

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

Die Rolle von MDM2 und p53 in den Podozyten

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

vorgelegt von
Victoria Kretschmer
aus Nürtingen
01/2023

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans Joachim Anders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Enrico de Toni
Prof. Dr. Wolfgang Neuhöfer
Prof. Dr. Markus Rentsch

Mitbetreuung: Dr. med. Dana Thromasova, PhD

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2023

Eidesstattliche Versicherung

von Victoria Kretschmer

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

Die Rolle von MDM2 und p53 in den Podozyten

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, PhD, LMU München
Sie fertigte Aufnahmen der immunhistologischen Schnitte an und führte einen Großteil der Zellkulturexperimente durch.
- Dr. Hauke Bruns, LMU München
Durch seine vorangehende Doktorarbeit konnten die Mausekreuzungen durchgeführt werden.
- Janina Mandelbaum und Dan Draganovici, LMU München
Sie fertigten die histologischen Schnitte an und führten die Genotypisierung der Versuchstiere durch.
- Martrez Ebrahim, LMU München
Sie half bei der Durchführung der Experimente zum p53/MDM2 Knockdown Mausmodell.
- Prof. Dr. Nicole Endlich, Uni Greifswald
Durch die Kollaborationsarbeit konnten die Experimente an den Zebrafischen durchgeführt werden.
- Dr.rer.nat Ahmed Kotb, Uni Greifswald
Mit seiner Hilfe konnte ich die Experimente an Zebrafischen durchführen.

München, den 23.01.2023 Victoria Kretschmer

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen Februar 2013 und April 2014 hauptzeitlich im Nephrologischen Zentrum der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV an der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt und zum Teil an der Universität in Greifswald. Die Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. med. Hans Joachim Anders betreut.

Förderung des Projekts

Diese Arbeit wurde durch das Förderprogramm Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität unter Leitung von Prof. Dr. Jürgen Heesemann gefördert.

Hervorgegangene Veröffentlichungen aus dem Projekt

Publikation

Thomasova, D., Bruns, H., Kretschmer, V., Ebrahim, M., Romoli, S., Liapis, H., Kotb, A. M., Endlich, N. und Anders, H.-J.: Murine Double Minute-2 Prevents p53-Overactivation-Related Cell Death (Podoptosis) of Podocytes. J. Am. Soc. Nephrol. 2015, 26(7): 1513-1523.

Vortrag

Berichtskolloquium des Förderprogramms Forschung & Lehre 2014, Herrsching: Kretschmer V., Thomasova, D., Anders H.-J.: Die Rolle von MDM2 und p53 in den Podozyten

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung	3
Abstract	5
1 Einleitung	6
1.1 Chronische Nierenerkrankung (CKD)	6
1.2 Aufbau, Struktur und Funktion der Niere	9
1.3 Die Filtrationsbarriere	11
1.3.1 Das fenestrierte Endothel	13
1.3.2 Die glomeruläre Basalmembran	14
1.3.3 Die Podozyten	15
1.4 Das Molekül p53	20
1.4.1 Aufbau und Wirkung von p53	21
1.5 Das Molekül MDM2	24
1.5.1 Interaktion zwischen p53 und MDM2- der Regulationskreis	25
1.5.2 Autoregulatorische Rückkopplung	26
1.6 Klinische Relevanz von MDM2 vor allem in der Karzinogenese	27
1.6.1 MDM2 als Target in der Tumorbekämpfung	29
1.7 Die Rolle von MDM2 in der Niere	30
2 Hypothese	32
3 Material und Methoden	34
3.1 Geräte	34

3.2	Materialien	37
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	37
3.2.2	Immunologische Methoden	40
3.2.3	Histologische Methoden	40
3.2.4	In vitro Methoden	41
3.2.5	Chemikalien, Puffer und Lösungen	42
3.2.6	Verbrauchsmaterialien	44
3.2.7	Primer für die RT-PCR	45
3.2.8	Software	45
3.3	Methoden	45
3.3.1	Zellkultur	45
3.3.2	Molekularbiologische Methoden	49
3.3.3	Immunologische Methoden	52
3.3.4	Histopathologische Untersuchungen	55
3.3.5	Maus-Experimente	56
3.3.6	Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>)-Experimente	59
3.3.7	Statistische Analyse	66
4	Ergebnisse	68
4.1	Ergebnisse in den Zebrafischen: Kontrolle versus <i>Mdm2</i> -Knockdown mittels Morpholinos	68
4.1.1	<i>Mdm2</i> -Knockdown in Zebrafischen mittels Morpholinos gegen zMDM2 durch RT-PCR bestätigt	68
4.1.2	<i>Mdm2</i> -Knockdown in Zebrafischen führt zu Malformationen	69
4.1.3	<i>Mdm2</i> -Knockdown in Zebrafischen führt zu verminderter Nephrin Expression in den Podozyten	69
4.1.4	<i>Mdm2</i> -Knockdown in Zebrafischen führt zum Funktionsverlust der glomerulären Filtrationsbarriere	71
4.2	Ergebnisse in den Zebrafischen: Knockdown von Mdm2 und p53	75
4.2.1	Knockdown von p53 und Mdm2 in den Zebrafischen mittels RT-PCR bestätigt	75
4.2.2	Knockdown von p53 und Mdm2 führt zu keinen Malformationen	76
4.2.3	Knockdown von Mdm2 und p53 in den Podozyten führt zu einer vergleichbaren Nephrinexpression wie in der Kontrollgruppe	78

4.2.4	Die glomeruläre Filtrationsbarriere bleibt bei doppeltem Knock-down (Mdm2 und p53) intakt	79
4.3	Ergebnisse im Mausmodell	82
4.3.1	Kreuzung von MDM2 ^{flox/flox} ;Nphs2-cre+ Mäusen mit p53 ^{flox/flox} führt zu Podozyten-spezifischem Doppel-Knockout MDM2 ^{flox/flox} p53 ^{flox/flox} ; Nphs2-cre+ (MDM2 / p53 ^{Dpod})-Mäusen	82
4.3.2	Der doppelte Knockout rettet den vakuolisierenden Phänotyp . . .	83
4.3.3	Der doppelte Knockout führt zu einer höheren Zahl von WT-1/Nephrin positiven Podozyten im Alter von 3 versus 14 Wochen . . .	83
4.3.4	Der doppelte Knockout von p53 und Mdm2 in den Podozyten sichert die Funktionsfähigkeit der Filtrationsbarriere im Sinne einer verminderten Proteinurie	84
4.3.5	Knockout von p53 und Mdm2 in den Podozyten verlängert das Überleben	87
4.4	Ergebnisse in vitro	88
4.4.1	Mdm2-Knockdown führt zur Überexpression von p53 und p53-Zielgenen, die den Zellzyklus , Zelltod und Autophagie regulieren	88
4.4.2	Der doppelte Knockdown (p53+Mdm2) führt zu einem verminderten Zelluntergang	89
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	90
5	Diskussion	92
5.1	MDM2 als essenzieller Gegenspieler von p53 für das Überleben der Podozyten	93
5.2	Doppelter Knockout verhindert Überexpression	94
5.3	Regulierung der Aktivität von p53 durch MDM2	95
5.4	Bei Mdm2-Knockdown vermehrte Expression von Zielgenen, die Zelluntergangsformen induzieren	97
	Literaturverzeichnis	100

Abbildungsverzeichnis

1.1	Einteilung der Niereninsuffizienz	6
1.2	schematische Darstellung chronische Niereninsuffizienz	8
1.3	Makroskopischer Aufbau der Niere	10
1.4	Aufbau eines Glomerulus	11
1.5	Querschnitt eines Glomerulus	12
1.6	Aufbau der Filtrationsbarriere	13
1.7	Aufbau der Podozyten	16
1.8	Schematische Interaktion der Transmembranproteine	18
1.9	Podozytenfußfortsätze und ihre Veränderung bei renalen Erkrankungen .	19
1.10	Aufbau von p53	21
1.11	Die Signalkaskade von p53	23
1.12	Interaktion zwischen p53 und MDM2	26
3.1	Schematische Darstellung einer RT-PCR	53
3.2	Gen-Knockdown durch ein Morpholino	67
4.1	mRNA Level von Kontroll-Morpholino vs.MDM2-Morpholino	69
4.2	Morphologie des Zebrafisches 3dpf	70
4.3	Glomerulus einer CADE-Fischlarve (Kontroll-MO)	71
4.4	Glomerulus einer ET-Fischlarve 3dpf (Kontroll-MO)	72
4.5	Glomerulus einer CADE-Fischlarve (MDM2 Knockdown)	73
4.6	Glomerulus einer ET-Fischlarve 3dpf (MDM2 Knockdown)	74
4.7	Verlust vom fluoreszierenden DPB-EGFP Protein bei <i>Mdm2</i> -Knockdown	74
4.8	Visualisierung der Durchgängigkeit der Filtrationsbarriere	75
4.9	mRNA Expression befruchteter Zebrafischeier	76
4.10	Vergleich des Phänotyps von Fischlarven	77
4.11	Kein perikardiales Ödem bei zMDM2/zp53 Knockdown	78
4.12	Glomerulus einer ET-Fischlarve 4dpf (Ctrl-MO)	80

4.13	Glomerulus einer ET-Fischlarve 4dpf (MDM2 Knockdown)	81
4.14	Intensität des fluoreszierenden Proteins DBP-EGFP	81
4.15	Postglomeruläre Tubulusepithelzellen	82
4.16	Repräsentative Nierenschnitte von Mäusen	84
4.17	Zweifachfärbung von WT-1/Nephrin	85
4.18	Anzahl von WT-1/Nephrin-positiven Zellen im Alter von 3 und 14 Wochen	85
4.19	Ergebnisse der Proteinurie (8 Wochen)	86
4.20	Ergebnisse der Proteinurie (14 Wochen)	87
4.21	Überleben der Kontrollgruppe und der doppelten Knockout-Gruppe . . .	88
4.22	Expressionsniveaus von p53-Zielgenen	89
4.23	LDH Assay zur Quantifizierung des Zelluntergangs	90
5.1	Interaktionsmöglichkeiten von MDM2	99

Abkürzungsverzeichnis

ACE: Angiotensin- Converting Enzyme
cDNA: complementary Desoxyribonukleinsäure
CKD: chronic kidney disease
Cre: cyclation recombination
Ctrl: Controle
DEPC: Diethyl-Pyrocarbonat
DNA: Desoxyribonukleinsäure
DPB: Vitamin D-binding- Proteine
dpf: days post fertilization
EGFP: enhanced green fluroescent protein
ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EM: Elektronenmikroskopie
ESL: endothelial cell surface layer
ESRD: end stage renal disease
EZM: extrazelluläre Matrix
FSGS: fokal segmentale Glomerulosklerose
GBM: glomeruläre Basalmembran
GFP: green fluorescent protein
GFR: glomeruläre Filtrationsrate
LDH: Laktatdehydrogenase
LoxP: locus of X-ing in P1
LSM: laser scanning microscope
Mdm2: murine double minute 2
MO: Morpholino
mRNA: messenger Ribonukleinsäure
OD: optische Dichte
PAS: Periodic Acid Schiff

PBS: Phosphate buffered Saline
PCR: Polymerase-Kettenreaktion
PFA: Paraformalaldehyd
qPCR: quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA: Ribonukleinsäure
RT-PCR: Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RPMI: Rosewell Park Memorial Institute
SD: slit diaphragm
SEM: Standard of the Mean
wt1a/b: Wilms Tumor Gene

Zusammenfassung

MDM2 (Murine double minute 2 homolog) ist einer der Hauptnegativregulatoren des Tumorsuppressors p53. Ein Knockout von Mdm2 führt zu Veränderungen, die nicht mit dem Leben vereinbar sind. In den Versuchstieren, den Zebrafischen, führte es zu Malformationen, perikardialen Ödemen, Veränderungen der Glomerula, Proteinurie und einer damit einhergehenden verringerten Lebenserwartung. Somit bestätigte sich die Hypothese, dass MDM2 zur Aufrechterhaltung der Homöostase in der Niere notwendig ist um damit ein Überleben der Podozyten über den Zeitraum eines Lebens und die damit verbundene glomeruläre Filtrationsbarriere zu gewährleisten. Zudem zeigte sich in der genaueren Betrachtung der Zelluntergangsform, dass es nicht, wie vermutet, zu einer p53-induzierten Apoptose kommt, sondern Zielgene von p53 hochreguliert werden, die Zellzyklus, Zelltod und Autophagie kontrollieren. Es zeigte sich eine neue Form des p53-induzierten Zelltods, welcher der Paraptose ähnelt und somit als Podoptose bezeichnet wurde.

Zur Betrachtung der Rolle von MDM2 und p53 in den Podozyten wurde folglich ein doppelter Knockout von Mdm2 und p53 sowohl in den Zebrafischen als auch im Mausmodell durchgeführt. Dort konnten wir zeigen, dass durch die Durchführung des doppelten Knockouts zuvor gesehene Veränderungen bei singulärem *Mdm2*-Knockout nicht auftraten. Die Tiere zeigten ein signifikant verlängertes Überleben, es kam zu einer signifikant niedrigeren Ausprägung der Proteinurie und die zuvor gezeigten Veränderungen der Glomerula ließen sich nicht wiederholen. Somit konnte die Hypothese bestätigt werden, dass p53 und MDM2 wichtige Gegenspieler sind, die sich gegenseitig regulieren und beeinflussen. Dadurch ergeben sich auch potentielle Einschränkungen bei der Verwendung von MDM2-Antagonisten in der Tumorthherapie. Denn eine durch die Suppression von MDM2 induzierte reaktive Steigerung von p53 kann möglicherweise zu irreversiblen renalen Schädigungen und glomerulären Veränderungen führen. Podozytäre pathologische Veränderungen sind hierbei aufgrund der fehlenden Regenerationsfähigkeit nicht reversibel.

Podozyten benötigen sowohl MDM2 als auch p53 um das Gleichgewicht zwischen pro-apoptotischen und contra-apoptotischen Faktoren beizubehalten. Nur dadurch kann es seine Funktion als Bestandteil der glomerulären Filtrationsbarriere beibehalten. Nur dadurch kann eine progrediente Nierenfunktionsverschlechterung mit Entwicklung einer Glomerulosklerose und die Dialysepflichtigkeit als Endpunkt verhindert werden.

Abstract

MDM2 (Murine double minute 2 homolog) is one of the major negative regulators of the tumor suppressor p53. Knockout of Mdm2 leads to changes that are incompatible with life. In the animals that were experimented with, zebrafish, it resulted in malformations, pericardial edema, glomerular changes, proteinuria, and concomitant decreased life expectancy. Thus, it confirmed the hypothesis that MDM2 is required to maintain homeostasis in the kidney to thereby ensure survival of podocytes over a lifetime as well as to ensure the associated glomerular filtration barrier. In addition, closer examination of the cell death form revealed that p53-induced apoptosis does not occur as suspected. Instead the target genes are upregulated by p53 that control cell cycle, cell death, and autophagy. A new form of p53-induced cell death was revealed, which resembles paraptosis and was thus termed podoptosis.

Consequently, to consider the role of MDM2 and p53 in podocytes, we performed a double knockout of MDM2 and p53 in both zebrafish and mouse models. There, we demonstrated that by performing the double knockout, changes previously seen with singular MDM 2-knockout did not occur. The animals showed significantly prolonged survival, there was a significantly lower expression of proteinuria, and the previously shown changes in the glomeruli could not be repeated. Thus, the hypothesis that p53 and MDM2 are important counterparts, that mutually regulate and influence each other, was confirmed. This imposes potential limitations on the use of MDM2 antagonists in tumor therapy as a reactive increase in p53 induced by suppression of MDM2 could potentially lead to irreversible renal damage and glomerular changes. In this regard, podocyte pathological changes are not reversible due to the lack of regenerative capacity. Podocytes require both MDM2 and p53 to maintain the balance between pro-apoptotic and contra-apoptotic factors. Only by doing so, it can maintain its function as a component of the glomerular filtration barrier. And only this can prevent progressive renal function deterioration with development of glomerulosclerosis and the eventual need for dialysis.

1 Einleitung

1.1 Chronische Nierenerkrankung (CKD)

Chronische Nierenerkrankung oder auch genannt chronic kidney disease (CKD) bezeichnet die verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz in Graden bis zum Endstadium mit zum Teil Dialysepflichtigkeit (End stage renale disease, ESRD). Zur Einschätzung der verringerten Nierenfunktion betrachtet man dabei zum einen die errechnete glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und die Albuminausscheidung über den Urin [101]. Zudem muss die Funktionseinschränkung über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten vorliegen.

Grade	Beschreibung	GFR (ml/min/1,73m ²)	A1: Albuminurie <30mg/g	A2: Albuminurie 30-300mg/g	A3: Albuminurie >300mg/g
G1	normal oder hoch	>90	1	1	2
G2	milde Verschlechterung	60-89	1	1	2
G3a	mild bis moderat	45-59	1	2	3
G3b	moderat bis schwerwiegend	30-44	2	3	3
G4	schwerwiegend	15-29	3	3	4
G5	Nierenversagen	<15	4	4	4

Abbildung 1.1: Einteilung der Niereninsuffizienz nach Stadien anhand der GFR und Albuminurie modifiziert nach KDIGO (Kidney disease improving global outcome) [38]

Dadurch wird nur das Ausmaß der Funktionseinschränkung definiert (siehe Abbildung 1.2). Die Ursache lässt sich daraus nicht ableiten. Es gibt verschiedene Grunderkrankungen, die Risikofaktoren für Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz sind. Zu den häufigsten zählen hierbei der arterielle Hypertonus und Diabetes Mellitus. In Ländern, in denen Bluthochdruck und Diabetes Mellitus weniger häufig sind, gehören zu den Ursachen vor allem nephrotoxische Medikamente wie NSAR und Antibiotika, Infektionskrankheiten und Glomerulonephritiden [77]. Dabei ist die Filtrationsstörung in den

meisten Fällen auf die Entwicklung einer Glomerulosklerose zurückzuführen [117]. Für die Filtration sind hauptsächlich die Nephronen zuständig. Jeder Mensch besitzt circa 900 000 Nephronen (dabei gibt es allerdings große Schwankungen). Die Entwicklung dieser ist in der 36. Schwangerschaftswoche abgeschlossen. Danach werden keine neuen Nephronen mehr gebildet [14]. Daher ist zum Beispiel auch eine Frühgeburt oder ein niedriges Geburtsgewicht (unter 2500g) mit der Entwicklung einer CKD assoziiert [23] [86]. Im Falle einer Degeneration bzw. Schädigung von Nephronen, kommt es kompensatorisch zur Steigerung der einzelnen Filtrationsleistung der verbliebenen Nephronen (Hyperfiltration). Das wiederum führt zu Hypertrophie, Podozytenverlust und schließlich zur Glomerulosklerose [32]. Die Sklerose (Vernarbung von Bindegewebe) findet dabei in einem Teil des Nephrons, den Kapillarschlingen des Nierenkörperchens, statt. Sofern dieser Kreislauf durch Therapiemaßnahmen nicht unterbrochen wird, führt dies zu einem ständigen Verlust der Nephronen, einem Abfall der Filtrationsleistung und zuletzt zu einem terminalen Nierenversagen, welches eine Nierenersatztherapie in Form einer Hämodialyse, Peritonealdialyse oder Nierentransplantation erforderlich macht [102]. Es gibt viele weitere Erkrankungen bzw. Risikofaktoren, die zur Entwicklung einer Niereninsuffizienz beitragen können. Dazu zählen auch genetische Erkrankungen wie die polyzystische Nierenerkrankung, hämatoonkologische Erkrankungen wie das multiple Myelom, entzündliche Erkrankungen wie Pyelonephritiden oder Glomerulonephritiden oder obstruktiv bedingt durch zum Beispiel eine Nephrolithiasis. Auch ein akutes Nierenversagen kann durch eine irreversible Schädigung perspektivisch zu einer chronischen Niereninsuffizienz führen. In Abbildung 3.2 wird dies schematisch dargestellt.

Prädisponierende Faktoren zur Entwicklung einer Niereninsuffizienz sind zum Beispiel Schwangerschaft, ein geringes Geburtsgewicht, Alter, Übergewicht und genetische Faktoren [150] [129]. Klinisch ist eine Niereninsuffizienz meistens erst im fortgeschrittenem Stadium sichtbar. Dazu zählen unspezifische Symptome wie Müdigkeit, Belastungsdyspnoe, Konzentrationsschwierigkeiten oder Übelkeit. Durch den progredienten Nierenfunktionsverlust kommt es zur Volumenüberladung und einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), was zu Bluthochdruck führt. Des Weiteren führt der Erythropoetin-Mangel zur Anämie, der Vitamin-D-Mangel zu einem gestörten Calcium-Phosphat-Haushalt, Elektrolytentgleisungen zu kardialen Rhythmusstörungen und durch die verminderte renale Exkretion von Wasserstoffionen zur metabolischen Azidose. Die häufigsten Todesursachen bei chronisch Nierenerkrankten sind kardiovaskuläre Erkrankungen [150]. Die Therapie richtet sich nach der zugrundeliegenden Erkrankung und den Risikofaktoren.

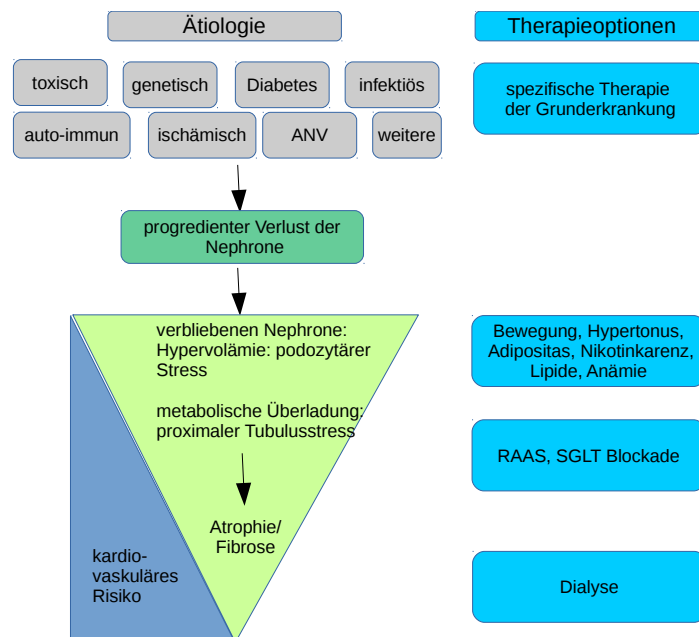


Abbildung 1.2: Ein Überblick über die Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz, die Pathogenese und das Endstadium; modifiziert nach [4]

Chronische Nierenerkrankungen sind eine relevante Erkrankung in unserer Gesellschaft. Da zum einen die weltweite Prävalenz aufgrund des demographischen Wandels steigend ist [28] und zum anderen durch den Ausfall der Nierenfunktionen sich ein potentiell lebensbedrohliches Krankheitsbild ergibt [52]. Allein die Erhebung von 1990 bis 2013 zeigte, dass die Anzahl verstorbener Patienten durch eine chronische Niereninsuffizienz um 135% angestiegen ist [1]. Himmelfarb J, *et al.* zeigte, dass die Zahl der Dialysebehandlungen weltweit 2010 noch bei 2,6 Millionen Menschen lag und 2030 bei circa 5,4 Millionen Menschen liegen wird [71]. 1990 lag die chronische Niereninsuffizienz noch auf Platz 27 der häufigsten Todesursachen, 2010 schon auf Platz 18 in der Global Burden of Disease Studie. Gesundheitsökonomisch belaufen sich die Kosten für Dialysen auf 5-7% des kompletten Budgets des Gesundheitswesens. Dagegen betrifft das Nierenversagen nur 0,1-0,2% der Bevölkerung [71]. Die Kosten in Deutschland für CKD, Nierenversagen und Versorgung von dialysepflichtigen Patienten lagen 2017 bei 4,73 Mrd Euro [56].

