 2 µl der verdünnten cDNA RT+ bzw. RT- und jeweils 0,6 µl Forward- und Reverse-Primer werden pro Well 10 µl SYBER Green, 0,16 µl Taq-Polymerase und 6,64 µl Diethyldicarbonat-behandeltes Wasser hinzugefügt. Um eine Kontamination ausschließen zu können, wurde als Negativprobe neben cDNA RT- auch destilliertes Wasser zur Bewertung herangezogen. Die vorbereitete Platte wird nun mithilfe einer Abdeckfolie luftdicht verschlossen, bevor sie dann für ca. 20 Sekunden bei 4°C und maximaler Zentrifugationsgeschwindigkeit zentrifugiert wird. Die Intensität der Fluoreszenz wird mittels LightCycler gemessen.

3.3.7 Bestimmung von Nierenfunktionsparametern Kreatinin und Harnstoff

Messung von Serumkreatinin

Die Kreatinin-Messung erfolgt mithilfe eines kinetischen Farbtests, der sog. Jaffé Methode. Kreatin ist eine Substanz in den Muskeln, die Energie speichern und unter Belastung wieder abgeben kann. 1-2 % des Muskelkreatins werden täglich in das Abbauprodukt Kreatinin umgewandelt, welches letztlich renal ausgeschieden wird. Für die Serum-Kreatinin-Messung wird durch die Beigabe von Pikrinsäure in eine kreatininhaltige Probe ein gelb-oranger Farbkomplex aus Kreatinin und Pikrinsäure in einer nun alkalischen Lösung gebildet. Zu Beginn werden jeweils 10 µl der Serumprobe bzw. des Standards in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Reagenzien 1 und 2 des Sets wurden nun in einem Verhältnis von 4 zu 1 gemischt. Anschließend wurden 200 µl dieser Mischung in jedes Well sowohl der Serumproben als auch des Standards gegeben. Bei einer Wellenlänge von 492 nm erfolgt die photometrische, kinetische Absorptionsmessung der Farbkomplexe 60 und 120 Sekunden nach Zugabe des Reagenzgemisches. Zur weiterführenden Analyse der Proben wurde die

Differenz der Absorption zwischen 120 und 60 Sekunden ermittelt. Anschließend wurde mithilfe der Standards der Kreatinin-Gehalt der Serumproben errechnet.

Messung von Serumharnstoff

Harnstoff (BUN) ist das Endprodukt des Harnstoffzyklus, welcher dem Zweck der Entgiftung des beim Abbau der Aminosäuren anfallenden Ammoniaks dient. Abhängig von der Quantität der Proteinzufuhr bzw. der Aminosäuremenge im Blutplasma als auch der Stoffwechsellage wird jeden Tag eine gewisse Menge im Urin ausgeschieden. Das wissenschaftliche bzw. klinische Setting bestimmt den Harnstoff quantitativ mittels enzymatischen UV-Test durch Oxidation von NADH bei der mit der Harnstoffhydrolyse gekoppelten reduktiven Aminierung von 2-Oxoglutarat. Der Harnstoff wird durch das Enzym Urease in Bicarbonat und Ammoniumionen gespalten. Der hierbei stattfindende Protonenverbrauch führt zu einer pH-Verschiebung Richtung alkalischen Bereich. Diese wird mittels zugesetzten Farbindikator o-Cresolphthalein-Komplexon (Phthalein Purple) sichtbar gemacht. Die Harnstoffmenge ist proportional zum Anstieg des pH-Werts. Bei der Durchführung des UV-Tests wurde zunächst in jedes Well einer 96-Well-Platte 2 µl der Serumprobe pipettiert. Zuvor wurde bereits ein Gemisch aus den Reagenzien R1 und R2 im Verhältnis 4 zu 1 vorbereitet, von welchen nun 200 µl auf jedes Well verteilt wurde. Die Absorption wurde nach einer Inkubationszeit von ca. 60 Sekunden bei einer Wellenlänge von 360 nm abgelesen (A1). Eine zweite Messung (A2) erfolgte weitere 60 Sekunden später. Anschließend wurde die Auswertung durch die Subtraktion der A2 von der A1 Messung durchgeführt. Um jedoch den BUN-Wert (Blood urea nitrogen, mg/dl) zu erhalten, multiplizierte man den zuvor berechneten Harnstoff-Wert (mg/dl) mit dem Faktor 0,467.

3.4 *In vitro* Methoden

3.4.1 Zellkultur der pTEC-Linie

Für die MDM2 Expressionsversuche wurden die isolierten primären TECs (pTECs) bei 37°C sowie mit einer Kohlenstoffdioxid -Konzentration von 5% kultiviert. Hierbei wurde ein spezielles Tubuluszell-Kulturmedium verwendet, bestehend aus DMEM Medium versetzt mit folgenden Zusatzlösungen:

- 10% Fetales Kälberserum (FBS)
- 1% Penicillin/Streptomycin (P/S)
- 1 mol/l HEPES pH 7,55
- 10 mg/ml Insulin-Transferrin-Sodium-Selenite Supplement (ITSS)

- 20-25 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF)
- 1% Hormon-Mix zusammengesetzt aus: 50 ml HBSS, 12,5 µl PGE1, 50 µl T3, 500 µl Hydrocortison

Das Wechseln des Mediums erfolgte in regelmäßigen Abständen von 2-3 Tagen. Zudem wurde mit großer Sorgfalt die Konfluenz der Zellen in den Petrischalen überwacht, wobei bei einer Konfluenz von ca. 60-70% ein Zellsplitten mithilfe des Enzyms Trypsin und anschließender Waschschriffe durchgeführt wurde. Bevor die Zellen neu ausplattiert wurden, wurde mittels Neubauer-Zellkammer unter dem Lichtmikroskop die Zelldichte eruiert und im Anschluss ca. 500.000 bis 750.000 Zellen pro 10 cm² verteilt.

3.4.2 Zellkultur der mTEC-Linie (immortalisierte Tubulusepithelzellen)

Um das Verhalten der primären Tubulusepithelzellen mit dem einer immortalisierten Zelllinie vergleichen zu können, wurden mTECs in einer Petrischale unter den gleichen Bedingungen (37°C, 5% CO₂ –Konzentration) kultiviert. Der Mediumwechsel sowie das Aufteilen und Umsetzen der Zellen erfolgte wie bei der primären Zellreihe in regelmäßigen Abständen. Es wurde hierbei RPMI 1640 Medium mit folgenden Zusatzlösungen verwendet:

- 10% Fetales Kälberserum (FBS)
- 1% Penicillin/Streptomycin (P/S)

3.4.3 Stimulation der TECs

Für die MDM2 Genexpressionsexperimente wurden die pTEC in 96-Well-Platten mit je 5000-8000 Zellen pro Well ausplattiert und vor der Stimulation eine Synchronisierung des Zellzyklus durchgeführt, bei der die Zellen 24 Stunden vor Versuchsbeginn mit nur 2% FBS reichem Medium kultiviert wurden. Nach Erreichen einer 70% Konfluenz in jedem Well verabreichten wir den Zellen 1 mg/ml Doxycyclin, um den MDM2 Knockout anzuschalten. Gleichzeitig gaben wir verschiedene Zelltodinhibitoren in die Wells. Nach einer Inkubationszeit von 2-3 Tagen führten wir den MTT-Assay durch (siehe unten). Die Konzentrationen der Zelltodinhibitoren waren wie folgt.

ZVAD: 20 µmol ; Necrostatin-1: 100 µmol

Ferostatin-1 : 2 µmol; Cyclosporin-A: 2 µmol; Dabrafenib: 5 µmol

3.4.4 MTT Assay

Das vordergründige Ziel des Proliferationstests ist es die Zellviabilität zu untersuchen, welche stark von der metabolischen Aktivität der Zellen abhängt. Somit wird es möglich die Zahl der

Zellen zu bestimmen, die in der Abwesenheit oder Präsenz bestimmter Agenzien proliferieren. Das Prinzip stützt sich auf die mitochondriale Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan (Abbildung 9). Die Quantität des umgesetzten Farbstoffs, gemessen mithilfe des Photospektrometers, repräsentiert die Glykolyserate der Zellen. Die Enzyme des endoplasmatischen Retikulums sind ausschlaggebend für die Reduktion von MTT durch NADH und NADPH. Zur Messung der Zellviabilität wurde stets der CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay herangezogen.

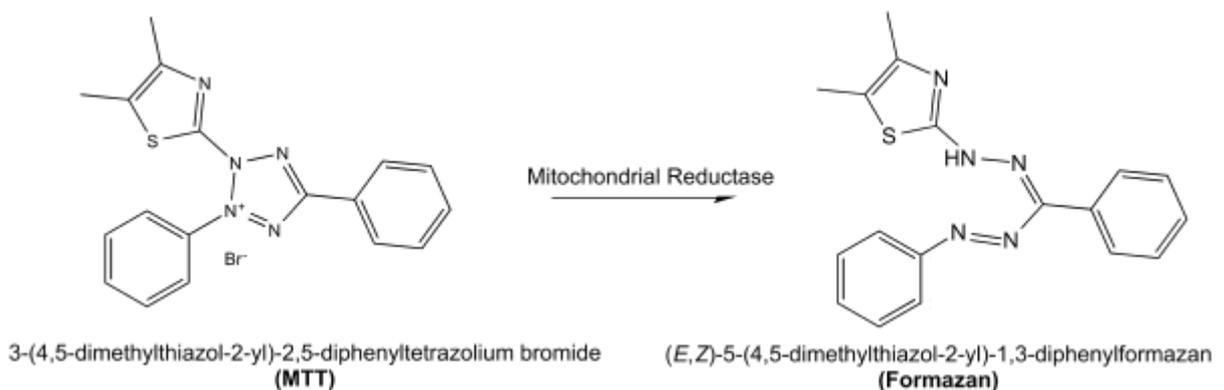


Abbildung 9: Chemische Formeldarstellung der mitochondrialen Reduktion des MTT Farbstoffs in das wasserunlösliche violett-bläuliche Formazan.

Zur Durchführung des Proliferationstests wurden ca. 5000 TECs pro Well in einer 96-Well-Platte in 100 µl K1-Medium kultiviert. Nach Ansiedeln der Zellen auf den Grund der Wells, was meist nach 24 Stunden erreicht wurde, wurden sowohl den *Mdm2* KO als auch den Kontrollzellen verschiedene Dosen Doxycyclin (100 und 1000 mg/ml) hinzugefügt. Nach entsprechender Einwirkzeit (24, 48, 72 Stunden) wurden jeweils 15 µl des Farbstoffs in jedes Well pipettiert und die 96-Well-Platte für ca. 90 bis 120 Minuten bei 37°C in den CO₂ Inkubator gestellt. Nach sichtbarem Farbumschlag wurde dann jeweils 75 µl Solubilization Solution (100 µl von 0.04 M Salzsäure in Isopropanol) in jedes Well gegeben. Die Platte konnte nun in Dunkelheit und bei Raumtemperatur gelagert werden. Die Messung der Absorption erfolgte nach 24 Stunden bei einer Wellenlänge von 570 nm. Die Hintergrundabsorption des Kulturmediums der Zellen wurde durch eine Leermessung desselbigen ohne Zellinhalt bestimmt und der zustande kommende Wert wurde von den jeweiligen gemessenen Absorptionswerten der stimulierten Gruppe mit TEC's subtrahiert.

3.4.5 Zytotoxizitätsassay

Der Cytotoxicity Detection Kit (LDH-Assay) ist ein nicht-radioaktiver kolorimetrischer Assay für die quantitative Messung der extrazellulären Menge an Laktatdehydrogenase (LDH), welche ein Biomarker für zelluläre Zytotoxizität und Zytolyse ist. Die kolorimetrische Messung der LDH, welche aus dem Zytosol beschädigter und sterbender Zellen durch Ruptur der Zellmembran freigesetzt wird und sich im Überstand des Kulturmediums befindet, erlaubt den Rückschluss auf den stattfindenden Zelluntergang. Die LDH ist ein intrazelluläres Enzym, welches in allen Geweben des Körpers vorkommt und am Energiestoffwechsel mitbeteiligt ist. Untersucht wurde das Zellkulturmedium von isolierten TECs und von der immortalisierten Zelllinie mTEC.

Dafür wurden je 100 µl des Überstands des Zellkulturmediums in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben. Zu dem Überstand wurden nun 75 µl der zuvor vorbereiteten Reaktionslösung hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5 bzw. 10 Minuten in Dunkelheit und bei Raumtemperatur wurde jeweils eine Absorptionsmessung mithilfe des Photospektrometers bei einer Wellenlänge von 492 nm vorgenommen. 1% Triton X-100 wurde den Zellen als Positivkontrolle ins Zellkultur-Medium dazugegeben und für ca. 60 Minuten inkubiert. Die anschließende Berechnung der Zytotoxizität der verschiedenen Stimuli erfolgte mittels nachfolgender Rechnung. Wobei „exp.value“ dem Wert der Absorptionsmessung für den Stimulus, „low control“ dem Absorptionswert einer Leermessung mit Stimuli ohne Zellen und „high control“ dem Absorptionswert der mit 1% Triton X-100 Lösung behandelten Zellen entspricht (siehe Formel 2).

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{exp. value} - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} * 100$$

Formel 2: Formel zur Berechnung der relativen Zytotoxizität gemessen an der Positivkontrolle (1% Triton X-100).

3.4.6 Transfektion mittels siRNA

Unter Transfektion versteht man den Vorgang, bei welchem Nukleinsäuren in Zellen eingebracht werden kann. Es gibt eine Vielzahl gängiger Methoden, um eine Transfektion erfolgreich durchzuführen, u.a. die Elektroporation oder auch die Lipofektion. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem Verfahren der Lipofektion gearbeitet. Bei dem Verfahren der Lipofektion wird DNS von einem synthetischen, positiv geladenen Lipid umhüllt, bevor dieses mit der lipophilen Zellmembran fusioniert und so die DNA ins Zellinnere transferiert. Die DNS-Moleküle dürfen eine Größe von bis zu 100 kb aufweisen.

Es wurde eine 96-Well-Platte mit je 5000 mTECs pro Well vorbereitet, wobei die Lipofektion erst bei einer allgemeinen Konfluenz von 70-90 % vorgenommen wurde. Der erste Schritt bestand im Vorbereiten des DNS-Lipid-Komplexes, welcher eine Endkonzentration von 4 pmol/Well haben sollte. Es werden zwei Suspensionen bestehend aus Opti-MEM Medium und Lipofectamin etwa im Verhältnis 1:40 vorbereitet. Zwei weitere Opti-MEM befüllte Eppendorf-Gefäße wurden einmal mit siMDM2 und einmal mit siRNA Negative Kontrolle gefüllt. Anschließend wurde je eine der Opti-MEM-Lipofectamin-Suspensionen mit einer der beiden zuvor vorbereiteten siRNA Eppendorf-Gefäße vermengt. Nach einer Inkubationsdauer von etwa 15 bis 20 Minuten konnten 20 µl der Lipofektionslösung auf jedes Well verteilt werden. Während dieser Inkubationszeit bildet sich eine Lipidhülle um die siRNA und ermöglicht somit das Einschleusen der neuen DNS in den anderen Organismus. Als experimentelle Gruppe wurde eine siRNA des Gens MDM2 zum selektiven MDM2 Knockout und als Kontrolle eine Silencer Select Negative Control verwendet. Nach Hinzufügen des transfektionsfähigen Lipidgemisches wurde die 96-Well-Platte für weitere 48 Stunden kultiviert, um von einer sicheren Aufnahme des DNS-Lipid-Komplexes in den Nucleus der Zelle ausgehen zu können.

3.5 Histopathologische Untersuchungen

Lichtmikroskopie

Nach Gewinnung der Gewebeproben wurde je ein Drittel des Nierengewebes per Perjodsäure Schiff (PAS) aufbereitet und lichtmikroskopisch unter 100- und 400-facher Vergrößerung begutachtet. Die Lichtmikroskopie nutzt den vergrößernden optischen Effekt von Linsen und ist so in der Lage Strukturen, welche mit emmetropen Auge nicht zu erkennen wären, darzustellen. Im Vergleich zu Lupen ist das Auflösungsvermögen von Lichtmikroskopen weitaus größer. In den folgenden Experimenten (siehe Ergebnisteil) wurden die PAS sowie Lectin eingefärbten Gewebeschnitte mittels Lichtmikroskopie analysiert.

Die PAS-Reaktion/Färbung ist eine häufig eingesetzte histochemische Färbetechnik in der Histologie, bei welcher v.a. kohlenhydrathaltige Bestandteile wie beispielsweise Glykoproteine sowie -lipide, Cellulose und Muzine mittels Perjodsäure und Schiff-Reagens nachgewiesen werden können. Im ersten Schritt sind die zuvor frisch entnommenen Organe für 24 Stunden in 4% Formalinlösung eingelegt worden. Anschließend wurden die Organblöcke in 70% Ethanol überführt, bevor sie weiterverarbeitet wurden. Es erfolgte die Einbettung in Paraffin. Von den hergestellten Paraffinblöcken wurden nun etwa 4 µm schmale Schnitte hergestellt, welche anschließend auf sterile Objektträger transferiert und getrocknet

wurden. Die nachfolgende Entparaffinisierung erfolgte erst mit Xylol, dann mittels Ethanol (100%, 96%, 70%, 50%). Danach wurde die namensgebende Perjodsäure zunächst für 5 bis 10 Minuten auf die Proben aufgebracht und anschließend mit destilliertem Wasser abgewaschen, bevor darauffolgend für eine Dauer von 20 Minuten die Inkubation in Schiff-Reagenz erfolgte. Nach einem weiteren Waschvorgang mit Leitungswasser wurden die Objektträger nun für zwei Minuten mit Kalium-Methabisulfid-Lösung bedeckt. Direkt anschließend wurde die Lösung durch eine Fixierlösung ausgetauscht, welche wiederum für zwei Minuten auf den Objektträgern verblieb. Nun wurden die Schnitte mit Mayer's Hämatoxylin für drei Minuten benetzt, das danach mit destilliertem Wasser heruntergewaschen wurde. Unter Verwendung einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die nun gefärbten Organschnitte dehydriert und zuletzt mit Xylol aufgebleicht.

Die zweite Färbung, welche wir verwendet haben, heißt „Lectin-Färbung“. Lectine sind komplexe Proteine oder Glykoproteine nicht immunogenen Ursprungs, welche fähig sind Zellen zu „verklumpen“ und/oder Glykokonjugate zu präzipitieren. Diese eingangs lediglich in Pflanzen entdeckten Proteine, sind ebenso in Säugetieren und Bakterien anzutreffen. Lectine besitzen keine enzymatische Aktivität auf ihre Liganden. Gleichzeitig können Lectine einige Stoffwechselforgänge z.B. die ribosomale Proteinsynthese, die Zellteilung oder das Immunsystem beeinflussen.

Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) stellt ein bekanntes Mikroskopie-Verfahren dar, das mittels Elektronenstrahlen eine gezielte Abbildung von Objekten ermöglicht, wobei die derzeitige Auflösungsgrenze bei 0,05 nm liegt. Das Prinzip beruht auf Elektronen, die ein Objekt durchstrahlen, das ausreichend dünn sein muss. Der Strahlengang verläuft dabei im Vakuum, um die Ablenkung der Elektronen durch Luftmoleküle zu verhindern. Zunächst wurden die Zellen in 6-well Platten auf sogenannten „Thincerts“, d.h. dünne transparente Membranen aus PET mit einem Porendurchmesser von 3 µm ausplattiert und kultiviert. Sobald die Zellen adhärent und gewachsen waren, wurden sie mit 1mg/ml Doxycyclin therapiert, wobei dies jeweils für unterschiedliche Zeitintervalle erfolgte (0, 12, 24, 48, 72 Stunden). Nach der jeweiligen Therapiedauer wurden die Membranen aus dem Kulturmedium entfernt und mittels 3% Glutaraldehyd in PBS mit einem pH von 7,2 fixiert und bis zur weiteren Aufbereitung bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die „Thincerts“ nach dreimaligem Waschen mit PBS Puffer (pH 7,2) in 3-mm Quadrate zugeschnitten. Diese wurden danach mit 2%-iger Osmium(VIII)-oxid für zwei Stunden inkubiert. Im Anschluss

erfolgte die Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe. Nach dem Transfer in Aceton wurden die Quadrate nun in EPON Lösung eingebettet. Nun wurden Schnitte mit einer Dicke von etwa 70 nm mithilfe eines Diamantmessers angefertigt. Diese wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat angefärbt und mit einem 1200 EXII Transmissionselektronenmikroskop von der Firma JEOL ausgewertet

Immunhistochemie/-fluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode, wobei Antikörper, welche mit einem Fluoreszenz (sog. Fluorochrom) gekennzeichnet sind, um ihr spezifisches Antigen nachzuweisen. Abhängig von der Vorbehandlung der Zellen, ist es möglich intrazelluläre und Oberflächengebundene Antigene dieser nachzuweisen. Mithilfe eines Epifluoreszenz-Mikroskops erfolgt der Nachweis in den Schnitten, indem der Farbstoff durch Licht spezifischer Wellenlänge angeregt und das emittierte Licht durch Sperrfilter der entsprechenden Wellenlänge gefiltert wird, bevor es ins Okular tritt. Daher ist das auftretende Signal hochspezifisch für das nachgewiesene Antigen. Antigene, welche für unsere Experimente von Bedeutung waren, sind Mdm2, Zytokeratin-7, E-Cadherin sowie Vimentin. Für die immunhistochemische Färbung wurden 2 µm dünne Paraffinschnitte deparaffiniert, rehydriert und mit PBS gewaschen. Vor der Antikörper-Färbung wurde die in den Schnitten enthaltene endogene Peroxidase durch eine 20-minütige Inkubation in einer H₂O₂ – Methanol-Lösung (20 ml 30% H₂O₂ in 180 ml Methanol) und anschließendem Waschen mit PBS blockiert. Da die Fixierung mit Formalin zu Proteininteraktionen führen kann, sodass die Epitope der Antigene nicht mehr von den Antikörpern erkannt und gebunden werden können, demaskiert man die Antigene. Hierfür werden die Schnitte in einer Mischung aus 3ml Antigen-Masking-Lösung und 300 ml Wasser gelegt und in einer Mikrowelle für insgesamt 10 Minuten erhitzt. Danach folgt abermals eine Waschung mit PBS. Nachdem die Schnitte auf Zimmertemperatur abgekühlt werden, wird das endogene Biotin mithilfe von Avidin für 15 Minuten blockiert. Darauf folgen eine rasche Reinigung der Schnitte und anschließend eine Inkubation mit Biotin für 15 Minuten. Zuletzt werden die Schnitte nochmals mit PBS aufgereinigt. Um das unspezifische Binden und Hintergrundfärbung zu reduzieren, werden die Schnitte in 10 % Ziegen Serum für 10 Minuten inkubiert, um so die reaktiven Seiten zu blockieren, die sonst mit den primären oder sekundären Antikörpern interagieren würden. Nachfolgend werden die Schnitte mit einem verdünnten primären Antikörper für 1h bei Raumtemperatur bzw. bis zum nächsten Tag bei 4°C in Nasskammern inkubiert. Danach erfolgt das Waschen mit PBS. Die ABC Trägerlösung (15 µl von Reagenz A und 15 µl des

Reagenz B in 1 ml PBS) für die sekundären Antikörper wird dann hinzugefügt, für 30 Minuten in der Nasskammer bei Raumtemperatur gelassen und abschließend wiederum mit PBS gereinigt. Unmittelbar anschließend werden die Schnitte für 5 Minuten mit TRIS Hydrochlorid gewaschen. Zudem wird die Reporter Enzymlösung DAB hinzugefügt und für 1 bis 10 Minuten einwirken lassen, um zu färben. DAB wird in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid oxidiert, wobei dies durch die Produktion eines bräunlichen Produkts leicht nachgewiesen werden kann. Dies wird danach mit Methylengrün gegengefärbt, um den Farbkontrast zu erhöhen. Die Schnitte werden zuerst mit 96% Ethanol und anschließend mit 100% Ethanol gereinigt, um überschüssige Farbe zu entfernen. Schließlich wird ein Tropfen VectaMount Fixierungsmedium auf die Schnitte aufgetropft, bevor sie dann mit einem Verschlussglascover bedeckt wurden. Gleichzeitig werden immer negativ Kontrollen für jede Immunfärbung mit dem jeweiligen Isotyp-Antikörper statt des primären Antikörpers angefertigt.

Die Evaluation wurde an einem konfokalen Mikroskop LSM 510 und mithilfe einer LSM Software vorgenommen. Die MDM2 Färbung wurde genutzt, um den erfolgreichen MDM2 Knockout in TECs zu bestätigen und visuell darzustellen. Die weiteren immunhistochemischen Färbungen wurden zur Überprüfung der Reinheit der TECs Zellkulturen benötigt. Hierbei stellt Zytokeratin-7 einen epithelzellspezifischen Marker dar, welcher von diesen gebildet wird und als Intermediärfilament den wichtigsten Teil des Zytoskeletts repräsentiert. E-Cadherin ist ein Calcium-abhängiges transmembranöses Glykoprotein aus der Gruppe der Adhäsionsmoleküle. Es ist für die Zell-Zell-Adhäsion an den Kontaktstellen der Epithelzellen verantwortlich. Dagegen ist Vimentin ein Zytoskelettprotein von mesenchymalen Zellen und stellt einen Marker der mesenchymalen Zellen einschließlich Fibroblasten, Endothelien etc. dar.

3.6 Statistische Analyse

Vor der Anwendung statistischer Methoden wurden der Shapiro-Wilk-Normalverteilungstest, der Levene-Homoskedastizitätstest und der Grubb-Ausreißertest auf die Datensätze angewendet. Die statistische Analyse wurde mithilfe des bilateralen Student t-Tests zum Vergleich zweier normalverteilter Datensätze genutzt. Alternativ wurde im Fall von zwei nicht normalverteilten Datensätzen der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test angewendet.