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass die Relevanz einer CKD für die medizinische Versorgung und auch die Gesellschaft zukünftig zunehmen wird [151], und auch für die Krankenkassen aufgrund der steigenden Kosten relevant ist [110]. Dies zeigt die zwingende Dringlichkeit nicht nur das Fortschreiten einer chronischen Niereninsuffizienz

zu verhindern, sondern auch die zugrundeliegende Pathogenese zu verstehen.

1.2 Aufbau, Struktur und Funktion der Niere

Die Niere ist ein paarig angelegtes, retroperitoneal gelegenes Organ, welches eine bohnenähnliche Form aufweist und im Durchschnitt folgende Größe besitzt: etwa 10–12 cm lang, 5–6 cm breit und 3–4 cm dick mit einem Gewicht von 120–200 g. Im Körper befinden sie sich links und rechts der Wirbelsäule auf Höhe des 12. Brust- bis 2. oder 3. Lendenwirbels. Die Funktionen der Niere sind vielfältig. Zum einen ist sie für die Ausscheidung von toxischen Endprodukten des Stoffwechsels, Harnproduktion, die Filtration, Reabsorption und Konzentration zuständig. Zum anderen ist sie an systemischen Regulationen, wie Wasser- und Elektrolythaushalt und Säure- Basen- Gleichgewicht, beteiligt. Darüber hinaus ist die Niere ein endokrines Organ, welches sowohl Renin als auch Erythropoetin produziert [68]. Dadurch ist sie auch in die systemische Blutdruckregulation und Erythropoese involviert.

Wie in Abbildung 1.3 zu sehen, unterteilt sich das Nierenparenchym in die Nierenrinde (Cortex renalis) und Nierenmark (Medulla renalis). Dieses wiederum besteht aus circa 7–12 kegelförmigen Pyramiden (Pyramides renales), wovon die Spitze als Nierenpapille (Papillae renales) in das Nierenbecken ragt. Die Papille enthält mehrere Öffnungen (Foramina papillaria), welche die Mündungen kleiner Gänge (Ductus papillares) darstellen [6]. Dadurch fließt der Harn in das Nierenbecken (Pelvis renalis).

In der Nierenrinde befindet sich die kleinste Funktionseinheit der Niere, das Nephron. Davon gibt es jeweils 1–1,4 Millionen. Folgende Bestandteile kennzeichnen das Nephron: das Nierenkörperchen (Corpusculum renale) und die Nierenkanälchen (Tubulus renalis). Die Nierenkörperchen lassen sich erneut unterteilen in den Glomerulus (Kapillarknäuel) und der Bowman- Kapsel (Capsula glomerularis) [6]. Abbildung 1.4 zeigt den Aufbau eines Glomerulus mit seiner Gefäßversorgung und der Bowman-Kapsel, sowie in der Vergrößerung die Filtrationsbarriere mit den Podozyten. Der Glomerulus besteht aus 30–40 parallelen, kapillären Schlingen. Für die Blutzufuhr zuständig ist die Arteriola glomerularis afferens, für den Blutabfluss die Arteriola glomerularis efferens. Diese beiden Arteriolen liegen dicht zusammen und bilden den Gefäßpol. Der gegenüber liegende Harnpol ist in das System der Nierenkanälchen geöffnet. Die Bowman- Kapsel umhüllt den Glomerulus, wobei das viszerale Blatt direkt den Kapillaren aufliegt und das pa-

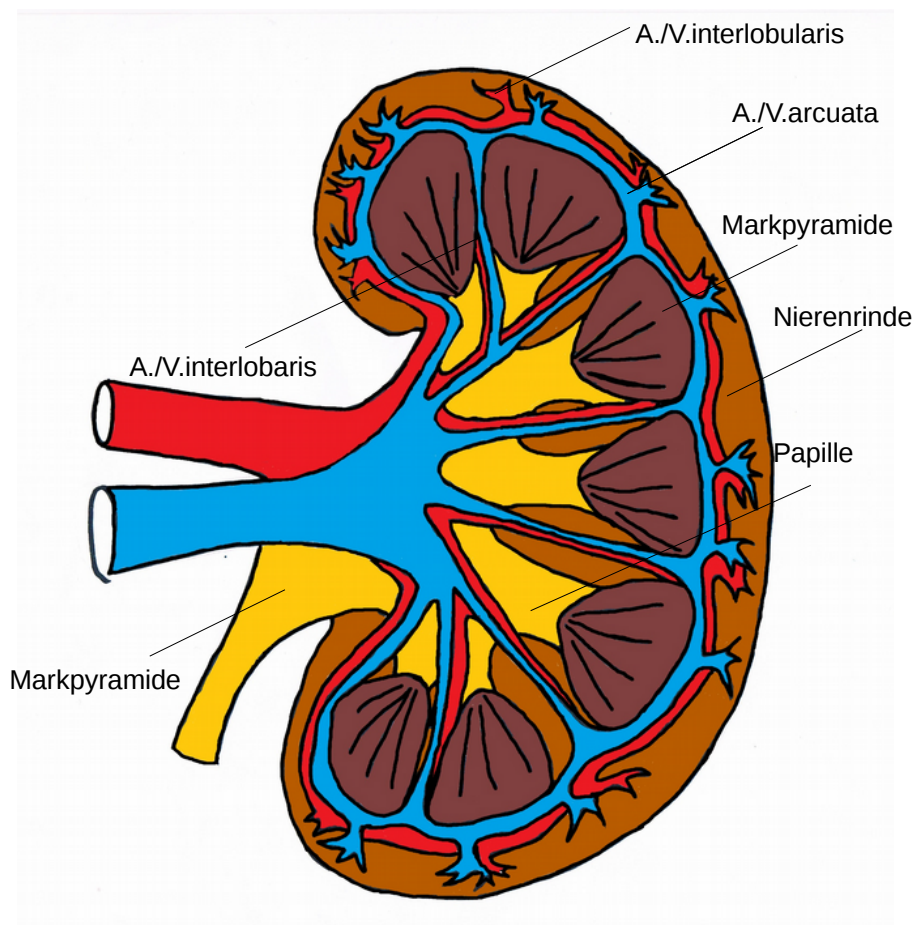


Abbildung 1.3: Makroskopischer Aufbau der Niere, modifiziert nach [6]

rietales zur Umgebung abgrenzt. Dazwischen liegt ein Spalt. Darin wird der Primärharn (150–180 Liter Primärharn täglich) als Ultrafiltrat des Blutplasmas abgegeben.

Der Wandaufbau der glomerulären Kapillarschlingen stellt einen wichtigen Bestandteil des Harnfiltersystems dar. Dieser besteht aus dem fenestrierten Endothel der Kapillarschlingen, deren Basalmembran und den Podozyten als Deckzellen [166].

In der Abbildung 1.5 wird ein schematischer Querschnitt eines Glomerulus dargestellt zur Veranschaulichung der Filtrationsbarriere. Das Nierenkanälchen schließt sich dem Harnpol an und übernimmt dort den Primärharn, welchen sie auf 1% seines Volumens konzentriert. Er lässt sich in folgende Abschnitte unterteilen: Am Harnpol beginnend der proximale Tubulus (unterteilt sich in einen gewundenen Teil- Pars convoluta proximalis und einen gestreckten Teil- Pars recta proximalis), gefolgt vom intermediären Tubulus

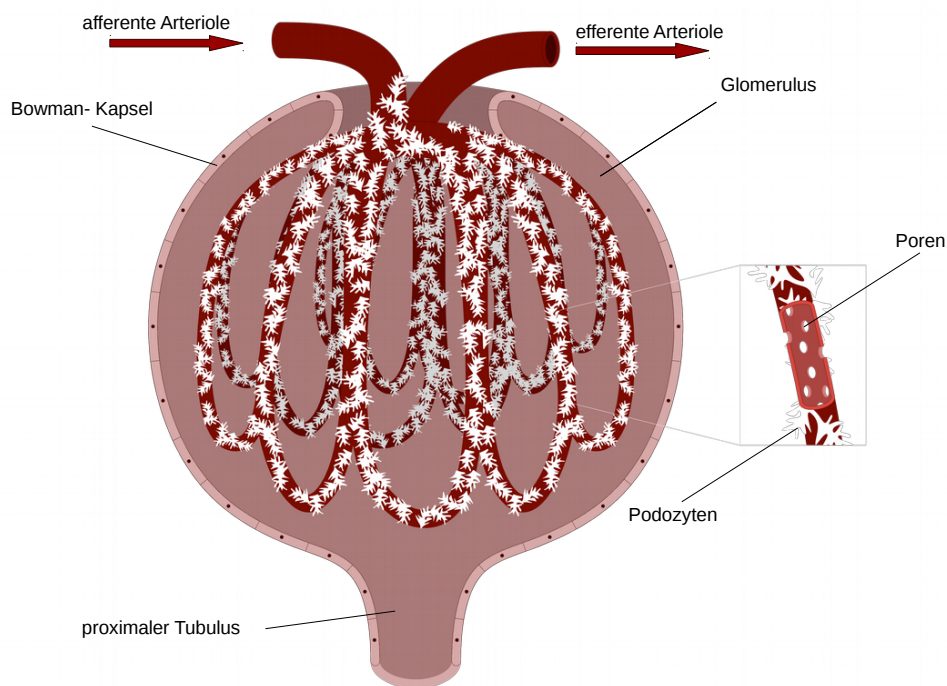


Abbildung 1.4: Aufbau eines Glomerulus; mit zuführender (afferenter) und abführender (efferenter) Gefäßversorgung, umgeben von der Bowman-Kapsel, Bildung des Primärharns in den Spalt; Vergrößerung des Glomerulus mit Podozyten und den Filtrationsschlitzen zwischen den Podozyten; modifiziert nach [6]

und distalen Tubulus, welcher schließlich in den Tubulus reuniens (Verbindungstubulus) mündet. Abgeschlossen wird das gesamte System vom Sammelrohr. Dabei liegen die gewundenen Tubulusanteile in der Rinde, wohingegen sich die geraden Abschnitte im Nierenmark befinden.

1.3 Die Filtrationsbarriere

Die für die Filtration zuständige Barriere besteht im Wesentlichen aus drei Komponenten: dem fenestrierten Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran und den

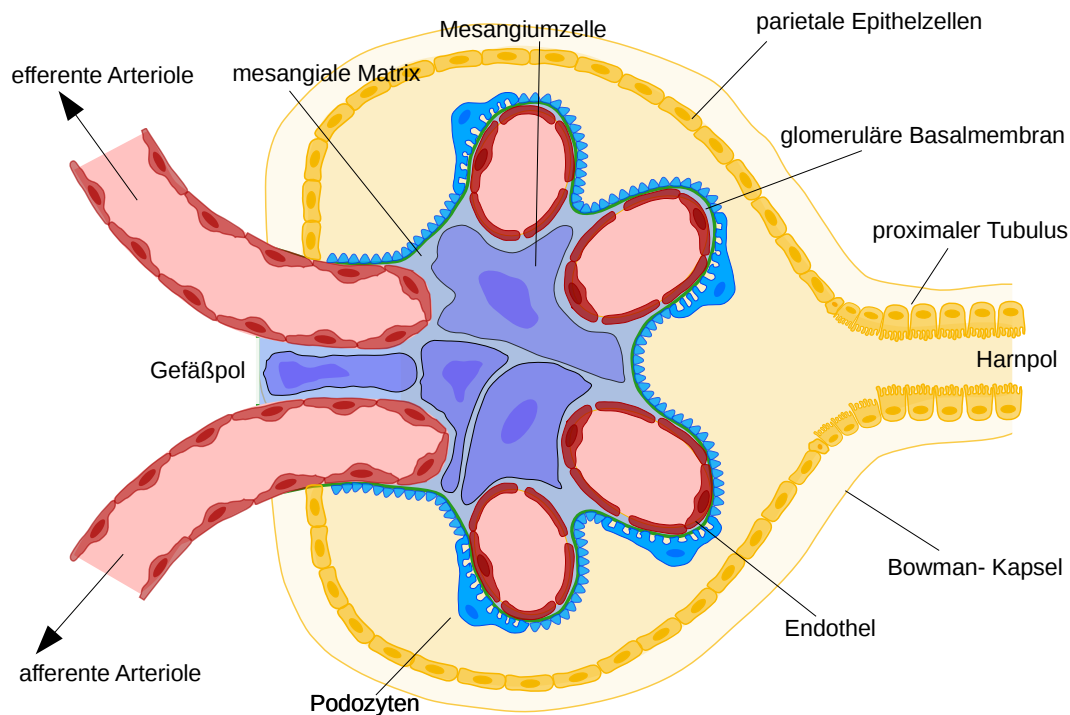


Abbildung 1.5: Schematischer Querschnitt eines Glomerulus: Die glomeruläre Filtrationsbarriere besteht aus dem fenestrierten Endotheln, der Basalmembran und den Podozyten, modifiziert nach [99]

Podozyten (viszeral glomeruläre Epithelzellen) (wie in Abbildung 1.6 zu sehen).

Sie ermöglicht die Filtration größerer Wassermengen, wobei nach Molekülgröße und wahrscheinlich auch nach Ladung sortiert wird. [136]. Die Selektivität anhand der Größe gilt ohne Zweifel, wohingegen die Auswahl nach Ladezustand noch Teil der Forschung ist. Zugleich verhindert sie den Verlust von Plasmaproteinen, wie Albumin, in den Urin [60]. Das erzeugte Filtrat wird Primärharn oder Ultrafiltrat genannt. Es beträgt pro 24 h circa 180 Liter oder 125 ml / min (das Maß der glomerulären Filtrationsrate, GFR) [64]. Dieser Vorgang findet passiv, d.h. ohne Energieaufwand statt und ist von folgenden Faktoren abhängig: dem effektiven Filtrationsdruck, der Filtrationsfläche und der Durchlässigkeit des Filters. Der effektive Filtrationsdruck wiederum wird vom hydrostatischen Druck in den Glomeruluskapillaren, dem hydrostatischen Druck in der Bowman- Kapsel und dem onkotischen Druck in den Glomeruluskapillaren bestimmt [64]. Bei den verschie-

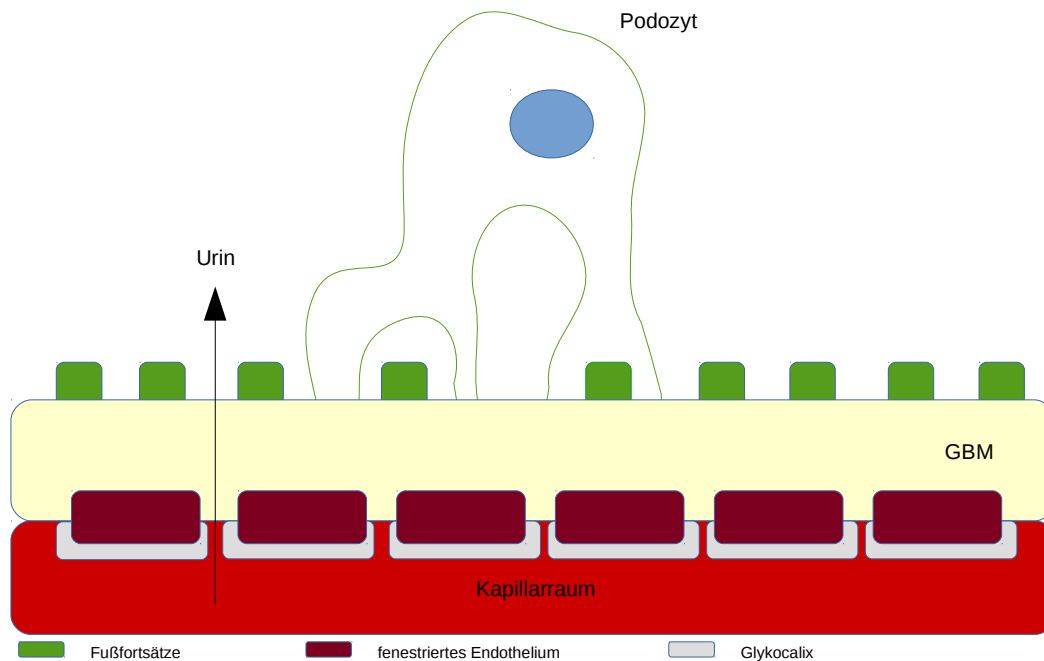


Abbildung 1.6: Aufbau der Filtrationsbarriere mit dem fenestrierten Endothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten; modifiziert nach [136]

densten Erkrankungen kann es zu einer Mitbeteiligung der Filtrationsbarriere kommen, was zu fortschreitenden renalen Erkrankungen bis hin zum Nierenversagen führen kann. Dabei ist die Funktionalität aller beteiligten Komponenten von Bedarf. Jedoch wurde den Podozyten in den letzten Jahren eine bedeutendere Rolle zugeschrieben [135]. Aufgrund dessen ist es wichtig die zuständigen Strukturen in ihrer Funktion und Aufgabe verstanden und erforscht zu haben.

1.3.1 Das fenestrierte Endothel

Die zum Gefäßlumen hin gerichteten Zellen werden als Endothel bezeichnet. Dabei gibt es in unserem Körper grundsätzlich drei verschiedene Arten von Endothel: das kontinuierliche, das fenestrierte und das diskontinuierliche. Der Unterschied liegt vor allem in der Durchlässigkeit des jeweiligen Endotheltyps. Dabei lässt das kontinuierliche, begünstigt durch Tight Junctions, keinerlei Stoffe hindurch. Der Stoffaustausch muss durch hochselektive Transportmechanismen geregelt werden (wie zum Beispiel in der Blut-Hirn-Schranke). Das diskontinuierliche Endothel hingegen ist wesentlich durchlässiger.

Es lässt zum Beispiel Zellen passieren. Zum Teil stehen die einzelnen Endothelzellen nicht miteinander in Kontakt. Ein Beispiel hierfür ist das Endothel der Leber. Das fenestrierte Endothel, welches sich in der Blut-Harn-Schranke befindet, bildet 20–50 % der inneren Oberfläche der Kapillaren und formt dabei eine antikoagulierende Grenze mit Poren von 70–100 nm zwischen dem Blut und dem Gewebe [131]. Da Albumin eine Größe von nur 3,6 nm besitzt, wurde davon ausgegangen, dass das Endothelium nicht zur Selektion anhand der Größe beiträgt [61]. Die Differenzierung in die unterschiedlichen Typen geschieht durch in situ Vaskulogenese. Dabei spielen unreife Podozyten eine entscheidende Rolle, da sie mithilfe von Faktoren wie VEGF-A [41] und Angiopoetin 1 [193] Signale zur Differenzierung senden. Die weitere Entwicklung führt dann über Rezeptoren auf Angioblasten, wie VEGFR2, Neuropilin-1 und Tie-2 zur vollständigen Differenzierung zum glomerulären Endothel [148]. Das Endothel ist in die ESL (endothelial cell surface layer) eingebettet, die aus den negativ geladenen Glykosaminoglykanen (GAG), Glykoproteinen und Membran-assoziierten und sezernierten Proteoglykanen besteht [61]. Mehrere Studien bestätigen die Annahme, dass die negative Ladung zur Selektion von Albumin und weiteren Plasmaproteinen beiträgt. Es konnte eine Korrelation zwischen verminderter Glykokalix und erhöhter Mikroalbuminurie festgestellt werden [30] [156] [62] [131]. Deshalb ist die Funktion des glomerulären Endothels, die von den negativ geladenen ESL umschlossen ist, wichtig zur Selektion.

1.3.2 Die glomeruläre Basalmembran

Die Basalmembran ist die Struktur, die sich zwischen dem fenestrierten Endothel und den Podozyten befindet. Sie trägt ebenfalls zur Selektion bei und beschränkt die Passage von Plasma. Renale Erkrankungen, wie zum Beispiel das Alport-Syndrom oder das Pierson-Syndrom, entstehen durch fehlende oder mutierte Bestandteile der Basalmembran. Die Basalmembran in der Niere ist im Vergleich zu den anderen im Körper relativ dick. Denn sie beträgt circa 240–370 nm, wohingegen ansonsten eine Dicke von 40–80 nm herrscht [61]. Sie besteht aus verschiedenen Komponenten wie dem Laminin-521, Kollagen Typ IV ($\alpha 3,4$ und 5), Nidogen-1/-2 und dem Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) [169]. Um die Funktion der Basalmembran besser zu verstehen, müssen die verschiedenen Komponenten beleuchtet werden. Laminin-521 besteht aus $\alpha 5$, $\beta 2$ und $\gamma 1$ -Ketten. Dies ist notwendig für die korrekte Filtration, da zum Beispiel β -spezifische Knockout-Mäuse eine massive Proteinurie entwickeln [130]. Genauso wie bei Patient*innen mit Mutationen in der $\beta 2$ -Kette. Dort entsteht das seltene Pierson-Syndrom,

welches mit einer perinatalen Proteinurie assoziiert ist [136]. Dies bestätigt, dass die Basalmembran einen wichtigen Teil zur Filtration beiträgt. Das Kollagen Typ IV stellt den größten Anteil der glomerulären Basalmembran (GBM) mit über 50% der Proteinmasse dar. Im Laufe der Zeit entwickelt es sich von der $\alpha 1, 2$ in der unreifen glomerulären Basalmembran zur reifen $\alpha 3, 4$ und 5. Diese Proteinketten bilden eine linksgängige Tripelhelix, welche durch Wasserstoffbrückenverbindungen stabilisiert werden. Ihre Rolle wird einem bei der Betrachtung des Alport-Syndroms bewusst. Dabei kommt es durch Mutationen im COL4A3, COL4A4 und COL4A5 zu einer Fehlbildung, die sich in einer verminderten Entwicklung vom unreifen GBM zum reifen GBM äußert [169]. Symptomatisch äußert sich dies in einer Hämaturie und Proteinurie. Heparan Sulfat Proteoglykane (HSPG) besitzen schwefelhaltige Seitenketten, welche eine negative Ladung verteilen und gleichzeitig mit einem Proteinkern verbunden sind. Obwohl Perlegran das häufigste HSPG in den Membranen ist, spielt vor allem Agrin in der GBM eine wichtige Rolle [118]. Durch die negative Ladung könnte erneut eine Ladungsselektivität vermutet werden. Allerdings führten Mausmodelle, in denen Agrin mutiert war, zu keiner Proteinurie [66]. Es gibt zwei Nidogen Proteine: Nidogen-1 und Nidogen-2. Aufgrund der früheren Entdeckung von Nidogen-1 ist darüber auch mehr bekannt. Es sorgt für die Verknüpfung von Laminin und Kollagen Typ IV. Aufgrund dessen wurde angenommen, dass ein Verlust von Nidogen gefährlich für die Formation der Basalmembran wäre. Allerdings konnte bei einer jeweils mutierten Nidogen Form keine Proteinurie festgestellt werden [128] [158]. Die Deletion beider Proteine hingegen führt zu einer perinatalen Letalität [119]. Die Betrachtung dieser verschiedenen Strukturkomponente zeigt, dass ein Verlust oder eine Mutationen in jedem noch so kleinen Bestandteil eine Pathologie nach sich ziehen kann.

1.3.3 Die Podozyten

Podozyten (aus dem Griechischen: Pous, Podos= „Fuß“; cytos= „Zelle“) oder viszeral glomeruläre Epithelzellen (VGEC) sind differenzierte Zellen innerhalb des Glomerulus. Mit ihrer Lage, dem Harnpol zugewandten Seite des Nierenkörperchens, bilden sie neben der Blut- Harn- Schranke auch die äußere Schicht der Filtrationsbarriere und das viszerale Blatt der Bowmann’schen Kapsel. Aufgrund ihrer Unfähigkeit zur Proliferation [90] und fehlenden Regeneration, im Gegensatz zu den meisten anderen Epithelien, birgt die Schädigung der Podozyten die Gefahr einer progredienten Niereninsuffizienz [127]. Daraus ergibt sich die außerordentliche klinische Relevanz der Podozytopathien. Podozyten

bauen sich aus drei Komponenten auf: dem Soma (=Zellkörper) und den primären und sekundären Zellfortsätzen [127]. Über die Zellfortsätze kommt es zu einer Verankerung an der GBM. Zwischen der GBM und den Podozytenzellkörpern gibt es keine Berührungspunkte, sie befinden sich im Ultrafiltrat des Kapselraumes [92] [175]. Die Abbildung 1.7 zeigt den schematischen Aufbau eines Podozyten und unter der elektronenmikroskopischen Betrachtung.

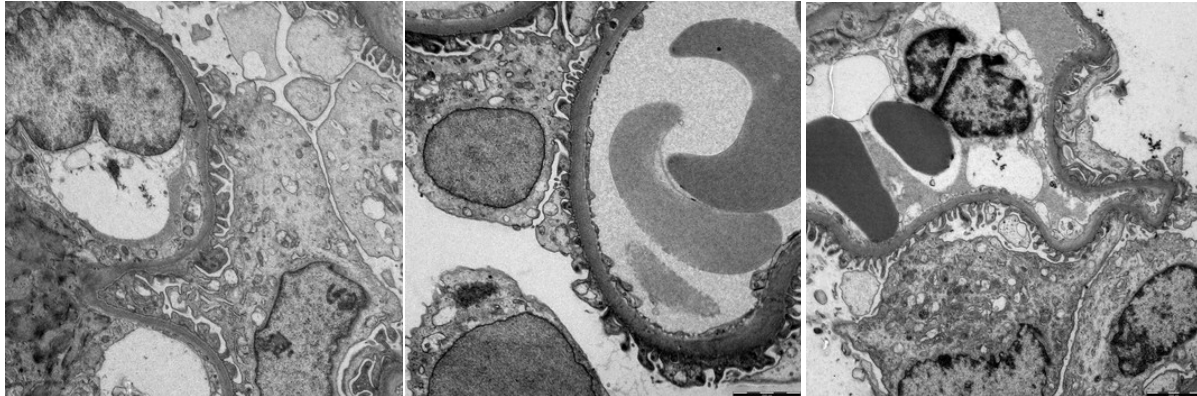


Abbildung 1.7: Aufbau der Podozyten; drei EM-Querschnitte mit Darstellung der Filtrationsbarriere mit Endothelzellen, glomeruläre Basalmembran, Fußfortsätze, Podozyten und Schlitzmembran

Dem Zellkörper entspringen die primären Zellfortsätze, die sich wiederum in kleinere, sekundäre Zellfortsätze aufspalten. Die sekundären greifen reißverschlussähnlich mit den sekundären Zellfortsätzen benachbarter Podozyten ineinander. Dadurch entsteht ein abdichtendes Netzwerk interdigitierender podozytärer Zellfortsätze, welche die Filtrationsschlitz bilden [8]. Dieser Spalt ist immer noch 30 bis 40nm breit [10] [189], sodass er von der Schlitzmembran abgedichtet wird.

Das podozytäre Zytoskelett

Der Aufbau des podozytären Zytoskeletts besteht aus drei verschiedenen Komponenten, zum einen den Mikrotubuli (24nm), den Intermediärfilamenten (10nm) und den Mikrofilamenten (7-9nm). Die Primärfortsätze bestehen aus dem Aktinskelett, den in Längsrichtung verlaufenden Mikrotubuli ohne einheitliche Polarität [36] [88] und Intermediärfilamenten. Diese wiederum sind aus Vimentin aufgebaut. Dahingegen besteht das Zytoskelett der sekundären Fußfortsätze aus Mikrofilamenten wie Aktin und Myosin, welche kontraktionsfähig sind. Der apikale Zellmembranbezirk besteht aus Proteinen

wie Podocalyxin [84], Podoplanin [115] und Podoendin. Diese Oberflächenproteine sind negativ geladen und verhindern damit den Durchtritt vom ebenfalls negativ geladenem Albumin. Nebeneinander liegende Podozyten stoßen sich gegenseitig ab.

Die Schlitzmembran

Die Schlitzmembran ist, wie eingangs schon erwähnt, notwendig zur „Abdichtung“ des extrazellulären Abstandes von 30-40nm zwischen den interdigitierenden Podozyten-Fußfortsätzen. Sie ist eine hochspezifische Zell-Zell-Verbindung. Bei Betrachtung unter einem Transmissions-Elektronen-Mikroskop (TEM) zeigt sich die reißverschlussähnliche („zipper-like“) Struktur [149]. Diese Schicht ist in ihrem Aufbau äußerst komplex aufgrund der zahlreichen Verbindungen, die zwischen den einzelnen Molekülen bestehen und damit eine dichte, heterogene Struktur bilden [149]. In der reißverschlussähnlichen Membran befinden sich Transmembranmoleküle mit extrazellulären Domänen wie P-Cadherin [164], dem Cadherin-ähnlichen Molekül FAT [75], das Protein Nep-1 [35] und Nephrin (NPHS1) [85]. Ein weiteres Transmembranprotein namens Podocin weist eine haarnadelähnliche Struktur auf. Im Gegensatz zu den anderen Transmembranproteinen hat es zwei zytosmatische Enden und wird nur in den Podozyten exprimiert [18]. Ein weiteres Protein ist CD2AP (CD2-assoziiertes Protein), welches im Zytoplasma lokalisiert ist und zur Befestigung von F-Actin der Zellen mit Nephrin und Podocin führt [100] siehe Abbildung 1.8.

Die wichtigsten und am besten erforschten Moleküle sind hierbei Nephrin, Podocin, FAT1, CD2AP, Nep-1 und P-Cadherin [107]. Mutationen, Schädigungen oder Verlust der Schlitzmembran-assoziierten Proteine führen zu einer Zerstörung der strukturellen und funktionellen Integrität der Schlitzmembran. Es folgt der Verlust der Filtrationsfähigkeit der Niere und damit einhergehend die Ausscheidung von hochmolekularen Proteinen über den Urin (=Proteinurie).

Funktion der Podozyten

Zu den Aufgaben der Podozyten gehört zum einen die Bildung der Proteine für die Schlitzmembran und der extrazellulären Matrix (EZM) der Basalmembran, zum anderen die Stützfunktion der glomerulären Kapillaren und die Bildung einer suffizienten

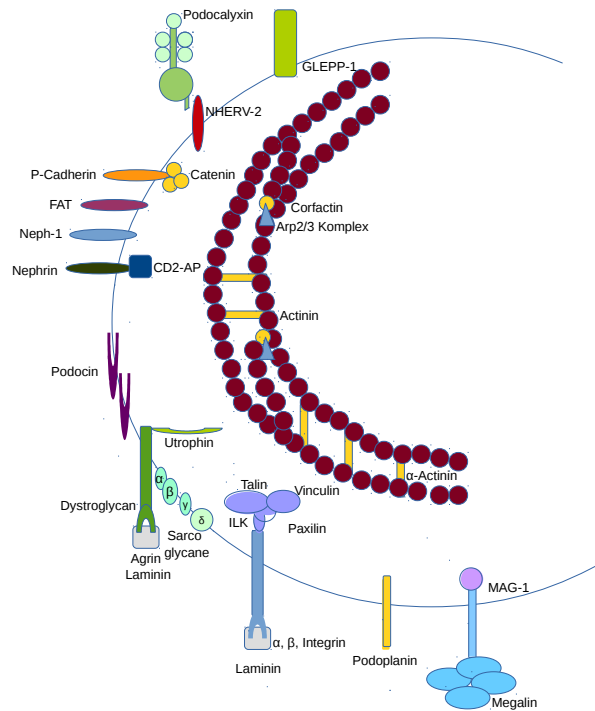


Abbildung 1.8: Schematisch wird die Interaktion der Transmembranproteine innerhalb der sekundären Podozyten- Fortsätze gezeigt, modifiziert nach [83].

Filtrationsbarriere [29] [113]. Dabei obliegt die Bildung der Proteine vor allem dem Soma des Podozyten, die Filterfunktion wird von den Fußfortsätzen übernommen. Das bedeutet, die Fußfortsätze bilden die Schlitzmembran, welche damit der äußerste und wichtigste Teil der glomerulären Filtrationsbarriere (GFB) ist. Aus dem Klinikalltag wissen wir, dass die Ursachen für glomeruläre Schädigungen vielfältig sind. Sie können allerdings auf eine einheitliche Änderung der Podozyten zurückgeführt werden [144], sodass Podozyten die Hauptverantwortlichen sind für den Beginn und den Progress renaler Erkrankungen [91]. Diese äußern sich klinisch in einer Proteinurie aufgrund des Verlustes der Filtrationsfunktion durch morphologische Veränderungen der Podozyten und der Schlitzmembran. Zu Beginn entsteht eine selektive Proteinurie. Das bedeutet, dass zuerst Albumin, welches bei intakter Filtrationsfähigkeit aufgrund der Größenselektivität gerade noch zurückgehalten wird, durch die Filtrationsbarriere tritt und somit im Urin vorzufinden ist. Weitere Schädigungen und damit einhergehende Umstrukturierungen der Podozyten führen zu einer unselektiven Proteinurie, sprich der Verlust von Makromolekülen. Diese eben genannte Umstrukturierung äußert sich in einer Hypertrophie der Podozyten und einer Verbreiterung der sekundären Fußfortsätze. Abbildung 1.9 veranschaulicht die morphologischen Veränderungen innerhalb eines Glomerulus bei

Entwicklung eines nephrotischen Syndroms.

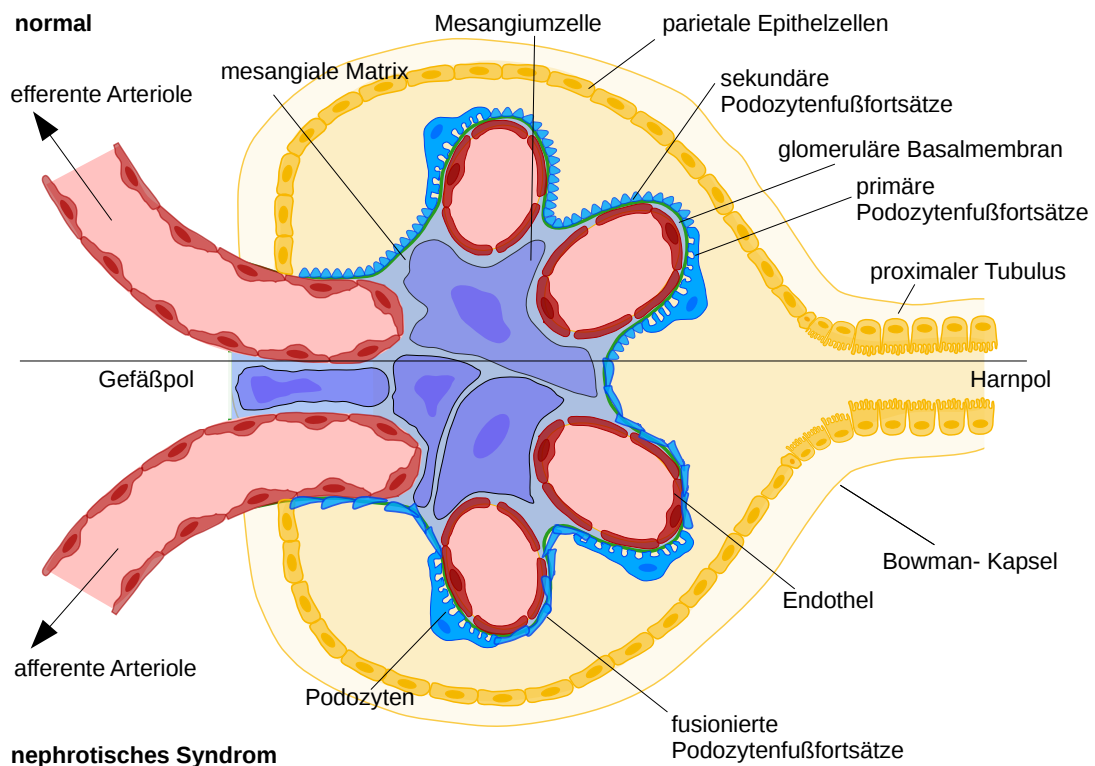


Abbildung 1.9: Podozytenfußfortsätze und ihre Veränderung bei renalen Erkrankungen
Glomerulus im Querschnitt: oben ein gesunder Glomerulus; unten morphologische Veränderungen bei renalen Erkrankungen, modifiziert nach [167]

Diese Hypertrophie entsteht, weil Podozyten die einzigen renalen Zellen sind, welche nach Beendigung der Organogenese zu keiner mitotischen Zellteilung mehr fähig sind [89] [146] und dadurch nicht regenerationsfähig sind. Vor einigen Jahren wurde jedoch herausgefunden, dass es im Gegensatz zur bisherigen Annahme (keine Podozytenproliferation- bzw regeneration in der adulten Niere) bei Verlust der Podozyten zu einer partiellen Regeneration kommen kann. Vor allem unter der Gabe von ACE- Hemmern [12], Kortikosteroiden [199] und einer guten Diabeteseinstellung [140]. Herausragend ist dabei die Erkenntnis, dass parietale Epithelzellen (PEC) eine bis dato unerkannte Fähigkeit haben sich zu Podozyten zu entwickeln [163] sowie zur Regeneration von Podozyten

beitragen [40]. Dies lässt die Hoffnung in Zukunft weitere Therapieverfahren zu entwickeln. Allerdings konnte ebenfalls gezeigt werden, dass diese Fähigkeit nur zum Tragen kommt, wenn es sich um akute podozytäre Schädigungen handelt oder im Rahmen von Wachstumsprozessen. Physiologische Degeneration von Podozyten aufgrund von Alter kann dadurch nicht verhindert werden [188]. Somit ist zusammenfassend zu sagen, dass Podozyten zwar aufgrund ihrer fehlenden ständigen Erneuerung, im Gegensatz zu anderen Zellen, eine deutliche längere Lebensfähigkeit haben, dies allerdings auch bedeutet, dass es einen langen Zeitraum gibt, in dem es zu Schädigungen kommen kann [192]. D.h., dass der Funktionsverlust ab einem gewissen Grad zu einer Glomerulosklerose [191] [87] über chronisches Nierenversagen (CKD) bis hin zur Dialyse und/oder Nierentransplantation führt. Somit ist es von außerordentlichen Bedeutung, die Funktionsfähigkeit der Podozyten, damit einhergehend die Filtrationsfähigkeit, zum Wohle und zur Gesundheit der Patient*innen aufrecht zu erhalten. Um einen Beitrag zum Verständnis der Aufrechterhaltung der podozytären Filtrationsfähigkeit zu leisten, untersuchten wir den aus der Krebsforschung bekannten Zellzyklusregulator p53 und seinen Gegenspieler MDM2.

1.4 Das Molekül p53

Das Molekül p53 wurde erstmals 1979 von zwei unabhängigen Forschungsgruppen entdeckt und beschrieben [96] [106]. Der Name entstand aufgrund der scheinbaren Molekülmasse von 53kDa, da es bei der Elektrophorese eine Bande auf Höhe von 53kDa schwerer Proteine bildet. In Wirklichkeit besteht die Molekülmasse aus 54kDa [106]. Zudem besteht es aus 393 Aminosäuren. Das TP53- Gen, TP steht hierbei für Tumor-suppressor, ist das dazugehörige Gen und liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17.p13.1) [114]. Es codiert für p53. Seine Funktion besteht darin bei Zellschäden den Zellzyklus zu unterbrechen und entweder eine DNA-Reparatur einzuleiten oder die Zelle zur Apoptose (den programmierten Zelltod) [95], Cyclophilin D mediated necrosis [178] oder Ferroptose [78] zu treiben. Aufgrund dessen wurde p53 1992 erstmals als „Wächter des Genoms“ bezeichnet [95]. Dieser Titel wird noch deutlicher, wenn man bedenkt, dass eine Mutation von p53 in 50% aller menschlicher Carcinome vorzufinden ist. Das erklärt seine medizinische Bedeutung und die Auszeichnung „Molekül des Jahres“ 1993 [11]. p53 wird ubiquitär exprimiert und hat eine Halbwertszeit von zwanzig Minuten [104]. Dadurch ist das Molekül instabil und einem ständigen Auf-und Abbau unterlegen um einen konstanten Spiegel in der Zelle zu halten. Für den proteasomalen Abbau ist MDM2 als

Hauptnegativregulator verantwortlich. Allerdings induziert p53 gleichzeitig die Bildung von MDM2, sodass ein Regelkreis entsteht [194].

1.4.1 Aufbau und Wirkung von p53

Der Aufbau von p53 entspricht dem Aufbau eines Transkriptionsfaktors. Es besteht aus verschiedenen Domänen wie einer Transaktivierungsdomäne, einer DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Bindungsdomäne, einer Oligomerisierungsdomäne und einer Carboxyterminalendomäne [44]. Die Abbildung 1.10 gibt eine Übersicht über den Aufbau von p53.

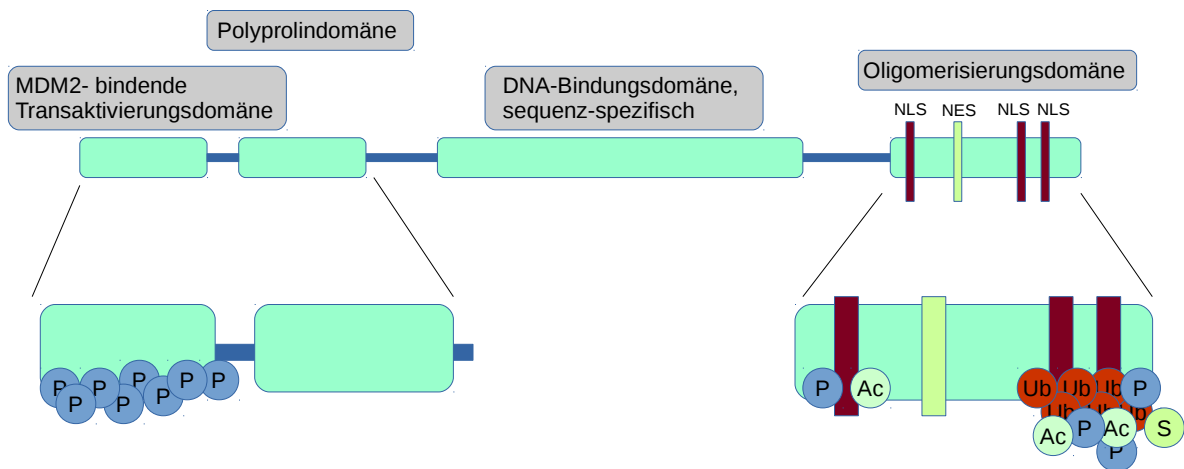


Abbildung 1.10: Übersicht über den Aufbau von p53, den verschiedenen Domänen und den Modifikationsmöglichkeiten. Ac = Acetylierung, NES = nukleäres Exportsignal, NLS = nukleäres Lokalisationssignal, P = Phosphorylierung, S = Sumoylierung, Ub = Ubyquitinierung; modifiziert nach [153]

Solange ein kontrollierter Zellzyklus herrscht, liegt p53 im Normalzustand gebunden mit MDM2 und weiteren negativen Regulatoren vor [9] [194]. Dabei blockt MDM2 die Transaktivierungsdomäne. Das wiederum führt zur Ubiquitinierung und einem proteasomalen Abbau. Eine Aktivierung von p53 und die daraus resultierende Wirkung kann man sich schematisch folgendermaßen vorstellen. Zuerst kommt es zur DNA-Schädigung durch genotoxischen und nicht genotoxischen Stress [183] [184] wie beispielsweise Chemotherapeutika, ionisierende Strahlung, Fehler in der DNA vor anstehender Zellteilung oder oxidativer Stress [202]. Daraufhin werden DNA-abhängige Proteinkinasen aktiviert, welche durch Phosphorylierung des N-terminalen Endes von p53 zu dessen Stabilisierung durch

posttranslationale Modifikation beitragen [5]. Das bedeutet, dass MDM2 die Transaktivierungsdomäne nicht mehr blockieren kann und es somit zu keinem Abbau von p53 durch MDM2 kommt [93]. Sprich, durch diese kovalente Modifikation wird p53 aktiviert und stabilisiert, wodurch sich die Halbwertszeit erhöht. Dadurch erhöht sich dessen Menge intrazellulär und akkumuliert [104] [138]. Nun liegt p53 frei vor und kann sich mit seiner DNA-Bindungsdomäne als Tetramer an die DNA anlagern [39] [104] [95]. Daraufhin kann p53 seine Funktion als Transkriptionsfaktor an p53-abhängigen Genen voll entfalten. Es kommt vorübergehend zu einem Zellzyklus-Arrest, dabei wird entweder eine DNA-Reparatur eingeleitet, oder einen dauerhaften Arrest induziert mittels Apoptose, Differenzierung oder zellulärer Seneszenz. In der Abbildung 1.11 ist die Kaskade schematisch dargestellt.

Welchen Weg die Zelle nimmt, hängt von der Höhe des intrazellulären p53-Spiegels ab. Vereinfacht gesagt, führen niedrigere Spiegel zu einem Zellzyklus-Arrest in der G1/S- und G2-Phase. Dort kann nun die DNA-Reparatur induziert werden. Irreparable Schäden führen zu einer höheren Akkumulation von p53, was wiederum zur Einleitung des programmierten Zelltods (Apoptose) führt [201] [143] [42]. Die Zielgene sind hierbei recht vielfältig und können je nach Wirkung in drei Gruppen eingeteilt werden:

- Um den Zellzyklus in Phase G1/G2 zu unterbrechen wird beispielsweise der Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor p21 induziert [153]. Zur Aufrechterhaltung des Zellzyklusarrestes finden sich 14-3-3sigma, GADD45 und BTG [50].
- Zur Einleitung der Apoptose führt die Aktivierung verschiedener endogener mitochondrialer Proteine wie Bax, Bak, NOXA, PUMA und p53AIP1.
- p53 fördert die Transkription von MDM2, indem es an zwei Abschnitte des Mdm2-Gens bindet [9] [139]. Das induziert den p53-MDM2-Regelkreis.