Für mehr als zwei Datensätze wurden die normalverteilten und homoskedastischen Datensätze mithilfe einer Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) mit Turkeys Post-Test bewertet. Im Falle der Heteroskedastizität wurde der Post-hoc-Games-Howell-Test verwendet. Bei

Verwendung von zwei Parametern mit mehreren Gruppen wurde eine Zwei-Wege-ANOVA mit Bonferronis Post-hoc-Vergleichstest durchgeführt. Überlebenskurven wurden mittels Kaplan Meier Kurve dargestellt.

Statistische Analysen wurden mit GraphPad Prism 5 (CA, USA) durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, werden die Daten als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$ war; Nicht signifikante Unterschiede (ns) sind entsprechend angegeben. Die Probengrößen wurden in jeder entsprechenden Figurenlegende angegeben.

Der Standardfehler des Mittelwerts wurde wie folgt berechnet.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n a_k$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

$$\text{SEM} = s / \sqrt{n}$$

Formel 3: X: Mittelwert der Versuchsreihe, n: Größe der Versuchsreihe, s: Standardabweichung, SEM: Standardfehler.

4 Ergebnisse

4.1 Erhöhte p53 Expression nach MDM2 Knockout reduziert die Überlebensrate von mTECs *in vitro*

Das Tubulussystem nimmt in der Pathogenese des ANV eine wesentliche Rolle ein [26]. Es wurde gezeigt, dass MDM2 im Rahmen der frühen tubulären Inflammation und der nachfolgenden Tubuluszellregeneration ein entscheidender Faktor ist und die TECs ein hohes MDM2 Expressionslevel zeigen [102]. Um den Effekt der MDM2 Deletion und die Interaktion mit p53 genauer *in vitro* zu untersuchen, habe ich eine immortalisierte murine TEC-Zelllinie (mTECs) verwendet. Um einen erfolgreichen *Mdm2* KO mittels „small interfering RNA“ (siRNA) Technologie zu induzieren, wurde eine Lipofektion mit *Mdm2* siRNA und Kontroll siRNA durchgeführt. Nach erfolgreicher Transfektion mit *Mdm2* siRNA, konnten die mTECs nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden für RNA Isolation und RT-PCR gewonnen werden. Die Ergebnisse der PCR Analyse zeigten einen erfolgreichen Knockdown von *Mdm2* in TECs um fast 65% im Vergleich zur Kontroll siRNA (Abbildung 10A). Die mRNA Expressionsstärke von *p53* hingegen hat sich, wie bereits vermutet, aufgrund des Knockdowns des Negativregulators MDM2 signifikant erhöht (Abbildung 10B).

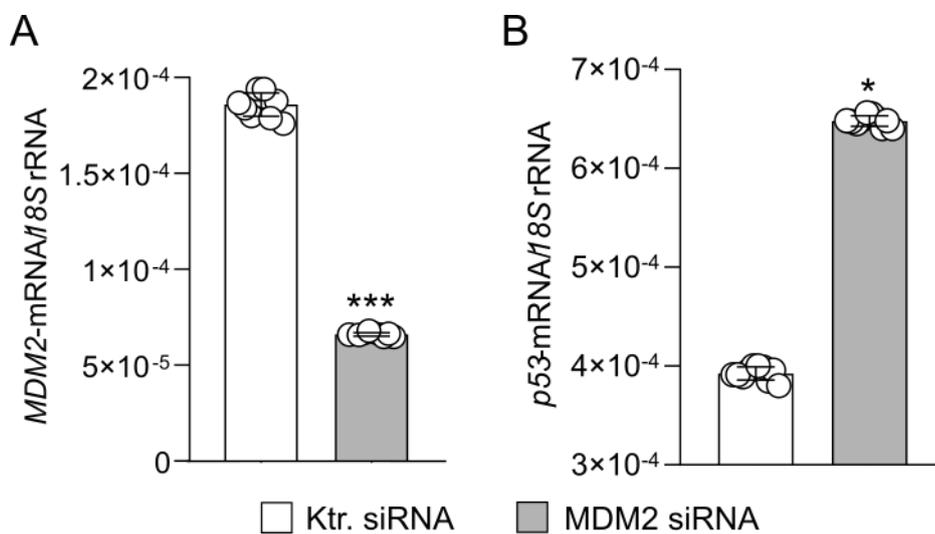


Abbildung 10: Verminderte *Mdm2* mRNA Expression bei gleichzeitigem Anstieg der *p53* mRNA Expression. (A) Die *Mdm2* mRNA aus murinen immortalisierten TECs (n = 5 pro Gruppe) zeigt eine hoch signifikante Reduktion des Spiegels um circa 65%. (B) Die *p53* mRNA aus mTECs (n = 5 pro Gruppe) zeigt im Gegensatz zu *Mdm2* mRNA eine signifikante Elevation des Spiegels. Daten zeigen Mittelwert ± SEM. * = p < 0,05; *** = p < 0,001 mittels Student t-Test. Ktr. = Kontrollgruppe.

Um die Konsequenzen dieser MDM2-p53-Expriemierungsverschiebung zu charakterisieren, habe ich in mTECs die Gene *Mdm2* und *p53* oder beide zusammen *Mdm2/p53* mittels siRNA

ausgeschaltet und deren Proliferationsverhalten und Zellviabilität mittels MTT-Assay quantifiziert. Der statistische Vergleich zwischen der Kontrollgruppe (Kontroll siRNA) und der induzierten *Mdm2* Geninaktivierung zeigte eine signifikante Reduktion des Lebendzellanteils, während bei einem zusätzlichen Ausschalten des p53 Einflusses durch Doppelknockdown eine ebenso hohe Signifikanz bezüglich der verbesserten Tubuluspopulation-Lebensfähigkeit zu beobachten war (Abbildung 11). Zellen, die hingegen ausschließlich eine Deletion im *p53* Gen und somit ein unbeeinträchtigtes MDM2 Level hatten, proliferierten im nahezu selben Maße wie die Kontrollzellen (Abbildung 11). Zusammenfassend kann ich sagen, dass MDM2 die Zellviabilitätsrate der mTECs maßgeblich beeinflusst und ein Verlust dieses Gens zu einer signifikant herabgesetzten Lebensfähigkeit führt.

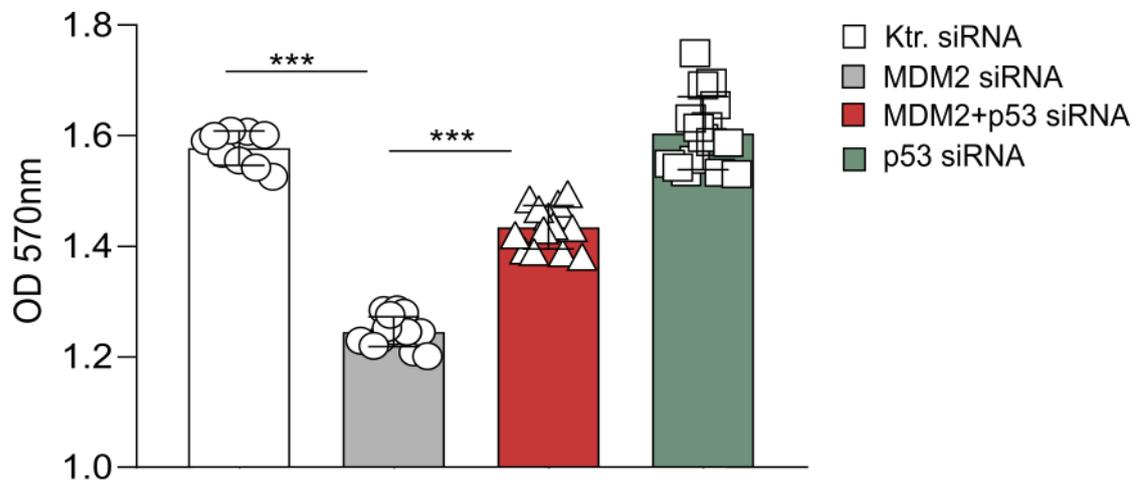
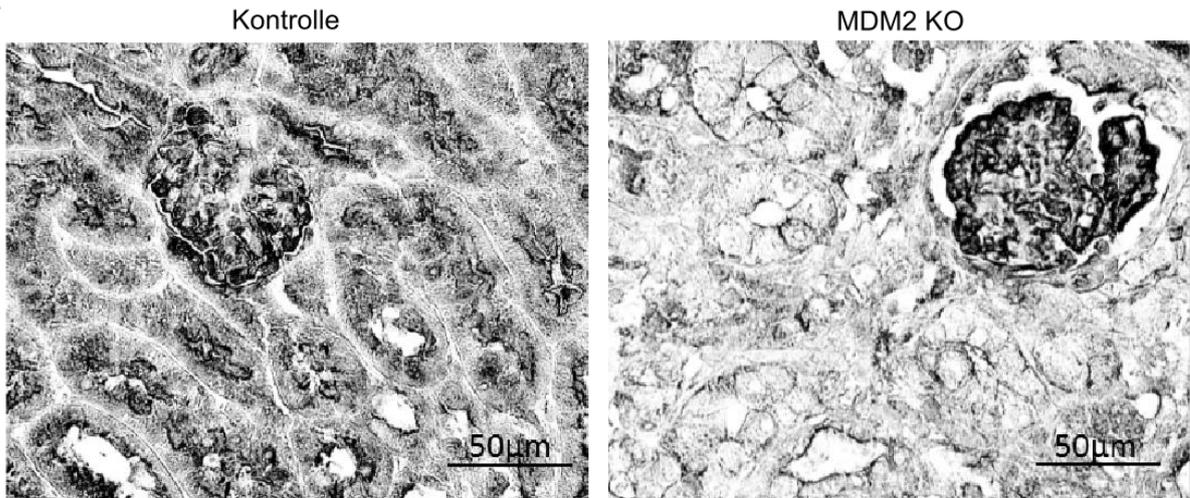


Abbildung 11: MDM2 Knockdown führt zu verminderter Proliferationsrate muriner TECs. Mittels Lipofektion und anschließender 48 stündiger Inkubation wurde bei murinen immortalisierten TECs ein single *Mdm2* oder *p53* Knockdown sowie ein *Mdm2/p53* Doppelknockdown mittels siRNA Technologie durchgeführt. Während bei single *Mdm2* Knockdown eine signifikante Proliferationsreduktion zu sehen war, verbessert sich das Wachstumsverhalten der TECs durch *MDM2/p53* Doppelknockdown oder *p53* Knockdown (n = 10 pro Gruppe). Daten zeigen Mittelwert ± SEM. *** = p < 0,001 mittels Einweg-ANOVA.

4.2 Verminderte MDM2 Expression in Tubularepithelialzellen *in vivo*

Nach *in vitro* Charakterisierung der TEC-spezifischen Mdm2-Geninaktivierung in einer murinen immortalisierten Tubuluszelllinie, sollten nun die Ergebnisse in primären murinen TECs (pTECs) von *Pax8rtTA-Cre;Mdm2^{flox/flox}* (*Mdm2* KO) Mäusen bestätigt werden. Vorab wurde die Deletion von *Mdm2* in TECs von *Mdm2* KO Mäusen mit und ohne Doxycyclinbehandlung mittels MDM2 Immunfärbung an Nierenschnitten ermittelt. Als genetische Kontrolle diente eine *Mdm2^{flox/flox}* (*Mdm2* fl/fl) Maus ohne Cre mit normaler MDM2 Expression in den TECs. Die Immunfärbung zeigte eine deutlich reduzierte MDM2 Expression in den Doxycyclin-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 12A). Des Weiteren wurden pTECs von *Mdm2* KO Mäusen mit und ohne Doxycyclinbehandlung isoliert und anschließend *in vitro* kultiviert. Nach 24 Stunden wurde RNA von pTECs isoliert und die *Mdm2* Expressionslevels mittels RT-PCR quantifiziert um Unterschiede bezüglich der mRNA *Mdm2* Expressionsstärke zwischen den *Mdm2* KO Tieren und der Kontrollgruppe offenzulegen. Hierbei hat sich eine signifikante Reduktion des *Mdm2* mRNA Levels um ca. 24% in der Gruppe der mit 100 ng/ml Doxycyclin behandelten Mäusen sowie 55% in der Gruppe der *Mdm2* KO Mäuse, die mit 1000 ng/ml Doxycyclin behandelt wurden, gezeigt (Abbildung 12B). Folglich kann man sagen, dass der Doxycyclin-induzierte Genknockout von *Mdm2* zu einer geringeren Menge an *Mdm2* mRNA führte und die Intensität des Knockouts mit der Doxycyclin-Dosis korrelierte.

A



B

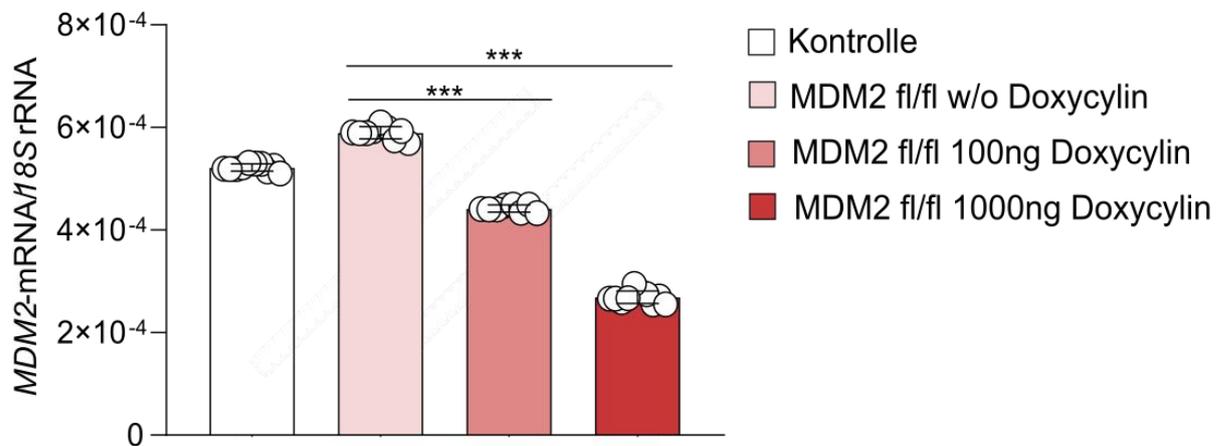


Abbildung 12: MDM2 Level durch Genknockout erfolgreich verringert. (A) In *Mdm2* KO Mäusen zeigt sich in immunohistochemischen Färbung eine wesentlich reduzierte MDM2 Färbung der TECs im Vergleich zu Podozyten der Glomeruli und TECs der Kontrollgruppe. (B) *Mdm2* mRNA aus TECs von 6-8 Wochen alten *Mdm2* fl/fl Mäusen (n = 7 Mäuse pro Gruppe) zeigt im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduzierte *Mdm2* mRNA Level abhängig von der Doxycyclinkonzentration. Daten zeigen Mittelwert \pm SEM. * = p < 0,05. ** = p < 0,001 mittels Einweg-ANOVA.

4.3 Etablierung einer „reinen“ Zellkultur von Tubulusepithelzellen mit spezifischem *Mdm2* Knockout

Durch den vorangegangenen erfolgreichen MDM2 Genknockout in TECs sollte nun überprüft werden, ob das Cre-Rekombinase-System ausschließlich im murinen Tubulussystem seine Wirkung entfaltet und nicht in den Glomeruli. Dazu wurden TECs und Glomeruli isoliert und in Zellkultur gebracht. Nach 8-10 Tagen der *in vitro* Expansion wurden die Glomeruli mit unterschiedlichen Doxycyclinkonzentrationen (100 und 1000 ng/ml) für 24 Stunden behandelt. Die *in vitro* Daten zeigten, dass der *Mdm2* KO spezifisch in TECs stattfand und dadurch keine signifikante Veränderung des Expressionslevels von MDM2 in den Zellen des Glomeruli-Auswuchses zu sehen war (Abbildung 13A). Der Ausdruck „Glomeruli-Auswuchs“ fasst hierbei einen Verbund verschiedener Zellpopulationen zusammen, darunter die renalen Progenitorzellen sog. PECs (parietal epithelial cells), Mesangialzellen sowie Endothelzellen, welche zusammen in einer Petrischale kultiviert wurden.

Um die Reinheit der isolierten primären TECs zu bestätigen, wurden primäre TECs mit dem epithelzellspezifischen Marker Zytokeratin-7, dem Zell-Zell Adhäsionsmolekül E-Cadherin, das an Kontaktstellen der Epithelzellen exprimiert ist und zusätzlich Vimentin, einem Marker von mesenchymalen Zellen gefärbt und anschließend Konfokalmikroskopie durchgeführt [118, 119]. Die konfokalen Mikroskopiebilder zeigten sowohl bei Zytokeratin-7 als auch bei E-Cadherin starke Signale und konnten eine Reinheit der TEC Zellkultur von über 95% attestieren (Abbildung 13B). Durch die vergleichsweise schwache Vimentin-Färbung konnte man auch eine übermäßige Kontamination an Mesenchymzellen in der Kultur der TECs ausschließen (Abbildung 13B).

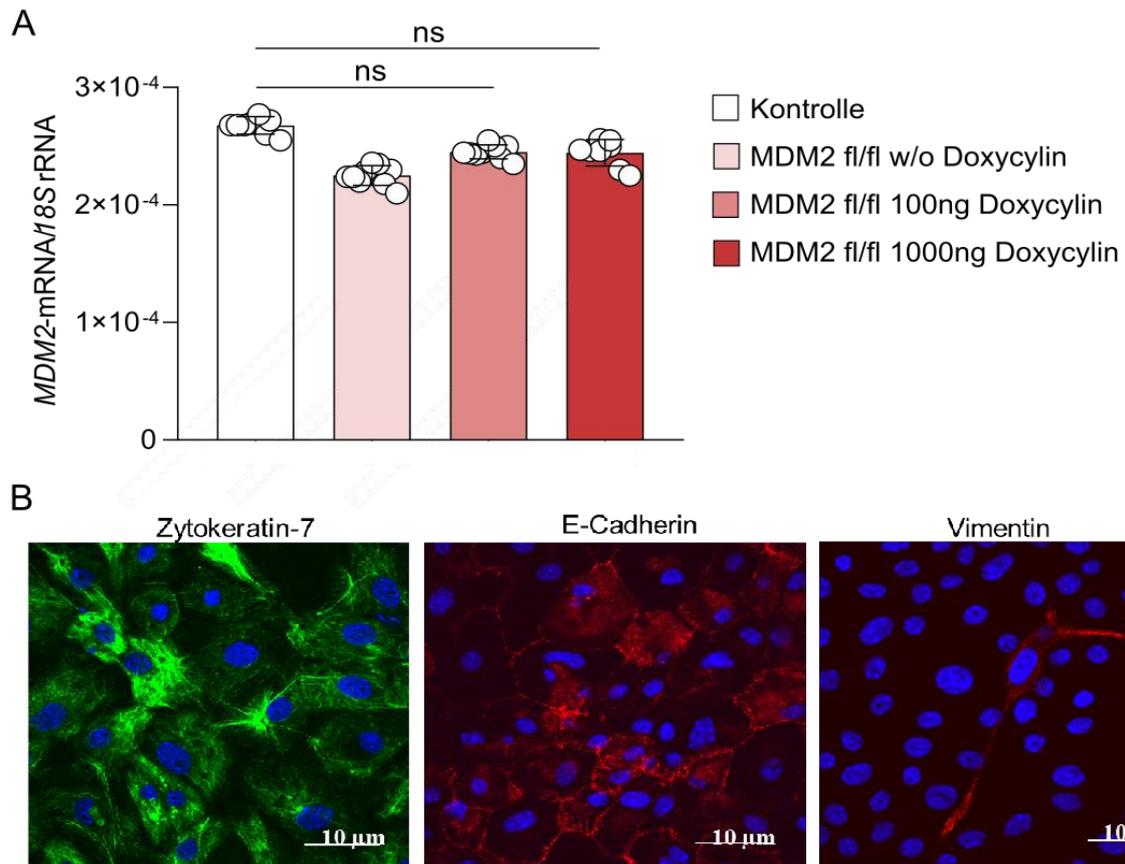


Abbildung 13: Tubulus-spezifischer *Mdm2* KO. (A) Glomerula wurden von *Mdm2* fl/fl Mäusen isoliert mittels magnetischer Separation (n = 7 Mäuse pro Gruppe) für 8-10 Tage mit speziellem Medium (10% FCS) kultiviert. Die auswachsenden Zellpopulationen wurden mit und ohne verschiedenen Dosen von Doxycylin (100 und 1000 ng/ml) behandelt, und die mRNA Level von *Mdm2* mittels RT-PCR ermittelt. Daten zeigen Mittelwert ± SEM. Einweg-ANOVA. (B) Fluoreszenzbilder zeigen tubuluszellspezifische Färbungen für Zytokeratin-7 (grün), E-Cadherin (rot) und Vimentin (rot), und Nukleus (DAPI, blau). Vergrößerung 400x.

4.4 Erhöhte p53 mRNA Expression als Folge des induzierten MDM2 Knockouts trägt zur Tubulusschädigung *in vivo* bei

Nach erfolgreichen tubuluszellspezifischen *Mdm2* Genknockout in isolierten pTECs *in vitro*, habe ich als nächstes die Auswirkungen des reduzierten MDM2 Levels in den TECs von *Mdm2* KO Versuchstieren untersucht. Da MDM2 unter anderem der Hauptnegativregulator von p53 ist [78], wurden nun die p53 mRNA Expressionswerte in den pTECs mittels RT-PCR ermittelt. Die Auswertung der Daten erfolgte durch Gegenüberstellung der mRNA Daten muriner *Mdm2* KO Tubuli mit Doxycylin-induzierter MDM2 Elimination zu denen der Kontrollgruppe in Form des gleichen Genotyps jedoch ohne Doxycylin-Behandlung. Die *in vivo* Daten zeigten eine signifikante Erhöhung der p53 mRNA Expression, v.a. bei TECs, welche mit 100 ng/ml Doxycylin therapiert wurden (Abbildung 14), d.h. dass der induzierte *Mdm2* KO für die erhöhten p53 mRNA Level in pTECs verantwortlich ist.

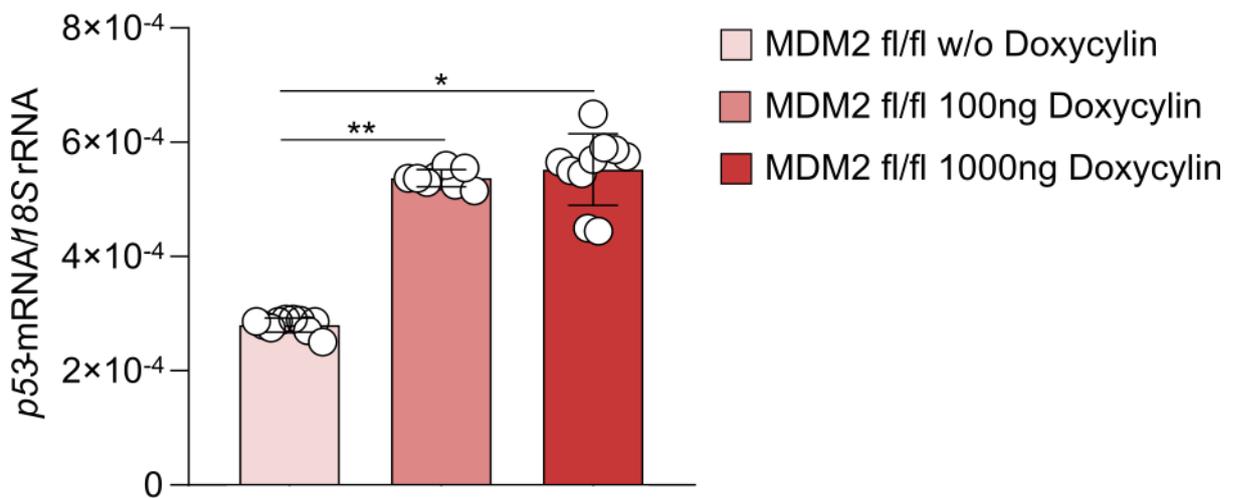


Abbildung 14: Mdm2 Knockout mit Doxycyclin führt zu deutlich erhöhter p53 mRNA Expression. In 6-8 Wochen alten *Mdm2* fl/fl Mäusen zeigt sich eine signifikante Steigerung der p53 mRNA Werte in pTECs nach Doxycyclingabe (100 oder 1000 ng/ml). n = 10 Mäuse pro Gruppe. Daten zeigen Mittelwert ± SEM. * = p < 0,05; ** = p < 0,01 mittels Einweg-ANOVA.

Der Transkriptionsfaktor p53 ist mit der Aktivierung einer Vielzahl von Zelltodmechanismen im Rahmen akuter Nierenschädigung assoziiert [120]. Exakt aufgrund dieses Attributes und der Tatsache, dass die TECs wegen des MDM2 Knockouts vermehrt den Einflüssen von p53 ausgesetzt waren, habe ich nun die Konsequenzen der erhöhten p53 mRNA Expressionswerte auf den Zustand des murinen Nierentubulussystems untersucht. Um die Auswirkungen auf TECs zu untersuchen, wurden isolierte primäre die *Mdm2*^{fl/fl} (*Mdm2* fl/fl) Zellen mit 1 mg/ml Doxycyclin *in vitro* für 24 Stunden behandelt und die mRNA Expressionswerte verschiedener Tubulusschädigungsmarker mittels RT-PCR gemessen. Denn wie bereits zuvor in der Einleitung erwähnt, ist vor allem das Tubuluskompartiment beim AKI betroffen. Zur Darstellung und zum Nachweis des Tubulusschadens wurden folgende Biomarker herangezogen: Kidney Injury Molecule-1 (*KIM-1*), L-Type Fatty Acid Binding Protein (*L-FABP*) und tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (*Timp-2*). *KIM-1* ist nebenbei bekannt als Biomarker für proximalen Tubulusschaden in humanen Nieren. Es zeigte sich, dass in der Gruppe der *MDM2*-defizienten Mäusen eine dosisabhängige erhöhte mRNA Expression der einzelnen Tubulusschädigungsmarker zu beobachten war (Abbildung 15A-C). Es waren sowohl *KIM-1* als auch *L-FABP* und *TIMP-2* signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle ohne Doxycyclin (Abbildung 15A-C). Schlussfolgernd kann man sagen, dass durch den *Mdm2* KO mit einhergehend erhöhter p53 mRNA Expression es zu einer Schädigung in den proximalen TECs kommt.