Zur Prävention zur Entstehung von Tumoren ist der p53-Signalweg folglich entscheidend. Kommt es zu einer Mutation von p53 kann dessen Funktion wie Kontrolle des Zellzyklus und der Zellproliferation nicht mehr gewährleistet werden [103]. Bei der Untersuchung der Tumore wurde festgestellt, dass die Hälfte aller Carcinome eine Mutation von p53 aufweisen [58]. Insbesondere eine Mutation in der DNA-Bindungsdomäne kodierenden Abschnitte des Moleküls [165]. Dies ist mit über 90% eine sogenannte missense Mutation, was bedeutet, dass es zum Austausch einer Aminosäure im p53-Protein kommt und dadurch die Funktion fehlerhaft ist [104]. Allerdings muss eine Mutation nicht zwangsläufig zu einer Krebsentstehung führen. Genauso wenig wie eine Nicht-Mutation zu keiner

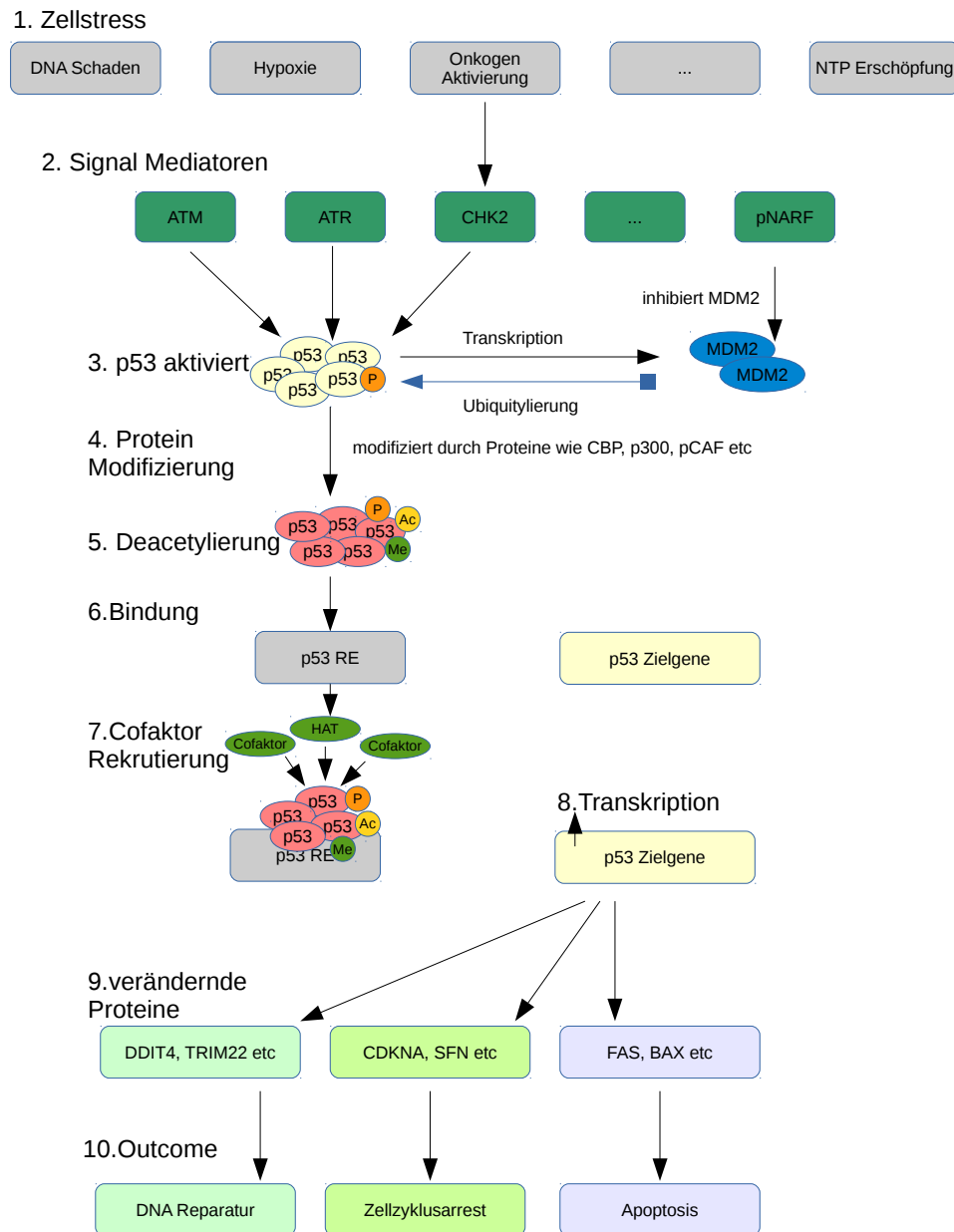


Abbildung 1.11: Die Signalkaskade von p53. Verschiedene Induktoren (Stress-Signale 1) werden über Signal-Mediatoren (2) weitergeleitet um schließlich p53 zu stabilisieren/aktivieren (3). Es folgen post-translationale Modifikationen (4 / 5), dann Bindung an Response-Elemente in den Promotoren (6), Rekrutierung von Co-Faktoren (7), Veränderung der Transkription der Zielgene (8) und unterschiedliche Produkte (9) führen von DNA-Reparatur bis Apoptose (10); modifiziert nach [147]

Krebsentstehung führt. Zum Beispiel gibt es Karzinome, die durch eine Überexpression von MDM2 (wie 1/3 aller Sarkome), Inaktivierung von p14ARF oder durch durchgehende Lokalisation im Zytoplasma (z. B., Mamma-Ca, Neuroblastom) zu einer Inaktivierung von p53 führen können [104] [185]. Vergleicht man zum Beispiel seröse Ovarialkarzinome mit Schilddrüsenmalignomen, erkennt man, dass erstgenannte in $> 90\%$ der Fälle eine Mutation von p53 aufweist, wohingegen bei zweitgenannten nur in $< 10\%$ der Fälle [49].

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass die p53-Defizienz zu einer zunehmenden Aggressivität, gesteigertem Wachstum und genetischer Instabilität bei der Entstehung von Tumoren beiträgt [15]. Experimentelle Studien an Mäusen bestätigten dies. Es zeigte sich bei Mäusen mit einem spezifischen *p53*-Knockout eine signifikant höhere Entwicklung von Tumoren [33]. Im Gegensatz dazu konnte auch gezeigt werden, dass bei Wiederherstellung von p53 es zu einem Rückgang des Tumorstwachstums kam [20] [43]. Erfolgreich erforscht und gezeigt wurde diese Annahme bei Tumoren wie Lymphomen, Sarkomen und Leberzellkarzinomen in Mäusen [182] [196]. Damit erkennt man die Möglichkeit zur Bekämpfung der Tumorgenese. Es macht p53 zu einem potenziellen Angriffspunkt. Damit rückt wiederum auch MDM2 in den Vordergrund als Hauptnegativregulator von p53 [179].

1.5 Das Molekül MDM2

Mdm2 (murine double minute 2) ist ein Gen [22], welches zum ersten Mal 1987 an der Howard Hughes Medical Institute erkannt und beschrieben wurde. Es kodiert das 489 Aminosäuren große, intrazelluläre Protein MDM2. Auch bekannt ist es unter dem Namen U3-Ubiquitin-Ligase. Große Bekanntheit erlangte MDM2 als sogenanntes Protoonkogen, da es als Gegenspieler von p53, einem Tumorsuppressor, dient und damit die Aktivität von p53 reguliert [67]. Die beiden Gegenspieler regulieren sich gegenseitig und bilden damit einen Regelkreis. Das Molekül p53 triggert die Bildung von MDM2, sodass ein Gleichgewicht zwischen pro-apoptotischen (p53) und contra-apoptotischen (MDM2) Stimuli auf die Zellen besteht [194]. Jones S.N., *et al.* zeigten 1995 was passiert, wenn das Gleichgewicht außer Kontrolle gerät. Ein homozygoter, generalisierter *Mdm2*-Knockout in Mäusen führte bereits in der embryonalen Entwicklung zur Letalität [79]. Dass dieser Phänotyp aufgrund der fehlenden Negativregulation durch MDM2 auftritt, zeigten Montes de Oca Luna, *et al.*. Durch den doppelten Knockout von Mdm2 und p53 in den

Mäusen konnte der Phänotyp komplett gerettet werden [31]. Dies zeigte, dass MDM2 ein Negativregulator von p53 ist und dadurch p53-bedingte Apoptose verhindert.

1.5.1 Interaktion zwischen p53 und MDM2- der Regulationskreis

MDM2 ist der Hauptnegativregulator von p53. Diese Aufgabe zur Kontrolle von p53 übernimmt er auf unterschiedliche Art und Weise. Es lassen sich, wie in Abbildung 1.12 dargestellt ist, drei Hauptmechanismen zur Regulation von p53 beschreiben:

1. Zum einen hindert MDM2 p53 an der Förderung der Transkription, indem es eine tiefe hydrophobe Tasche der N-terminalen Region von p53 blockiert. Damit wird die Transaktivierungsdomäne von p53 blockiert, es kommt zu einer Konfigurationsänderung und dadurch wird eine Interaktion mit dem Transkriptionsapparat verhindert [120] [97]. Das bedeutet, es erfolgt keine oder eine reduzierte Transkription p53-abhängiger Gene und folglich wird keine Apoptose oder Zellzyklusarrest induziert. Diese Blockade der Transkription wird auch Repression genannt [122] [24]. Die Bindung der beiden erfolgt nach dem Schlüssel- Schloss- Prinzip, weshalb es nur bei vorhandener Konformität und Hydrophobie funktioniert. Sprich, bereits kleine Veränderungen in den Aminosäuren der beiden Proteine können die Interaktion verhindern. Gezielt eingesetzt wird dieses Phänomen bei vorhandenen DNA-Schäden. Dabei wird eine Phosphorylierungskaskade in Gang gesetzt, welche wiederum beteiligte Aminosäuren phosphoryliert und damit keine Verbindung zwischen p53 und MDM2 mehr möglich ist [154] [82]. Dadurch wird die Regulationsfähigkeit von MDM2 gegenüber p53 unterbunden.
2. Zweitens exportiert MDM2 p53 vom Zellkern zum Zytoplasma und blockiert somit weitere p53-abhängige Transkriptionen [26]. Dies geschieht durch seine Funktion als E3-Ubiquitin-Ligase- Es wird an das C-terminale Ende von p53 Ubiquitin-Moleküle konjugiert. Bei Mono-Ubiquitinierung kommt es zum Export von p53 aus dem Zellkern [47] [152].
3. Drittens ist ebenfalls durch die E3-Ubiquitin-Ligase bestimmt. Diesmal erfolgt keine Mono- sondern eine Poly-Ubiquitinierung [105]. Es kommt zu einem direkten Abbau von p53 indem es von den Proteasomen erkannt wird [72] [67].

lungsmechanismus unterbrochen, indem p53 durch posttranslationale Mechanismen wie zum Beispiel Phosphorylierung akkumuliert und dadurch seine Funktion als Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor ausüben kann.

Dass dieser Mechanismus relevant ist, erkennt man bei der Entwicklung von Tumoren. Dort zeigte sich, dass eine nicht funktionierende Autoregulation zu einer Anhäufung von mutierten Proteinen in Tumorzellen führt [120]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass dies mit einer schlechten Prognose verknüpft scheint [133].

1.6 Klinische Relevanz von MDM2 vor allem in der Karzinogenese

Zusammenfassend ist MDM2 aufgrund seiner Funktion als Hauptnegativregulator von p53 maßgeblich an Zelltod und Zellproliferation beteiligt und damit auch am Überleben der Zellen. Dies konnte vor allem durch Knockout- Experimente gezeigt werden. In Tierversuchen mit *Mdm2*-Knockout zeigte sich eine embryonale Letalität [79] [31]. Dies ergibt sich durch den fehlenden MDM2- vermittelten Abbau von p53, welcher somit zur Akkumulation von p53 als Apoptose- induzierender Faktor führt. Diese Einflüsse sind mit einer Lebensfähigkeit der Embryos nicht vereinbar. Ein weiteres Beispiel sind Untersuchungen an Kardiomyozyten. Dort wurde ein zelltypspezifischer *Mdm2*-Knockout in murinen Kardiomyozyten induziert. Die Ergebnisse zeigten, dass es p53- vermittelt zu einem Zelluntergang führte. Aufgrund fehlender Kardiomyozyten kam es zum Herzversagen und zum Versterben in der Embryonalphase [53]. Diese Vermutung wurde anschließend bestätigt als man einen doppelten Knockout induzierte und p53 und *Mdm2* in den Kardiomyozyten herunter regulierte. Das Ergebnis war kein Herzversagen und damit kein Versterben in der Embryonalphase. Allerdings führt nicht nur zu wenig MDM2 zu einer pathologischen Entwicklung, sondern auch ein vermehrtes Vorkommen von MDM2. Man erkannte hierbei verschiedene Mechanismen die, die Tumorentstehung beeinflussen: ausgeweitete Translation, Genamplifikation [132], in ihrer Aktivität gesteigerte Transkription [176] und durch verminderten proteasomalen Abbau [51]. Sobald eine gesteigerte Aktivität von MDM2 zu verzeichnen ist, besteht die Befürchtung, dass dies zur Tumorentstehung und -entwicklung beiträgt. Dieser Verdacht ergibt sich aufgrund des Wissens bezüglich der physiologischen Regulation beziehungsweise Suppression des Tumorsuppressors p53 und der damit einhergehenden Kontrolle

über den Zellzyklus [2]. Sobald man die verschiedenen Tumore untersucht hat, stellte man überexprimiertes Mdm2 fest. Es folgt die Entstehung von Tumoren bereits in der frühen Entwicklung [109]. Folgende Tumore zeigen eine Überexpression von Mdm2: Weichteilsarkome, Osteosarkome, Rhabdomyosarkome, orale Adenokarzinome, kolorektale Karzinome, maligne Melanome und Mammakarzinome [49] [186]. Insgesamt wurden 19 verschiedene Tumorarten festgestellt, nachdem im Rahmen einer Studie 3500 Proben ausgewertet wurden [121].

Dort konnte auch gezeigt werden, dass meistens eine singuläre Mutation, sprich entweder p53 oder Mdm2 ist mutiert, vorliegt [121]. Diese Erkenntnis scheint logisch, wenn man bedenkt, dass eine Mdm2-Mutation nur dann einen entscheidenden Vorteil hat, wenn der Wildtyp von p53 vorliegt, auf den sie hemmend einwirken kann [81]. Des Weiteren gibt es mittlerweile auch viele Hinweise für p53- unabhängige Funktionen von MDM2 bezüglich Zellzyklusregulation, DNA- Synthese, Transkription oder Differenzierung [17] [111]. Dies zeigte sich ebenfalls in der Tumorforschung. Man fand überexprimiertes Mdm2, aber sowohl bei gleichzeitig vorliegendem mutierten als auch nicht mutiertem p53 [98] [27]. Dies lässt vermuten, dass überexprimiertes Mdm2 unabhängig von p53 zum zusätzlichen Wachstum beiträgt. Zum Beispiel beim Östrogen-abhängigen Mamma-Ca. Dort benötigt man einen p53- unabhängigen MDM2- Aktivierungsweg um die Zellproliferation in Gang zu setzen. Außerdem ist p53 nicht das Hauptziel von MDM2 [19]. Des Weiteren stellte man fest, dass MDM2 mit verschiedenen Zellzyklusregulatoren interagiert wie zum Beispiel Rb, E2F1, MTBP etc. Diese unterstützen dabei unabhängig von p53 den onkogenen Effekt von MDM2 [17] [111]. Es gibt weitere Hinweise für diese Hypothese. Zum Beispiel benötigt MDM2 p53 nicht für die Translation des anti-apoptotischen Protein XIAP, welches in Krebszellen akkumuliert [55]. Man weiß auch, dass MDM2 IGF 1-R negativ reguliert. Dieses wiederum schützt die Zellen vor Apoptose bei DNA-Schäden.

Zusammenfassend unterstützen sowohl p53-abhängige als auch p53-unabhängige Wirkungsweisen von MDM2 die Proliferation von Zellen mit DNA-Schäden, Tumorstadium oder Metastasenbildung. Für die vorliegende Arbeit war es zudem bedeutsam, dass sich in den Podozyten überproportional viel MDM2 befindet im Vergleich zu anderen Geweben [126]. Dadurch bestand die Annahme, dass MDM2 in den Podozyten eine außerordentliche Funktion übernimmt.

1.6.1 MDM2 als Target in der Tumorbekämpfung

Durch die gewonnenen Erkenntnisse über MDM2 und p53 und deren Interaktion ist verständlich, dass MDM2 als Target in der Tumorbekämpfung als vielversprechender Ansatzpunkt erkannt und erforscht wurde [161]. Die initiale Überlegung bestand darin, dass durch die Hemmung von MDM2 p53 in den Tumorzellen akkumuliert und damit die erwünschte Apoptose der unerwünschten Zellen einleitet [160]. Durch verschiedene Forschungsprojekte konnte bereits gezeigt werden, dass sich diese Hypothese bestätigt und auch erfolgreich ist [112] [182] [196]. Bei der Entwicklung der Ansatzpunkte machte man sich das Wissen über die Interaktion zunutze, sodass am Ende drei Ansatzpunkte verfolgt wurden um die Negativregulation von MDM2 auf p53 zu inhibieren:

- Durch Senkung der MDM2-Expression [25]
- Durch Hemmung der U3-Ubiquitin-Ligase [171] [197]
- Durch fehlende Interaktion von p53 und MDM2 [7]

Als attraktivster Ansatzpunkt stellte sich hierbei die Störung der MDM2-p53 Interaktion heraus. Das folgt aus dem bereits gut erforschten molekularen Aufbau der Bindungsstelle zwischen MDM2 und p53 [141] [94]. Dabei unterscheidet man zwei Antagonisten von MDM2: niedermolekulare Moleküle und kleine Peptide. In der Gruppe der niedermolekularen Moleküle sind vor allem die cis-Imidazoline, wie zum Beispiel Nutlin-1,2 und 3, Benzodiazepine und Spiro-Oxindole bekannt [134]. Dabei gehören die Nutline zu den wirksamsten und vor allem Nutlin-3 ist der Potenteste unter ihnen [180], da es die höchste Affinität zu MDM2 hat [159]. Nutlin-3 besteht aus zwei Teilen, Nutlin-3a als aktives Enantiomer und Nutlin-3b als inaktives Enantiomer. Die Wirkungsweise besteht darin, dass Nutlin-3 um die relativ tiefe p53- Bindungstasche auf der Oberfläche von MDM2 mit p53 konkurriert und damit den durch MDM2-induzierten Abbau von p53 unterbindet [80].

Zusammenfassend zeigten Experimente, dass das Tumorwachstum, wie zum Beispiel bei dem humanen Osteosarkom und Prostatakarzinom beendet wird [174], aber der klinische Einsatz dennoch fragwürdig ist, aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit und der Toxizität [21]. Daraufhin wurde die Entwicklung von Nutlin-ähnlichen Molekülen vorangetrieben, welche eine höhere Bioverfügbarkeit aufweisen und auch eine geringere Toxizität. Dabei kombiniert man Zytostatika und monoklonale Antikörper. Diese sind Bestandteil aktueller und bereits abgeschlossener Studien. Problematisch ist, dass bei

einer systemischen Applikation von MDM2- Antagonisten, sowohl Tumorzellen, als auch gesunde Zellen diesem Molekül ausgesetzt sind. Sodass die Wirkung auf die gesunden Zellen und damit potentiell destruierende Funktion zum einen gut erforscht werden müssen und zum anderen ein möglicherweise begrenzender Faktor der Tumorthherapie auf dem Gebiet der MDM2-Inhibitoren sind.

1.7 Die Rolle von MDM2 in der Niere

Die Rolle von MDM2 für die Homöostase in der Niere ist noch recht unbekannt. Vor allem das Zusammenspiel zwischen p53 und MDM2 in den Podozyten. Obwohl es im Vergleich zu anderen Geweben zu einer verstärkten Expressierung von Mdm2 in den renalen Epithelzellen, sprich auch den Podozyten, kommt [125].

Vorangegangene Untersuchungen zeigten folgende Funktionen von MDM2 in der Niere:

- Durch das bekannte Zusammenspiel zwischen p53 und seinem Hauptnegativregulator MDM2 kommt es bei Fehlregulationen zur Entartung. Konkret bedeutet es beispielsweise, dass eine übermäßige Inhibierung von p53 durch MDM2 zur Entstehung von Nierenzellkarzinomen beiträgt [74].
- Während der Organogenese spielt MDM2 für die physiologische Entwicklung der Nieren eine wichtige Rolle. Dies konnte verdeutlicht werden bei dem Versuch MDM2 nur in den Epithelzellen des Ureterursprungs zu deletieren. Dies führte zu einer Hypodysplasie der Nieren und schließlich zum postnatalen Versterben [69].
- Ebenfalls während der Organogenese führt eine Supprimierung von Mdm2 in den Vorläuferzellen der Nephrone zur Fehlentwicklung der Nephrone und damit einhergehend zu einer deutlich schlechteren Nierenfunktion [70].
- Anhand eines Ischämie-Reperusions-Modell konnte eine weitere Funktion von MDM2 gezeigt werden. Durch die Supprimierung von Mdm2 zeigte sich in diesem Modell reduzierte postischämische Entzündungen. Sodass MDM2 auch im Rahmen von renalen Entzündungsprozessen beteiligt ist [125].
- Bei weiteren entzündlichen Prozessen, wie bei einer rasch progressiven Glomerulonephritis, zeigt sich, dass weniger MDM2 zu einem milderem Verlauf der Glomerulonephritis führt [124].

- Bei Mausmodellen zur Untersuchung des systemischen Lupus erythematoses zeigt sich ebenfalls eine verringerte Krankheitsaktivität bei Suppression von Mdm2. Dies äußert sich auch in der verringerten Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe [3]. Sozusagen besteht eine proinflammatorische Komponente von MDM2.
- Eine weitere Funktion scheint zudem eine progenerative Wirkung, unter anderem auf die Tubuluszellen. In-vivo zeigte sich, dass es nach einer renalen Ischämie bei Suppression von Mdm2 zu einer verminderten Erholung des Tubulusepithels kommt [125]. Ein weiteres in-vitro Modell zur Erforschung des akuten Nierenversagens zeigte ebenfalls die beschriebene pro-regenerative Funktion [57].
- In den Podozyten hingegen bestätigt sich nicht die beschriebene pro-regenerative Funktion. Im Gegenteil, MDM2 führt zu einem verstärkten Verlust von Podozyten nach dessen Schädigung. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Podozyten nicht zur Zytokinese im Rahmen der Mitose fähig sind. Durch die Unterdrückung von p53 als Zellzyklus-Regulator durch MDM2 kommt es zur Einleitung der Mitose und damit zur Ablösung der Podozyten und letztendlich zu dessen Verlust. Dies bestätigt sich durch eine Suppression von Mdm2 im Modell einer Adriamycin-induzierten Nephropathie. Ein verlängertes Überleben beziehungsweise ein verminderter Verlust der Podozyten ist die Folge [126].

Durch vorangegangene Forschungsarbeiten konnte durch Suppression von Mdm2 dessen vielfältige Wirkungsweise zum einen in den verschiedenen Geweben und speziell im renalen Gewebe gezeigt werden. Durch die bekannte Funktion von MDM2 als Hauptnegativregulator von p53, stellte sich nun die Frage, welchen Einfluss zum einen das singuläre Ausschalten von Mdm2 in den Podozyten hat und zum anderen, ob die damit einhergehenden Veränderungen durch das doppelte Ausschalten, sprich von Mdm2 und p53, wieder aufgehoben werden können. Damit lag die Motivation für diese Arbeit vor.

2 Hypothese

Podozyten sind einer der wichtigsten Bestandteile der glomerulären Filtrationsbarriere. Sie sind vollständig differenzierte Epithelzellen, welche sich auf der äußeren Oberfläche der Glomerula befinden. Das besondere und auch gefährliche der Podozyten besteht darin, dass sie, im Gegensatz zu anderen Epithelien, keine Fähigkeit zur Proliferation beziehungsweise Regeneration besitzen [54].

Umso erstaunlicher erscheint es, dass Podozyten in der Lage sind, den ständigen glomerulären Filtrationsdruck, sowie den toxischen als auch immunologischen Herausforderung über das gesamte Leben eines Menschen standzuhalten. Welcher Mechanismus dahinter steckt, ist allerdings noch nicht verstanden. Dabei scheint es umso verständlicher, dass eine Vielzahl renaler Erkrankungen mit den Podozyten in Einklang zu bringen sind. Denn Glomerulosklerose ist oftmals auf Erkrankungen, Verlust und Untergang von Podozyten zurückzuführen [116] [191].

Durch den deutlichen Verlust an Podozyten, kommt es zur Ablösung der glomerulären Basalmembran und anschließend zur Adhäsion an die Bowmansche Kapsel. Dies ist insofern relevant, da Glomerulosklerose mit fast 90 % mit Abstand die häufigste Folge für die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz ist [192]. Dadurch spielt der Podozyt bei der Entstehung von chronischen Nierenerkrankungen eine zentrale Rolle [91]. Diese wiederum stellen eine Herausforderung für unser Gesundheitssystem dar, da sie zum einen weltweit eine steigende Prävalenz [37] haben und zum anderen teure, zeitaufwendige und komplexe Therapien benötigen [110].

Die E3-Ubiquitin Ligase murine double minute-2 (MDM2) ist der Hauptnegativregulator des Tumorsuppressors und Zellzyklus-Regulator p53. Es reguliert dessen proteasomalen Abbau. Eine Überexpression von MDM2 führt zum Tumorwachstum, daher werden MDM2-Gegenspieler bereits in der Bekämpfung von Tumoren eingesetzt. Während des akuten Tubulusschadens führt MDM2 zu einer Progredienz der Inflammation [125]. Wo hingegen p53 vor allem für die proregenerative Wirkung in der Heilungsphase zuständig

ist. Zusätzlich kommt es bei einer Verletzung der Podozyten zu einem weiteren Podozytenverlust durch MDM2, indem dieses den Zellzyklus umgeht und direkt in die Mitose eintritt [126].

In den Podozyten herrschen dennoch hohe Spiegel von MDM2 [126], wofür es bis dato keine Erklärung gibt. Daher stellten wir uns die Frage, benötigen Podozyten MDM2 um die Homöostase aufrechtzuerhalten? Sorgt MDM2 für einen engen Spielraum des proapoptotischen Tumorsuppressors p53 um vermehrten Zelluntergang zu vermeiden? Um unserer Hypothese nachzugehen, untersuchten wir das Zusammenspiel zwischen p53 und MDM2 in den Podozyten in den Zebrafischen und Mäusen.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Labor München

Elektronenmikroskop 1200EX
Elektrophorese
– Gel-Kammer MiniVE
– Spannungsquelle Power PAC 3000
ELISA-Reader GENios Plus
ELISA-Washer ELx50
Entwicklungsmaschine Curix 60
Eppendorf-/Falcon-Reaktionsgefäße
– (1,5ml, 2ml, 15ml, 50ml)
Inkubator Heracell 150
Inkubator Typ B5060
Kamera Canon S95
Konfokalmikroskop LSM 510
Homogenisator Ultra Turrax T25
Lichtmikroskop Leica DMRBE
Lichtmikroskop Leica Wild M10
LightCycler 480
Magnetrührer IKAMAG REO
Mikrotom HM 340E
pH-Meter WTW
Pipette
– Easypet
– Multipette Plus
– Pipetman (2, 10, 20, 100, 200, 1000µl)
– Pipetus
– Research Plus (30–300µl)
– Research Pro (5–100µl)

JEOL, Tokyo, JP

Amersham, Glattbrugg, CH
BioRad, München, DE
Tecan, Crailsheim, DE
BioTek, Bad Friedrichshall, DE
Agfa, Köln, DE

TPP, Trasadingen, CH
Heraeus Sepatech, Osterode, DE
Heraeus Sepatech, Osterode, DE
Canon, Tokio, JP
Carl Zeiss, Oberkochen, DE
IKA-Werke, Staufen, DE
Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Roche Life Science, Basel, CH
IKA-Werke, Staufen, DE
Microm, Heidelberg, DE
WTW GmbH, Weilheim, DE

Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf, Hamburg, DE
Gilson, Middleton, US
Hirschmann Lgeräte, Eberstadt, DE
Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf, Hamburg, DE

Pipettenspitzen Sapphire (10, 200, 1000µl)	Grainer Bio-One, Frickenhausen, DE
Photometer DU 530	Beckman Coulter, Fullerton, US
Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München, DE
Software LSM	Carl Zeiss, Oberkochen, DE
Sicherheitswerkbank	
– SterilGard Class II, Typ A/B3	Baker Company, Sanford, US
– Microflow Class II	Nunc, Wiesbaden, DE
Thermocycler UNO-II	Biometra, Göttingen, DE
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, DE
UV-Licht	Bachofer LG, Reutlingen, DE
Vortex Genie 2TM	Scientific Industries, Bohemia, US
Waage BP 110S	Sartorius, Göttingen, DE
Waage Mettler PJ 3000	Mettler Toledo, Gießen, DE
Waage Mettler P1200N	Mettler Toledo, Gießen, DE
Zählkammer Neubauer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Osterode, DE
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg, DE

Labor Greifswald

Autoklav	Systec V-95, Systec GmbH, Wettenberg, DE
Blotting Apparatur Semi Phor	Hofer Scientific, Instruments, San Francisco, US
Elektrophoresekammer Mighty Small 2 SE 250	Hofer Scientific; Instruments, San Francisco, US
Geldokumentationssystem INTAS Gel Jet	Imager System, Göttingen, DE
Kryotom Cryostat Microm HM 560	Thermo, Fisher Scientific, Reinnach, CH
Magnetrührer	JANKE und Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen, DE
Mikroinjektor Transjektor 5246	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Mikroskope	
– Axioskop	Carl Zeiss AG, Jena, DE
– Leica TCS SP5	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
– Stereomikroskop Stemi SV11	Carl Zeiss AG, Jena, DE
PCR Gerät Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Reinstwassersystem	Typ Clear- UV plus, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel, DE
Schüttler	
– Swip KS-10	Edmund Bühler, Hechingen, DE
– Heidolph Polymax 2040	Heidolph Instruments, Darmstadt, DE
Stromversorgungsgerät PS 500 XT DC Powersupply	Hofer Scientific Instruments, San Francisco, US
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Vortexer VF2	JANKE und Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen, DE
Waage 440-43N	Kern und Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE
Zentrifugen	
– Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
– Z36HK	Hermle Labortechnik, Wehingen, DE

3.2 Materialien

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

DNA-Isolation

QIAamp DNA Mini Kit
Proteinase K
PBND Puffer

Qiagen GmbH, Hilden, DE
Merck, Darmstadt, DE
2,5 ml 2 M KCl, 1 ml 1 M Tris-HCl,
0,25 ml 1 M MgCl₂, 10 ml 0,1 % Gela-
tine, 0,45 ml 100 % NP40, 0,45 ml 100 %
Tween-20; mit H₂O auf 100 ml auffüllen

Polymerase-Kettenreaktion

Master-Mix:
10 x PE-Puffer
1,25mM dNTPs
Taq-DNA-Polymerase
PCR-Optimizer
Primer
– MDM2 FLOX Forward
– MDM2 FLOX Reverse
– Cre Forward
– Cre Reverse

ThermoFisher, Waltham, US
Metabion GmbH, Planegg, DE
New England BioLabs, Ipswich, US
Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Metabion GmbH, Planegg, DE
5' -TGTGGAGAAACAGTTACTTC-3'
5' -CTGTGCTCCTTCACAGAG-3'
5' -AGGTTTCGTTCACTCATGGA-3'
5' -TCGACCAGTTTAGTTACCC-3'

Gelelektrophorese

Agarosepulver
Ethidiumbromid
Ladepuffer 6x
FastRuler Low Range DNA Ladder
1× TBE-Puffer

ThermoFisher, Waltham, US
Carl Roth, Karlsruhe, DE
ThermoFisher, Waltham, US
ThermoFisher, Waltham, US
108 g Tris, 55 g Borsäure, 5,84 g EDTA,
auf 10 l H₂O auffüllen

RNA-Isolation

PureLink RNA Mini Kit
RNase-Free DNase Set
β-Mercaptoethanol
100 % Ethanol

ThermoFisher, Waltham, US
Qiagen, Hilden, DE
Carl Roth, Karlsruhe, DE
Merck, Darmstadt, DE

cDNA-Synthese

5 x First strand Buffer	ThermoFisher, Waltham, US
25 mM dNTPS	GE Healthcare, Chalfont-Giles, GB
0,1 M DTT	ThermoFisher, Waltham, US
linear-Acrylamid	ThermoFisher, Waltham, US
Hexanucleotide-Mix	Roche Life Science, Basel, CH
Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
RNAasin©	Promega, Fitchburg, US
Superscript II (Reverse Transkriptase)	ThermoFisher, Waltham, US

Realtime-Polymerase-Kettenreaktion

Master Mix siehe oben Nano drop	PEQLAB Biotechnology, Erlangen DE
LightCycler 480 Real-Time PCR System	Roche, Basel, CH
Klebefolie	Roche, Basel, CH
LightCycler 480 Multiwell-Platte 96	Roche, Basel, CH

Primer		Metabion, Planegg, DE
MDM2	Forward	5'-TGTGAAGGAGCACAGGAAAA-3'
	Reverse	5'-TCCTTCAGATCACTCCCACC-3'
p53	Forward	5'-TCCGACTGTGACTCCTCCAT-3'
	Reverse	5'-CTAGCATTTCAGGCCCTCATC-3'
p21	Forward	5'-CGGTGTCAGAGTCTAGGGGAn-3'
	Reverse	5'-ATCACCAGGATTGGACATGG-3'
ATG5	Forward	5'-AACTGAAAGAGAAGCAGAACCA-3'
	Reverse	5'-TGTCTCATAACCTTCTGAAAAGTGC-3'
Becn	Forward	5'-GGCGAGTTTCAATAAATGGC-3'
	Reverse	5'-CCAGGAACTCACAGCTCCAT-3'
Bcl-xl	Forward	5'-GCTGCATTGTTCCCGTAGAG-3'
	Reverse	5'-GTTGGATGGCCACCTATCTG-3'
LC3A	Forward	5'-TTGGTCAAGATCATCCGGC-3'
	Reverse	5'-GCTCACCATGCTGTGCTGG-3'
LC3B	Forward	5'-CCCACCAAGATCCCAGTGAT-3'
	Reverse	5'-CCAGGAACTTGGTCTTGTCCA-3'
Casp1	Forward	5'-TCAGCTCCATCAGCTGAAAC-3'
	Reverse	5'-TGGAAATGTGCCATCTTCTTT-3'
Casp3	Forward	5'-TGCTGGTGGGATCAAAGC-3'
	Reverse	5'-TGAATCCACTGApGGTTTTGTTG-3'
Cdkn1c	Forward	5'-CTGAAGAGCCAGCCTCTCTC-3'
	Reverse	5'-TTCTCCGCAGTTCTCTT-3'
Flip	Forward	5'-GCTCCAGAATGGGCGAAGTAAAG-3'
	Reverse	5'-ACGGATGTGCGGAGGTAAAAAG-3'
Ripk1	Forward	5'-GAAGACAGACCTAGACAGCGGA-3'
	Reverse	5'-CAGTAGCTTCACCACTCGACTG-3'
Ripk3	Forward	5'-CTGTCAAGTTATGGCCTACTGGTG-3'
	Reverse	5'-GAACACGACTCCGAACCCCTC-3'
Fas	Forward	5'-CAGACATGCTGTGGATCTGG-3'
	Reverse	5'-CCTCAGCTTTAAACTCTCGGA-3'
Rb1	Forward	5'-GAACAGATTTGTCCTTCCCG-3'
	Reverse	5'-TCTTGTCAAGTTGGCTTCCA-3'
BAX	Forward	5'-GATCAGCTCGGGCACTTTAG-3'
	Reverse	5'-TTGCTGATGGCAACTTCAAC-3'
BAD	Forward	5'-GTACGAACTGTGGCGACTCC-3'
	Reverse	5'-GAGCAACATTCATCAGCAGG-3'
NOXA	Forward	5'-ACTTTGTCTCCAATCCTCCG-3'
	Reverse	5'-GAAGTCGCAAAAGAGCAGGA-3'
PUMA	Forward	5'-CACCTAGTTGGGCTCCATTT-3'
	Reverse	5'-ACCTCAACGCGCAGTACG-3'
18s	Forward	5'-GCAATTATTCCCATGAACG-3'
	Reverse	5'-AGGGCCTCACTAAACCATCC-3'

Kreatinin-Messung

Creatinine Kit

DiaSys, Holzheim, DE

3.2.2 Immunologische Methoden

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Mouse Albumin ELISA Quantitation Set
Beschichtungs-Puffer

Bethyl-Lab's, Montgomery, US
0,1M Natriumkarbonat: 7,13g, NaH-
CO₃, 1,59g Na₂CO₃, mit H₂O auf 1l
auffüllen, pH 9,5

PBS

80g NaCl, 11,6g Na₂HPO₄, 2,0g
KH₂PO₄, 2,0 g KCl, mit H₂O auf 10l
auffüllen, pH 7,0

Tween-20

Sigma-Aldrich, St. Louis, US

Bovines Serum Albumin

Sigma-Aldrich, St. Louis, US

Wasch-Lösung

PBS, 0,05 % Tween-20

Blocking-Puffer

PBS, 2 % BSA

TrisNaCl

6,06g Tris, 8,18g NaCl, mit H₂O auf 1l
auffüllen, pH 8,0

Proben-Verdünner

TrisNaCl, 1 % BSA, pH 8,0

TMB Substrate Reagent Set

BD Biosciences, San Diego, US

ELISA Stop Lösung: 2N H₂SO₄

Carl Roth, Karlsruhe, DE

3.2.3 Histologische Methoden

PAS-Färbung

Periodic Acid-Schiff-Kit

Sigma-Aldrich, St. Louis, US

Xylol

Merck, Darmstadt, DE

Immunfluoreszenz/Immunhistochemie

Anti-mouse Nephlin (Meerschweinchen)	Acris Antikörper, Herford, DE
Anti-mouse WT1 (Kaninchen)	SantaCruz Biotech, Santa Cruz, US
Anti-pig Alexa-488 (Ziege)	ThermoFisher, Waltham, US
Anti-rabbit Cy3 (Ziege)	Jackson IR Labs, West Grove, US
Anti-mouse MDM2 (Kaninchen)	Abcam, Cambridge, GB
Anti-mouse p53 (Kaninchen)	Vector Laboratories, Burlingame, US
Anti-rabbit Biotin (Ziege)	Vector Laboratories, Burlingame, US
Unmasking Solution	Vector Laboratories, Burlingame, US
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, US
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Ziegen-Serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
TRIS-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Avidin-Biotin Complex Reagenz	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
DAB	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Nickel(II)-Chlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
DAB-Färbelösung	200ml TRIS-HCl (37°C), 4ml DAB, 1ml NiCl ₂ , 500µl 3 % H ₂ O ₂
Methylgrün	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
VectaMount Permanent Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, US

3.2.4 In vitro Methoden

Zellkultur

Petrischalen/6-Loch-Platten	TPP ZKBedarf, Trasadingen, CH
Medium RPMI1640	ThermoFisher, Waltham, US
FBS	Biochrom KG, Berlin, DE
Penicillin/Streptomycin	PAA Labs, Pasching, AT
Sodiumpyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Sodiumbicarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
HEPES	ThermoFisher, Waltham, US
Trypsin / EDTA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Kollagen IV	Sigma-Aldrich, St. Louis, US

LDH-Messung/Stimulation

Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Life Science, Basel, CH
Pam3C	InvivoGen, San Diego, US
Nutlin-3	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Triton-X-100TM	Sigma-Aldrich, St. Louis, US

Zelllinien

Konditionell immortalisierte PECs	S.J. Shankland, Seattle, US
Humane primärisolierte PECs	P. Romagani, Florenz, IT
Humane GFP-LC3 Podozyten	T.Huber, Freiburg, DE

3.2.5 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Chemikalien

Agarose	SeaKem LE, Biozym, Hess. Oldendorf, DE
Aqua ad injectabilia	Delta Select, Dreieich, DE
Alkaline Phosphatase	Biorad Laboratories, Inc., München, DE
Bromphenolblau	Sigma- Aldrich, München, DE
Calciumchlorid	FLUKA Chemie AG, Buchs, CH
Calciumsulfat- Dihydrat	FLUKA Chemie AG, Buchs, CH
CHAPS	Roche Applied Science, US
Complete protease inhibitor	Roche Applied Science, US
DAPI	Sigma-Aldrich, München, DE
Dextran, Alexa Fluor 647-konjugiert10-kD	Invitrogen, San Diego, CA
dNTP- Mix	Life Technologies, NY, US
DMSO	Sigma- Aldrich, München, DE
DTT	Roche Applied Science, US
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, DE
EDTA	Sigma- Aldrich, München, DE
IPG- Puffer	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB
Magnesiumchlorid	FLUKA Chemie AG, Buchs, CH
β -Mercaptoethanol	Sigma- Aldrich, München, DE
Methanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, DE
Methylenblau	FERAK Berlin GmbH, Berlin, DE
Mowiol	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, DE
Natriumhydrogencarbonat	Sigma- Aldrich, München, DE
Natriumhydroxid	FLUKA Chemie AG, Buchs, CH
Oligo- dT Nukleotide	Life Technologies, NY, US
Paraformaldehyd	SERVA Feinbiochemica, Heidelberg, DE
Reaktionspuffer für RT- PCR	Life Technologies, NY, US
RNase Inhibitor	Life Technologies, NY, US
RNase	Life Technologies, NY, US

Saccharose	Sigma- Aldrich, München, DE
Seesalz	Red Sea Fish Pharm Ltd., Eilat, IL
Superscript Reverse Transcriptase	Life Technologies, NY, US
Thiourea	Sigma- Aldrich, München, DE
Tissue Factor	Tissue- Tek O.C.T.Compound, Stauf, DE
Tricain	Sigma- Aldrich, München, DE
Tris	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Triton X-100	Serva Feinbiochemica, München, DE
TRI- Reagenz	Sigma- Aldrich, München, DE
Wasser für RT- PCR, RNase frei	Sigma- Aldrich, München, DE

Zebrafischhaltung und -aufzucht

ArtemiaLarven	2 Messlöffel Artemia-Eier (Artemia nauplia spec.) 2 Messlöffel Seesalz (Coral Pro Salt) in 500 ml Leitungswasser unter Luftumwälzung 48 h inkubieren
E3 Medium für Embryos	60x, Stocklösung: 17,2 g NaCl 0,76 g KCl 2,9 g CaCl ₂ 4,9 g MgSO ₄ Die Stocklösung wird mit autoklaviertem Wasser auf 1 l gebracht. Anschließend stellt man den pH mit 1 M NaHCO ₃ auf 7,5 ein. Vor dem endgültigen Gebrauch wird erneut mit autoklaviertem Wasser verdünnt.
E3 Agarose	Zur Herstellung wird das fertige E3 Medium mit 2% Agarose vermischt. Anschließend unter ständigem Rühren mithilfe des Magnetrührers gleichmäßig erwärmt. Sobald alles vollständig aufgelöst ist, gibt man es in die sterilen Petrischalen und lässt es abkühlen.
Anlagenwasser	100x, Stocklösung: 15,0 g NaHCO ₃ 3,6 g Seesalz 1,68 g CaSO ₄ H ₂ O auf 2 l auffüllen
0,05 %ige Tricain-Lösung	Für die Konzentration von 0,5 mg/ml wird 5 mg Tricain (Ethyl-3 aminobenzoatmethansulfonat) in 10 ml E3 Medium gelöst.

Histologie

1x PBS	8,0 g NaCl 0,2 g KCL 1,44 g Na ₂ HPO ₄ 0,24 g KH ₂ PO ₄ H ₂ O auf 1 l auffüllen.
Blockierlösung	2 % FBS 2 % Rinderserum Fraktion V (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) 0,2 % Fischgelatine (Sigma-Aldrich, München), in PBS lösen, in kleinere Mengen aufteilen und bei -20 °C lagern.
Mowiol- Lösung	10 g Mowiol plus 40 ml PBS über Nacht durchmengen, 20 ml Glycerol zufügen und 8–10 h mixen. Daraufhin 15 min bei 15000 g zentrifugieren. aliquotieren und bei -20 °C zur Lagerung einfrieren.
4 % PFA	80ml destilliertes Wasser mit 4 mg Paraformaldehyd, nach Zugabe von 3 Tropfen NaOH (1N) auf 50 °C erhitzen. Es folgt 10 ml 10-fach PBS und H ₂ O bis 100ml erreicht sind. Lagerung bei -20 °C

3.2.6 Verbrauchsmaterialien

Blottingpapiere	Biorad Laboratories, Inc., München, DE
Deckgläser	Marienfeld Deckgläser Supe&Rior, Lauda-Königshofen, DE
50 ml Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson France S.A., Le Pont de Claix, FR
Femtotips	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Impfschlingen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Microloader Pipette Tips	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell, Bioscience GmbH, Dassel, DE
PAGEr Duramid Precast- Gels	Cambrex Bio Science Rockland, US
Papier, saugkräftig	Whatman Trockenblock, Fisher Scientific, Reinnach, CH
Rotilabo Einbettkassetten	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, DE
Safe- Lock Reaktionsgefäße 0,5;1,5 und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Sterilfilterspitzen 10; 100 und 1000 µl	Biosphere, Nümbrecht, DE
Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellkulturschale	Greiner Bio-One, Solingen, DE

3.2.7 Primer für die RT-PCR

Um den Knockdown von Mdm2 bzw p53 verifizieren zu können, verwendeten wir folgende Primer:

- MDM2(1)
- MDM2(2)
- p53
- NPHS1
- CTRB1
- Primer gegen Housekeeping Protein EF1alpha [172]
- RT-PCR 1 % Agarose-Gel plus 0,5 µg/ml Ethidiumbromid 0,5 g Agarose in 50 ml TBE (1x). Zuerst Erhitzen, dann abkühlen lassen und währenddessen rühren+ 2,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugeben.

3.2.8 Software

GraphPad Prism, Version 5.0

GraphPad Software, San Diego, California, US

Leica Applications Suite “Advanced Fluorescence”

Leica Mikrosysteme, Wetzlar, DE

3.3 Methoden

3.3.1 Zellkultur

Wir verwendeten konditionierte immortalisierte Zellen, sowohl murine als auch humane Podozyten. Dabei handelt es sich bei den humanen Podozyten um solche, die GFP-LC3 exprimieren. Diese wurden uns von Tobias Huber (Universität Freiburg, Freiburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Durch Bereitstellung bestimmter Kulturbedingungen zeigen die Zelllinien eine gewisse Proliferation. Die Differenzierung der Podozyten kann durch eine Erhöhung der Temperatur, von 33 °C auf 37 °C, und durch die Substraktion von IFN- γ (Interferon gamma) im Medium herbeigeführt werden. Herausragend dabei ist, dass die konditionierten, immortalisierten Zelllinien in vitro ein ähnliches

Differenzierungspotential beibehalten wie solche in vivo. Des weiteren produzieren sie auch in vitro viele bislang beschriebenen, von den Podozyten in vivo hergestellten Proteine [162].

Zellkultur von murinen Podozyten

Zellkulturmedium 33 °C 1640-RPMI, 10 % FCS, 1 % Penicillin (100 U/ml) /Streptomycin (100 mg/ml), 10 U/ml murines Interferon- γ (Sigma, München)

Zellkulturmedium 37 °C 1640-RPMI, 10 % FCS, 1 % Penicillin (100 U/ml) /Streptomycin (100mg/ml)

Trypsin / EDTA 0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA

Alle für die Podozytenkultivierung verwendeten Geräte müssen mit Collagen A beschichtet werden, in einer Konzentration von 0,1mg/ml. Da die Podozyten nicht sehr resistent sind, muss dieser relativ aufwendige Schritt zuvor durchgeführt werden. Die Gefäße wurden hierfür mit der Lösung eine Stunde bei 37 °C in den Inkubator gestellt. Danach wurde die restliche Lösung unter der Abzugshaube abgesaugt und anschließend mit PBS gespült.

Für die Proliferation von Podozyten wurden diese bei 33 °C in den Inkubator mit dem dafür vorgesehenen Medium (s. o.) in mit Kollagen beschichteten 6-well-Platten kultiviert. Das Medium muss jeden bis jeden zweiten Tag gewechselt werden. Anhand des Aussehens der Zellen kann man die verschiedenen Phasen, Proliferations- und Differenzierungsphase, unterscheiden. Nun wartete man bis circa 80-95 % Konfluenz erreicht wurde. Danach kann man die Zellen in einem Verhältnis von 1 : 10 passagieren. Das erfolgte folgendermaßen: zuerst wurde das Medium unter sterilen Konditionen abgesaugt. Daraufhin wusch man die Zellen mit PBS. Danach wurden sie mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei Zimmertemperatur inkubiert, wobei man den Ablösungsprozess der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Durch leichtes Schütteln können die Zellen dabei fast vollständig abgelöst werden. Bei Erreichen dieses Schrittes, wird das Trypsin mithilfe eines hierfür hergestellten, gebrauchsfertigen Mediums (35ml) inaktiviert. Nun pipettierte man die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon-Röhrchen und zentrifugiert dieses für fünf Minuten bei 2300 rpm. Der dabei entstandene Überstand wurde danach abgesaugt. Die Zellen wurden mit dem Medium erneut vermischt und wieder im Verhältnis 1 : 10 passagiert. Nun konnte man entscheiden, ob man sie entweder erneut bei 33 °C kultivieren möchte, oder bei 37 °C mit 5 % CO₂ und keinem IFN- γ ausdifferenzieren lässt. Diese Phase

betrug circa zehn Tage. In dieser Zeit bildeten die Podozyten ihre charakteristischen Fortsätze. Danach konnte man die Zellen für weitere Experimente verschiedenster Art verwenden.