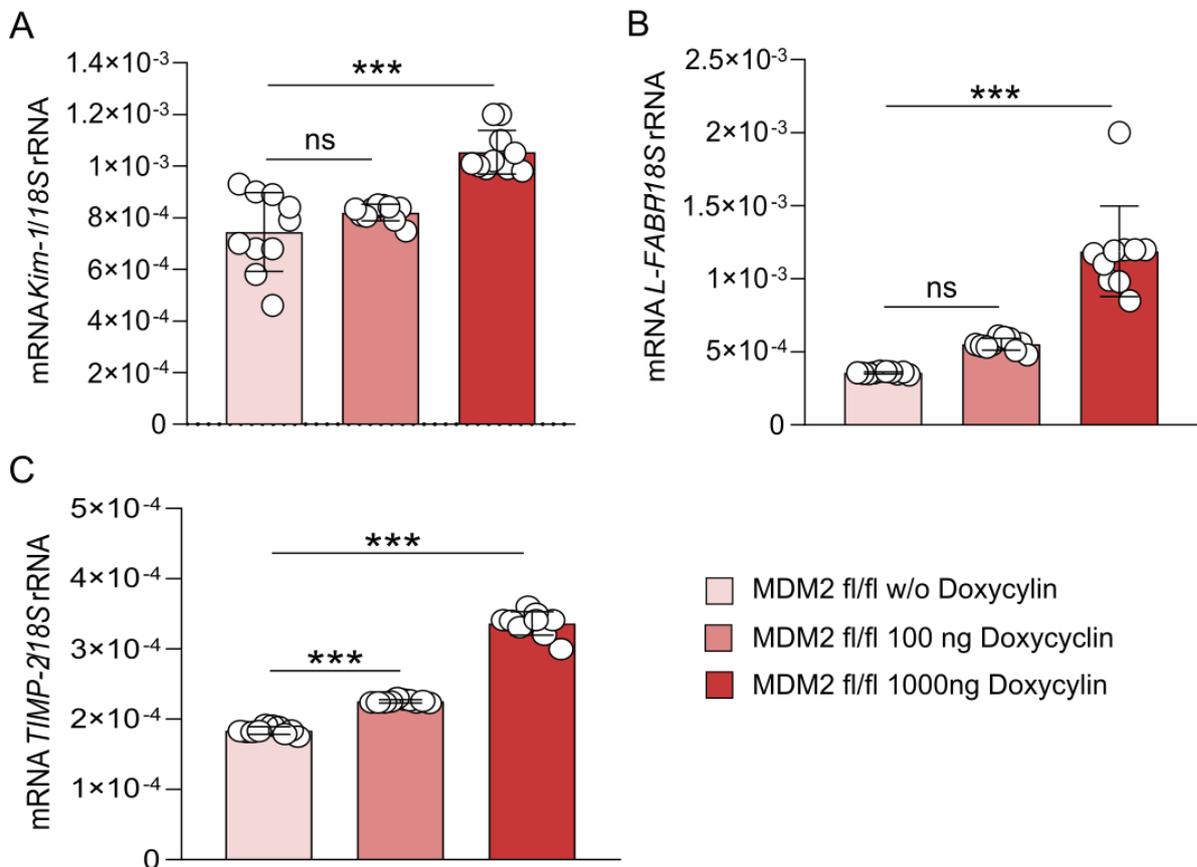


Abbildung 15: Erhöhte mRNA Expression der Tubulusschädigungsmarker in Mdm2 KO pTECs. (A bis C) mRNA Expressionlevels der Nierenschädigungsmarker *KIM-1* (A), *L-FABP* (B) und *TIMP-2* (C) von primären TECs von *Pax8rtTA-Cre;Mdm2^{flox/flox}* Mäusen nach Behandlung mit (*Mdm2* KO) und ohne Doxycyclin (n = 10 pro Gruppe). Daten zeigen Mittelwert ± SEM. * = p < 0,05, ns = nicht signifikant mittels Einweg-ANOVA.

4.5 Mdm2 Knockout in Tubulusepithelzellen verschlechtert die Nierenfunktion *in vivo*

Um die Auswirkungen des TEC-spezifischen *Mdm2* KO auch *in vivo* zu evaluieren, wurden *Pax8rtTA-Cre;Mdm2^{flox/flox}* (ab Doxycyclin Behandlung: *Mdm2* KO) sowie Kontrolltiere mit 1 mg/ml Doxycyclin behandelt und die Nierenfunktion mittels GFR Messung sowie Serum BUN quantifiziert. Die Ergebnisse zeigten, dass sechs Tage nach Doxycyclinbehandlung die GFR rapide und signifikant in den *Mdm2* KO Mäusen im Vergleich zu nicht behandelten Tieren abfällt (Abbildung 16A). Die *Mdm2* KO Mäuse hatten an Tag sechs bereits 80% der Nierenfunktion verloren und an Tag acht fast 95% (Abbildung 16B). Deshalb musste dieses Mal das Experiment nach acht Tagen wegen des sich rapid verschlechterten Allgemeinzustands der Mäuse beendet werden. Diese signifikante Reduktion der GFR war im Einklang mit einem erhöhten BUN an Tag acht (Abbildung 16B). Aus diesen Daten kann man schlussfolgern, dass es bereits in einem Zeitraum von acht Tagen durch den *Mdm2* KO zu

einer extremen Einschränkung der Nierenfunktion gekommen war, welche schließlich in vielen *Mdm2* KO Tieren zur Anurie führte.

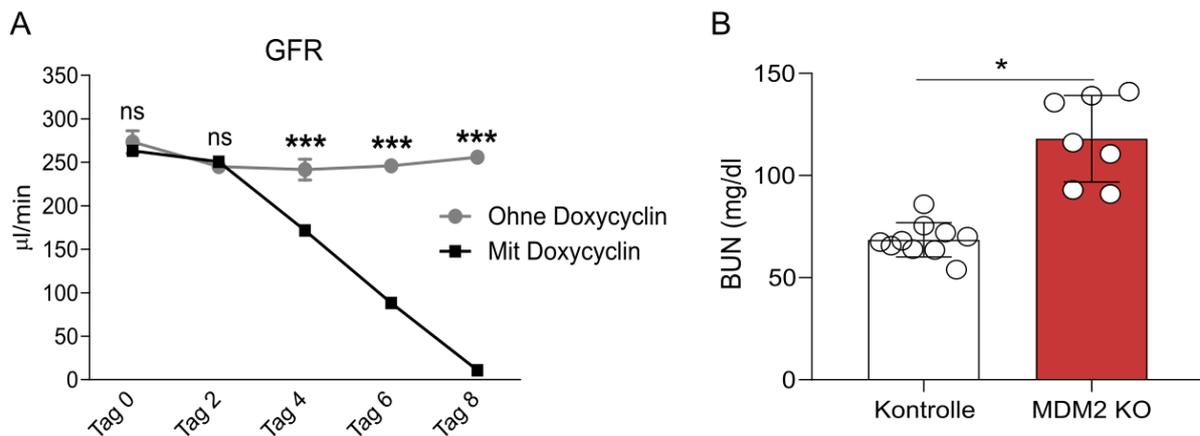


Abbildung 16: *Mdm2* Knockout führt zur Reduktion der Nierenfunktion. (A) *Pax8rtTA-Cre;Mdm2^{flox/flox}* Mäuse wurden mit (*Mdm2* KO) oder ohne Doxycyclin (1 mg/ml) behandelt und die GFR und Serumharnstoff über einen Zeitraum von 8 Tage gemessen (n = 6 Mäuse pro Gruppe, Zwei-Wege-ANOVA). Signifikanter Abfall der GFR in *Mdm2* KO Mäusen ab Tag 4 verglichen mit über einen Zeitraum von 8 Tagen. (B) Serumharnstoff (BUN) von Mäusen mit (*Mdm2* KO) und ohne Doxycyclinbehandlung an Tag 8 (n = 7-10 Mäuse pro Gruppe). Daten zeigen Mittelwert ± SEM. * = p < 0,05 mittels Student t-Test.

Um den plötzlichen Funktionsverlust der Nieren pathologisch genauer zu untersuchen, wurden Nierenschnitte von mit Doxycyclin behandelten *Pax8rtTA-Cre;Mdm2^{flox/flox}* (*Mdm2* KO) und *Mdm2* Wildtyp (*Mdm2* wt) Mäusen mit PAS gefärbt und anschließend lichtmikroskopisch bewertet. Die Schnitte der *Mdm2* KO Tiere wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe wesentliche pathologische Veränderungen in der Struktur und Integrität der Zellen auf (Abbildung 17A). Die Mehrheit der begutachteten Tubuli zeigte eine Abflachung der Epithelzellen infolge einer massiven Tubulusdilatation und einen inkompletten bzw. kompletten Verlust des Bürstensaums, ein Prozess bekannt als Tubulusatrophie. Des Weiteren konnte die Formation sowohl azellulärer und granulärer als auch zellulärer Trümmer („cast debris“) im Lumen nachgewiesen werden, was auf abgestorbenes Epithelzellmaterial hindeutete (Abbildung 17A). Eine Denudation von TECs stellt ein weiteres mikroskopisches Charakteristikum dar, das auf eine Schädigung des Tubulussystems schließen ließ. Insgesamt betrachtet lässt sich die mikroskopische Analyse der *Mdm2* KO Mäuse mit dem histologischen Bild einer ATN vereinbaren.

Für die TEM wurden isolierte pTECs von *Mdm2* fl/fl und *Mdm2* wt (Kontrolle) Mäusen auf Membranen kultiviert und *in vitro* mit 1 mg/ml Doxycyclin für eine Dauer von 24 Stunden

behandelt. Nach Fixation der Zellen und anschließender Aufbereitung konnte die Analyse der Zellen mit einem 1200 EXII Transmissionselektronenmikroskop von der Firma JEOL erfolgen. Die TEM Bilder der pTECs zeigten eine verstärkte Vakuolisierung des Zytoplasmas (Abbildung 17C). Die Vakuolisierung veranschaulicht den Stress auf das endoplasmatische Retikulum im Rahmen p53-bedingter Prozesse während des Vorgangs der Tubuluszellschädigung. Im Gegensatz dazu zeigten die Kontrollzellen keine Zeichen einer Vakuolenbildung und wiesen eine intakte zytoplasmatische Membran auf. Schlussfolgernd verdeutlichen meine Ergebnisse, dass der MDM2-Mangel und folglich die p53-Überexpression in TECs sowohl in vitro als auch in vivo eine Schädigung der Zellen hervorruft, was zur Abnahme der Nierenfunktion und letztendlich zum ANV führt.

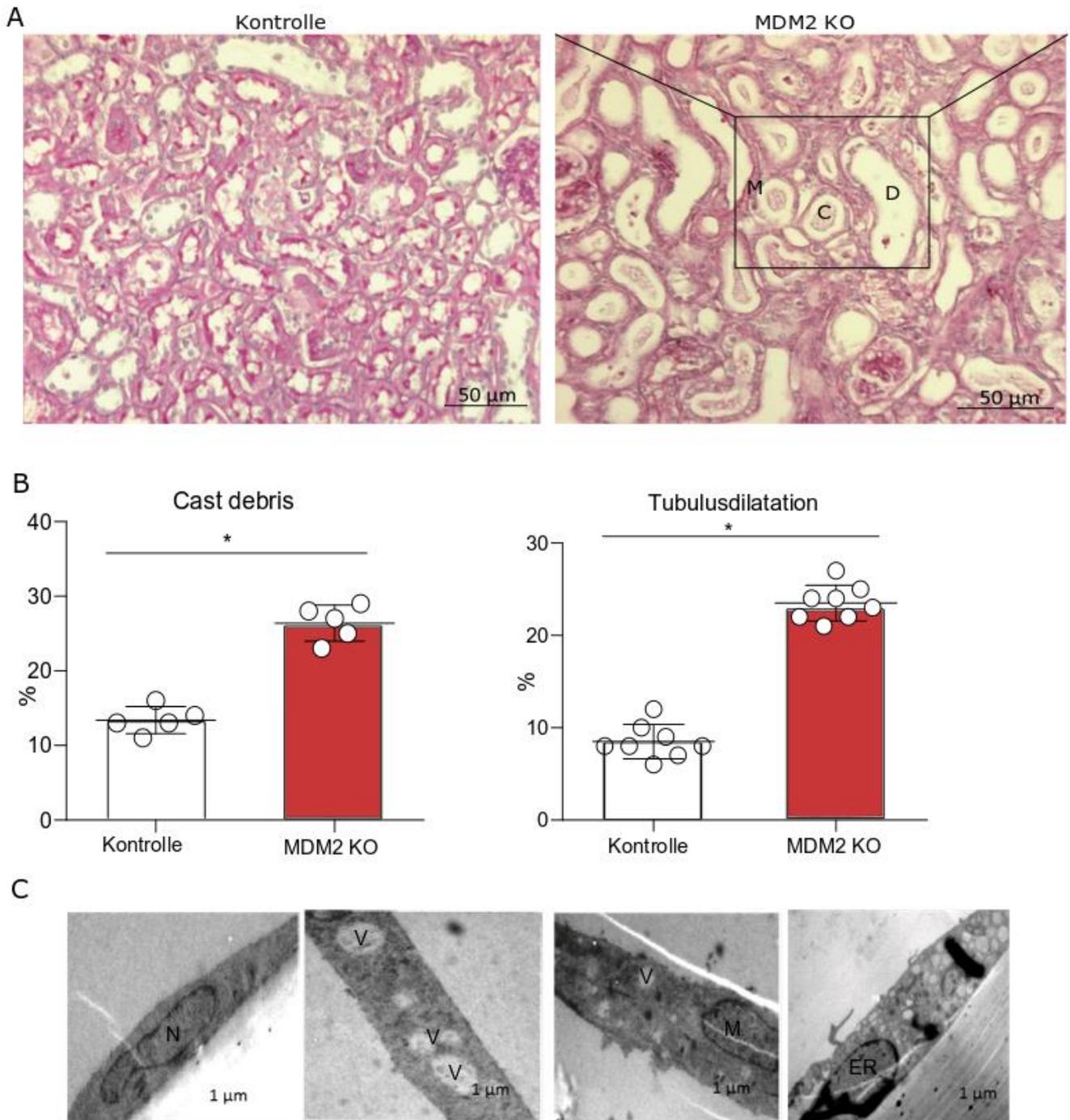


Abbildung 17: Mdm2 Knockout führt zur Tubulusnekrose und Vakuolenbildung. *Mdm2* fl/fl Mäuse und *Mdm2* wt Mäuse (Kontrolle) wurden mit Doxycyclin (1 mg/ml) für 14-17 Tage behandelt. (A) PAS Färbung von Nierenschnitten von Mäusen (n = 5-8 Mäuse pro Gruppe). Vergrößerung 200x. M: Mitotische Zellen. C: Cast debris. D: Dilatation. (B) Quantifizierung der Casts und Tubulusdilatation (in Prozent). Daten zeigen Mittelwert ± SEM. * = $p < 0,05$ mittels Student t-Test. (C) Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung isolierter TECs von *Mdm2* fl/fl Mäusen, die mit oder ohne Doxycyclin *in vitro* behandelt wurden. Bereits nach einem 24-stündigen Knockout findet sich eine ausgeprägte Vakuolenbildung und veränderte Mitochondrienstruktur. V: Vakuole. N: Nucleus. M: Mitochondrium. ER: Endoplasmatisches Retikulum. Die Größenindikatoren zeigen 1 μm in allen Spalten.

4.6 MDM2/p53 Doppelknockout schützt vor Tubulusschädigung *in vivo*

Da die bisherigen *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse der *Mdm2* KO Mäuse weitreichende Auswirkungen auf TECs und eine signifikante Verschlechterung der Nierenfunktion aufgrund des erhöhten *p53* Expression zeigten, wollte ich als nächstes untersuchen, ob der Verlust des *p53* Gens in TECs zur Verbesserung der Nierenfunktion beiträgt. Um diese Hypothese zu prüfen, generierte ich mithilfe des Cre/loxP-Systems eine zellspezifische Mauslinie mit Doppelknockout von *Mdm2* und *p53* in TECs.

Um sicherzugehen, dass das Cre/loxP-System einen *p53* KO in TECs herbeiführte, wurde zunächst eine *p53* Immunhistofärbung von Nierenschnitten von *Mdm2/p53* dKO und *Mdm2* KO/*p53* wt durchgeführt. Beide Gruppen wurden zuvor für 14-17 Tagen mit 1 mg/ml Doxycyclin behandelt. Die Mäuse wurden anschließend untereinander und gleichzeitig mit ebenfalls *p53*-gefärbtem Nierengewebe der bekannten *Mdm2* KO und *Mdm2* wt/*p53* wt Mauslinien auf ihre *p53* Protein- und mRNA-Expression hin verglichen. Das *p53* Signal in den Nierenschnitten von Mäusen mit *Mdm2* wt/*p53* wt (Abbildung 18A, Bild links unten) entsprach der durchschnittlichen Zellumsatzrate. Hingegen bei den *Mdm2* KO/*p53* wt Mäusen kam es zu einer erhöhten *p53* Proteinexpression aufgrund des eliminierten MDM2-vermittelten *p53* Abbaus (Abbildung 18A, Bild links oben). Nach Verlust eines *p53*-Allels nahm die *p53* Proteinexpression ab (*Mdm2* KO/*p53* het, Abbildung 18A, Bild rechts oben) und ein vollständiger *p53* Knockout bestätigte das Fehlen von *p53*-positiven TECs (*Mdm2/p53* dKO, Abbildung 18A, Bild rechts unten).

Da sowohl die Genotypisierung der Mäuse als auch die Immunhistologie mit einer stark verminderten *p53* Anfärbbarkeit der Tubuli in den Doppelknockout Tieren auf eine erfolgreiche *p53* Depletion hinwiesen, wurden die *p53* und *Mdm2* mRNA Expressionlevels mit RT-PCR bestimmt. Als Kontrolle dienten die *Mdm2*^{fl^{ox}/fl^{ox}} (*Mdm2* fl/fl) Tiere. Die *Mdm2* mRNA Expression in beiden Mauslinien *Mdm2/p53* dKO und *Mdm2* KO/*p53* het war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert, wohingegen die *p53* mRNA Expressionswerte zwar in den heterozygoten Tieren dem Level der Kontrollmäuse mit normaler *p53* Genausstattung ähnelten (Abbildung 18B). Eine hoch signifikante Verminderung von *p53* um 62% in dem Doppelknockout-Stamm erreicht werden konnte.

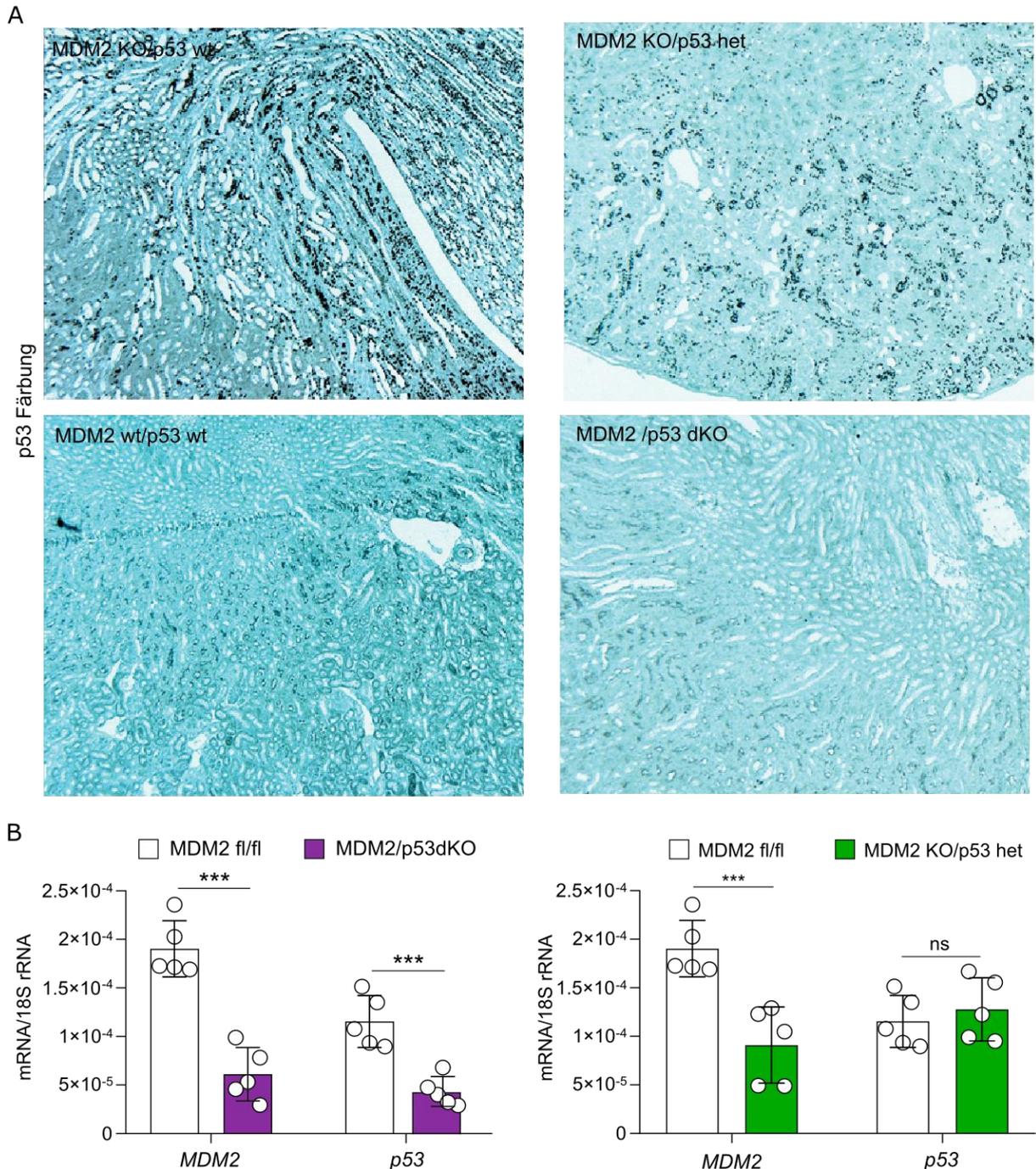


Abbildung 18: *Mdm2/p53* dKO Mäuse zeigen eine verminderte p53 mRNA Expression in Tubuli. *Mdm2* KO/*p53* wt, *Mdm2* KO/*p53* het, *Mdm2* wt/*p53* wt und *Mdm2/p53* dKO Mäuse wurden mit Doxycyclin (1 mg/ml) für 14-17 Tage behandelt. (A) Immunfärbung von Nierenschnitten mit p53 Antikörper. Bei den *Mdm2/p53* dKO Tieren ist ein im Vergleich zu den Kontrollen deutlich weniger p53 exprimiert. Messbalken zeigen 100 µm. (B) Intrarenale mRNA Expression von *Mdm2* und *p53* von den Nieren von *Mdm2* KO/*p53* het im Vergleich zu *Mdm2* fl/fl Tieren (n = 5 Mäuse pro Gruppe). Daten zeigen Mittelwert ± SEM nach Student t-Test. *** = p < 0, 001, ns = nicht signifikant.

Um einen möglichen protektiven Einfluss von p53 auf die Tubulusschädigung bei Doppelknockout von MDM2 und p53 zu untersuchen, habe ich *Mdm2/p53* dKO Tiere mit Doxycyclin behandelt und dann die Nieren für RT-PCR Analyse entnommen. Wie in

Abbildung 19 zu erkennen ist, führte die Doppelgengendepletion von *Mdm2* und *p53* zu einer signifikant reduzierten mRNA Expression von *KIM-1*, *NGAL-1* und *TIMP-2* im Vergleich zu den *Mdm2* KO/*p53* het Kontrolltieren. Dies bedeutete zum einen, dass die Tubulusschädigung bei *Mdm2* Genverlust durch die ungebremste *p53*-Aktivität erfolgt und somit *p53*-abhängig ist und zweitens der Tubulusschaden durch den gemeinsamen Genknockout von *Mdm2* und *p53* zu verhindern ist.