Zellkultur von humanen Podozyten Zellkulturmedium: 1640-RPMI, 10 % FCS, 1 % ITS, 1 % Penicillin (100 U/ml)/ Streptomycin (100 mg/ml) Trypsin / EDTA: 0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA

Lediglich die Medien unterschieden sich bei den murinen und humanen Podozytenzelllinien. Auch die humanen Podozyten wurden bei 33 °C proliferiert, in 10 cm Zellkulturschalen (TPP, Trasadingen, Schweiz) und die Differenzierungsphase findet bei 37 °C auf 6-Well-Plattern oder 10 cm Zellkulturschalen statt, welche ebenfalls zuvor mit Collagen A beschichtet wurden. Die Konditionen für die Podozyten wurden schon beschrieben [155].

Einfrieren und Auftauen der Podozyten

Medium zum Einfrieren: RPMI 1640-Medium mit 10 % FBS und 6 % DMSO Medium zum Auftauen: RPMI 1640-Medium mit 10 % FBS, 1 % PS und 50 U/ml IFN- γ

Hierbei nahm man die konfluierenden Zellen in der Proliferationsphase und wusch sie wie bei der vorhergehenden Methode mit PBS (phosphate buffered saline). Danach wurden sie mit Trypsin/EDTA von dem Kulturboden gelöst und anschließend zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wurde mit dem Medium (s. o.) resuspendiert. Als nächsten Schritt pipettierte man einen Milliliter der Suspension in ein Kryoröhrchen. Dieses beschriftete man mit Zellanzahl, dem Datum und die Anzahl der bisher vorgenommenen Teilungen der Zelllinie. Danach stellte man alle Röhrchen in eine Kryobox, welche wiederum bei -80 °C gelagert wurde. Sobald man die Zellen wieder auftauen möchte, bereitete man eine mit Collagen A beschichtete Kulturflasche her. Danach entnahm man die Kryogefäße der kalten Umgebung und ließ sie im Wärmebad bei 37 °C auftauen. Danach wurden sie für fünf Minuten bei 2300 rpm zentrifugiert. Das gebildete Pellet wurde in die Kulturflasche pipettiert und mit oben genanntem Medium resuspendiert. Erneut wurden die Podozyten in Brutschrank bei 37 °C zur Proliferation gelagert.

Zellzählung

Die Zählung der Podozyten erfolgte mit einer Zählkammer nach Neubauer. Das Prinzip hierbei ist, dass man zwei Deckplatten übereinander hat, eine etwas dickere Grundplatte, welche auf ihrer Oberfläche Strichmarkierungen enthält und einen Objektträger, welcher darüber befestigt wird. Nun pipettierte man das Medium mit den Podozyten hinein. Das Volumen ergab sich nun durch die Markierungen auf der Grundplatte und den Abstand dieser zur Unterseite des Objektträgers. Das ergab einen Raum, welcher die eigentliche Zählkammer darstellt. Nun wurden die lebenden Zellen unter dem Mikroskop gezählt und dann wurde gemäß Formel 3.1 die Gesamtzahl der in dem Medium befindlichen Podozyten bestimmt.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Milliliter}} = \frac{\text{Gezählte Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \cdot \text{Verdünnung} \cdot 10^4 \quad (3.1)$$

Stimulation der Podozyten

Für die Stimulationsversuche als auch für die RNA (Ribonukleinsäure) Extraktion wartete man bis die Podozyten mit einer Konfluenz von 90–95 % ausdifferenziert sind (nach mindestens 10 Tagen bei 37 °C ohne IFN- γ). Dafür benutzten wir erneut das RPMI-Medium mit 10 %FBS. Die Menge des Mediums unterschied sich dabei in welchem Gefäß man die Podozyten wachsen lässt (6-well Platten mit 2ml Medium, 12-well-Platten mit 1ml und 24-well-Platten mit 0,5ml). Für die RNA Extraktion wurden die Podozyten 24–48h mit 25 nM siRNA inkubiert mithilfe von Lipofectamin RNAiMAX Transfektionsreagenz (Life technologies, Darmstadt, Deutschland). Des Weiteren wurde auch spezifische siRNA zur Reduktion von murinen und humanen MDM2 oder murinem p53 verwendet (Ambion, Life Technologies).

Lactatdehydrogenase-Assay

LDH (Laktatdehydrogenase) ist ein Enzym, welches sich nur intrazellulär befindet und ubiquitär vorhanden ist. Es ist unter anderem am Energiestoffwechsel beteiligt. Bei Zerfall von Zellen wird LDH freigesetzt. Bei dem LDH-Assay wird mittels enzymatischem Nachweisverfahren dieses durch Zellzerfall freigesetzte LDH nachgewiesen. Dadurch kann ein Zelluntergang quantifiziert werden. Wir untersuchten damit die Podozyten-Zelllinien

in vitro bei Knockout von Mdm2 und doppeltem Knockout von p53 und Mdm2, sowie einer Kontrollzelllinie. Dafür wurden 250 µl der Zelllinien genommen und bei 25G 10 Minuten zentrifugiert. Nun wurden je 100 µl auf die 96-Loch-Mikrotiterplatte gebracht, Kontrollen und Proben wurden mindestens doppelt genommen. Daraufhin wurden weitere 100 µl der Reaktionslösung des LDH-Kits (Roche), welche zuvor vorbereitet wurde, aufgetragen. Es folgte eine 15-30-minütige Inkubationszeit im Dunkeln. Anschließend wurde mithilfe einer Absorptionsmessung bei 492nm Wellenlänge ausgewertet.

3.3.2 Molekularbiologische Methoden

RNA-Isolation aus Gewebe und Zellkulturmaterial

Die RNA wurde entweder aus Zellkulturmaterial oder aus dem Gewebe gewonnen und mithilfe des RNeasy-Kit von Qiagen isoliert. Die Arbeiten fanden an einem RNasefreien Platz statt. Die Proben und sämtliche Zwischenprodukte wurden während des Versuchs ständig auf Eis gelagert, da RNA sehr instabil ist. Die für den Versuch verwendeten Gefäße wurden zuvor mit DEPC (Diethyl-Pyrocbonat) behandelt.

Zelllyse

Für die Zelllyse benötigte man einen Lysepuffer, der aus β -Mercaptoethanol und RLT-Lysepuffer im Verhältnis 1 : 100 bestand. Bei der Herstellung von RNA aus Zellkulturen saugte man zunächst das Medium aus den Platten ab. Danach wusch man zweimal mit PBS. Daraufhin gab man 350 µl von dem Lysepuffer in eine Vertiefung. Falls mehr Zellen vorhanden waren, konnte es möglich sein, dass man mehr Lysepuffer benötigte. Nun wurde jede Vertiefung mithilfe einer umgekehrten Pipettenspitze leicht abgekratzt, sodass sich alle Zellen lösen. Bei Entnahme wurde mit der Pipette immer wieder vor und zurück pipettiert, damit die Zellen platzen. Entweder wurden die lysierten Zellen in ein DEPC- Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und eingefroren (bei -20 °C) oder man verarbeitet es direkt weiter zu RNA.

Das Nierengewebe musste zuerst mithilfe einer Rasierklinge zu einem Brei zerschnitten werden (währenddessen lagert man es auf Eis). Danach wurde es ebenso mit 350 µl RTL-Puffer versetzt und eine halbe Stunde auf dem Rüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

RNA-Isolation

Hierfür wurde ein PureLink RNA Mini Kit (ThermoFisher) verwendet. Zuerst wurden die Proben mit 70 % Ethanol (in DEPC-Wasser) im Verhältnis 1 : 1 gemischt (meistens 350 µl). Mithilfe der Pipette wurden diese beiden Komponenten vermischt und anschließend auf eine Filtriersäule transferiert und bei 10.000 rpm 30 Sekunden lang zentrifugiert. Durch das Filtriersystem befand sich nun die RNA in der Membran und die überschüssige Flüssigkeit im unteren Gefäß, welche entsorgt werden konnte. Als nächsten Schritt möchte man nun Ethanol und Reststoffe auswaschen. Hierfür vermischte man 350 µl RW1- Puffer mit der Probe und zentrifugierte erneut eine halbe Minute bei 10.000 rpm. Wieder konnte die überschüssige Flüssigkeit entfernt werden. Zwischenzeitlich stellte man das DNase-Puffer-Gemisch her. Dieses bestand aus dem DNase-Pulver und 550 µl RNase freiem Wasser. Man benötigte für jede Probe 10 µl der DNase plus 70 µl RDD-Puffer, dies wurde gemischt und anschließend mittig auf die Säule gegeben. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nun folgte ein erneutes Waschen mit 350 µl RW1-Puffer und anschließender Zentrifugation. Nachdem man die Filtriersäulen in neue Gefäße gesetzt hatte, folgte der nächste Waschschrift, allerdings diesmal 500 µl vom RPE-Puffer und mit einer Zentrifugation von 15 Sekunden. Den zweiten Waschgang mit 500 µl RPE-Puffer, diesmal allerdings zwei Minuten bei 10.000 rpm zentrifugieren, damit auch wirklich alle Ethanolreste entfernt werden, die die Elution zum späteren Zeitpunkt behindern könnte. Der Überstand wurde abgegossen und bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Säulen wurden in ein neues RNase- freies Eppendorfgefäß (im Kit enthalten) gesetzt. Es wurde 30-50 µl RNase- freies Wasser hinzugegeben und bei 10.000 rpm eine Minute lang eluiert.

Quantitative Nukleinsäureanalyse

Im Anschluss wurde die Konzentration der isolierten RNA mithilfe der Nano drop Technologie (PEQLAB Biotechnology GmbH , Erlangen, Deutschland) bestimmt. Dafür eichte man das Gerät zuerst mit RNase-freiem Wasser um dann die RNA- Proben zu messen. Dabei genügte die Menge von 1 µl pro Lösung. Hierfür maß das Gerät den Quotienten der Absorptionen bei 260 nm und 28 nm. Dies ist ein Indikator für die Reinheit der RNA. Nur Proben mit einem Quotienten von 1,7–2,0 wurden dabei akzeptiert. Die Quantifikation der RNA wurde folgendermaßen bestimmt: $\text{Absorption bei 260nm} \cdot 40/1000 =$

Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Anschließend erfolgte die Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder die direkte Weiterverarbeitung zu cDNA.

cDNA-Synthese (complementary DNA)

Zur Quantifikation der Genexpression im Gewebe wurde die RNA in cDNA umgeschrieben um mittels Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion analysiert zu werden. Dafür verwendeten wir $2\mu\text{g}$ der RNA, verdünnten mit $10\mu\text{l}$ DEPC-Wasser und inkubierten fünf Minuten bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. In dieser Zeit konnte man bereits den Mastermix herstellen, der sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzte:

	RT+	RT-
FS buffer 5x (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)	8 μl	8 μl
25mM dNTPs Mix (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)	0,8 μl	0,8 μl
0,1 M DTT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)	2 μl	2 μl
Lin.Acrylamid (Stock: 5mg/ml; Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, England)	0,5 μl	0,5 μl
Hexanucleotide (Roche, Mannheim, Deutschland)	0,43 μl	0,43 μl
DEPC-Wasser	16,4 μl	16,4 μl
RNasin (Promega, Mannheim, Deutschland)	1 μl	1 μl
Superscript 2 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)	0,87 μl	
DEPC-Wasser		0,87 μl

Hierbei stellte man zwei verschiedene Ansätze her, einmal mit der Superscript Polymerase (RT plus) und einmal ohne (RT-). Dadurch wurde sichergestellt, dass man keine Kontamination mit genomischer DNA hat. Sprich RT- war in diesem Versuch die Kontrolle. Nun wurden der Mastermix und die verdünnte RNA vermischt und bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 90 Minuten wurden die cDNA-Fragmente amplifiziert. Zuletzt wurde die reverse Transkriptase durch Inkubation von fünf Minuten bei $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ deaktiviert. Entweder wurde die umgeschriebene RNA nun direkt weiter verwendet oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Real-time RT-PCR (TaqMan)

Die rt- qPCR (quantitative real-time polymerase chainreaction oder quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) lässt im Vergleich zur klassischen PCR eine quantitative

Bestimmung der Fragmente innerhalb einer Probe zu. Dadurch kann man auf das Maß der Expression der zuständigen Gene rückschließen. Nach der Herstellung der cDNA nach dem oben beschriebenen Prinzip, wurde diese in einem Verhältnis von 1 : 10 (cDNA:H₂O) erneut verdünnt. Des Weiteren benötigte man einen zweiten Mastermix, der aus folgenden Bestandteilen besteht: 10 µl SYBR Green 0,6 µl forward Primer (in einem Verhältnis von 1 : 10) 0,6 µl reverse Primer (in einem Verhältnis von 1 : 10) 0,16 Taq Polymerase 6,64 µl H₂O. Nun pipettierte man getrennt voneinander jeweils 2 µl der verdünnten cDNA und 18 µl des Mastermixes in ein Well auf einer 96-Well-Platte. Mithilfe einer Folie wurde diese Platte abgedichtet, zentrifugiert und in den LightCycler480 für die real time RT-PCR gestellt.

Wie im Mastermix beschrieben, wurde ein Farbstoff (Sybr Green) verwendet, mithilfe dessen man über die Zunahme der Fluoreszenzintensität eine Zunahme der DNA messen konnte, da dies proportional zueinander ist. Der Farbstoff lagerte sich nämlich an die doppelsträngige DNA an und maß bei jedem Zyklus. Daraus ließ sich im Anschluss bestimmen, in welcher Probe mehr cDNA vorhanden war. Der Unterschied ließ sich schon zu Beginn anhand unterschiedlicher Fluoreszenzintensitäten feststellen, steigerte sich dann exponentiell mit Fortschreiten der Zyklen (cycle threshold; ct-Wert; hypothetischer Anfangswert). Zur Kontrolle wurde zudem bei jeder Platte auch das Housekeeping Gen 18s bestimmt, da es in den Zellen eines Organs gleichmäßig vorhanden ist. Insgesamt waren es 45 Zyklen, die jeweils aus einer Strangtrennungsphase bei 95 °C, einer Primerhybridisierungsphase bei 60 °C (diese Phase dient der Anlagerung des Primers am gewollten Amplifikationsstück) und zuletzt die Amplifikationsphase bei 72 °C. Im Laufe der Zyklen kam es dabei zu einer exponentiellen Steigerung des gesuchten DNA-Abschnitts (Amplicon), wodurch man genauer die Anzahl der DNA-Kopien bestimmen konnte. Der Ablauf wird in Abbildung 3.1 veranschaulicht.

3.3.3 Immunologische Methoden

ELISA

ELISA bedeutet Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Diese Methode wurde verwendet, um mit Hilfe von verschiedenen Antikörpern und einem enzymatischen Farbumschlag die Quantität eines Antigens wie zum Beispiel Proteine, Hormone, Toxine oder

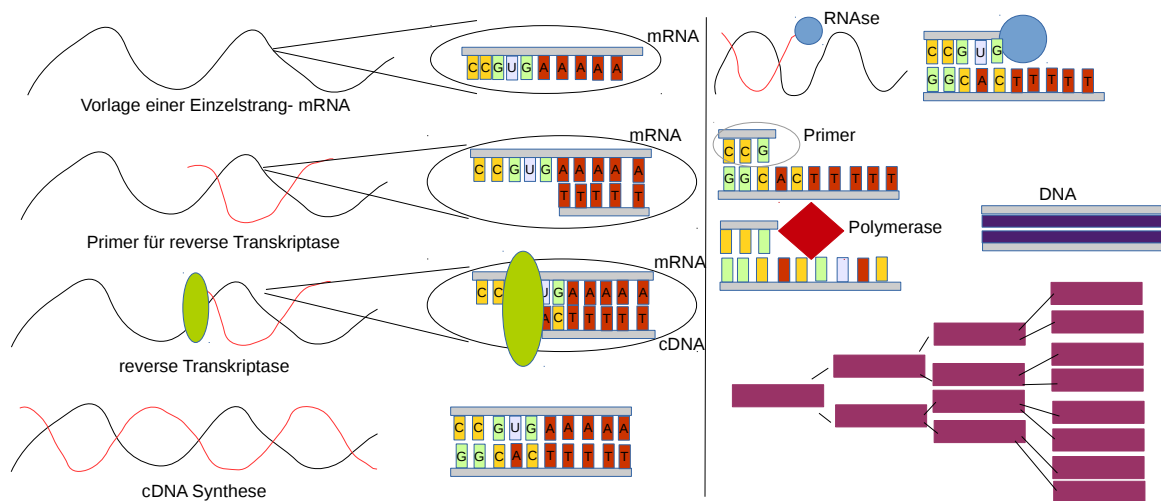


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung einer RT-PCR; links: Umschreibung der mRNA in cDNA mithilfe der reversen Transkriptase; rechts: Ablauf der Polymerasekettenreaktion mit folgenden Schritten: Denaturierung (bei 95 °C wird die cDNA in zwei Einzelstränge gespalten); Annealing (bei 60 °C Anlagerung der Primer an die komplementären Einzelstränge); Amplifikation (bei 72 °C Taq Polymerase beginnt mit Synthese des komplementären Stranges); exponentielle Vervielfältigung; modifiziert nach [73].

weitere niedermolekulare Verbindungen feststellen zu können. Das erfolgte über Antikörper, die über Epitope spezifische Antigene erkennen können. Dieses Prinzip wurde beim sogenannten „Sandwich-ELISA“ insofern genutzt, dass Antikörper zuerst auf die ELISA-Platte gebracht wurden (Coating) und diese dann das dazugehörige Antigen in den Proben banden. Später folgte ein zweiter Antikörper gegen das Antigen. Wir verwendeten einen Albumin und Kreatinin- ELISA.

Albuminlevel im Urin zum Kreatinin Ratio

Zur Feststellung der Albuminlevel im Urin unserer Versuchstiere verwendeten wir das Albumin-Elisa Kit von Bethyl-Laboratories. Dabei folgten wir den Anweisungen des Herstellers. Da wir aufgrund einer induzierten Filtrationsschädigung einen erhöhten Albuminspiegel erwarteten, verdünnten wir die Proben mit Wasser im Verhältnis 1:1000 bzw 1:1500. Zuerst wurden die 96-well Platten mit dem Antikörper beschichtet (Anti-Maus-Albumin, Verdünnung 1:100) mithilfe des Coating Buffer (pH 9,6). Nun wurde es bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei Waschschritte mit ei-

ner bestimmten Waschlösung (Tris NaCl mit Tween 20). Danach wurden 200 µg der Blocklösung (Tris NaCl mit 1 %BSA, pH 8) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 1h bei Raumtemperatur. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um zu verhindern, dass eine Bindung zwischen dem zweiten Antikörper und den eventuell nicht mit coating- Antikörper beschichteten Stellen in den Vertiefungen entsteht. Die Blocklösung bestand unter anderem aus Rinderserumalbumin, welches nicht von dem zweiten Antikörper (für murines Albumin spezifischer AK) gebunden werden kann. Daraufhin wurden erneut 3-5 Waschgänge mit der oben genannten Waschlösung durchgeführt. Als nächstes wurden jeweils 100 µg der verdünnten Proben und Standards in die Vertiefungen gegeben und für eine Stunde inkubiert. Standards sind hierbei Verdünnungsreihen mit einer Albumin- Konzentration von 1000 µg/ml bis 7,5 µg/ml. Ebenfalls wurden Leerproben nur mit Probenverdünner, ohne Antigen, auf die Platte gebracht. Auf jeder Platte wurde jeweils in doppelter Ausführung aufgetragen. Nach der Inkubationszeit wurde wieder 5x gewaschen und der verdünnte (1:30 000) HRP (Horseradish Peroxidase)-konjugierte Ziegen-anti-Mouse-Albumin Antikörper wurde mit 100 µg in die Wells pipettiert und im Dunkeln für eine weitere Stunde inkubiert. Nach dieser Stunde wurde 5x gewaschen mit der Waschlösung und die TMB- (Tetramethylbenzidin) Lösung, welche kurz zuvor vorbereitet wurde, wurde hinzugefügt und erneut im Dunkeln inkubiert bis der Farbumschlag (von farblos zu blau nach circa 10-20 Minuten) sichtbar wurde. Das geschieht durch die Umsetzung von Tetramethylbenzidin durch die antikörpergekoppelte horseradish-Peroxidase. Nun wurde die Reaktion mithilfe von H₂SO₄ gestoppt (erneuter Farbumschlag zu gelb durch die Schwefelsäure). Innerhalb der nächsten zehn Minuten wurde die Absorption bei 450 nm gemessen. Nun wurde zuerst der Mittelwert der jeweiligen Duplikate von den Proben, Standards und Kontrollen ermittelt. Daraufhin konnte der Albuminwert bestimmt werden, indem man die gemessene Absorption mit der bekannten Konzentration verglich und ins Verhältnis setzte. Bei jeder Platte wurden gleichzeitig einige Wells mit Assay Diluent befüllt um die unspezifische Signalintensität (Background) bestimmen zu können.

Der Kreatininwert im Urin wurde mit dem Creatinine FS kit von DiaSys Diagnostic system, GmbH, Holzheim, Deutschland, bestimmt. Es wurde die Jaffé- Methode verwendet. Das heißt, einer kreatininhaltigen Probe wird Pikrinsäure zugesetzt. Es entstand ein alkalisches Gemisch mit einer gelb-orangen Farbe. Dafür wurden die Urinproben zu 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Gleichzeitig bereitete man die verschiedenen Konzentrationen vom mitgelieferten Standard vor. Für den Ablauf der Reaktion präparierte man ein Verhältnis von 4:1 von Reagenz 1 und Reagenz 2 (R1:R2) des Sets. Nun pi-

pettierte man 10 µl von jeder Probe und jedem Standard (ebenfalls als Duplikate) in die 96-well-Platte. Im Anschluss folgten 90 µl des Reaktionsgemischs aus R1 und R2. Es wurde bei 492nm nach 30 und 60sec die Absorption gemessen. Daraus berechnete man die Differenz und bestimmte mithilfe des Standards den Kreatiningehalt. Zuletzt wurde das Verhältnis vom Albuminwert im Urin zum Kreatininwert bestimmt, indem man zuerst Albumin und Kreatinin in die gleiche Einheit (mg/dl) umwandelte. Nun teilte man die Albuminmenge (mg/dl) jeder Probe durch die Kreatininmenge (mg/dl) der gleichen Probe.

3.3.4 Histopathologische Untersuchungen

Immunhistochemische Färbung, PAS-Färbung und Konfokale Bilddarstellung

Für die Färbungen wurden die Nieren der Mäuse in Formalin über 24h fixiert (10 % in PBS oder Saline). Daraufhin wurden sie in Paraffinblocks eingebettet und in 2-4 µm dicke Schnitte mithilfe eines Mikrotoms gebracht. Die Schnitte wurden auf Objektträger, die zuvor mit Ammoniumpersulfat behandelt wurden, gelegt und bei 37°C über Nacht getrocknet. Zum Entparaffinieren wurde zuerst Xylol (3x5min) verwendet und dann mit Ethanol behandelt mit absteigendem Alkoholgehalt (zuerst 100 % Ethanol 3x3min, 95 % für 2x3min, 70 % für 1x3min). Zum Schluss wurde gründlich mit PBS gespült (2x5min). Die Schnitte wurden für die PAS (Periodic Acid Schiff)- Färbung mit einer PAS-Lösung gefärbt für 10 Minuten. Danach wurde mit destilliertem Wasser gewaschen, worauf Schiffssches Reagenz (Inkubationszeit 20 Minuten) folgte. Erneutes Waschen, daraufhin Bearbeitung der Schnitte mit Kalium-Methabisulfid-Lösung mit einer Einwirkzeit von 2 Minuten. Nun wurde diese entfernt und eine Fixierlösung aufgetragen für 2 Minuten und danach abgewaschen. Es folgte für 3 Minuten Mayers Hernalum-Reagenz und wurde mit destilliertem Wasser abgewaschen. Zuletzt wurde dieses Wasser mithilfe von einer aufsteigenden Alkoholreihe den Schnitten entzogen, mit Xylol aufgehellt und abgedichtet mit Deckgläsern. Für die immunhistochemische Färbung wurden die Paraffinschnitte 2x à 7 Minuten mit PBS gewaschen. Mit einer H₂O₂-Methanol-Mischung (20 ml von 30 % H₂O₂ in 180ml Methanol) wurde die endogene Peroxidase geblockt. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten in Dunkelheit und anschließend folgte erneutes Waschen mit PBS (2x7min). Nun folgte eine Demaskierungslösung (3ml Antigen- Unmasking- Lösung in 300ml destilliertem Wasser) für 20 Minuten, dann Abkochen in der Mikrowelle (4x 2,5min, zwischendurch Wasserstand überprüfen). Es folgte ein Waschschriff (2x7min mit

PBS). Danach kam es durch Avidin zur Blockung von Biotin für 15 Minuten. Erneuter Waschschrift mit PBS und anschließender Zugabe von Biotin und 15 Minuten inkubieren, woraufhin 2x 7min mit PBS gewaschen wurde. Damit es zu keiner ungewollten Bindung mit dem sekundären Antikörper kam, wurden die Paraffinschnitte noch mit 10 % Ziegen-Serum inkubiert (10 Minuten lang). Nun erfolgte die Inkubation (entweder 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C) mit den verschiedenen primären Antikörper wie Pig anti-mouse Nephro (1 : 100, Acris Antibodies, Herford, Deutschland), Rabbit anti-mouse WT1 (1 : 25, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), Rabbit anti-mouse MDM2 (1 : 100, Abcam, Cambridge, UK) oder p53-AK (1 : 500). Nach Zugabe des sekundären Antikörpers (Anti-Kaninchen-Biotin verdünnt im Verhältnis 1 : 300 mit PBS) für 30 Minuten folgte ein Waschschrift (1x7min). Es folgte die ABC-Lösung (je 15 µl Reagenz A/B zu 1ml PBS) für eine weitere halbe Stunde, anschließend gewaschen mit PBS und TRIS-Hydrochlorid für 5min. Dann kam die Färbung mit DAB-Lösung für 1-10 Minuten (währenddessen erfolgt die mikroskopische Kontrolle bezüglich der Farbtintensität). Im Anschluss wurden die Schnitte mit Methylgrün (Fluka) gegengefärbt. Zuletzt wurden die Schnitte 2x à 10 Sekunden in 96 %igem Ethanol gewaschen und 3x à 10 Sekunden im 100 %igem Ethanol. Nach Hinzufügen von einem Tropfen VectaMount wurde mit dem Deckglas verschlossen. Für die Betrachtung der Färbungen wurde das Konfokale Mikroskop LSM 510 mit der dazugehörigen LSM Software von Carl Zeiss AG verwendet.

3.3.5 Maus-Experimente

Versuchstierhaltung

Die Mäuse wurden bis zu einem Alter von drei Wochen gemeinsam mit ihrer Mutter in einem Käfig vom Typ Makrolone Typ 2 gehalten. Die Tiere lebten bei 12-stündigem Hell-/ Dunkelrhythmus und hatten immer Futter und Wasser zur freien Verfügung. Nach drei Wochen wurden die Tiere markiert und nach Geschlecht getrennt in frische Käfige gesetzt. Diese wurden, genauso wie Streu, Futter und Wasser vor der Benutzung autoklaviert. Die Tierexperimente waren von der Regierung von Oberbayern genehmigt und wurden sorgfältig nach den deutschen Tierschutzbestimmungen durchgeführt.

Versuchstiere

Cre/lox-Mäuse Bei unseren Versuchen wurden Mäuse mit einem black6 Hintergrund verwendet. Um unseren Hypothesen nachgehen zu können, nahmen wir Tiere, bei denen Mdm2 beziehungsweise Mdm2 und p53 in den Podozyten nicht mehr vorhanden war. Dies wurde mithilfe des Cre/lox Rekombinations-Systems erreicht. Cre (cyclization recombination) sind Rekombinasen, die für die Spaltung und Neuverknüpfung der DNA zuständig sind. Dieser natürliche Prozess kann durch loxP gesteuert werden. LoxP (locus of X-ing in P1), aus dem Bakteriophagen P1, besteht aus 34 Basenpaaren mit jeweils an den beiden Enden liegenden 13 Basenpaaren, die Palindrome sind. Dazwischen befindet sich eine 8 Basenpaar lange, richtungsweisende Sequenz („good planning and serenditiy“). Möchte man nun eine bestimmte DNA-Sequenz oder Gen nicht mehr codieren, dann kombiniert man eine Cre-Maus mit einer loxP Maus. LoxP wird dabei jeweils vor und hinter die DNA-Sequenz gesetzt. Das Cre-Enzym erkennt nun loxP und bindet daran. Dabei schneidet es das sich dazwischen befindende Gen-Segment heraus. Bereits in einer vorangehenden Doktorarbeit aus unserem Labor wurde nun die Kreuzung und Züchtung durchgeführt. Es wurden MDM2^{flox/flox} Mäuse mit black6 gemischtem Hintergrund, wo loxP an den Exons 4 und 5 des MDM2 Gens andockt, genommen. Der Dank gebührt hierbei Guillermina Lozano, Universität von Texas, Houston, TX für die Bereitstellung der Tiere. Diese wurden mit Nphs2-cre⁺ Mäusen (C56Bl/6 Hintergrund; von Tobias Huber, Universität Freiburg) gekreuzt, welche die Cre Rekombinase unter Kontrolle des Podocin Promoters exprimierten. Daraufhin entstanden die MDM2^{flox/flox};Nphs2-cre⁺ (MDM2^{Apodocyte}) Mäuse, welche einen spezifischen *Mdm2*-Knockout in den Podozyten besitzen. Wie oben bereits erwähnt, wurde die Kreuzung und Züchtung in einer vorhergehenden Doktorarbeit durchgeführt. Wir führten nun zuerst unsere Experimente mit diesen Tieren durch. Zur Kontrolle nahmen wir Wurfgeschwister, denen der Knockout fehlte. Dann kreuzten wir MDM2^{flox/flox}; Nphs2-cre⁺ Mäuse mit p53^{flox/flox} Mäusen (ein Geschenk von Karl Lernhard Rudolph, Universität Ulm). Dort wurde loxP in den Introns 1 und 10 eingefügt um die vollständige Auslöschung fast aller codierenden Sequenzen gewährleisten zu können. Daraufhin erhielten wir Tiere, bei denen sowohl p53 als auch Mdm2 in den Podozyten ausgeknockt war. Dies wurde mithilfe einer PCR bestätigt. Als Positivkontrollen verwendeten wir MDM2^{flox/flox} p53^{flox/wt}; Nphs2-cre⁺ (MDM2^{Apod/p53f/wt}) Wurfgeschwister.

Genotypisierung Zur Gewinnung der notwendigen DNA wurde den Mäusen die Spitze ihres Schwanzes entnommen. Die Amplifikation der jeweiligen Genabschnitte erfolgte über die PCR, anschließend wurde durch die Gelelektrophorese die Banden aufgetrennt und interpretiert.

DNA-Isolierung Wie bereits erwähnt wurde zur Bestimmung der DNA ein kurzes Stück der Schwanzspitze der Mäuse (circa 2mm) entnommen. Zur Hydrolysierung wurde die Schwanzspitze mit 1 µl Proteinase K in 200 µl PBND-Puffer versetzt und bei 56 °C >4h geschüttelt. Daraufhin wurde dies bei 13 800G 2 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert. Im Anschluss wurde das DNA-Kit der Firma Qiagen verwendet. Der Überstand wurde mit 100 µl AL-Puffer vermischt und 10 Minuten lang bei 70 °C inkubiert. Danach mit 100 %igem Ethanol vermischt und auf eine Filter-Säule aufgetragen. Es folgte die Zentrifugation bei 5200G, dann das Hinzufügen von 500 µl AW1-Puffer, erneute Zentrifugation für 1 Minute bei 5200G, 500 µl vom AW2-Puffer, Zentrifugation über 3 Minuten mit 16 000G. Es folgte die zweimalige Gabe von 150 µl AE-Puffer mit anschließender Inkubation über 5 Minuten und 1-minütiger Zentrifugation bei 5200G. Im letzten Schritt waren in den 300 µl AE-Puffer die murine DNA der Schwanzspitze. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Agarose- Elektrophorese Bestandteil der Gele waren 2g Agarosepulver pro 100 ml TBE-Puffer. Dies wurde erhitzt bis es anfang zu kochen. Es wurde 8 µl Ethidiumbromid zugesetzt und abgekühlt. Sobald das Gel ausgehärtet war, wurde es mit TBE- Puffer bedeckt. Die Probe wurde mit 4 µl Ladepuffer vermengt. Nun wurde in die erste Geltasche ein DNA-Marker gegeben, in die restlichen kamen 8 µl dieser Mischung. Eine Spannung von 200 Volt wurde angeschlossen und die DNA-Fragmente wanderten entlang des Spannungsgradienten. Aufgrund ihrer Größe kam es zu unterschiedlichen Geschwindigkeiten der einzelnen DNA-Fragmente, sodass sie sich dadurch auftrennten. Diese wurden nun unter UV-Licht sichtbar und die Größe konnte mithilfe des DNA-Markers ausgewertet werden. Es folgte der Vergleich mit den Banden des Wildtyps, der homo- und heterozygoten Proben. Dadurch konnte der Genotyp bestimmt werden.

Blut-und Urinproben

Blutproben wurden durch eine spezielle retroorbitale Blutentnahmetechnik gewonnen. Dabei waren die Versuchstiere mithilfe von Isofluran anästhesiert worden. Mit einer dünnen, langen Spritze wurde das Blut entnommen und in mikrozentrifugale Tubes, welche EDTA beinhalten, gegeben (10 µl von 0,5M Lösung auf 200 µl Mausblut). Sobald alle Proben gewonnen wurden, kamen sie in die Zentrifuge bei 8000rpm für 5 Minuten, wodurch das Plasma sich absetzen konnte. Die zwei Phasen wurden getrennt und bei -20 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Die Urinproben wurden entweder im Zuge der Blut-und Organentnahme gewonnen oder bei lebendigen Mäusen unter leichter Massage der Mäuseblase direkt in Eppendorftubes. Auch diese wurden bei -20 °C gelagert.

3.3.6 Zebrafisch (*Danio rerio*)-Experimente

Zebrafisch-Stämme

Für die Durchführung unserer Experimente verwendeten wir folgende Zebrafischstämme:

AB-Stamm Dies ist der Wildtyp, welcher mit einer starken Pigmentierung einhergeht. Hiermit bedanken wir uns bei Frau Professor Nüssli Vollhard aus Tübingen, da sie diesen Stamm zur Verfügung stellte.

wt1b:eGFP-, wt1a:eGFP-Stamm Die beiden Wilms Tumor Gene, wt1b und wt1a, sind unter anderem für die Kontrolle der eGFP Expressierung in den Podozyten zuständig [137]. Für die Bereitstellung danken wir herzlich Herrn Professor Englert aus Jena. Zur Vereinfachung benennen wir wt1b als WT und wt1a als DBP.

Durch Kreuzung:

E.T. Durch Kreuzung der transparenten Zebrafischlinie Casper (dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von Uwe Strähle, Karlsruhe, Deutschland) mit wt1a:eGFP. Dadurch entstand eine Zebrafischlinie, die sich gut für die Mikroskopie eignet und grün fluoreszierenden Farbstoff in den Glomeruli zeigte.

Trabo Durch Kreuzung der Casper-Linie mit der transgenetischen 1-fabp:DBP-eGFP Zebrafischlinie (von Anand-Apte zur Verfügung gestellt) erhielt man eine Line, die

DBP (Vitamin D-binding-Protein) an eGFP im Blutplasma gebunden hatte. DBP-eGFP besitzt die Größe und Ladung, welche ähnlich dem Albumin ist. Dadurch erhielt man einen rot fluoreszierenden Farbstoff, an Vitamin D gebunden, welcher sich physiologischerweise in den Blutgefäßen befindet und nicht filtriert wurde.

Morpholinos (MO)

Morpholinos sind meistens aus einer Kette von 25 Nukleotiden aufgebaute spezifische Nukleinsäure- Analoga (Antisense- Oligonukleotide). Sie werden in der Forschung eingesetzt um einen Knockdown von den gewünschten Proteinen herbeiführen zu können und damit Einfluss auf die Genexpression nehmen zu können. Dabei binden diese an komplementäre mRNA und verhindern dadurch entweder die Translation durch Bindung an die Startsequenz oder das korrekte Spleißen durch Bindung an einen Exon-Intron-Übergang (siehe Abbildung 3.2. Für unsere Zwecke wurden die verdünnten und gefärbten Morpholinos in die Fischeier direkt nach Befruchtung und Eiablage injiziert im 2-8 Zellstadium.

Der strukturelle Unterschied zwischen Morpholinos und DNA besteht darin, dass die Bestandteile durch einen Morpholino Ring verbunden sind anstelle von Desoxyribose. Des Weiteren sind sie durch Phosphordiamidat anstatt von Phosphat miteinander verknüpft. Daher leitet sich auch das Synonym für Morpholino ab: PMO (phosphorodiamidate morpholino oligo). Der Vorteil ist eine längere Stabilität und Halbwertszeit, da sie durch die strukturelle Veränderung kein Substrat mehr für RNasen darstellen und somit von diesen nicht abgebaut werden. Die Pionierarbeit für die Entwicklung der synthetischen Oligos ist James E. Summerton und Dwight D. Weller zuzusprechen und wurde 1997 erstmals publiziert [170].

Folgende Gruppen wurden für unsere Experimente kategorisiert:

1. Kontrolllarven, denen kein Morpholino injiziert wurde. Diese werden Ctrl genannt.
2. Kontrolllarven, denen Kontroll-Morpholinos injiziert werden und daher als Ctrl-MO bezeichnet werden.
3. Larven von Eiern, denen MDM2-Morpholinos injiziert wurden und deswegen MDM2-MO heißen.

4. Larven von Eiern, denen MDM2- und p53-Morpholinos injiziert wurden und deswegen MDM2/p53-MO im Folgenden bezeichnet werden.

Alle Morpholinos wurden von der Firma Genetools (Genetools, LLC, Oregon, USA) gekauft. Die Sequenzen der verwendeten Morpholinos sind:

Ctrl-MO: 5'- CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A-3'

Laut Hersteller sollte dieses Oligonukleotid auf keine passende mRNA treffen und keine signifikante biologische Veränderung verursachen, da es gegen die prä-mRNA von humanem β -Globin mit einer Mutation an Position 705 gerichtet ist. Das bedeutet, es würde nur in Retikulozyten von Menschen mit einer Thalassämie zu einem korrekten Spleißen der mRNA und damit zu funktionierenden β -Globinketten führen. Für MDM2 benutzten wir zweierlei Morpholinos. Eines (zMdm2) um die Translation zu unterbinden und das zweite (Mdm2) für eine Exon-Intron-Sequenz wodurch kein korrektes Spleißen möglich war:

ZMdm2- MO: 5'-AACAACTCTCTGTTGCCATTTTGGT-3'

Mdm2- MO: 5'-CTCTGTTGCCATTTTGGTAGTTATC-3'

Für p53 nahmen wir ein Morpholino, welches ebenfalls die Translation unterbindet:

Zp53- MO: 5'-GCGCCATTGCTTTGCAAGAATTG-3'

Injektionslösung

Die von der Firma GeneTools gelieferten Morpholino-Lypophilisate wurden in der Originalflasche zu einer Stocklösung von 10mM durch Zugabe von 20 μ l Aqua ad injectibilia verflüssigt. Zur vollständigen Durchmischung wurde diese Lösung bei 65 °C für fünf Minuten erhitzt und mit dem Vortexer vermischt. Nun konnte man entweder die Morpholinos zur Lagerung vorbereiten, indem man sie auf 1 μ l Aliquots verteilt und bei -80 °C einfriert. Oder die Morpholinos wurden für die bevorstehenden Experimente vorbereitet, indem man sie auf beschriftete Eppendorf Tubes verteilt und bei -4 °C lagert. Kurz vor dem Injektionsgebrauch wurde der benötigte Mastermix vorbereitet. Dafür wurden je nach gewünschter Konzentration das Morpholino mit einer verdünnenden Injektionslösung (100 mM KCl, 10mM Hepes, pH 7,6) und 10 % Phenolrotlösung versetzt. Um eine

vollständige Durchmischung zu erreichen, wurde für einige Sekunden zentrifugiert und der Überstand bei 65°C für fünf Minuten erhitzt.

Zebrafischhaltung und Aufzucht

Die Zebrafische wurden aufgezogen, aufbewahrt und verpaart gemäß vorbestehenden Protokollen bei konstanten 28,5 °C [190]. Die Embryos wurden in der E3 Lösung aufbewahrt. Sie lebten in PP- Modulen (Aqua Schwarz, Göttingen) und wurden zur Verpaarung in Verpaarungsbecken gebracht. Damit eine konstante Wasserqualität vorherrscht, wurde mit einer definierten Salzlösung gearbeitet. Vor deren Benutzung wurde das Leitungswasser sowohl durch einen Aktivkohlefilter, als auch einen Anionenaustauscher gereinigt (Wasseraufbereitungsanlage, Aqua Schwarz, Göttingen). Daraufhin wurde aus einem Vorratstank die konzentrierte Salzlösung entnommen, die Leitfähigkeit auf 250 µS eingestellt und mithilfe von 2,3 % HCl-Lösung wurde der pH auf ungefähr 7,2 titriert. Für einen gleichbleibenden Tagesablauf steuerte eine Zeitschaltuhr den Tag- Nacht- Rhythmus mittels einer Beleuchtung, die zwischen 8 und 22 Uhr programmiert war. Zweimal pro Tag erhielten die Zebrafische Futter, bestehend aus Artemia- Larven am Morgen und Trockenfutter am Abend. Einmal pro Woche wurden die Fische verpaart.

Verpaarung und Gewinnung der Eier

Zebrafische sind bei der Paarung lichtabhängig und legen ihre Eier morgens kurz nach Aufgang der Sonne. Für die Verpaarung wurden die Zebrafische demnach am Vorabend, 1- 2 Stunden bevor das Tageslicht erlischt, gefüttert und in ein Verpaarungsbecken mit Siebeinsatz gebracht. Die besten Ergebnisse erreichte man bei einem Verhältnis von einem Männchen auf zwei Weibchen. Kurz nach Eiablage wurden die Fische wieder nach Geschlecht getrennt in ihre Anlagen zurückgesetzt und man kann mit dem Sammeln der Eier beginnen. Dies geschah mithilfe einer Transferpipette. Um die Embryos von Fäces zu befreien, wurden sie mehrere Male mit dem E3 Medium gewaschen und anschließend in eine mit E3 Medium gefüllte, sterile Petrischale gelegt. Je nach gewünschtem Experiment, konnte nun entweder mit der Mikroinjektion begonnen werden, oder die Petrischalen wurden bei 28,5 °C inkubiert.

Mikroinjektion

Nach dem Legen der Eier hatte man circa 40 Minuten Zeit für die Mikroinjektion, da sie während des 2- 4-Zellstadiums stattfinden sollte. Dafür wurden die soeben gesammelten Embryos in eine 1,2%ige E3- Agarose- Petrischale gelegt. Dies bedeutete einen Schutz vor dem Austrocknen, da es ein feuchtes Milieu fördert. Außerdem schützte es die Eier vor der Injektionsnadel. Damit man die Eier besser für die bevorstehende Injektion fixieren konnte, wurde eine halbe Agaroseplatte hineingelegt, an derer man die Eier mithilfe eines Spatels entlangreichte und gleichzeitig beschädigte oder unbefruchtete Eier entfernen konnte. Nun konnte man mit der Mikroinjektion beginnen, indem man 3 µl der vorbereiteten Morpholino- Injektionslösung in die Mikroinjektionsnadel (Femtotips, Eppendorf) brachte und an das Femtotip- Haltegerät befestigte. Bei einem stetigen Druck von 400 bis 500hPa stach man fortlaufend kurz in das Ei und wieder heraus (es wurden circa 0,5pl injiziert). Dabei bestand ein stetiger Fluss der Morpholino- Injektionslösung. Den Erfolg erkannte man an der rötlichen Verfärbung der Eier und ob sich innerhalb des Eis ein kleiner Tropfen befand. Nach abgeschlossener Injektion wurden die Eier in eine neue Petrischale mit frischen E3 Medium gelegt und in den Inkubator bei 28,5 °C gestellt.

Molekularbiologische Methoden

mRNA Isolation Für die mRNA Isolation wurden mindestens 15 Zebrafischlarven, entweder 3dpf (days post fertilization) oder 4dpf, genommen und in einem Eppendorf Tube gesammelt. Anschließend wurde das komplette E3-Medium entfernt und die Tiere mithilfe von Stickstoff Schock gefroren. Nun konnte man sie entweder bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung lagern, oder die Fische in Lysing Matrix Tubes von MP Biomedicals geben. Diese wurden daraufhin in den FastPrep-24 von MP gestellt und für 20-40 Sekunden durchmengt, wodurch die Proben lysiert, zerrieben und homogenisiert wurden.

Zur RNA Isolation wurde das Rneasy Plus Universal Mini Kit (50) von Qiagen (rot) verwendet. Mithilfe von dem TRI-Reagenz (Sigma-Aldrich, München) und Chloroform kam es zur Extraktion. Hierfür fügte man 1 ml TRI-Reagenz pro Eppendorfgefäß hinzu. Anschließend wurde es mit einer 20-Gauge Nadel homogenisiert. Nun folgte eine Inkubationszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur.

Daraufhin wurde es mit 0,2 ml Chloroform versetzt. Mithilfe des Vortexer wurde eine Emulsion gebildet, welche bei 10 000G/4 °C für 15 Minuten zentrifugiert wurde. Es entstand eine getrennte Lösung mit zwei Phasen und einer weißen Zwischenschicht. Die obere, welche wässrig und klar war, wurde mithilfe einer Pipette entnommen und kam in ein weiteres Reaktionsgefäß. Es wurde 0,5 ml Isopropanol hinzugegeben und anschließend bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Dadurch wurde die RNA präzipitiert. Es folgte für 10 Minuten eine Zentrifugation bei 10 000G und 4 °C, wobei es am Boden des Reaktionsgefäß zu einem Pellet verdichtet wurde. Der Überstand wurde entfernt. Das Pellet wurde nun mit ca. 1ml 75 %igem Ethanol versetzt, gefolgt von kurzem Vortexen und vorsichtiger Zentrifugation (7.500G bei 4 °C). Der Überstand wurde erneut entfernt und das Pellet wurde an der Luft angetrocknet. Im Anschluss wurde es in 10µl RNase- freiem Wasser aufgelöst. Zuletzt wurde von dieser Lösung 1 µl genommen und mit 199 µl Wasser vermengt. Es folgte die Messung der optischen Dichte (OD) im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 und 280nm. Dies diente der Qualitätskontrolle und gleichzeitig wurde die Konzentration bestimmt. Diese lag bei ca. 2–5µg/µl und der Quotient (260 / 280) bei 1,7–1,8.

cDNA Synthese und RT-PCR Für die Umschreibung in cDNA benutzten wir das Superscript- Kit von Invitrogen. Dabei nahmen wir zu circa 2µg RNA 4µl von 5x MuL V-RT- Puffer, 1 µl dNTP, 2 µl Oligo dT und für die Differenz destililliertes Wasser. Dieser Mix wurde für 2 Minuten bei 65 °C inkubiert und auf Eis gelagert, da es sehr instabil war. Nun gab man 1 µl Reverse Transkriptase MuLV und 0,5µl Rnase Inhibitor hinzu. Im Anschluss wurde der Mix erneut für eine Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend bei 95°C denaturiert und zur direkten Weiterverarbeitung auf Eis gelagert oder bei -20°C eingefroren. Mit der cDNA konnte nun mit einem Thermocycler die RT-PCR folgen, wofür das Platinum-Taq-Kit von Invitrogen verwendet wurde. Die Durchführung der RT-PCR erfolgte in 30 Zyklen. Vor jedem Zyklus wurde das Reagenz bei 94 °C für eine halbe Minute inkubiert. Darauffolgend kam eine Inkubationszeit von 30 Sekunden bei 55 °C und von zwei Minuten bei 72 °C.