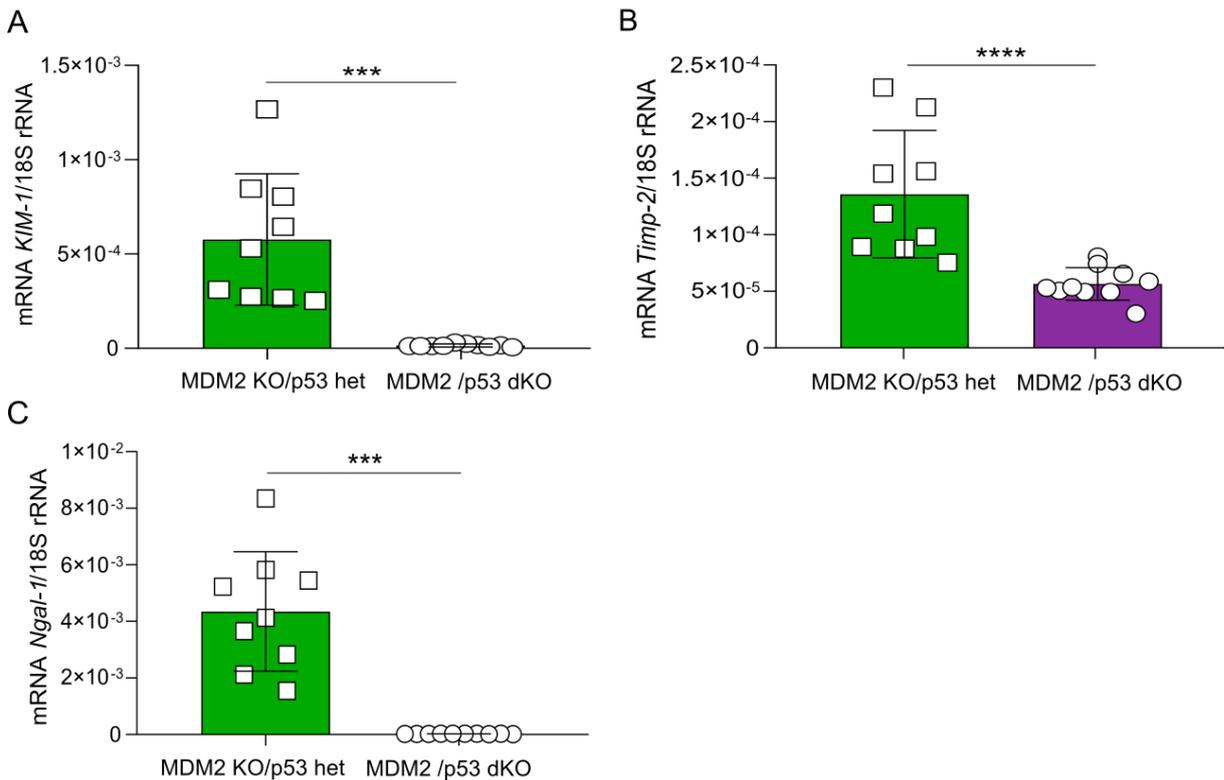


Abbildung 19: *Mdm2/p53* dKO Mäuse weisen weniger Tubulusschaden auf. (A-C) *Mdm2/p53* dKO und *Mdm2* KO/*p53* het Mäuse wurden mit Doxycyclin (1 mg/ml) für 14-17 Tage behandelt. mRNA Expressionswerte der Marker *KIM-1* (A), *NGAL-1* (B) und *TIMP-2* (C) in 6-8 Wochen alten *Mdm2/p53* dKO zeigen eine signifikante Reduktion verglichen mit der *Mdm2* KO/*p53* het Kontrollgruppe (n = 10 Tiere pro Gruppe). Daten zeigen Mittelwert ± SEM nach Student t-Test. *** = p < 0, 001.

Immunhistologische Analysen von PAS-gefärbten Nierenschnitten von *Mdm2/p53* dKO Mäusen und *Mdm2* KO/*p53* het Kontrolltieren verdeutlichten, dass wie bei den *Mdm2* KO Mäusen auch die PAS Färbung der heterozygoten Kontrollgruppe eine veränderte Histologie mit Schäden im Tubulussystem aufwies (Abbildung 20A). Die quantitative Auswertung zeigte vermehrt dilatierte Nierenkanälchen, vermehrte Zelltrümmer („cast debris“) in den Lumina der Tubuli und Tubulussdilataion in den *Mdm2* KO/*p53* het Tieren im Vergleich zu den

Nieren der *Mdm2/p53* dKO Tiere, die morphologisch weitestgehend unauffällig waren (Abbildung 20B).

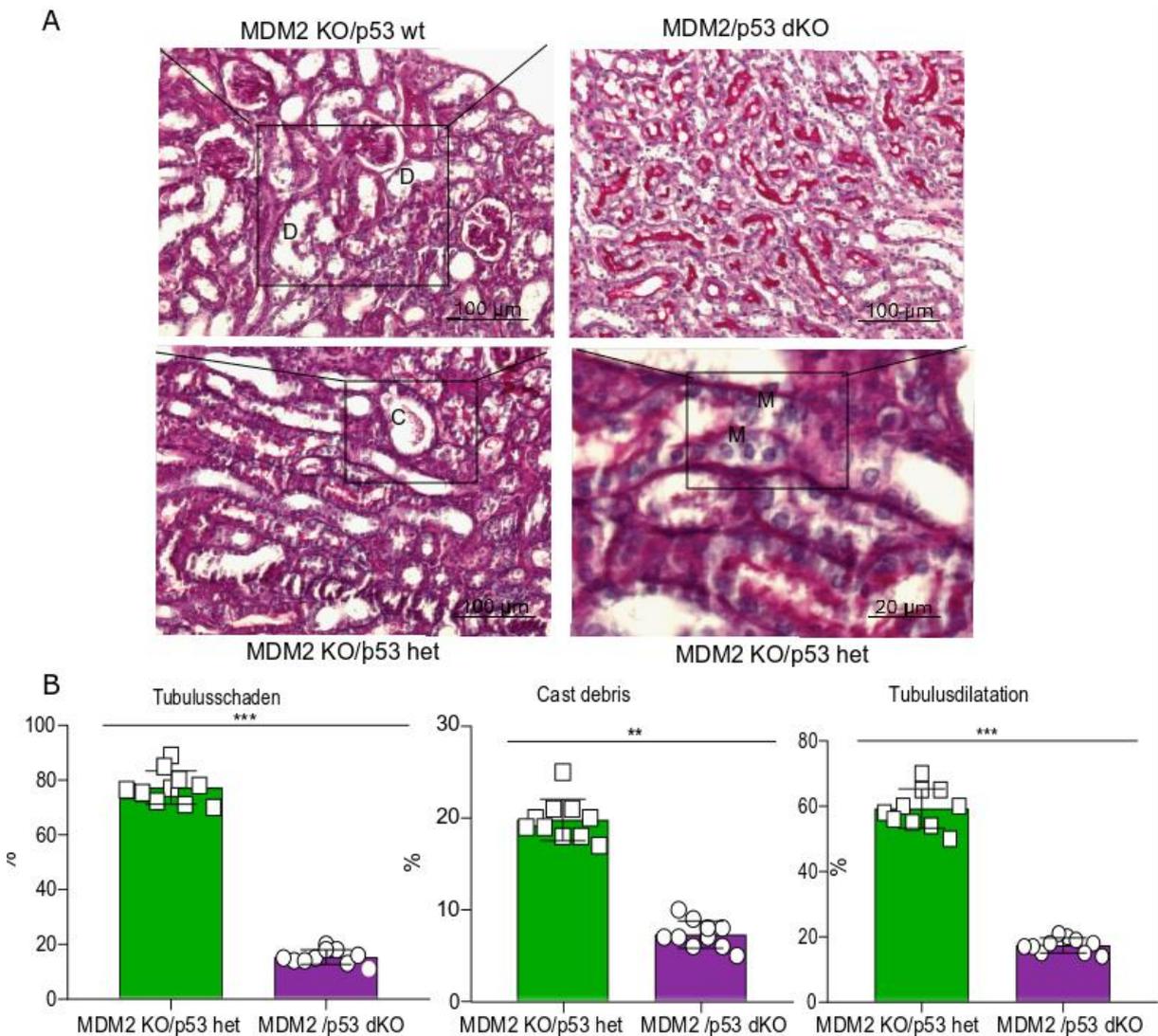


Abbildung 20: *Mdm2/p53* dKO aber nicht *Mdm2 KO/p53* het Mäuse weisen einen verminderten Tubulusschaden auf. Sieben Wochen alte *Mdm2/p53* dKO Mäuse und *Mdm2 KO/p53* wt und *Mdm2 KO/p53* het Kontrolltiere wurden mit Doxycyclin (1 mg/ml) behandelt und nach 14-17 Tagen die Nieren für immunhistologische Färbung entnommen. (A) PAS Färbung von Nierenschnitten von allen drei Gruppen. Balken entsprechen 100 μm. (B) Quantifizierung der PAS Färbung. Score: Wt > 85% der Tubuli weisen Schäden auf (n = 10 Tiere pro Gruppe). Daten zeigen Mittelwert ± SEM nach Student t-Test. *** = p < 0,001

Eine Vielzahl akuter sowie chronischer Nierenerkrankungen lässt sich auf eine Dysfunktion des Tubulussystems zurückführen, die sich vor allem zu Beginn im proximalen Tubulus manifestieren [121]. Auch der Doppelknockout von *Mdm2* und *p53* induziert einen tubulären Schaden, vor allem in den proximalen Tubuli. Um dies zu bestätigen, wurde eine Lectinfärbung von Nierenschnitten von *Mdm2 KO/p53* het Mäusen durchgeführt. Lotus

tetragonolobus (asparagus pea) Lectin färbt spezifisch proximale Tubuli an [122]. Zum Vergleich wurden verschiedene Genotypen herangezogen: *Mdm2 wt/p53 wt*, *Mdm2 KO* sowie *Mdm2/p53 dKO*. Der Nachweis einer positiven Lectinfärbung war in den proximalen TECs der *Mdm2 wt/p53 wt* und *Mdm2/p53 dKO* Tieren zu beobachten, während in den Nierenschnitten von *Mdm2 KO/p53 wt* und *Mdm2 KO/p53 het* Mäusen eine verminderte Lectinpositivität in den proximalen Tubuluszellen sichtbar war (Abbildung 21). Dies bedeutet, dass eine erhöhte Aktivität von p53 das Zellsterben vor allem in den proximalen Tubuli fördert und dies folglich auch in dem hier vorliegendem Pathomechanismus eine wichtige Rolle spielt.

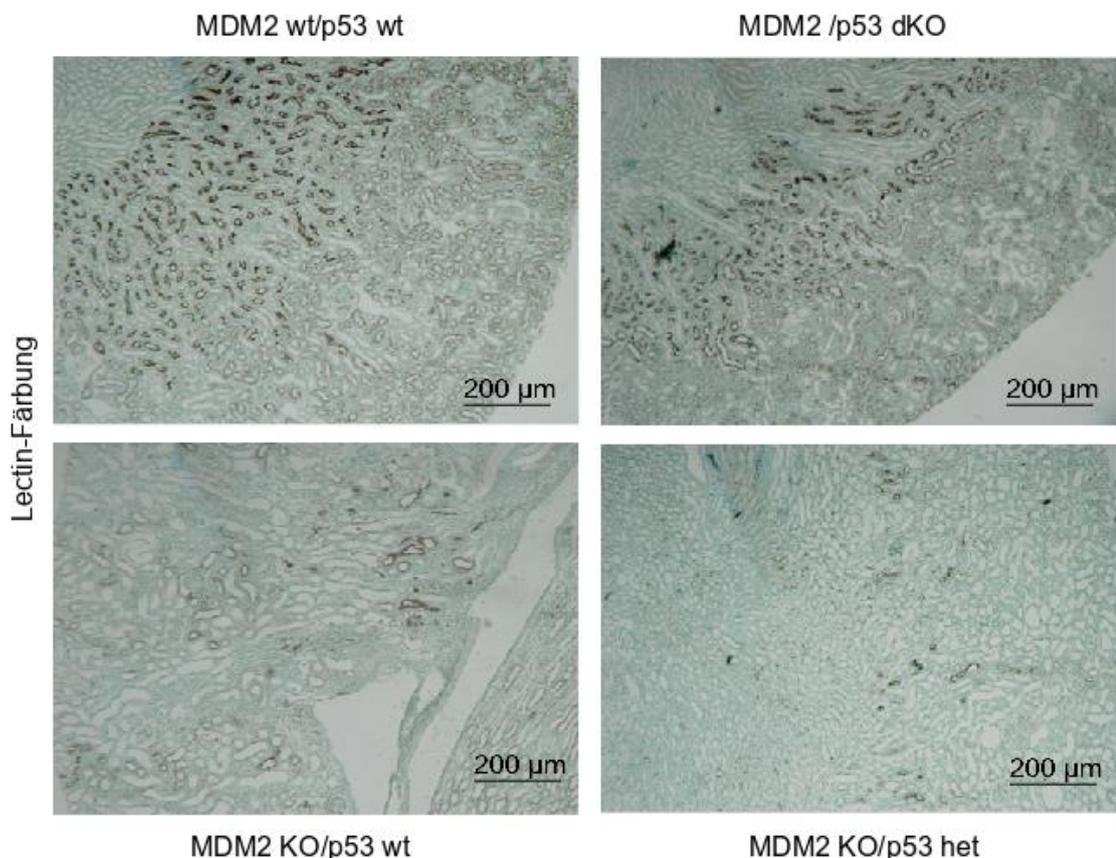


Abbildung 21: Tubulusepithelzelltod bei *Mdm2 KO/p53 het* Mäusen findet vor allem in proximalen Tubuli statt. Während die proximalen Tubuli im S3 Segment in den *Mdm2 wt/p53 wt* und *Mdm2/p53 dKO* Mäusen eine positive Färbung für Lectin zeigten (obere Reihe), war in den Nieren 8 Wochen alter *Mdm2 KO/p53 wt* und in *Mdm2 KO/p53 het* Tiere ein vermindertes Lectinsignal zu beobachten (untere Reihe). Die Größenindikatoren zeigen 200 µm.

Die Bestimmung der Nierenfunktion der *Mdm2 KO/p53 het* Versuchstiere zeigte nach Ende der 1 mg/ml Doxycyclin-Behandlung an Tag 14-17, abhängig von der Entwicklung des Allgemeinzustands, signifikant erhöhte Konzentrationen von Serumkreatinin und BUN an Tag 14-17 im Vergleich zu Tag 0 (Abbildung 22). Hingegen wiesen *Mdm2/p53 dKO* Mäuse keine relevante Erhöhung der Retentionsparameter auf. Die Daten verdeutlichen, dass der

Knockdown von p53 in MDM2-defizienten Tieren die Nierenfunktion vor einem p53-induzierten Nierenschaden bewahren kann.

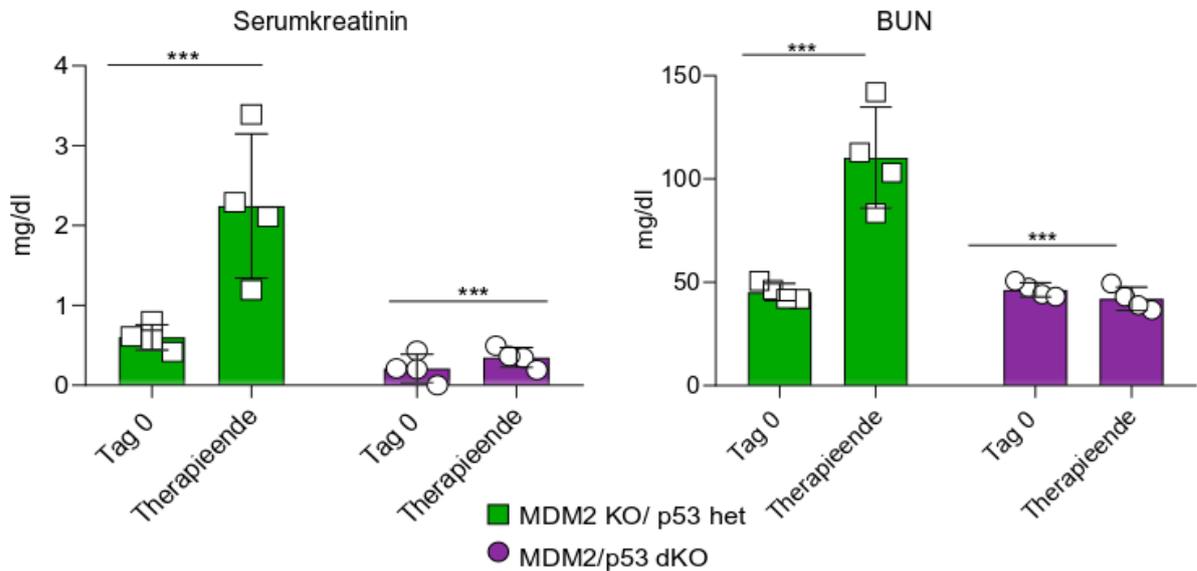


Abbildung 22: *Mdm2/p53* dKO Mäuse sind vor einem Rückgang der Nierenfunktion geschützt. Während bei Kontrolltieren mit Genotyp *Mdm2* KO/*p53* het eine signifikante Elevation der Serumkreatinin und Harnstoff (BUN) Level nach 14-17 Tagen 1 mg/dl Doxycyclin der Tiere zu sehen war, zeigten *Mdm2/p53* dKO Mäuse keine relevante Veränderung der Parameter während dieses Zeitintervalls (n = 4 Mäuse pro Gruppe). Daten zeigen Mittelwert ± SEM nach Zwei-Wege-ANOVA. *** = p < 0, 001.

Als Nächstes habe ich die Überlebenszeiten der *Mdm2* KO/*p53* het Mäuse mit denen der *Mdm2/p53* dKO Mäuse nach Doxycyclin-Behandlung verglichen. Anhand der Kaplan-Meier-Kurve kann man sehen, dass die Doppelknockout Mäuse lebensfähig sind, wohingegen die Überlebensrate der *Mdm2* KO/*p53* het Mäuse ab Tag 8 abnahm (Abbildung 23). Bereits nach zwei Wochen war der Mäusebestand um 70% zurückgegangen. Letztlich überlebte keines der Tiere länger als 17 Tage. Dies bedeutet, dass bei einem kompletten p53 Knockout die Mäuse lebensfähig sind.

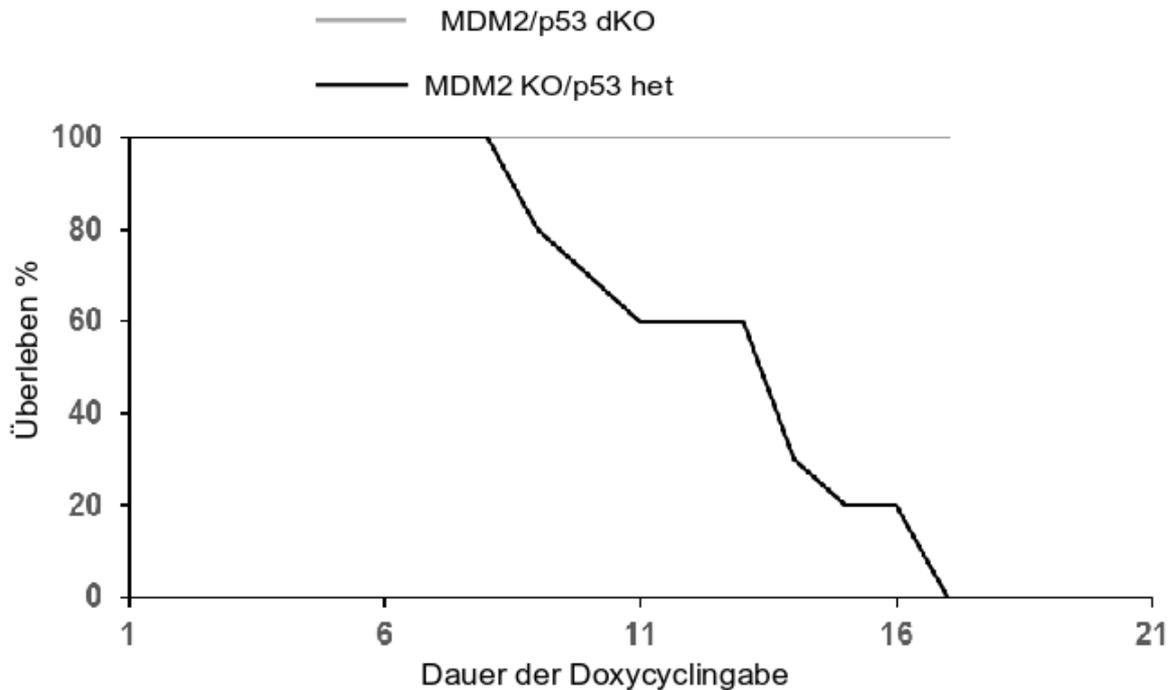


Abbildung 23: *Mdm2/p53* dKO aber nicht *Mdm2* KO/*p53* het Tiere haben eine höhere Lebenserwartung. Heterozygote *Mdm2* KO/*p53* het Mäuse und *Mdm2/p53* dKO wurden mit Doxycyclin (1 mg/ml) behandelt und die Überlebensrate (%) ermittelt (n = 10 Tiere pro Gruppe). Kaplan-Mayer-Kurve.

4.7 Nekroptose, eine Form der regulierten Nekrose, schützt vor *Mdm2* KO-induziertem Tubulusepithelzelltod

Nun stellte sich die Frage, welche spezielle Zelltodform für das Sterben der TECs bei MDM2-Defizienz verantwortlich ist. Um dies zu untersuchen, habe ich pTECs von *Mdm2*^{flox/flox} Mäusen (*Mdm2* fl/fl) isoliert und *in vitro* die Zellen mit Doxycyclin um MDM2 auszuschalten (*Mdm2* KO) und Zelltodinhibitoren kultiviert. Als Zelltodinhibitoren fungierten der Pancaspase Inhibitor Z-VAD-FMK zur Hemmung der Apoptose, Dabrafenib als potenter RIPK3 Inhibitor und Necrostatin-1 als RIPK1 Inhibitor der Nekroptose, Ferrostatin-1 zur Inhibierung der Ferroptose und Cyclosporin-A als Inhibitor der MPT-vermittelten regulierten Nekrose. Die Daten in Abbildung 24 zeigen, dass die Zellproliferation in TEC-spezifischen *Mdm2* KO Zellen eine signifikante Besserung nach Injektion von Cyclosporin-A, Dabrafenib und Necrostatin-1 hatte, wohingegen bei ZVAD, dem Apoptose-Inhibitor, keine relevante Änderung im Vergleich zur Lebensfähigkeit der Kontrollzellen gesehen werden konnte. Die *in vitro* Daten verdeutlichten, dass bei p53-induziertem Tubulusepithelzelltod bei MDM2 Verlust Mitochondrien eine Rolle spielen und möglicherweise Proteine, wie RIPK1 und

RIPK3, der Nekroptose ebenfalls involviert sind. Erstaunlicherweise konnte man jedoch keine Besserung der TEC-Proliferation durch Caspaseninhibition, d.h. Verhinderung apoptotischer Vorgänge, erreichen.

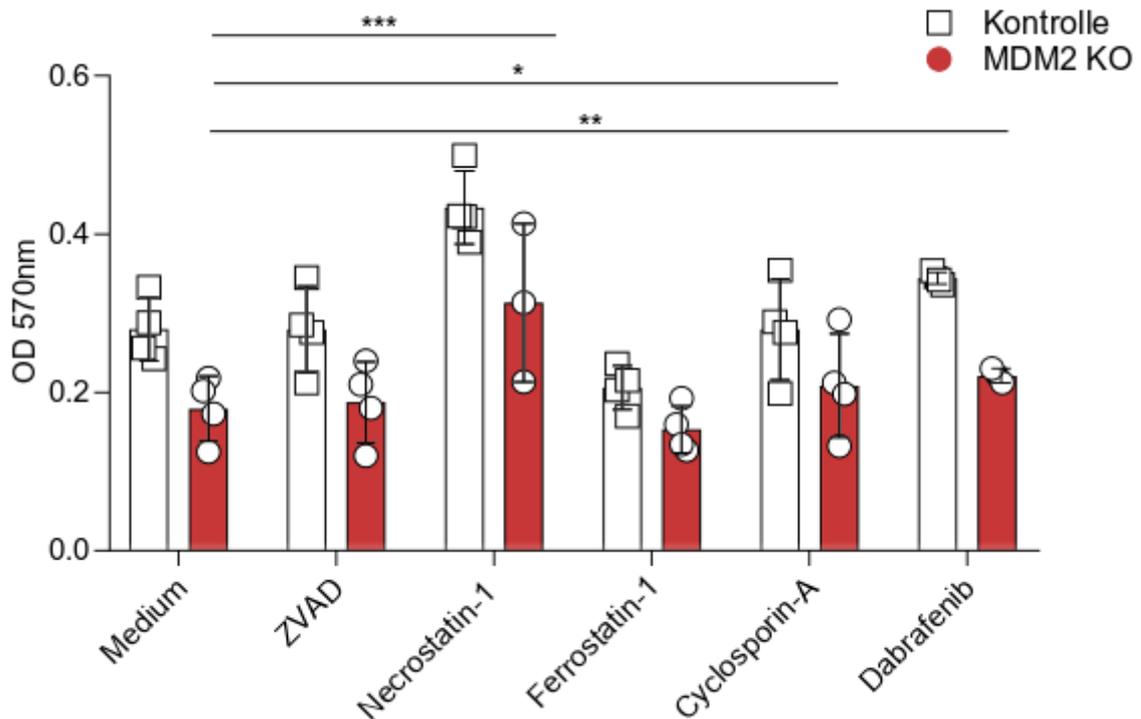


Abbildung 24: Zelltodinhhibitoren und deren Einfluss auf primäre TECs von *Mdm2* fl/fl Mäusen. In 96-Well-Platte wurden 5000 Zellen pro Well kultiviert (n = 4 pro Gruppe) und mit und ohne 1 mg/ml Doxycylin sowie verschiedenen Zelltodinhhibitoren behandelt. Es zeigten sich signifikante Besserungen der Zellviabilität unter Necrostatin-1, Dabrafenib und Cyclosporin A. Daten zeigen Mittelwert \pm SEM. *** = $p < 0,001$ mit Zwei-Wege-ANOVA.

Im Anschluß an die Zelltodinhibierung von TECs von *Mdm2* KO Mäusen *in vitro* sollte nun der Effekt der Zelltodinhibierung auch *in vivo* getestet werden. Als Erstes wurde eine mögliche Beteiligung des apoptotischen Zelltods bei *Mdm2* KO Mäusen untersucht. Dafür wurden *Mdm2* fl/fl Mäuse mit Doxycylin behandelt und gleichzeitig entweder der ,in 20% DMSO gelöste, Pancaspaseinhibitor ZVAD (Dosis: 2mg/kg KG) oder 20% DMSO als Kontrolle intraperitoneal injiziert. Für die Bestimmung der Nierenfunktion wurde an Tag 0, 4, und 8 Blut entnommen und Serum BUN als auch Kreatinin bestimmt. Die Daten zeigten, dass die Serumharnstoff und -kreatininwerte in den DMSO-behandelten *Mdm2* KO Mäusen an Tag 8 anstiegen im Vergleich zu Tag 0 (Abbildung 25A). Allerdings hatte die Behandlung mit ZVAD keinen protektiven Effekt auf die Nierenfunktionsparameter (Abbildung 25A). Die

immunhistochemische PAS Färbung zeigte, dass die ZVAD-behandelten Tiere ein sehr ähnliches Schädigungsmuster aufzeigten wie die DMSO-behandelte Kontrollgruppe, wie z.B. Tubulusschaden, Cast debris, und Tubulusdilatation (Abbildung 25B). Es fanden sich innerhalb beider Gruppen eine Vielzahl an Tubuli mit Verlust des Bürstensaums, einer gestörten Tubuluszellstruktur mit teils „geschwollenen“ Tubulusepithelzellen („Ballooning des Zytoplasmas“) und teils anuklearen Regionen und weitere Auffälligkeiten wie intraluminale Zelltrümmer. Da die mikroskopischen Attribute der Apoptose allerdings per Definition eine Kernpyknose also Kernschrumpfung anstatt einer Zellkernschwellung zeigen, konnten wir auch histologisch das Mitwirken von Caspasen-abhängigem Zelltod ausschließen. Diese Form des Apoptose- und somit Caspase-unabhängigen Tubuluszelltods haben wir als „Podoptose“ (p53-overactivation-related-cell-death) bezeichnet.

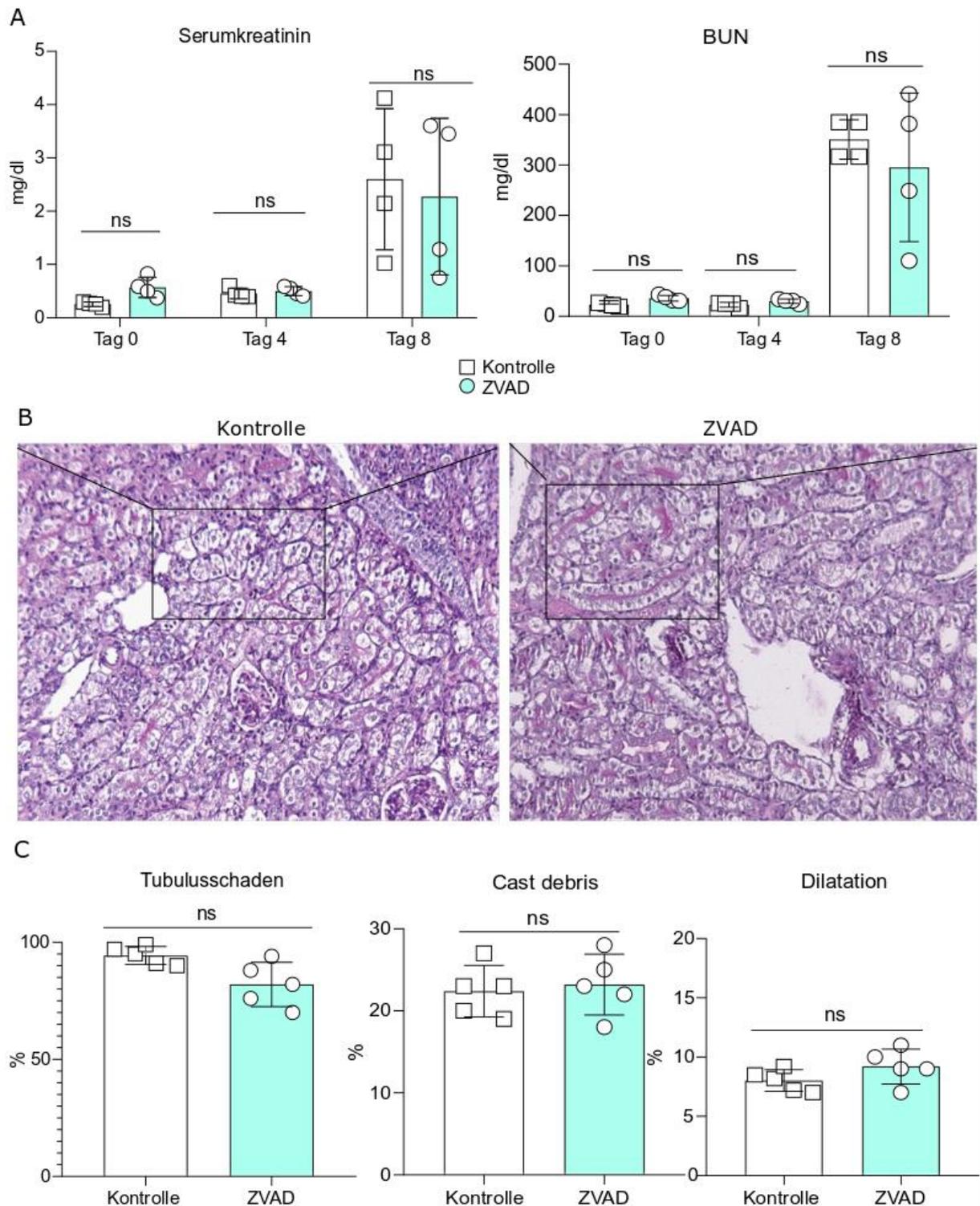


Abbildung 25: Apoptose Inhibierung verhindert nicht den MDM2-Defizit-vermittelten Tubulusschaden. *Mdm2* fl/fl Mäuse wurden mit oder ohne Doxycyclin (1 mg/ml) behandelt und gleichzeitig mit ZVAD oder DMSO als Kontrolle injiziert. An Tag 0, 4 und 8 wurde Blut für Serumgewinnung entnommen. (A) Serumkreatinin und -harnstoffwerte (n = 4 Tiere pro Gruppe). (B) PAS-Färbung von Nierenschnitten von ZVAD und DMSO-behandelten *Mdm2* KO Mäusen an Tag 8 (n = 5). (C) Die Quantifizierung zeigte auffällige Änderungen des Durchmessers der Tubuli, intratubulärer Zelltrümmer („Cast debris“) und aufgequollener Zellkerne sowie Tubulusdilatation. Gemessen in Scores. Vergrößerung von 100 µm. Daten zeigen Mittelwert ± SEM nach Student t-Test. ns = nicht signifikant.

4.8 RIPK1 ist nicht für den *Mdm2* Knockout-induzierten Tubulusepithelzelltod verantwortlich

Es ist bekannt, dass bei ANV eine Koexistenz mehrere Zelltodformen vorherrschend ist, vor allem die Nekroptose ist hier von großem Interesse [42]. Da meine *in vitro* Experimente eine signifikant gesteigerte Zellviabilität nach Necrostatin-1 Behandlung gezeigt hatten, wollte ich nun die Wirkung von Necrostatin-1 in *Mdm2* KO Mäusen *in vivo* untersuchen. Die Funktion von Necrostatin-1 besteht darin RIPK1 zu inhibieren, eine Schlüsselkinase bei der Aktivierung der Nekroptose [123]. Der Versuchsablauf entsprach dem des zuvor durchgeführten ZVAD *in vivo* Experiments (Abbildung 25). Die Nierenfunktionsparameter Serumkreatinin, BUN sowie die GFR wurden ermittelt und immunhistologische PAS Färbungen von Nierenschnitten für die Quantifizierung des Tubulusschadens an Tag 8 durchgeführt. Auch die Behandlung mit Necrostatin-1 (Dosis: 1,65 mg/kg KG) zeigte keinen Unterschied hinsichtlich Serumkreatinin und BUN (Abbildung 26A) im Vergleich zu DMSO-behandelten *Mdm2* KO Mäusen. Der anschließende mikroskopische Vergleich der Versuchstiere ergab, dass sowohl in den Necrostatin-1-behandelten Mäusen als auch in den Kontrolltieren 90% der Tubuli Auffälligkeiten zeigten (Abbildung 26B-C). Dazu zählten vor allem ein erweitertes Tubulussytem, das bei 15% beider Gruppen vorhanden war sowie Zellschäden unter anderem in Form intratubulären Zellschrotts. Prominent sind ebenfalls die geschwollenen Nuclei der Tubuluszellen als unspezifische Reaktion des Zellkerns auf die Noxe gewesen und die Präsenz basolateraler Einschlusskörperchen. Zusammenfassend zeigten die Daten, dass Necrostatin-1 keine protektive Auswirkung auf die Funktion der Nieren von *Mdm2* KO Mäusen hatte.

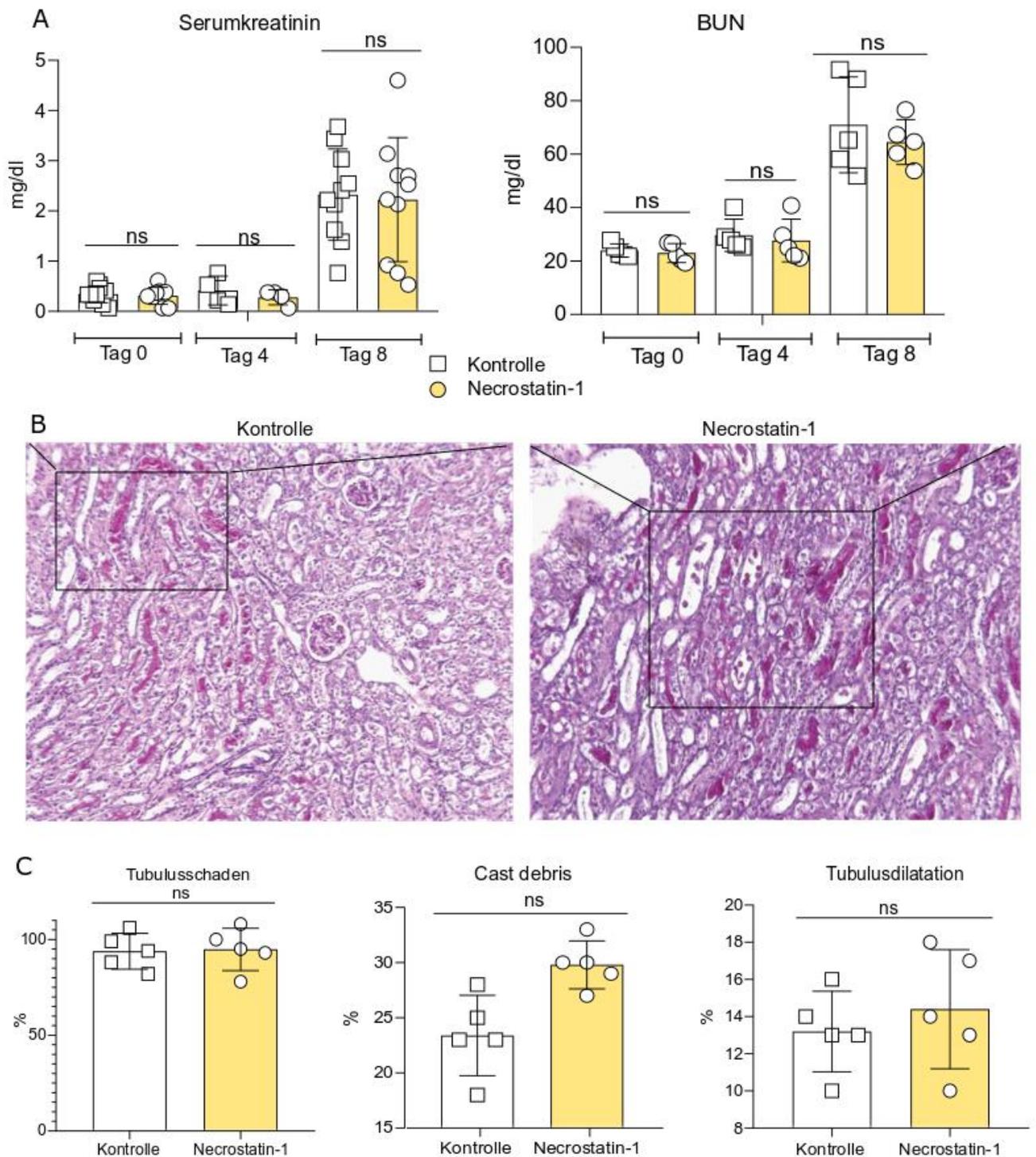


Abbildung 26: Nekroptose Inhibition mit Necrostatin-1 verhindert nicht den Mdm2-Defizit-vermittelten Tubulusschaden. (A) Serumkreatinin und -harnstoff (BUN) von *Mdm2* KO Tieren (n = 5 Mäuse pro Gruppe), die entweder mit Necrostatin-1 (Dosis: 1,65 mg/kg KG) oder DMSO als Kontrolle behandelt wurden an Tag 0, 4, und 8 (Zwei-Wege-ANOVA). (B) PAS Färbung von Nierenschnitten von Necrostatin-1 und DMSO-behandelten *Mdm2* KO Mäusen an Tag 8 (n = 5 Mäuse pro Gruppe). (C) Quantifizierung zeigte auffällige Änderungen des Durchmessers der Tubuli, intratubulärer Zelltrümmer („Cast debris“) und aufgequollener Zellkerne sowie Tubulusedilatation in beiden Gruppen. Gemessen in Scores. Vergrößerung von 100 μ m. Daten zeigen Mittelwert \pm SEM nach Student t-Test. ns = nicht signifikant.

4.9 RIPK3 spielt bei der Podoptose von Tubulusepithelzellen eine Rolle

Das Nekrosom, welches Nekroptose induziert, setzt sich aus den beiden Molekülen RIP1 und RIP3 zusammen [123], [65]. *In vivo* Studien haben gezeigt, dass *Ripk3* KO Mäuse vor dem ischämisch-bedingten ANV geschützt sind [124], was für eine wichtige Rolle von RIPK3 bei ANV spricht. Meine *in vitro* Experimente verdeutlichten, dass die Blockade von RIPK3 mittels Dabrafenib die Lebensfähigkeit der TECs signifikant erhöht (Abbildung 24). Aus diesen Gründen sollte nun der Effekt von Dabrafenib in Tubulusspezifischen *Mdm2* KO Mäusen *in vivo* untersucht werden. Dafür wurden *Mdm2* fl/fl Mäuse nach Doxycylin-Gabe (*Mdm2* KO) entweder mit Dabrafenib (Dosis: 50 mg/kg KG) oder 20%-DMSO als Kontrolle intraperitoneal gespritzt und die Nierenfunktionsparameter an Tag 0 und 8 ermittelt. Um nicht nur die Nierenfunktion, sondern auch das morphologische Korrelat als Bewertungshilfe heranzuziehen, haben wir Nierengewebe an Tag 8 entnommen und mit PAS angefärbt. Die Daten zeigten, dass Serumkreatinin und –harnstoff in den DMSO-injizierten *Mdm2* KO Mäusen an Tag 8 signifikant im Vergleich zu Tag 0 anstieg (Abbildung 27A). Obwohl die Behandlung mit Dabrafenib zur Reduktion des Serumharnstoffwerts führte, war kein signifikanter Unterschied von Serumkreatinin zwischen beiden Gruppen erkennbar (Abbildung 27A). Dies spiegelte sich auch in der Quantifizierung der PAS Färbung von Nierenschnitten wieder. Auch hier gab es keinen Unterschied hinsichtlich Tubulusnekrose, Casts und Tubulusdilatation zwischen Dabrafenib und DMSO-behandelten *Mdm2* KO Mäusen (Abbildung 27B-C). D.h. ,obwohl der Serumharnstoffspiegel signifikant nach Dabrafenib-Behandlung abnahm, war pathologisch kein Unterschied im Nierengewebe zwischen beiden Gruppen zu sehen.

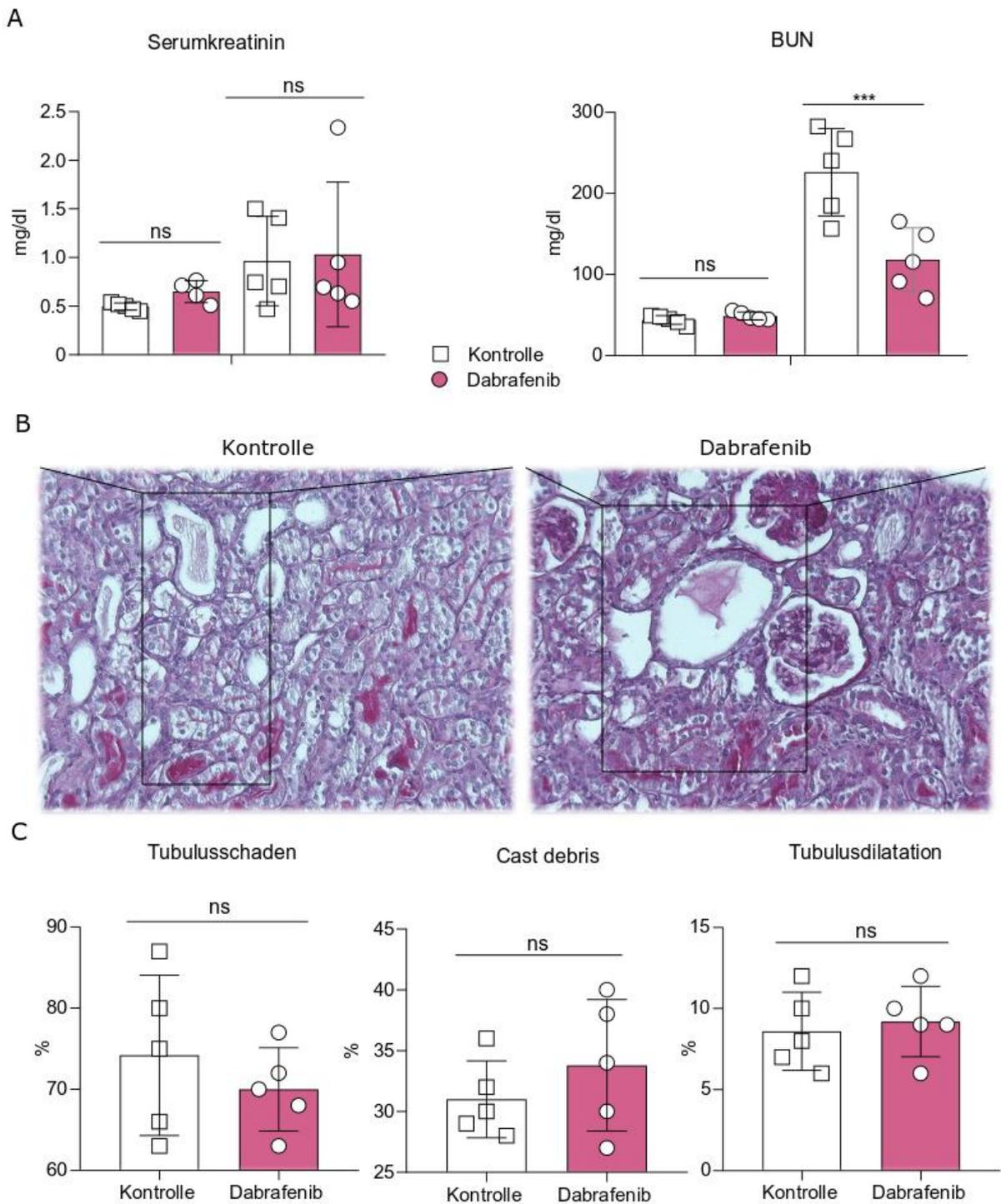


Abbildung 27: Dabrafenib Therapie verbessert die Nierenfunktion der *Mdm2* KO Mäuse ohne Einfluss auf den Tubulusschaden. *Mdm2* fl/fl Tiere wurden mit Doxycyclin (1 mg/ml) und gleichzeitig mit Dabrafenib oder DMSO als Kontrolle für 8 Tage behandelt. (A) Serumkonzentrationen von Serumkreatinin und -harnstoff (BUN) von Dabrafenib- und DMSO-behandelten *Mdm2* KO Mäusen an Tag 0 und 8 (n = 5 Mäuse pro Gruppe). Daten zeigen Mittelwert ± SEM nach Zwei-Wege-ANOVA. *** = p < 0,001; ns = nicht signifikant. (B,C) Nierenschnitte von Dabrafenib- und DMSO-behandelten *Mdm2* KO Mäusen wurden mit PAS gefärbt und hinsichtlich Tubulusschaden, Casts und Tubulusdilatation untersucht. Vergrößerung von 100. Daten zeigen Mittelwert ± SEM nach Student t-Test.

Aufgrund der widersprüchlichen *in vivo* Daten zur Rolle von RIPK3 (Abbildung 27), sollten die Auswirkungen der RIPK3 Blockade in weiterführenden *in vitro* und *in vivo* Experimenten genauer untersucht werden. Dies wurde u.a. mithilfe von RIPK3-defizienten Fibroblasten umgesetzt. Grund für das Heranziehen einer Fibroblasten Zelllinie mit Verlust der RIP3-Kinase ist, dass nach einem akuten Tubulusschaden Remodellingvorgänge eingeleitet werden, in welche Fibroblasten eine wesentliche Rolle spielen. Nach einer akuten Tubulusschädigung gibt es neben dem Tubuli-Anteil, welcher sich regeneriert, einen anderen Teil, welcher atrophisch wird. Dieser wiederum ist assoziiert mit einem beginnenden fibrotischen Umbau um die atrophischen Tubuli herum, herbeigeführt durch aktivierte Fibroblasten[125] [126].

Wir nutzten die Fibroblasten Zelllinie von *Pax8rtTA-Cre;Ripk3* KD Mäusen (RIPK3^{-/-}). Diese Zellen sowie Zellen der *Pax8rtTA-Cre;Mdm2^{flox/flox}* Kontrolltiere (*Ripk3* wt bzw. RIPK3^{+/+}) wurden isoliert und anschließend mit MDM2 siRNA oder Kontroll siRNA transfiziert bzw. parallel mit Dabrafenib behandelt. Zwei Tage nach Transfektion konnte mittels kolorimetrischem MTT-Test die Zellviabilität beurteilt werden. Die RIPK-3 Knockdown -Zelllinie zeigte einen signifikanten Zellvitalitätsrückgang von 20%, während die RIPK-3 enthaltenen Zellen eine Reduktion der Lebensfähigkeit um fast 50 % verzeichneten (Abbildung 28A). Allerdings konnte das Beifügen von Dabrafenib bei RIPK-3 positiven Fibroblasten ein hoch signifikantes Ansteigen des Zellüberlebens fördern und so vor Zellverlust schützen. In diesem Fall sieht man den protektiven Effekt der RIPK-3 Blockade im Zellsterbeprozess von **Tubulusfibroblasten**.

Um den Effekt von RIPK3 bei der Podoptose in TECs auch *in vivo* zu untersuchen, hatte ich *Pax8rtTA-Cre; Mdm2/Ripk3* dKO Mäuse und *Mdm2* fl/fl Kontrolltiere mit Doxycyclin für 7 Tage behandelt. Im Anschluss wurden die Serumparameter Kreatinin und Harnstoff gemessen sowie Nierengewebe für Histologie entnommen. In Abbildung 28B ist zu erkennen, dass die Serumkreatinin- und signifikant die Serum BUN-Werte in den *Mdm2* KO Kontrolltieren an Tag 7 im Vergleich zu Tag 0 anstiegen. Hingegen nahmen die Nierenfunktionsparameter signifikant in den *Pax8rtTA-Cre; Mdm2/Ripk3* dKO Mäusen im Vergleich zu den *Mdm2* KO Tieren ab. Diese funktionellen Daten waren im Einklang mit einem reduzierten Tubulusschaden in PAS-gefärbten Nierenschnitten, erkennbar durch verringerte Casts und verminderte Tubulusdilatation (Abbildung 28C-D). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine positive Korrelation zwischen RIPK3 und dem p53-Überexpressionsbedingten Zelltod („Podoptose“) in TECs besteht und folglich RIPK3 bei der Podoptose eine Rolle spielt.

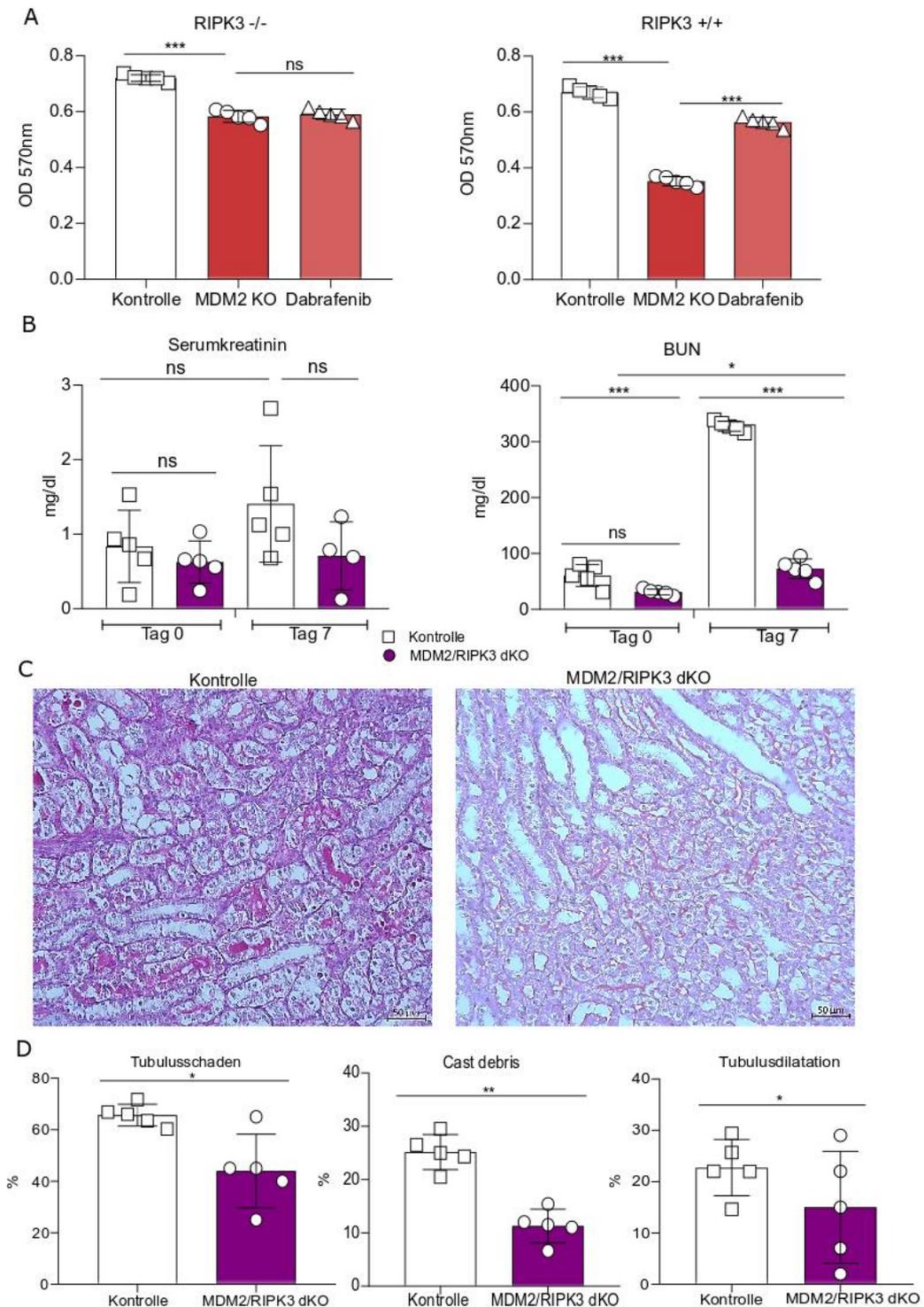


Abbildung 28: RIPK3 Inhibition hat einen protektiven Einfluss auf den p53-vermittelten Zelltod. (A) Pro Well wurden 4000 Fibroblasten mit und ohne RIPK3 Defizit mit 20 μ mol MDM2 siRNA und gleichzeitig Dabrafenib in Konzentration von 5 μ mol für zwei Tage therapiert und danach die Zellviabilität mit MTT-Assay (Wellenlänge 570nm) gemessen. (B) *Pax8rtTA-Cre; Mdm2/Ripk3* dKO Mäuse und *Mdm2 fl/fl* Kontrolltiere wurden mit Doxycyclin für 7 Tage behandelt (n = 5 Mäuse pro Gruppe) und die Serumparameter Kreatinin und Harnstoff (BUN) an Tag 0 und 7 gemessen. Daten zeigen Mittelwert \pm SEM nach Einweg-ANOVA. * = p < 0,05; *** = p < 0,001; ns = nicht signifikant. (C,D) Nierenschnitte von *Pax8rtTA-Cre; Mdm2/Ripk3* dKO Mäusen und *Mdm2* KO Kontrolltieren an Tag 7 wurden mit PAS gefärbt und der Tubulusschaden quantifiziert. Vergrößerung 400x.

4.10 MDM2-induzierter Zelltod von Tubulusepithelzellen ist unabhängig vom mitochondrialen Permeabilität-Transitions-Pore- Zelltod

Basierend auf der Tatsache, dass Mitochondrien wesentlich in Zellstress- und Zelltodmechanismen involviert sind und wir ebenso Auffälligkeiten im Rahmen der elektronenmikroskopischen Untersuchung gefunden haben, wurde Cyclosporin-A als Zelltodinhibitor *in vivo* getestet. Cyclosporine sind Moleküle mit der Fähigkeit die MPTP-Öffnung durch Bindung an Cyclophilin-D zu blockieren [74]. Des Weiteren konnte Wen und Kollegen einen protektiven Effekt in Mäusen mit Folsäure-induziertem ANV bereits nach einer Dosis Cyclosporin-A zeigen [75].

Um dies zu untersuchen, habe ich *Mdm2* fl/fl Mäuse mit Doxycyclin (*Mdm2* KO) behandelt und gleichzeitig Cyclosporin oder DMSO als Kontrolle injiziert. An Tag 0 und 8 wurde Blut für die Bestimmung der Nierenfunktionsparameter im Serum sowie Nieren nach Abschluss des Experiments für die histologische Bewertung entnommen. Die Daten zeigten, dass die Serumkreatinin und –harnstoffwerte signifikant in den DMSO-behandelten *Mdm2* KO Tieren anstiegen (Abbildung 29A). Allerdings hatte die Behandlung mit Cyclosporin-A keinen Effekt auf die Nierenfunktion im Vergleich zu DMSO-behandelten Tieren. Hier ist zu erwähnen, dass der Versuch nach 8 Tagen abgebrochen werden musste, da sich der Zustand der Tiere in beiden Gruppen drastisch verschlechterte (Gewichtabnahme und reduzierte Vitalität, Daten nicht gezeigt). Auch die PAS Färbung von Nierenschnitten zeigte keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich Tubulusschäden (Abbildung 29B-C), d.h. dass die Behandlung mit Cyclosporin-A keinen Einfluss auf den MDM2-vermittelten Podoptose von TECs hat.

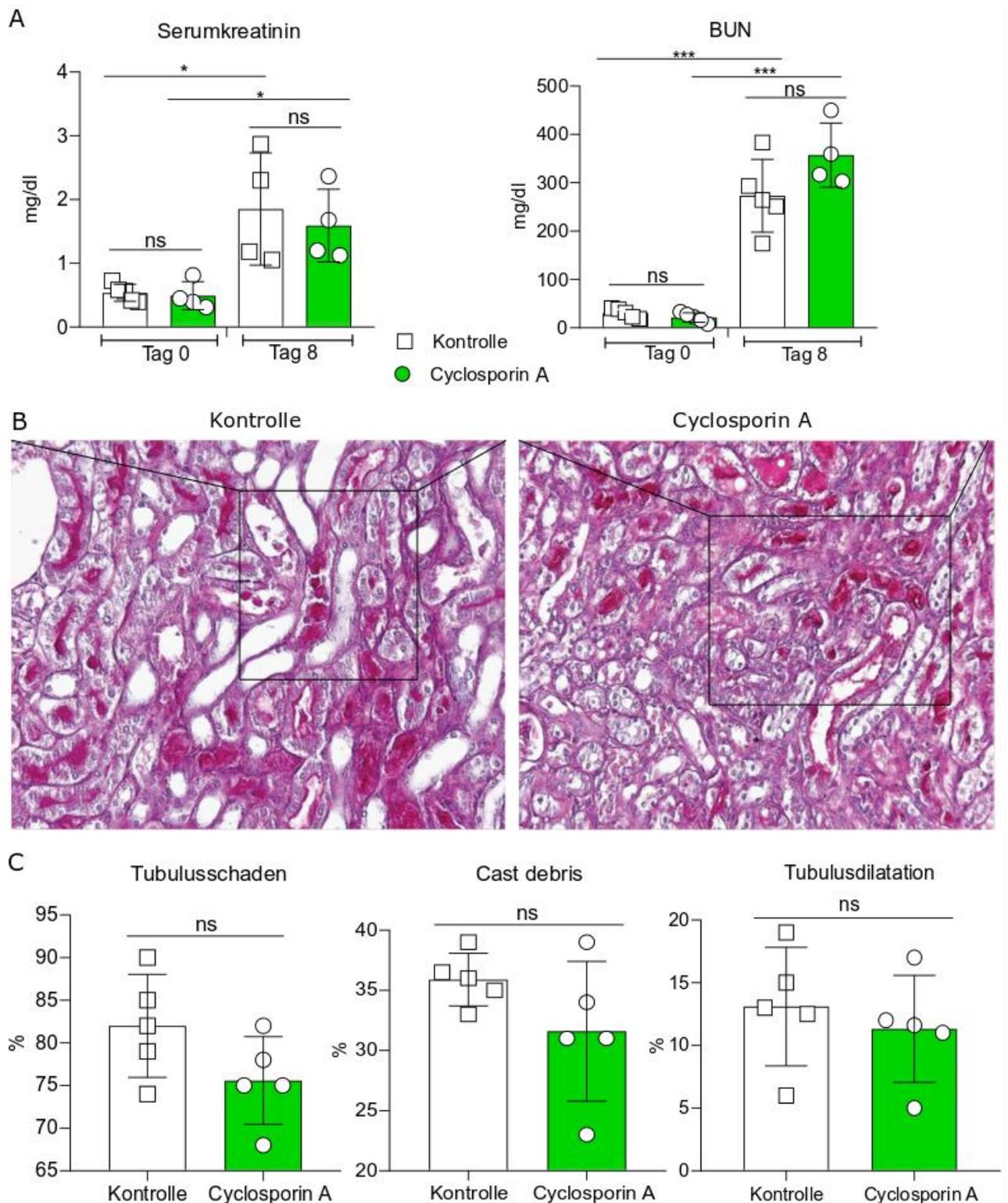


Abbildung 29: Cyclosporin-A zeigt keinen renoprotektiven Effekt in *Mdm2* Knockout Mäusen. *Mdm2* fl/fl Mäuse wurden mit Doxycyclin (1 mg/ml) für 8 Tage behandelt und gleichzeitig Cyclosporin-A (10 mg/kg pro Körpergewicht) oder DMSO als Kontrolle injiziert (n = 4-5 Mäuse pro Gruppe). (A) Serumkreatinin und Harnstoff (BUN) von Cyclosporin-A und DMSO-behandelten *Mdm2* KO Mäusen an Tag 0 und 8. * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$; ns = nicht signifikant nach Zwei-Wege-ANOVA. (B,C) Nierenschnitte von Cyclosporin-A- und DMSO-behandelten *Mdm2* KO Mäusen von Tag 8 wurden mit PAS gefärbt und hinsichtlich Tubulusschaden, Casts und Tubulusdilatation untersucht. Vergrößerung von 200. Daten zeigen Mittelwert \pm SEM nach Student t-Test

5. Diskussion

5.1 Überblick

Bisherige *in vitro* und *in vivo* Studien konnten eine Rolle von MDM2 und p53 in Podozyten und TECs im Rahmen des ANV zeigen [102, 116]. Meine Doktorarbeit liefert nun weitere Einblicke hinsichtlich der Funktion von MDM2 und p53 in TECs. Das Ziel meiner Arbeit war es zu untersuchen, ob MDM2 in quieszenten TECs konstitutiv exprimiert wird und somit vor Podoapoptose (p53-overactivation related cell death) zur Sicherstellung der Homöostase schützt. Des Weiteren wurde die Auswirkung eines Doppelknockouts von *Mdm2/p53* in TECs hinsichtlich der Zelltodform „Podoapoptose“ besser charakterisiert.

Meine *in vitro* und *in vivo* Daten zeigen, dass es ohne MDM2 zum akuten Tubuluszellschaden mit Übergang ins ANV durch ein erhöhtes p53-Level kommt. Mittels Tubulus-spezifischer Doppeldeletion von *Mdm2* und *p53* bei Mäusen lässt sich die erniedrigte Überlebensrate der TECs rückgängig machen und ein ANV vermeiden. Diese Mäuse weisen eine normale Lebenserwartung auf, welche mit verminderter Tubulusschädigung und verbesserter Nierenfunktion assoziiert ist. Zudem konnte ich mittels *in vitro* und *in vivo* Experimenten zum Zelltod Apoptose (caspase-abhängig) und andere bekannten Zelltodformen als Hauptmechanismen bei ANV ausschließen.

5.2 Die Interaktion von MDM2 und p53 in Tubulusepithelzellen während der Homöostase

Die Funktion von MDM2 als negativer Regulator von p53 ist während der Embryogenese essentiell. Während der gesamten Nephrogenese besteht eine komplexe Interaktion zwischen p53 und MDM2. Erniedrigte MDM2 Werte führen zu morphologisch und funktionell unterentwickelten Nieren bei Mäusen, was auf erhöhte p53 Werte mit ungebremster Apoptose zurückzuführen ist. Ein konkomitanter p53 Verlust konnte die Funktionsfähigkeit der Nieren wiederherstellen [127]. Zudem weisen *Mdm2* KO Mäuse schwere renale Hypodysplasien im embryonalen Ureterepithelium auf, was zum postnatalen Tod aufgrund der insuffizienten Ureterknospenausprossung führt. Des Weiteren war eine eingeschränkte Nephronformation zu beobachten, die aus einem Mangel der defizienten Kommunikation mit dem metanephrischen Mesenchym resultiert. Gleichzeitig kann man eine deutlich reduzierte Zellproliferationsrate als auch eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu Tieren ohne *Mdm2* Defizienz beobachten. Die Depletion beider Allele p53 und MDM2 des Ureterepitheliums sichert eine normale Ureterknospenausprossung mit postnatalem Überleben und ohne

Nephronverluste [128]. Ebenso zeigen Nephron-Progenitor-Zellen (NPC), eine intrarenale Zellpopulation mit Selbsterneuerungspotential, dass der Verlust von MDM2 zu einer p53-vermittelten erhöhten perinatalen Letalität sowie zu hypoplastischen Nieren führen kann [129]. Diese wissenschaftlichen Erkenntnisse unterstützen die Hypothese, dass MDM2-abhängige p53-Inhibition eine Voraussetzung für eine funktionierende renale Organogenese ist [130, 131]. In einer Publikation konnte die Arbeitsgruppe von Professor Anders zeigen, dass die Reduktion von MDM2 bzw. die konsekutive Erhöhung von p53 in Podozyten zu einem Podozytenverlust mit nachfolgender fokaler segmentaler Glomerulosklerose führt [116]. Obwohl bisherige Forschungsergebnisse eine Rolle von MDM2 und p53 in der Niere darlegten, wie während des Prozesses der embryonalen Entwicklung als auch postnatal in den Podozyten, waren die Effekte von MDM2 und p53 bei TECs weitestgehend unbekannt. Aus diesem Grund habe ich ein Mausmodell mit tubuluszellspezifischem *Mdm2* KO etabliert. Meine Daten zeigen, dass eine Doppeldeletion von *Mdm2* und *p53* (*Mdm2/p53* dKO Mäuse) in den TECs die Niere vor einem ANV schützt. Hingegen single *Mdm2* KO Tiere ein ANV entwickelten aufgrund der *Mdm2* Defizienz, aber Überexpression von p53. D.h. dass eine regulierte MDM2-p53 Interaktion auch für die Homöostase der TECs und somit für den Erhalt der Nierenfunktion ausschlaggebend ist. Dies stimmt mit früheren Erkenntnissen überein, dass MDM2 einen Negativregulator für das Protein p53 darstellt.

5.3 Der proximale Tubulus als Hauptschädigungsort bei Podoptose-vermitteltem akuten Nierenversagen

Unsere Arbeitsgruppe hat in einer vorherigen Publikation zeigen können, dass *Mdm2* KO Mäuse ein ANV entwickeln, ein Prozess, der mit dem Zelltod von Podozyten, auch bekannt als Podoptose, assoziiert ist [116]. Um die Rolle von MDM2 in TECs im Rahmen des durch Podoptose ausgelösten ANV zu untersuchen, haben wir am Nephrologischen Zentrum Tubulus-spezifische *Mdm2* KO Mäuse generiert. Meine Daten zeigen nun, dass TECs von *Mdm2* KO Mäusen mit einer homozygoten oder einer heterozygoten p53 Expression eine reduzierte Lectinfärbbarkeit aufwiesen, was für einen Tubulusschaden sprach (S 81, Abbildung 21). Da Lectin lebende proximale Tubuluszellen anfärbt, konnte so in unserem Experiment der proximale Tubulus als Hauptschädigungsort bei der Podoptose identifiziert werden. Des Weiteren konnte ein signifikanter Anstieg des ,für proximale Tubuluszellen spezifischen, Biomarkers KIM-1 gemessen werden (S.73, Abbildung 15). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Ergebnissen von Nakhoul *et al.* [121], die eine Bedeutung des proximalen Tubulus in der Pathogenese renaler Erkrankungen im Tiermodell nachgewiesen

haben. Der proximale Tubulus nimmt bei einer Vielzahl von Nierenleiden und -funktionsstörungen einen zentrale Stellenwert ein, u.a. bei immunologischen, ischämischen sowie toxischen Nierenschädigungen. Die beschädigten bzw. stimulierten proximalen TECs lösen verschiedene Signalkaskaden via Botenstoffe aus. Nachfolgend kommt es zu einer Freisetzung von „Danger Signalen“, wie Komplementfaktoren, Zytokinen, Chemokinen und Komponenten der EZM (Extrazellulärmatrix). Durch eine konsekutive verstärkte Leukozytenmigration (Diapedese) aufgrund der ausgeschütteten Moleküle können sich die Schäden der proximalen TECs weiter verschlimmern. Gerade die Freisetzung von Danger Signalen fördert eine Inflammation, sodass die Nierenfunktion irreversibel geschädigt werden kann. Dies wiederum kann im Verlauf zur chronischen Niereninsuffizienz führen. Ein möglicher Therapieansatz zur Behandlung der durch den Untergang der proximalen TECs verursachten Krankheiten, ist die gezielte Immunsuppression des sterilen Entzündungsprozesses [19]. Es gibt jedoch noch viele weitere Signalwege, welche den TEC Untergang einleiten, abhängig vom jeweiligen Zelltodtyp (siehe Einleitung).

Zudem ist das S3 Segment sowohl bei akuten als auch chronischen Nierenerkrankungen als erstes innerhalb des Tubulusapparates betroffen. Beispielsweise assoziiert die Schwere und Häufigkeit der Schädigung des proximalen Tubulus mit der Progression in eine chronische Nierenerkrankung im Rahmen der Pathophysiologie des Cisplatin-induziertem ANV [132]. Proximale Tubuli spielen auch bei der Pathogenese der diabetischen Nephropathie eine wichtige Rolle. In der frühen Phase des Diabetes mellitus kommt es zum Tubuluswachstum und zum Einbau eines Natrium-Glucose-Kotransporters in den proximalen Tubulus. Die Folge ist eine vorübergehende Hyperreabsorption, welche durch Reduktion des hydrostatischen Drucks im Bowman-Raum protektiv ist. Im weiteren Verlauf trägt der proximale Tubulusabschnitt jedoch zur Progression der CKD bei, da es zu einer Interaktion zwischen Proteinurie, Wachstumsfaktoren und dem Tubulussystem kommt. Dieses Zusammenspiel induziert eine Entzündungsreaktion. Durch das Ausschütten Fibrinogenese-wirksamer Moleküle ist der proximale Tubulus ebenfalls bei der Entwicklung der tubulointerstitiellen Fibrose beteiligt [133]. Auch wir gehen von einer beginnenden Fibrose in unserem AKI-Modell aus, da wir in histologischen Schnitten von geschädigten Tubulussegmenten ebenso eine veränderte Glomerulusstruktur erkennen konnten. Dies erklärt wiederum den erhöhten BUN sowie die fortschreitende entzündliche Komponente (u.a. Tubulusnekrose siehe S.76 Abbildung 17) , welche letztlich die Fibrosebildung anregt. In einer weiteren Studie konnte man im Rahmen der Progression der autosomal-dominaten polycystischen Nierenerkrankung Abnormalitäten in der Architektur des proximalen Tubulus

beobachten. D.h., dass die Sekretionsrate des proximalen Nephronabschnitts bei Schädigung mit der Abnahme der eGFR korreliert [134]. Ebenso sahen wir in unseren Experimenten innerhalb von acht Tagen eine akute und progrediente GFR Reduktion (S.74, Abbildung 16), was im Zusammenhang mit dem zunehmenden Tubuluszellschaden v.a. im proximalen Segment einzuordnen ist.

Folglich kann man auch an diesem Beispiel sehen, wie sehr der proximale Tubulus im Fokus wissenschaftlichen Interesses liegt.

5.4 Podoptose ist eine caspase-unabhängige Zelltodform, bei der RIPK3 eine entscheidende Rolle spielt

Jahrzehntelang ist man davon ausgegangen, dass die Apoptose als Caspase-abhängige Zelltodform hauptsächlich für das ANV verantwortlich ist [52]. Neben dem Ischämie-Reperfusion-induzierten ANV erfolgten weitere Untersuchungen zum Caspase-abhängigen Zelltod während des ANV. In einem Tiermodell zur akuten unilateralen ureteralen Obstruktion in Ratten haben die Autoren gezeigt, dass die Ischämie und der oxidative Stress während der partiellen Ureterobstruktion zur Apoptose der TECs führten. Der Vorgang der Apoptose begünstigte die Infiltration von Immunzellen ins Nierengewebe, interstitielle Zellproliferation und interstitielle Fibrose. Während nach unilateraler ureteraler Obstruktion eine milde Schädigung vorwiegend den apoptotischen Zelltod durch Zellverlust resultierend in einer tubulointerstiellen Atrophie ausgelöst hat, dominierte bei schweren Schäden Nekrose als Hauptzelltodform [135, 136]. Weitere Auslöser eines caspase-abhängigen Zelltodes sind das akute und chronische Posttransplantations-Nierenversagen in Folge eines Ischämie-Reperfusionsschadens [137]. Im Rahmen einer akuten Abstoßung führt eine Apoptose-Kaskade zur Tubulusatrophie [138]. Bei einer chronischen Nierenabstoßungsreaktion entwickelt sich eine persistierende geringfügige Schädigung mit einem irreversiblen Verlust der Nierenfunktion begleitet von klinischen Zeichen der Proteinurie sowie Hypertension [139]. Während einer CKD schreitet der Verlust der TECs graduell fort, was zur tubulären Atrophie und Nierenfibrose beiträgt, assoziiert mit der Progression der CKD [140]. Toxine können eine Caspase-abhängige Apoptose in proximalen TECs induzieren, was letztendlich zum ANV beiträgt. Zum Beispiel tragen geringe Mengen des Arsengifts zur Bax/Bak-abhängigen Apoptose bei [141] oder Metalle wie Cadmium, welche zur mitochondrialen Dysfunktion und Freisetzung von Radikale beitragen und somit Caspase-abhängige Apoptose induzieren [142, 143]. Auch Medikamente, wie Cisplatin und Gentamicin, können Apoptose

in TECs auslösen. Die Folge ist ein Zellverlust, der wahrscheinlich durch die Generierung von ROS initiiert wird [144].

Apoptose wurde lange Zeit als einzig regulierter Zelltodtyp deklariert. Jüngste Forschungsergebnisse zeigten, dass es neben dem apoptotischen Zelltod weitere regulierte Zelltodformen gibt. Darunter u.a. die bereits erwähnte Nekroptose, MPT-RN („Mitochondrial-permeability transition-mediated regulated necrosis“) sowie Ferroptose und Pyroptose (siehe Abbildung 1), welche auch in dem Paper „Regulated Cell Death in AKI“ von Linkermann et al benannt und näher vorgestellt werden [145]. Um nun eine eventuelle Mitbeteiligung der Apoptose in meinem Tiermodell zu beweisen bzw. ausschließen zu können, hatte ich Tubulus-spezifische *Mdm2* KO Mäuse mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD behandelt. Allerdings war die Therapie mit Z-VAD nicht renoprotektiv, d.h. Apoptose ist für die Podoptose von TECs in *Mdm2* KO Mäusen nicht verantwortlich. Meine Daten stehen demzufolge im Widerspruch zu bisherigen Publikationen bezüglich der Beteiligung der Caspase-abhängigen Apoptose bei ANV. Aus diesem Grund wollte ich anschließend wissen, ob andere regulierte Zelltodformen eine Rolle beim TEC-sterben spielen.

Da Nekroptose bis zu diesem Zeitpunkt ebenfalls als präzente Zelltodform in anderen ANV Modellen identifiziert wurde [42], wollte ich nun ebenfalls deren Rolle beim TEC-Untergang in Folge des MDM2 Verlustes näher untersuchen. Dies erfolgte mithilfe der bekannten Zelltodinhibitoren Dabrafenib, ein potenter RIPK3 Inhibitor und Necrostatin-1, ein RIPK1 Inhibitor. Hierbei konnte ich eine signifikante Besserung klinischer Nierenfunktionsparameter in den mit Dabrafenib-behandelten *Mdm2* KO Mäusen nachweisen. Bestätigt wurden diese Daten in *Pax8rtTA-Cre; Mdm2/Ripk3* 3dKO Mäusen, d.h., dass RIPK3 eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie des ANV durch MDM2 Depletion in TECs spielt. Eine Evidenz für einen RIPK3-abhängigen Zelltod im Rahmen des ANV besteht.

Auch Sepsis-induziertes ANV wird durch mitochondriale Dysfunktion via RIPK3 gefördert. In diesem Kontext konnte ein MLKL-unabhängiger RIPK3-abhängiger Nekroptose Signalweg identifiziert werden. Demnach war NADPH Oxidase-4 in TECs hochreguliert, aber die Mitochondrienkomplexe I und III inhibiert. Immunhistochemische Analysen zeigten eine stärkere KIM-1 Färbung auf der apikalen Seite der TECs in den Schnitten von *Ripk3* wt Mäusen verglichen mit den *Ripk3* KO Kontrollmäusen. Takasu *et al.* [146] wiesen gleichzeitig in einer Studie die Koexistenz von tubulärer Nekrose sowie Apoptose in dem ANV-Sepsis-Modell nach. Dieser RIPK3-abhängige Tubuluszelltod stellt ein neues therapeutisches Target für Patienten mit durch Sepsis ausgelöstem ANV dar [147].

RIPK3/MLKL-abhängige Nekroptose von TECs ist ein Pathomechanismus, der beim Ischämie/Reperfusion-induzierten ANV eine Rolle spielt. RIPK3 Defizit verhindert Nekroptose in TECs, Inflammation und interstitielle Fibrose nach Ischämie/Reperfusion-induzierten ANV [148]. Des Weiteren führte ein *Ripk3* KO nach Nierentransplantation zu einem reduzierten Transplantat-assoziiertem Ischämie/Reperfusionsschaden sowie zu einem verbesserten Transplantatüberleben in den Nieren des Spenders. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die genaue Rolle von RIPK3 im Rahmen der Podoptose beurteilen zu können.

5.5 Limitationen der experimentellen Untersuchungen

Obgleich ich mithilfe von *Mdm2* KO und *Mdm2/p53* dKO Mäusen den Effekt von MDM2 Deletion sowie das Zusammenspiel von p53 und Mdm2 in renalen TECs untersuchen konnten, existierten auch in unserer Studie wissenschaftliche und methodische Einschränkungen.

Als Erstes muss man erwähnen, dass die Effizienz des Cre/loxP Systems beschränkt ist, sodass ich davon ausgehen muss, dass kein 100%iger *Mdm2* KO sowie kein vollständiger Doppelknockout von *Mdm2* und *p53* mittels Cre-Rekombinase erreicht werden konnte. Auftretende Limitationen des Cre lox-Systemes wurden bereits in anderen *in vivo* Mausexperimenten beschrieben [149].

Zudem muss man berücksichtigen, dass die von mir isolierte RNA der Nieren von Mäusen das gesamte Nierengewebe beinhaltet, einschließlich Glomeruluszellen, Kapillaren, Immunzellen, Fibroblasten und nicht nur spezifisch die TECs, d.h. , dass die Validität der Ergebnisse durch die teils vorhandenen RNA Spuren anderer Zellpopulationen eingeschränkt ist. Um dies zu vermeiden, müsste man die Pax8+ TECs mittels eines Zellsortierers isolieren und dann erst eine RT-PCR durchführen.

Als dritter Punkt ist zu nennen, dass man trotz Verwendung Zell- und Gen-spezifischer transgener Tiere in keiner Weise die Komplexität der menschlichen Biologie imitieren kann, sodass weiterführende Experimente im menschlichen Organismus notwendig sind, um den präzisen molekularen Mechanismus des Zelltodes nach *Mdm2* Deletion in TECs vollständig verstehen und für weitere medizinische Forschung öffnen zu können. Letztlich werden weiterführende Studien benötigt, welche die Kurz- als auch Langzeiteffekte von Mdm2 Antagonisten im Rahmen von ANV und Krebstherapien in Hinsicht auf die Auswirkung auf die Nierenfunktion untersuchen.

6. Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse meiner Doktorarbeit bieten neue Einblicke hinsichtlich der regulierten Podoptose in TECs beim ANV und der Interaktion von MDM2 und p53 in TECs zur Aufrechterhaltung der Homöostase. Die *in vitro* und *in vivo* Daten der aktuellen Arbeit haben mehrere Auswirkungen, die wie folgt aufgelistet und zusammengefasst sind:

1. Die Tubulus-spezifische Deletion von MDM2 führte zu einer Nierenschädigung mit eingeschränkter Nierenfunktion bei Mäusen. Hingegen eine Tubulus-spezifische Doppeldeletion von *Mdm2* und *p53* begünstigt die Pathophysiologie, Überlebensrate und Nierenfunktion im Vergleich zu *Mdm2* KO Mäusen.
2. Die *in vitro* Behandlung von MDM2-defizienten TECs mit verschiedenen Zelltodinhhibitoren verdeutlichte, dass die Zellviabilität sich nach Inhibierung von RIPK1, RIPK3 sowie der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore verbessert.
3. Die *in vivo* Zelltodblockade mittels Z-VAD und Necrostatin-1 zeigte keine renale Verbesserung hinsichtlich Nierenfunktion und histologischer Parameter in den *Mdm2/p53* dKO Tieren. Wohingegen die Behandlung mit Dabrafenib die Nierenfunktion verbesserte, aber zu histologischen Veränderungen wie Zellmorphologie und verstopfte Tubuluslumina nicht beiträgt. Tubulus-spezifische *Ripk3* KO Mäuse wiesen eine verbesserte Nierenfunktion nach ANV auf, d.h. das Podoptose für das Zellsterben von TECs verantwortlich ist.

Zusammenfassend zeigen meine oben genannten Ergebnisse, dass zum einen MDM2 für das Überleben und die Homöostase der TECs *in vivo* essentiell ist und zum anderen eine p53-Überexpression zu erhöhtem Zellsterben („Podoptose“) beiträgt, wobei RIPK3 eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion und der Podoptose spielt.

7. Ausblick

Blockade von Nekroptose und MDM2 als Therapiemöglichkeit

Der Nekroptose Signalweg ist in vielen Krankheitsentitäten als pathogenetische Komponente enthalten. Dies beinhaltet inflammatorische Prozesse, wie Atherosklerose, kardiale Ischämie/Reperfusionsschaden, Sepsis, entzündliche Darmerkrankungen und neurodegenerative Erkrankungen. Die Nekroptose ist ein protektiver Zelltodmechanismus im Rahmen der angeborenen Immunabwehr, da somit Pathogen-infizierte Zellen eliminiert werden. Auch in Tiermodellen zum AKI, wie z.B. im renalen Ischämie/Reperusionsmodell (IRI: ischemia/reperfusion injury) [63] als auch in den Cisplatin- [150] sowie Kontrastmittel-induzierten [151] AKI Modellen spielt diese Zelltodform eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund stellt der Nekroptose Signalweg einen neuen Ansatzpunkt zur therapeutischen Intervention dar. Es wurden bereits einige Inhibitoren dieses Zelltodweges im Rahmen experimenteller Settings eingesetzt. Die Inhibitoren umfassen das RIPK1-spezifische Necrostatin-1, RIPK3-ansteuernde Moleküle, wie GSK'872, GSK'843, Dabrafenib, der RIPK1/RIPK3 Inhibitor GSK'074 sowie Necrosulfonamide, welcher MLKL als therapeutisches Ziel ansteuern [148].

Aufgrund der Rolle der Nekroptose Inflammation sowie Zelltod zu induzieren, könnte die Hemmung der Nekroptose ein vielversprechender therapeutischer Ansatz werden. Auf der anderen Seite könnte die regulierte Aktivierung von Komponenten des Nekrosom eine therapeutische Strategie in der Tumorbehandlung darstellen, wie beispielsweise beim Kolon-Karzinom, Melanom oder Cervix-CA. Aktuell wird in klinischen Studien die Wirkung kleiner Molekülinhibitoren für RIPK1, 3, HSP90 sowie MLKL geprüft [152]. Bis *dato* ist Necrostatin-1 der potenteste und spezifischste Inhibitor von RIPK1 und wird vorwiegend in Nekroptose-Inhibitionsstudien genutzt. Weitere RIPK1-Inhibitoren werden derzeit in diversen klinischen Experimenten bei Krankheitsbildern wie der rheumatoiden Arthritis, der Psoriasis, der ulzerativen Kolitis und des Kolon-CA überprüft. Des Weiteren wird ein RIPK1 Inhibitor DNL747 in der Behandlung neurodegenerativer Krankheiten, wie der amyotrophen Lateralsklerose und Alzheimer eingesetzt [153]. Das Pharmaunternehmen GlaxoSmithKline hat bereits eine Klasse potenter RIPK3-Inhibitoren, wie GSK'840, GSK'843 und GSK'872 entwickelt, um Zellen vor nekroptotischem Zelltod zu schützen [154]. Zudem wurde Dabrafenib als B-Raf und RIPK3 Inhibitor identifiziert, welcher auch in klinischen Studien zur Melanombehandlung genutzt wird [155]. Darüber hinaus stellen Ponatinib und Pazopanib interferierende Moleküle dar, die Nekroptose in humanen Zellen blockieren und

aufgrunddessen als mögliche Kandidaten in klinischen Studien verschiedener Krebstypen gehandelt werden [156].

Nekroptose spielt auch bei neurodegenerativen, kardiologischen und endokrinologischen Erkrankungen eine Rolle. So zeigten sich signifikant erhöhte Expressionswerte von RIPK1, RIPK3, MLKL und weiteren Nekrosomkomplexen im Gehirn von Alzheimer Patienten [157]. Im Tiermodell zur amyotrophen Lateralsklerose war die Inhibition von RIPK1 mittels Nectrostatin-1 oder Knockout von RIPK3 protektiv und schützte die Axone vor Demyelinisierung. Einen ähnlichen protektiven Effekt konnte durch Inhibition von RIPK1 in einer Studie mit an Multiple Sklerose erkrankten Patienten nachweisen werden [158]. Auch bei der rheumatoiden Arthritis spielt der nekroptotische Zelltod eine Rolle [159]. So konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von RIPK1 und RIPK3 fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen reduziert sowie die Rekrutierung von Makrophagen aufhalten kann [160]. In Mäusen mit Typ 2 Diabetes mellitus verminderte die Behandlung mit Necrostatin-1 eine Insulinresistenz/ Glucoseintoleranz [161]. Zudem verbesserte die Behandlung mit Nekroptoseinhibitoren oder der genetische Knockout von Nekrosomkomponenten das Outcome in Tiermodellen zum ANV, wie die akute Oxalatnephropathy [162] und zur chronischen Niereninsuffizienz, wie dem Subtotal-Nephrektomie-Ratenmodell [163]. Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse sind weitere Studien notwendig, um die therapeutische Effizienz von Nekroptoseinhibitoren auch bei Nierenerkrankungen zu untersuchen.

Neben den positiven Therapieeffekten von Nekroptoseinhibitoren können u.a. Dabrafenib und Vemurafenib auch Nebenwirkungen, wie Papillomabildung, Kopfschmerzen, Husten und Nausea verursachen. In einem Literaturbericht zu „*Renal effects of BRAF inhibitors: a systematic review by the cancer and the kidney international review*“ [164] wurde unter anderem über die Behandlung von Patienten, die an inoperablen oder metastasierten Melanom erkrankten mit B-Raf Inhibitoren berichtet. Bei Nierenbiopsien dieser Studienteilnehmer konnten tubulointerstitielle Schäden gezeigt werden. Des Weiteren wurde von Elektrolytstörungen i.F. einer Hypokaliämie, - natriämie sowie – phosphatämie berichtet. Erklärt wurde dies durch die Expressierung und Lokalisation von B-Raf in glomerulären Podozyten. Aus diesem Grund bleibt es noch abzuwägen, ob der potentielle Einsatz von Nekroptoseinhibitoren mehr Nutzen als Risiken bergen wird, auch beim ANV.

MDM2 Inhibitoren und ihre Auswirkungen

Neben dem Ansatz der Nekroptoseinhibitoren wird bereits seit einigen Jahren die Unterbindung der MDM2/p53 Interaktion als therapeutische Strategie in Form von MDM2

Inhibitoren untersucht. Im Jahr 2004 entwickelte Vassilev *et al.* [165] das Molekül Nutlin, was bis heute eines der potentesten MDM2 Antagonisten darstellt. Nutlin hat eine starke Affinität gegenüber MDM2, bindet an die hydrophobe Tasche des N-Terminus und blockiert somit die Bindungsstelle zwischen MDM2 und p53. Jedoch benötigen Nutline den Wildtypallel von p53, um effektiv wirksam sein zu können [109, 115]. Obgleich die erfolgversprechenden Resultate im onkologischen Fachbereich zu sehen sind, zeigen sich ebenso unerwünschte Wirkungen. Denn die erwünschten antiproliferativen und proapoptischen Effekte von MDM2 Antagonisten in der Onkologie können auch gesunde Gewebe und Organe beeinflussen, v.a. die mit hohem Proliferationsindex, wie das hämatopoetische System und das Intestinalepithelium. Weitere Nebenwirkungen, wie Neutropenie Grad 4 in 30% und ausgeprägte Thrombozytopenie in 15% der Patienten, wurden in einer klinischen Studie über Liposarkoma beschrieben. Ebenso konnte eine erworbene Resistenz der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika beobachtet werden. Aus diesen Gründen muss man weiterhin das Nutzen-Risiko-Profil abwägen, die Langzeiteffekte von MDM2 Inhibitoren weiter untersuchen und dann individuell entscheiden [166].

Letztlich werden weiterführende klinische Studien benötigt, welche die Kurz- als auch Langzeiteffekte von MDM2 Antagonisten im Rahmen von Krebstherapien hinsichtlich der Nierenfunktion untersuchen. Zudem sind bzgl. meiner Forschungsergebnisse weitere Untersuchungen notwendig, um die therapeutische Blockade der Nekroptose als weitere Therapiemöglichkeit des *per* Podoptose ausgelösten ANV zu erforschen.

Podoptose - eine bisher unbekannte Ursache für akutes Nierenversagen

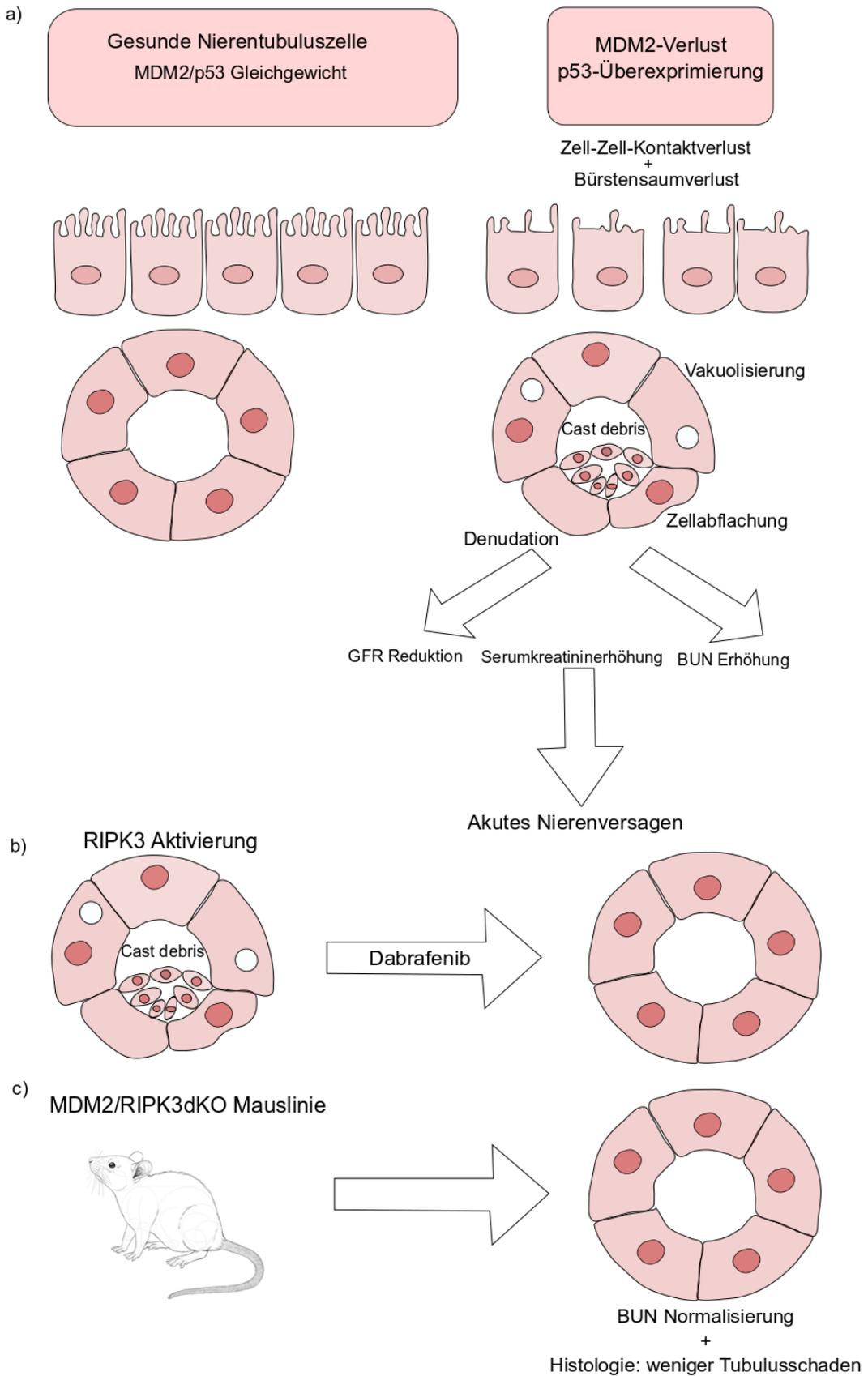


Abbildung 30: Zusammenfassende Graphik: Podoptose- eine bisher unbekannte Ursache für akutes Nierenversagen

8. Bibliografie

1. Chambers BE, Wingert RA: **Renal progenitors: Roles in kidney disease and regeneration.** *World J Stem Cells* 2016, **8**(11):367-375.
2. Chmielewski C: **Renal anatomy and overview of nephron function.** *Nephrol Nurs J* 2003, **30**(2):185-190; quiz 191-182.
3. Karam Z, Tuazon J: **Anatomic and physiologic changes of the aging kidney.** *Clinics in geriatric medicine* 2013, **29**(3):555-564.
4. Denic A, Glasscock RJ, Rule AD: **Structural and Functional Changes With the Aging Kidney.** *Advances in chronic kidney disease* 2016, **23**(1):19-28.
5. Heptinstall RH, Jennette JC: **Heptinstall's pathology of the kidney.** In. Philadelphia, Pa. u.a.: Lippincott.
6. Liebich HG: **[Functional morphology of the kidney. A review of the histophysiology of the kidney glomerulus, the nephrons and the collecting tubule system].** *Tierarztl Prax* 1990, **18**(2):109-121.
7. Behrends JC: **Physiologie: ... 93 Tabellen.** Stuttgart: Thieme; 2010.
8. Shankland SJ, Wolf G: **Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis.** *American journal of physiology Renal physiology* 2000, **278**(4):F515-529.
9. Witzgall R: **Are renal proximal tubular epithelial cells constantly prepared for an emergency? Focus on "the proliferation capacity of the renal proximal tubule involves the bulk of differentiated epithelial cells".** *American journal of physiology Cell physiology* 2008, **294**(1):C1-3.
10. Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y: **Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2003, **14**(12):3138-3146.
11. de Almeida DC, Bassi EJ, Azevedo H, Anderson L, Origassa CS, Cenedeze MA, de Andrade-Oliveira V, Felizardo RJ, da Silva RC, Hiyane MI *et al*: **A Regulatory miRNA-mRNA Network Is Associated with Tissue Repair Induced by Mesenchymal Stromal Cells in Acute Kidney Injury.** *Front Immunol* 2016, **7**:645.
12. Cantley LG: **Adult stem cells in the repair of the injured renal tubule.** *Nat Clin Pract Nephrol* 2005, **1**(1):22-32.
13. Angelotti ML, Ronconi E, Peired A, Mazzinghi B, Lazzeri E, Lasagni L, Romagnani P: **[Tubular progenitor cells: new protagonists of tubular regeneration].** *G Ital Nefrol* 2012, **29**(5):514-518.
14. Anglani F, Forino M, Del Prete D, Toso E, Torregrossa R, D'Angelo A: **In search of adult renal stem cells.** *J Cell Mol Med* 2004, **8**(4):474-487.
15. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA: **Pathophysiology of acute kidney injury.** *Compr Physiol* 2012, **2**(2):1303-1353.
16. Palevsky PM, Liu KD, Brophy PD, Chawla LS, Parikh CR, Thakar CV, Tolwani AJ, Waikar SS, Weisbord SD: **KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury.** *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2013, **61**(5):649-672.
17. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E *et al*: **Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study.** *Jama* 2005, **294**(7):813-818.
18. Metnitz PG, Krenn CG, Steltzer H, Lang T, Ploder J, Lenz K, Le Gall JR, Druml W: **Effect of acute renal failure requiring renal replacement therapy on outcome in critically ill patients.** *Critical care medicine* 2002, **30**(9):2051-2058.

19. Fayad AI, Buamscha DG, Ciapponi A: **Intensity of continuous renal replacement therapy for acute kidney injury.** *The Cochrane database of systematic reviews* 2016, **10**:Cd010613.
20. Coca SG, Singanamala S, Parikh CR: **Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis.** *Kidney international* 2012, **81**(5):442-448.
21. Saly D, Yang A, Triebwasser C, Oh J, Sun Q, Testani J, Parikh CR, Bia J, Biswas A, Stetson C *et al*: **Approaches to Predicting Outcomes in Patients with Acute Kidney Injury.** *PLoS one* 2017, **12**(1):e0169305.
22. Yoshida M, Honma S: **Regeneration of injured renal tubules.** *Journal of pharmacological sciences* 2014, **124**(2):117-122.
23. Gill N, Nally JV, Jr., Fatica RA: **Renal failure secondary to acute tubular necrosis: epidemiology, diagnosis, and management.** *Chest* 2005, **128**(4):2847-2863.
24. Liano F, Pascual J: **Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group.** *Kidney international* 1996, **50**(3):811-818.
25. Johansson ME: **Tubular regeneration: when can the kidney regenerate from injury and what turns failure into success?** *Nephron Experimental nephrology* 2014, **126**(2):76.
26. Lieberthal W, Nigam SK: **Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury.** *Am J Physiol* 1998, **275**(5 Pt 2):F623-631.
27. Bonventre JV: **Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2003, **14** Suppl 1:S55-61.
28. Mazzinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, Sagrinati C, Ballerini L, Angelotti ML, Parente E, Mancina R, Netti GS, Becherucci F *et al*: **Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells.** *J Exp Med* 2008, **205**(2):479-490.
29. Romagnani P, Lasagni L, Remuzzi G: **Renal progenitors: an evolutionary conserved strategy for kidney regeneration.** *Nat Rev Nephrol* 2013, **9**(3):137-146.
30. Hsu YC, Fuchs E: **A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012, **13**(2):103-114.
31. Romagnani P, Anders HJ: **What can tubular progenitor cultures teach us about kidney regeneration?** *Kidney international* 2013, **83**(3):351-353.
32. Langworthy M, Zhou B, de Caestecker M, Moeckel G, Baldwin HS: **NFATc1 identifies a population of proximal tubule cell progenitors.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2009, **20**(2):311-321.
33. Angelotti ML, Ronconi E, Ballerini L, Peired A, Mazzinghi B, Sagrinati C, Parente E, Gacci M, Carini M, Rotondi M *et al*: **Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury.** *Stem Cells* 2012, **30**(8):1714-1725.
34. Ye Y, Wang B, Jiang X, Hu W, Feng J, Li H, Jin M, Ying Y, Wang W, Mao X *et al*: **Proliferative capacity of stem/progenitor-like cells in the kidney may associate with the outcome of patients with acute tubular necrosis.** *Human pathology* 2011, **42**(8):1132-1141.
35. Sallustio F, Costantino V, Cox SN, Loverre A, Divella C, Rizzi M, Schena FP: **Human renal stem/progenitor cells repair tubular epithelial cell injury through TLR2-driven inhibin-A and microvesicle-shuttled decorin.** *Kidney international* 2013, **83**(3):392-403.
36. Lee PT, Lin HH, Jiang ST, Lu PJ, Chou KJ, Fang HC, Chiou YY, Tang MJ: **Mouse kidney progenitor cells accelerate renal regeneration and prolong survival after ischemic injury.** *Stem Cells* 2010, **28**(3):573-584.
37. Clarke PG: **Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms.** *Anatomy and embryology* 1990, **181**(3):195-213.
38. Kers J, Leemans JC, Linkermann A: **An Overview of Pathways of Regulated Necrosis in Acute Kidney Injury.** *Semin Nephrol* 2016, **36**(3):139-152.
39. Smolens P, Stein JH: **Pathophysiology of acute renal failure.** *The American journal of medicine* 1981, **70**(3):479-482.

40. Sancho-Martinez SM, Lopez-Novoa JM, Lopez-Hernandez FJ: **Pathophysiological role of different tubular epithelial cell death modes in acute kidney injury.** *Clinical kidney journal* 2015, **8**(5):548-559.
41. Kaushal GP, Shah SV: **Autophagy in acute kidney injury.** *Kidney international* 2016, **89**(4):779-791.
42. Wang S, Zhang C, Hu L, Yang C: **Necroptosis in acute kidney injury: a shedding light.** *Cell death & disease* 2016, **7**:e2125.
43. Shibutani ST, Yoshimori T: **A current perspective of autophagosome biogenesis.** *Cell research* 2014, **24**(1):58-68.
44. Havasi A, Dong Z: **Autophagy and Tubular Cell Death in the Kidney.** *Semin Nephrol* 2016, **36**(3):174-188.
45. Kaushal GP: **Autophagy protects proximal tubular cells from injury and apoptosis.** *Kidney international* 2012, **82**(12):1250-1253.
46. Schutze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W: **Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**(8):655-662.
47. Riedl SJ, Shi Y: **Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**(11):897-907.
48. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR *et al*: **Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.** *Cell death and differentiation* 2009, **16**(1):3-11.
49. Bia MJ, Tyler KA: **Effect of cyclosporine on renal ischemic injury.** *Transplantation* 1987, **43**(6):800-804.
50. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C: **Mitochondrial membrane permeabilization in cell death.** *Physiological reviews* 2007, **87**(1):99-163.
51. Horn F, Armbruster M: **Biochemie des Menschen das Lehrbuch f©*r das Medizinstudium, 4., aktualisierte und erw. Aufl. edn.** Stuttgart u.a.: Thieme; 2009.
52. Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Gobe G, Connor J, O'Toole KM, Olsson CA, Wise GJ, Buttyan R: **Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia.** *The American journal of pathology* 1992, **140**(4):831-838.
53. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB: **Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity.** *Toxins* 2010, **2**(11):2490-2518.
54. Lerolle N, Nochy D, Guerot E, Bruneval P, Fagon JY, Diehl JL, Hill G: **Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: apoptosis and leukocytic infiltration.** *Intensive care medicine* 2010, **36**(3):471-478.
55. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *British journal of cancer* 1972, **26**(4):239-257.
56. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M *et al*: **Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.** *Nature* 1999, **397**(6718):441-446.
57. Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, Susin SA: **NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor.** *J Biol Chem* 2001, **276**(19):16391-16398.
58. Li LY, Luo X, Wang X: **Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria.** *Nature* 2001, **412**(6842):95-99.
59. Dible JH, Bull GM, Darmady EM: **Acute tubular necrosis.** *British medical journal* 1950, **1**(4664):1262-1264.
60. Lieberthal W, Koh JS, Levine JS: **Necrosis and apoptosis in acute renal failure.** *Semin Nephrol* 1998, **18**(5):505-518.
61. Galluzzi L, Kepp O, Krautwald S, Kroemer G, Linkermann A: **Molecular mechanisms of regulated necrosis.** *Seminars in cell & developmental biology* 2014, **35**:24-32.

62. Degtarev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J: **Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury.** *Nature chemical biology* 2005, **1**(2):112-119.
63. Linkermann A, Brasen JH, Himmerkus N, Liu S, Huber TB, Kunzendorf U, Krautwald S: **Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury.** *Kidney international* 2012, **81**(8):751-761.
64. Vandenabeele P, Declercq W, Van Herreweghe F, Vanden Berghe T: **The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis.** *Sci Signal* 2010, **3**(115):re4.
65. Li J, McQuade T, Siemer AB, Napetschnig J, Moriwaki K, Hsiao YS, Damko E, Moquin D, Walz T, McDermott A *et al*: **The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis.** *Cell* 2012, **150**(2):339-350.
66. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, Wang L, Yan J, Liu W, Lei X *et al*: **Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase.** *Cell* 2012, **148**(1-2):213-227.
67. Mulay SR, Desai J, Kumar SV, Eberhard JN, Thomasova D, Romoli S, Grigorescu M, Kulkarni OP, Popper B, Vielhauer V *et al*: **Cytotoxicity of crystals involves RIPK3-MLKL-mediated necroptosis.** *Nat Commun* 2016, **7**:10274.
68. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV: **Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance.** *Immunity* 2013, **38**(2):209-223.
69. Mulay SR, Kumar SV, Lech M, Desai J, Anders HJ: **How Kidney Cell Death Induces Renal Necroinflammation.** *Semin Nephrol* 2016, **36**(3):162-173.
70. Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES: **Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis.** *Cell Host Microbe* 2010, **7**(4):302-313.
71. Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ: **The permeability transition pore complex: another view.** *Biochimie* 2002, **84**(2-3):153-166.
72. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA: **Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection.** *Cardiovascular research* 2004, **61**(3):372-385.
73. Lemasters JJ, Qian T, He L, Kim JS, Elmore SP, Cascio WE, Brenner DA: **Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy.** *Antioxidants & redox signaling* 2002, **4**(5):769-781.
74. Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Wenger RM, Bernardi P: **Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel.** *J Biol Chem* 1996, **271**(4):2185-2192.
75. Wen X, Peng Z, Li Y, Wang H, Bishop JV, Chedwick LR, Singbartl K, Kellum JA: **One dose of cyclosporine A is protective at initiation of folic acid-induced acute kidney injury in mice.** *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2012, **27**(8):3100-3109.
76. Feldkamp T, Kribben A, Weinberg JM: **Assessment of mitochondrial membrane potential in proximal tubules after hypoxia-reoxygenation.** *American journal of physiology Renal physiology* 2005, **288**(6):F1092-1102.
77. Fakhrazadeh SS, Trusko SP, George DL: **Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line.** *EMBO J* 1991, **10**(6):1565-1569.
78. Lu H: **p53 and MDM2: their Yin-Yang intimacy.** *Journal of molecular cell biology* 2017.
79. Bond GL, Hu W, Levine AJ: **MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting.** *Current cancer drug targets* 2005, **5**(1):3-8.
80. Montes de Oca Luna R, Wagner DS, Lozano G: **Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53.** *Nature* 1995, **378**(6553):203-206.
81. Carr AM, Green MH, Lehmann AR: **Checkpoint policing by p53.** *Nature* 1992, **359**(6395):486-487.
82. Lane DP: **Cancer. p53, guardian of the genome.** *Nature* 1992, **358**(6381):15-16.

83. Linzer DI, Levine AJ: **Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells.** *Cell* 1979, **17**(1):43-52.
84. Linzer DI, Maltzman W, Levine AJ: **The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen.** *Virology* 1979, **98**(2):308-318.
85. Levine AJ: **p53, the cellular gatekeeper for growth and division.** *Cell* 1997, **88**(3):323-331.
86. Crawford L: **Human p53 and human tumours.** *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 1985, **3**(3):117-120.
87. Fierabracci A, Pellegrino M: **The Double Role of p53 in Cancer and Autoimmunity and Its Potential as Therapeutic Target.** *International journal of molecular sciences* 2016, **17**(12).
88. Hublarova P, Greplova K, Holcakova J, Vojtesek B, Hrstka R: **Switching p53-dependent growth arrest to apoptosis via the inhibition of DNA damage-activated kinases.** *Cellular & molecular biology letters* 2010, **15**(3):473-484.
89. Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ: **The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop.** *Genes & development* 1993, **7**(7a):1126-1132.
90. Enoch T, Norbury C: **Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM.** *Trends in biochemical sciences* 1995, **20**(10):426-430.
91. Zhang XP, Liu F, Wang W: **Two-phase dynamics of p53 in the DNA damage response.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, **108**(22):8990-8995.
92. Reisman D, Takahashi P, Polson A, Boggs K: **Transcriptional Regulation of the p53 Tumor Suppressor Gene in S-Phase of the Cell-Cycle and the Cellular Response to DNA Damage.** *Biochemistry research international* 2012, **2012**:808934.
93. Correa H: **Li-Fraumeni Syndrome.** *Journal of pediatric genetics* 2016, **5**(2):84-88.
94. Perri F, Pisconti S, Della Vittoria Scarpati G: **P53 mutations and cancer: a tight linkage.** *Ann Transl Med* 2016, **4**(24):522.
95. Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B: **Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53.** *Nature* 1993, **362**(6423):857-860.
96. Juven-Gershon T, Oren M: **Mdm2: the ups and downs.** *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 1999, **5**(2):71-83.
97. Michael D, Oren M: **The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system.** *Semin Cancer Biol* 2003, **13**(1):49-58.
98. Honda R, Tanaka H, Yasuda H: **Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53.** *FEBS letters* 1997, **420**(1):25-27.
99. Eischen CM, Lozano G: **The Mdm network and its regulation of p53 activities: a rheostat of cancer risk.** *Human mutation* 2014, **35**(6):728-737.
100. Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W: **Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2.** *Science (New York, NY)* 2003, **302**(5652):1972-1975.
101. Chen L, Agrawal S, Zhou W, Zhang R, Chen J: **Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(1):195-200.
102. Mulay SR, Thomasova D, Ryu M, Anders HJ: **MDM2 (murine double minute-2) links inflammation and tubular cell healing during acute kidney injury in mice.** *Kidney international* 2012, **81**(12):1199-1211.
103. Thomasova D, Mulay SR, Bruns H, Anders HJ: **p53-independent roles of MDM2 in NF-kappaB signaling: implications for cancer therapy, wound healing, and autoimmune diseases.** *Neoplasia* 2012, **14**(12):1097-1101.
104. Ambrozova N, Ulrichova J, Galandakova A: **Models for the study of skin wound healing. The role of Nrf2 and NF-kappaB.** *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 2017.

105. Havasi A, Borkan SC: **Apoptosis and acute kidney injury**. *Kidney international* 2011, **80**(1):29-40.
106. Dagher PC: **Apoptosis in ischemic renal injury: roles of GTP depletion and p53**. *Kidney international* 2004, **66**(2):506-509.
107. Di J, Zhang Y, Zheng J: **Reactivation of p53 by inhibiting Mdm2 E3 ligase: a novel antitumor approach**. *Current cancer drug targets* 2011, **11**(8):987-994.
108. Wade M, Li YC, Matani AS, Braun SM, Milanese F, Rodewald LW, Wahl GM: **Functional analysis and consequences of Mdm2 E3 ligase inhibition in human tumor cells**. *Oncogene* 2012, **31**(45):4789-4797.
109. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C *et al*: **In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2**. *Science (New York, NY)* 2004, **303**(5659):844-848.
110. Ding K, Lu Y, Nikolovska-Coleska Z, Wang G, Qiu S, Shangary S, Gao W, Qin D, Stuckey J, Krajewski K *et al*: **Structure-based design of spiro-oxindoles as potent, specific small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 interaction**. *J Med Chem* 2006, **49**(12):3432-3435.
111. Shangary S, Qin D, McEachern D, Liu M, Miller RS, Qiu S, Nikolovska-Coleska Z, Ding K, Wang G, Chen J *et al*: **Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(10):3933-3938.
112. Shangary S, Ding K, Qiu S, Nikolovska-Coleska Z, Bauer JA, Liu M, Wang G, Lu Y, McEachern D, Bernard D *et al*: **Reactivation of p53 by a specific MDM2 antagonist (MI-43) leads to p21-mediated cell cycle arrest and selective cell death in colon cancer**. *Molecular cancer therapeutics* 2008, **7**(6):1533-1542.
113. Shangary S, Wang S: **Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy**. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009, **49**:223-241.
114. Aziz MH, Shen H, Maki CG: **Acquisition of p53 mutations in response to the non-genotoxic p53 activator Nutlin-3**. *Oncogene* 2011, **30**(46):4678-4686.
115. Burgess A, Chia KM, Haupt S, Thomas D, Haupt Y, Lim E: **Clinical Overview of MDM2/X-Targeted Therapies**. *Frontiers in oncology* 2016, **6**:7.
116. Thomasova D, Bruns HA, Kretschmer V, Ebrahim M, Romoli S, Liapis H, Kotb AM, Endlich N, Anders HJ: **Murine Double Minute-2 Prevents p53-Overactivation-Related Cell Death (Podoptosis) of Podocytes**. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2015, **26**(7):1513-1523.
117. Schreiber A, Shulhevich Y, Geraci S, Hesser J, Stsepankou D, Neudecker S, Koenig S, Heinrich R, Hoecklin F, Pill J *et al*: **Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice**. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012, **303**(5):F783-788.
118. Hirukawa T, Wu Q, Sawada K, Matsusaka T, Saka S, Oka A, Hirawa N, Umemura S, Kakuta T, Endoh M *et al*: **Kidney Diseases Enhance Expression of Tetraspanin-8: A Possible Protective Effect against Tubular Injury**. *Nephron extra* 2014, **4**(1):70-81.
119. Jin TX, Kakehi Y, Moroi S, Yoshida O: **[E-cadherin expression and histopathological features in renal cell carcinomas]**. *Hinyokika kiyo Acta urologica Japonica* 1995, **41**(9):653-657.
120. Ranjan A, Iwakuma T: **Non-Canonical Cell Death Induced by p53**. *International journal of molecular sciences* 2016, **17**(12).
121. Nakhoul N, Batuman V: **Role of proximal tubules in the pathogenesis of kidney disease**. *Contrib Nephrol* 2011, **169**:37-50.
122. Hennigar RA, Schulte BA, Spicer SS: **Heterogeneous distribution of glycoconjugates in human kidney tubules**. *The Anatomical record* 1985, **211**(4):376-390.
123. Linkermann A, Green DR: **Necroptosis**. *N Engl J Med* 2014, **370**(5):455-465.
124. Linkermann A, Brasen JH, Darding M, Jin MK, Sanz AB, Heller JO, De Zen F, Weinlich R, Ortiz A, Walczak H *et al*: **Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-**

- reperfusion injury.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, **110**(29):12024-12029.
125. Venkatachalam MA, Weinberg JM, Kriz W, Bidani AK: **Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2015, **26**(8):1765-1776.
 126. Saito H, Tanaka T, Tanaka S, Higashijima Y, Yamaguchi J, Sugahara M, Ito M, Uchida L, Hasegawa S, Wakashima T *et al*: **Persistent expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and M2 macrophage markers and chronic fibrosis after acute kidney injury.** *Physiol Rep* 2018, **6**(10):e13707.
 127. Terzian T, Wang Y, Van Pelt CS, Box NF, Travis EL, Lozano G: **Haploinsufficiency of Mdm2 and Mdm4 in tumorigenesis and development.** *Molecular and cellular biology* 2007, **27**(15):5479-5485.
 128. Hilliard S, Aboudehen K, Yao X, El-Dahr SS: **Tight regulation of p53 activity by Mdm2 is required for ureteric bud growth and branching.** *Developmental biology* 2011, **353**(2):354-366.
 129. Hilliard SA, Yao X, El-Dahr SS: **Mdm2 is required for maintenance of the nephrogenic niche.** *Developmental biology* 2014, **387**(1):1-14.
 130. Moyer SM, Larsson CA, Lozano G: **Mdm proteins: critical regulators of embryogenesis and homeostasis.** *Journal of molecular cell biology* 2017.
 131. El-Dahr S, Hilliard S, Saifudeen Z: **Regulation of kidney development by the Mdm2/Mdm4-p53 axis.** *Journal of molecular cell biology* 2017.
 132. Ozkok A, Edelstein CL: **Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury.** *Biomed Res Int* 2014, **2014**:967826.
 133. Vallon V: **The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011, **300**(5):R1009-1022.
 134. Wang K, Kestenbaum B: **Proximal Tubular Secretory Clearance: A Neglected Partner of Kidney Function.** *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2018, **13**(8):1291-1296.
 135. Kennedy WA, 2nd, Stenberg A, Lackgren G, Hensle TW, Sawczuk IS: **Renal tubular apoptosis after partial ureteral obstruction.** *J Urol* 1994, **152**(2 Pt 2):658-664.
 136. Nilsson L, Madsen K, Krag S, Frokiaer J, Jensen BL, Norregaard R: **Disruption of cyclooxygenase type 2 exacerbates apoptosis and renal damage during obstructive nephropathy.** *American journal of physiology Renal physiology* 2015, **309**(12):F1035-1048.
 137. Kato S, Akasaka Y, Kawamura S: **Fas antigen expression and its relationship with apoptosis in transplanted kidney.** *Pathol Int* 1997, **47**(4):230-237.
 138. Bonegio R, Lieberthal W: **Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002, **11**(3):301-308.
 139. Laine J, Etelamaki P, Holmberg C, Dunkel L: **Apoptotic cell death in human chronic renal allograft rejection.** *Transplantation* 1997, **63**(1):101-105.
 140. Thomas GL, Yang B, Wagner BE, Savill J, El Nahas AM: **Cellular apoptosis and proliferation in experimental renal fibrosis.** *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 1998, **13**(9):2216-2226.
 141. Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B: **Cell death mechanisms and their implications in toxicology.** *Toxicol Sci* 2011, **119**(1):3-19.
 142. Sabath E, Robles-Osorio ML: **Renal health and the environment: heavy metal nephrotoxicity.** *Nefrologia* 2012, **32**(3):279-286.
 143. Hamada T, Tanimoto A, Iwai S, Fujiwara H, Sasaguri Y: **Cytopathological changes induced by cadmium-exposure in canine proximal tubular cells: a cytochemical and ultrastructural study.** *Nephron* 1994, **68**(1):104-111.

144. Abuelezz SA, Hendawy N, Abdel Gawad S: **Alleviation of renal mitochondrial dysfunction and apoptosis underlies the protective effect of sitagliptin in gentamicin-induced nephrotoxicity.** *J Pharm Pharmacol* 2016, **68**(4):523-532.
145. Linkermann A, Chen G, Dong G, Kunzendorf U, Krautwald S, Dong Z: **Regulated cell death in AKI.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2014, **25**(12):2689-2701.
146. Takasu O, Gaut JP, Watanabe E, To K, Fagley RE, Sato B, Jarman S, Efimov IR, Janks DL, Srivastava A *et al*: **Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis.** *Am J Respir Crit Care Med* 2013, **187**(5):509-517.
147. Sureshbabu A, Patino E, Ma KC, Laursen K, Finkelsztejn EJ, Akchurin O, Muthukumar T, Ryter SW, Gudas L, Choi AMK *et al*: **RIPK3 promotes sepsis-induced acute kidney injury via mitochondrial dysfunction.** *JCI Insight* 2018, **3**(11).
148. Choi ME, Price DR, Ryter SW, Choi AMK: **Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease.** *JCI Insight* 2019, **4**(15).
149. Valentin-Vega YA, Okano H, Lozano G: **The intestinal epithelium compensates for p53-mediated cell death and guarantees organismal survival.** *Cell death and differentiation* 2008, **15**(11):1772-1781.
150. Xu Y, Ma H, Shao J, Wu J, Zhou L, Zhang Z, Wang Y, Huang Z, Ren J, Liu S *et al*: **A Role for Tubular Necroptosis in Cisplatin-Induced AKI.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2015, **26**(11):2647-2658.
151. Linkermann A, Heller JO, Prokai A, Weinberg JM, De Zen F, Himmerkus N, Szabo AJ, Brasen JH, Kunzendorf U, Krautwald S: **The RIP1-kinase inhibitor necrostatin-1 prevents osmotic nephrosis and contrast-induced AKI in mice.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2013, **24**(10):1545-1557.
152. Chen J, Kos R, Garssen J, Redegeld F: **Molecular Insights into the Mechanism of Necroptosis: The Necrosome As a Potential Therapeutic Target.** *Cells* 2019, **8**(12).
153. Chi H, Chang HY, Sang TK: **Neuronal Cell Death Mechanisms in Major Neurodegenerative Diseases.** *International journal of molecular sciences* 2018, **19**(10).
154. Kaiser WJ, Sridharan H, Huang C, Mandal P, Upton JW, Gough PJ, Sehon CA, Marquis RW, Bertin J, Mocarski ES: **Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL.** *J Biol Chem* 2013, **288**(43):31268-31279.
155. Geserick P, Wang J, Schilling R, Horn S, Harris PA, Bertin J, Gough PJ, Feoktistova M, Leverkus M: **Absence of RIPK3 predicts necroptosis resistance in malignant melanoma.** *Cell death & disease* 2015, **6**:e1884.
156. Schlichtig K, Durr P, Dorje F, Fromm MF: **New Oral Anti-Cancer Drugs and Medication Safety.** *Dtsch Arztebl Int* 2019, **116**(46):775-782.
157. Ofengeim D, Mazzitelli S, Ito Y, DeWitt JP, Mifflin L, Zou C, Das S, Adiconis X, Chen H, Zhu H *et al*: **RIPK1 mediates a disease-associated microglial response in Alzheimer's disease.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2017, **114**(41):E8788-E8797.
158. Ofengeim D, Ito Y, Najafov A, Zhang Y, Shan B, DeWitt JP, Ye J, Zhang X, Chang A, Vakifahmetoglu-Norberg H *et al*: **Activation of necroptosis in multiple sclerosis.** *Cell Rep* 2015, **10**(11):1836-1849.
159. Lee SH, Kwon JY, Kim SY, Jung K, Cho ML: **Interferon-gamma regulates inflammatory cell death by targeting necroptosis in experimental autoimmune arthritis.** *Sci Rep* 2017, **7**(1):10133.
160. Lin J, Li H, Yang M, Ren J, Huang Z, Han F, Huang J, Ma J, Zhang D, Zhang Z *et al*: **A role of RIP3-mediated macrophage necrosis in atherosclerosis development.** *Cell Rep* 2013, **3**(1):200-210.
161. Xu H, Du X, Liu G, Huang S, Du W, Zou S, Tang D, Fan C, Xie Y, Wei Y *et al*: **The pseudokinase MLKL regulates hepatic insulin sensitivity independently of inflammation.** *Mol Metab* 2019, **23**:14-23.

162. Liu W, Chen B, Wang Y, Meng C, Huang H, Huang XR, Qin J, Mulay SR, Anders HJ, Qiu A *et al*: **RGMB protects against acute kidney injury by inhibiting tubular cell necroptosis via an MLKL-dependent mechanism.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2018, **115**(7):E1475-E1484.
163. Zhu Y, Cui H, Xia Y, Gan H: **RIPK3-Mediated Necroptosis and Apoptosis Contributes to Renal Tubular Cell Progressive Loss and Chronic Kidney Disease Progression in Rats.** *PloS one* 2016, **11**(6):e0156729.
164. Wanchoo R, Jhaveri KD, Deray G, Launay-Vacher V: **Renal effects of BRAF inhibitors: a systematic review by the Cancer and the Kidney International Network.** *Clinical kidney journal* 2016, **9**(2):245-251.
165. Vassilev LT: **MDM2 inhibitors for cancer therapy.** *Trends in molecular medicine* 2007, **13**(1):23-31.
166. Secchiero P, Bosco R, Celeghini C, Zauli G: **Recent advances in the therapeutic perspectives of Nutlin-3.** *Curr Pharm Des* 2011, **17**(6):569-577.

9. Danksagung

„Das schönste Glück des denkenden Menschen ist, das Erforschliche erforscht zu haben und das Unerforschliche zu verehren.“

-Johann Wolfgang von Goethe-

Die Begegnung mit der Wissenschaft hat mich vieles gelehrt, weit mehr als nur die Theorie und Praxis wissenschaftlicher Texte und Experimente. Es hat mich Neugier, Geduld, Resilienz, einen kritischen und offenen Verstand, den wissenschaftlichen, leidenschaftlichen Diskurs, aber auch Empathie, das Schätzen eines interkulturellen Austausches und das Ehren jeden Lebens gelehrt. So bin ich sehr dankbar für die intellektuellen als auch menschlichen Schätze während der letzten Jahre, die ich gewonnen habe.

Zunächst möchte ich meinen Dank meinem Doktorvater Herrn Professor Hans-Joachim Anders sowie meiner Betreuerin Frau Professor Dana Thomasova aussprechen. Sie bieten mir die Möglichkeit meine Doktorarbeit in ihrem renommierten Forschungsinstitut (Schillerstraße 42) zu machen und waren mir gute Mentoren.

Des Weiteren danke ich Herrn Privatdozenten Bruno Luckow, dessen Leidenschaft für die Wissenschaft und wissenschaftliche Praxis mich sehr inspiriert und geprägt haben.

Von ganzem Herzen möchte ich mich ebenfalls bedanken bei meinen Laborkollegen und –freunden PD Dr. Stefanie Steiger, Martrez, Moying, Steffi, Santhosh, Simone, Mohsen, Julian und Nuru. Ihr habt mir gezeigt wie viel Spaß wissenschaftliches Arbeiten machen kann, wenn man von ambitionierten, kollegialen und freundlichen Menschen umgeben ist.

Einen weiteren gebührenden Dank geht an die ausgezeichneten Labormitarbeiter Jana und Dan, die immer mit größter Sorgfalt und Wohlwollen die Genotypisierung und Histologie gemacht haben. Ebenso danke ich Frau Professor Helen Liapis von der Washington Universität für ihre Kooperation.

Der größte Dank geht an meine wunderbare Familie, insbesondere an meine Eltern. Sie stehen mir zu jeder Zeit zur Seite und unterstützen mich, wo es nur geht. Ohne sie an meiner Seite hätte ich weder mein Medizinstudium noch meine Doktorarbeit erfolgreich beginnen und beenden können. Sie lehrten mich die wichtigsten Dinge über das Leben: einen wachen Verstand sowie Güte, ein starkes Herz und Mitgefühl für jedes Lebewesen zu haben.

Zu guter Letzt möchte ich den vielen Tieren, die ihr Leben ließen, danken, ohne die meine Doktorarbeit in der Form nicht existieren würde.

10. Affidavit

Eidesstattliche Versicherung

von Kristina Teresa Fleckinger

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Podoptose- eine bisher unbekannte Ursache für akutes Nierenversagen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Folgende Personen haben an der Durchführung dieser Arbeit mitgewirkt:

- Dr. Dana Thomasova, Ph.D., Prag, Tschechien
Sie fertigte Aufnahmen der immunhistologischen Schnitte an.
- Prof. Dr. Helen Liapis, Washington University, USA
Sie führte die elektronenmikroskopischen Aufnahmen durch.
- Janina Mandelbaum und Dan Draganovici, LMU Klinikum
Sie fertigten die histologischen Schnitte an und führten die Genotypisierung der Versuchstiere durch
- Moying Li, ehemalige Doktorandin von Prof. Dr. med. Anders, Ärztin in Mannheim, Deutschland
Es überscheiden sich einzelne Experimente mit denen von Frau Li durchgeführten Experimenten in deren Dissertation „Mdm2 Prevents Spontaneous Tubular Epithelial Cell Death and Acute Kidney Injury“ aufgrund der Prüfung auf Reproduzierbarkeit dieser Daten, welche ich vornehmen sollte.

Ort, Datum

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen Februar 2015 und März 2017 im Nephrologischen Zentrum der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV an der Ludwig-Maximilians-Universität München im Anders & Vielhauer Research Laboratory durchgeführt. Die Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. med. Hans Joachim Anders betreut. Diese Arbeit wurde durch das Förderprogramm Forschung und Lehre (FöFoLe) der Ludwig-Maximilians-Universität unter Leitung von Prof. Dr. Thomas Gudermann gefördert.

11. Publikationsliste

Aus dem Projekt hervorgegangene Veröffentlichungen:

Publikationen:

Thomasova, D., Ebrahim, M., **Fleckinger, K.**, Li, M., Molnar, J., Popper, B., Liapis, H., Kotb, A. M., Siegerist, F., Endlich, N., Anders, H.-J.: MDM2 prevents spontaneous tubular epithelial cell death and acute kidney injury. *Cell Death Dis*, 2016. 7(11): p. e2482.

Vortrag:

Berichtskolloquium des Förderprogramms Forschung & Lehre 2016, Herrsching: **Fleckinger K.**, Thomasova, D., Anders H.-J.: Podoptose- eine bisher unbekannte Ursache für akutes Nierenversagen.

Poster:

Doktamed (Studentenkongress an der Ludwig-Maximilians-University Munich) **2017**, Munich. , Thomasova, D, Ebrahim, M, Anders, HJ: Murine Double Minute-2 (MDM2) maintains homeostasis in renal tubular cells by preventing p53-overactivation-regulated cell death.