Histopathologische Untersuchungen

Anfertigung der Kryo- Schnitte Die Zebrafischlarven wurden bei 3dpf oder 4dpf nach

möglichst vollständiger Entfernung des E3- Mediums in PBS 2% gelegt und auf dem Edmund Bühler Swip KS-10 für mindestens zwei Stunden langsam hin und her bewegt. Nach zwei Stunden wurde PBS 2% mit Saccharose 30% ausgetauscht und über Nacht im Kühlschrank gelagert, sodass das Wasser vollständig durch die Saccharose ersetzt wurde. Am nächsten Tag konnte man mit der Fixierung der Fische beginnen. Dafür wurden circa drei Zebrafischlarven mithilfe einer Pipette auf eine Objektträgerplatte gelegt. Um die Flüssigkeit auf dem Deckglas entfernen zu können, benutzte man saugkräftiges Papier von Fisher Scientific. Die Fische wurden nun in einer Reihe in gleicher Richtung angeordnet und diese wurden mit tissue factor von Sakura bedeckt, möglichst ohne Blasenbildung. Danach wurde das Deckglas mit den Fischen zur Fixierung für wenige Sekunden in flüssigen Stickstoff gehalten. Durch das Schockfrieren bildeten sich keine Kristalle, die sich beim Auftauen ausdehnen könnten und damit die Morphologie und den Schnitt zerstören könnten. Nun legte man es ins Kryotom, welcher im Inneren eine konstante Temperatur von -20°C hatte. Darin wurden die Fische quadratförmig geschnitten. Nach dem Einspannen konnte man mit den 60 µm dicken Schnitten beginnen. Dabei begann man bei den Augen, was mithilfe des Mikroskops kontrolliert wurde, bis zum Glomerulus. Die Schnitte wurden der Reihe nach auf einen zuvor beschichteten Objektträger gelegt. Dieser wurde beschriftet und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank getrocknet.

Färbung der Kryoschnitte Nachdem die Schnitte über Nacht im Kühlschrank gelagert wurden, nahm man sie am nächsten Tag und begann mit der Permeabilisierung mithilfe von Triton-x100 0,3% (Merck, Darmstadt, Deutschland) für circa 30 Sekunden. Danach wurde 1x mit PBS gespült. PBS wurde abgeschüttet, worauf die Blocking Zellkultur (PFA 2%) für 30 Minuten folgte. Für die Färbung mit Nephro, folgte der Anti-Rabbit Antikörper Nephro 1:4000 in Blocklösung (ein Geschenk von A.Majumdar, Uppsala, Schweden), welcher über Nacht bei 4°C über den Schnitten gelassen wurde. Am nächsten Morgen folgte erneut ein Waschschritt mit PBS. Darauf folgte der Cy3-konjugierte zweite Anti-Rabbit Antikörper (1:250, Dianova, Hamburg, Deutschland) für 30 Minuten. Des Weiteren wurde mit Phalloidin (Alexa Fluor 546-konjugierte Phalloidin, Invitrogen), welcher die Aktinfilamente rot färbt und Hoechst 33342 (1mg/100ml, Sigma-Aldrich), welcher den Nukleus blau färbt in einem Verhältnis von 1:100 in Blocklösung für 30 Minuten über die Schnitte getropft. Erneut wurde mit PBS gewaschen. Als letzter Schritt folgte nun Mowiol, vorsichtig tropfen und langsam das Deckgläschen darüber legen

zur endgültigen Fixierung. Von nun ab wurde nur noch waagrecht gelagert. Diese Schnitte konnten nun mithilfe des LSM (laser scanning microscop) betrachtet werden.

Injektion von Dextran 10kD und Konfokalmikroskopie

Hierfür verwendeten wir Zebrafischlarven 4dpf, welche wir mithilfe von Tricain 0,1 %–0,5 % (im E3 Medium) anästhesierten. Zur Fixation der Fische wurde 3 % Methylcellulose verwendet, was die Mikroinjektion vereinfacht. Auch hierfür benötigten wir den Microinjector, die Femtotips Mikropipetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), Mikroinjektionsnadel und ein Mikroskop. Nun injizierte man 20mg/ml Alexa Fluor 647-konjugierte 10kD Dextranlösung (Invitrogen, San Diego, CA), welche zusätzlich rötlich verfärbt war. Dadurch konnte man mithilfe des Mikroskops erkennen, ob die Mikroinjektion in die Blutgefäße geglückt war oder nicht. Anschließend konnten sich die Zebrafischlarven für 40 Minuten im E3- Medium erholen bevor sie erneut anästhesiert wurden um sie unter dem Konfokalmikroskop (von Leica TCS SP5) betrachten zu können. Dafür wurden sie auf in einer Petrischale mit Glasboden auf die Seite gelegt und mit 8 % Methylcellulose in PBS fixiert. Die Blutgefäße und der pronephrotische Tubulus wurden dargestellt und man beobachtete am lebenden Fisch die Verteilung, die Aufnahme und die Ausscheidung von Dextran. Dafür benutzten wir ein 20x Wasserimmersionsobjektiv (HCX PL APO 20x/0.7)

3.3.7 Statistische Analyse

Die Ergebnisse werden mit dem zugehörigen Standard of the Mean (SEM) in einer Gruppe mit demselben Genotyp angegeben und stellen das arithmetische Mittel dar. Um Signifikanzen darzustellen, wurde der zweiseitige t-Test mit Microsoft Excel 2010 verwendet. Ein p-Wert $< 0,05$ bedeutet hierbei einen statistisch signifikanten Unterschied. Des Weiteren werden weitere Abstufungen benutzt um Unterschiede deutlicher hervorzuheben: *p $< 0,05$; **p $< 0,01$; ***p $< 0,001$.

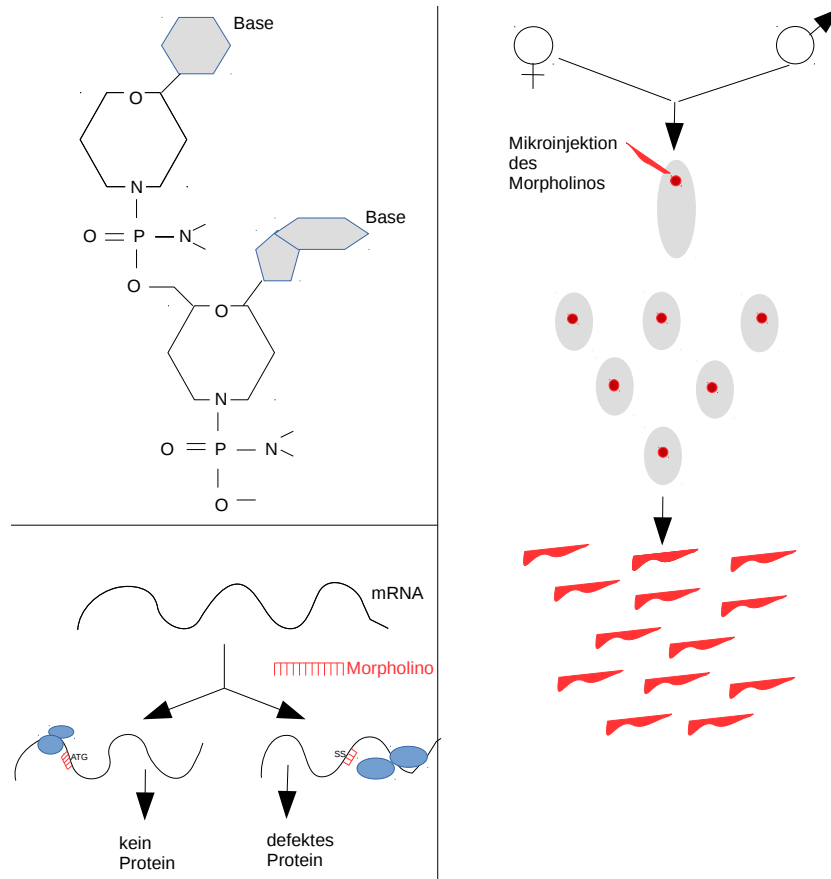


Abbildung 3.2: Gen-Knockdown durch ein Morpholino, **links oben**) Struktur und Aufbau eines Morpholinos, **links unten**) Funktionsweise des Morpholinos, entweder Bindung an Startcodon (ATG) wodurch die Translation nicht stattfinden kann und kein Protein gebildet wird, oder an Exon- Intron-Sequenz wodurch es zu einem fehlerhaften Spleißen kommt und in der Folge ein fehlerhaftes Protein gebildet wird, **rechts**) Injektion des verdünnten, gefärbten Morpholinos in die Fischeier; modifiziert nach [145].

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse in den Zebrafischen: Kontrolle versus *Mdm2*-Knockdown mittels Morpholinos

4.1.1 *Mdm2*-Knockdown in Zebrafischen mittels Morpholinos gegen zMDM2 durch RT-PCR bestätigt

Wir injizierten das Morpholino gegen zMDM2 in die befruchteten Fischeier der Zebrafischlinie ET, welche die transparenten Fische sind und deren Podozyten grün fluoreszieren, da GFP unter dem wt1-Promoter exprimiert wird. Nach Injektion untersuchten wir die Fischeier, um sicherzustellen, ob der Knockdown für die MDM2 kodierende Sequenz auch wie erwartet im Genom der Fischlarven, vor allem im Genom der Podozyten, funktionierte. Sprich, ob der Knockdown von *Mdm2* mittels Morpholinos in den Zebrafischen erfolgreich war. Zunächst wurde die MDM2-mRNA-Expression in den Versuchstieren untersucht. Hierfür wurden die gesamten Zebrafische, sowohl von den Knockdown-Zebrafischen, als auch von den Kontroll-Zebrafischen genommen. Daraus isolierten wir die mRNA, welche in cDNA umgeschrieben wurde. Im Anschluss wurde eine Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Hierbei konnten die Unterschiede bezüglich der *Mdm2*-Genexpression quantifiziert werden. Es wurden die Werte der MDM2-mRNA von CTRL MO-Zebrafischen (Kontrollgruppe) mit MDM2 MO-Zebrafischen (Knockdown) verglichen (Abbildung 4.1).

Die Ziel-mRNA-Expressionsspiegel wurden als der Mittelwert des Verhältnisses gegenüber dem jeweiligen CTrB1-mRNA-Level ausgedrückt. In den durchgeführten Experimenten zeigte sich in der Knockdown Zebrafischversuchsreihe eine signifikant verminderte Expression von MDM2-mRNA, in der Kontrollgruppe circa 0,5 versus 0,13 in der Knockdown-Gruppe [173].

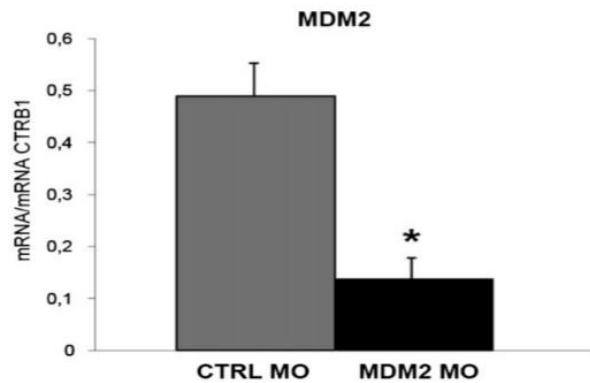


Abbildung 4.1: mRNA Level von Kontroll-Morpholino vs.MDM2-Morpholino [173]: Nachdem in die befruchteten Eizellen der Zebrafische die Morpholinos injiziert wurden, stellten wir mithilfe von RT-PCR fest, ob der Knockdown funktioniert. Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von MDM2.

4.1.2 *Mdm2*-Knockdown in Zebrafischen führt zu Malformationen

Erneut injizierten wir das Morpholino gegen zMDM2 in die befruchteten Fischeier. Diesmal untersuchten wir die geschlüpften Zebrafische an Tag 3 nach der Fertilisation. Dabei wurden hinsichtlich der Morphologie deutliche Unterschiede sichtbar. In der Kontrollgruppe zeigte sich eine normale Entwicklung in Größe und Reife. Die Zebrafische hatten keinerlei Probleme aus ihren Zebrafischeiern zu schlüpfen ganz im Unterschied zu den *Mdm2*-Knockdown Zebrafischen. Dort zeigte sich eine deutliche Malformation. Insbesondere entwickelten die Zebrafische perikardiale Ödeme. Zudem hatten sie Schwierigkeiten aus den Fischeiern zu schlüpfen (siehe Abbildung 4.2).

4.1.3 *Mdm2*-Knockdown in Zebrafischen führt zu verminderter Nephrin Expression in den Podozyten

Im Anschluss interessierten uns die mikroskopischen Veränderungen. Wir verwendeten die Fischlarven drei Tage nach der Fertilisation. Es wurden die Fischlarven, welche mit dem Kontroll-Morpholino behandelt wurden mit denen verglichen, die mit zMDM2 Morpholino behandelt wurden. Wir führten histologische Schnitte durch und färbten diese

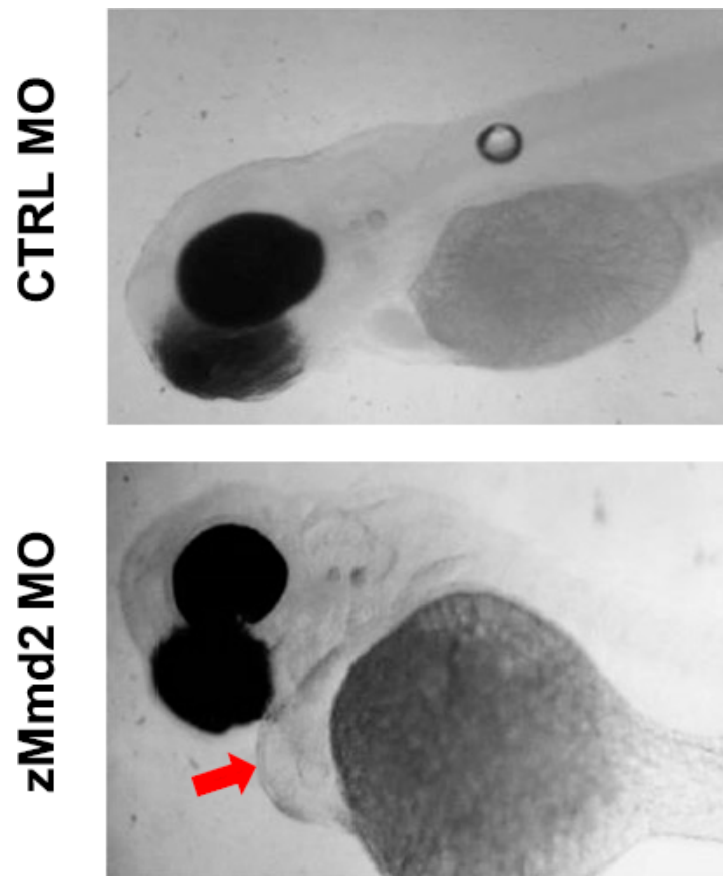


Abbildung 4.2: Morphologie des Zebrafisches 3dpf: oben die Kontrollgruppe mit einer normalen Entwicklung; unten fehlerhafte Entwicklung mit perikardialem Ödem (roter Pfeil). [173]

mit Hoechst, Nephtrin und die Podozyten in grün. Daraufhin schauten wir uns die Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop an. In der Kontrollgruppe (Abbildungen 4.3 und 4.4) zeigte sich ein normal entwickelter Gomerulus mit zahlreich vorhandenen Podozyten (grün), welche Nephtrin exprimieren (rot). Dies ergibt, wenn man die Bilder unter dem Fluoreszenzmikroskop überlagert, eine gelbliche Färbung.

Im Vergleich dazu zeigten die Fischlarven mit dem *Mdm2*-Knockdown (Abbildungen 4.5 und 4.6) eine deutliche Veränderung im glomerulären Apparat. Es zeigten sich weniger Podozyten (grün) und die Nephtrinexpression (rot) war vermindert. Zudem erschienen die Podozyten unter dem Fluoreszenzmikroskop in ihrer Form länglich verändert.

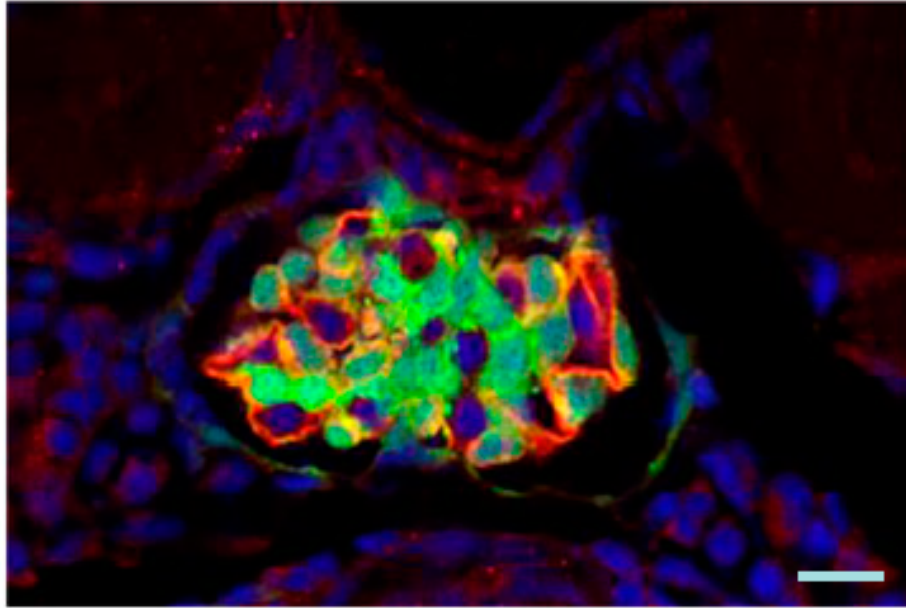


Abbildung 4.3: Glomerulus unter dem Fluoreszenzmikroskop einer CADE-Fischlarve, welche mit Kontroll-MO behandelt wurde. In der Färbung zeigte sich unter dem Fluoreszenzmikroskop ein gut entwickelter Glomerulus mit Podozyten (grün), welche Nephrin exprimieren (rot). Beide Bilder überlagert gelblich gefärbt. Maßstabsbalken 10 μm . [173]

4.1.4 *Mdm2*-Knockdown in Zebrafischen führt zum Funktionsverlust der glomerulären Filtrationsbarriere

Nun interessierte uns die Auswirkungen auf die glomeruläre Filtrationsbarriere. Dafür verwendeten wir eine andere Zebrafischlinie namens Cade, dies ist eine Kreuzung aus der transparenten Casper-Zebrafischlinie mit der transgenetischen 1-fabp:DBP-eGFP Zebrafischlinie. Dadurch erhält man eine Linie, die das DBP (Vitamin D-binding proteine) an EGFP (enhanced green fluorescent protein) im Blutplasma hält. Dadurch ergibt sich ein grün fluoreszierender Farbstoff, der an Vitamin D gebunden ist. Hiermit kann man die Funktionsfähigkeit der glomerulären Filtrationsbarriere mikroskopisch überprüfen. Sollte es zu einem Funktionsverlust kommen, verringert sich der fluoreszierende Farbstoff in den Blutgefäßen, da es zu einem Austritt der Proteine durch die Filtrationsbarriere kommt. Wir verglichen die Fischlarven vier Tage nach der Fertilisation. Zum einen diejenigen, die mit dem Kontroll-MO behandelt wurden. Zum anderen diejenigen, bei welchen sich nach Morpholino-Injektion ein relevanter *Mdm2*-Knockdown erreichen ließ. Es zeigt

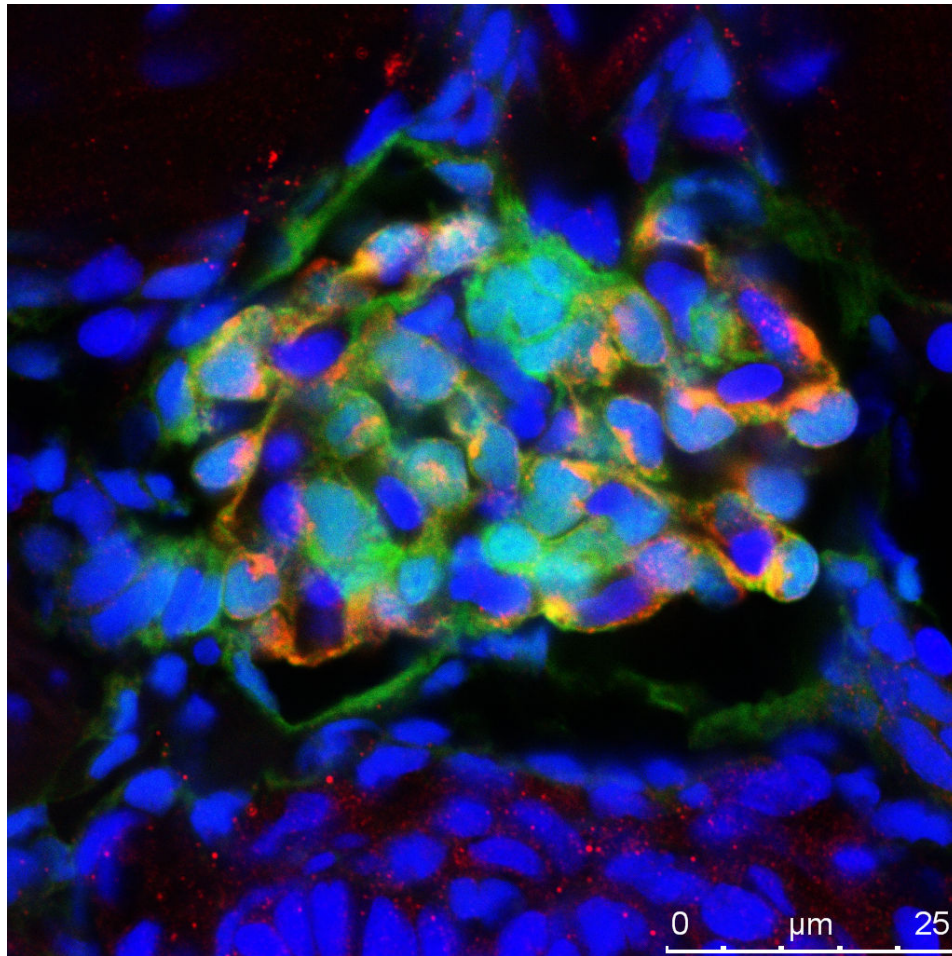


Abbildung 4.4: Glomerulus einer ET Fischlarve 3dpf mit Kontroll-MO behandelt; Färbung mit Phallo, Höchst und Nephrin. Maßstabsbalken 25 μm

te sich in den zMDM2-MO Fischlarven, vier Tage nach der Fertilisation, eine signifikant verminderte Intensität von DBP-EGFP [173]. Das war hinweisend für einen Verlust von DBP-EGFP über die Filtrationsbarriere in den Glomeruli. In der Kontrollgruppe hingegen war keine Verminderung der DPB-EGFP Intensität zu verzeichnen. In Abbildung 4.7 sind die Ctrl-MO gegen zMDM2-MO und Zebrafische ohne MO abgebildet.

Um zu überprüfen, ob die verringerte fluoreszierende Intensität, sprich der Verlust von EGFP, wirklich auf den Funktionsverlust in der glomerulären Filtrationsbarriere zurück zu führen ist, injizierten wir Alexa Fluor 647-konjugiertes 10-kD Dextran in die CADE Fischlarve. Dieses Protein wird physiologischerweise in der glomerulären Filtrationsbarriere filtriert und im proximalen Tubulus von den Tubulusepithelzellen wieder aufgenommen. Die Kontrollgruppe zeigte lediglich die 10-kD Dextran in den Tubulu-

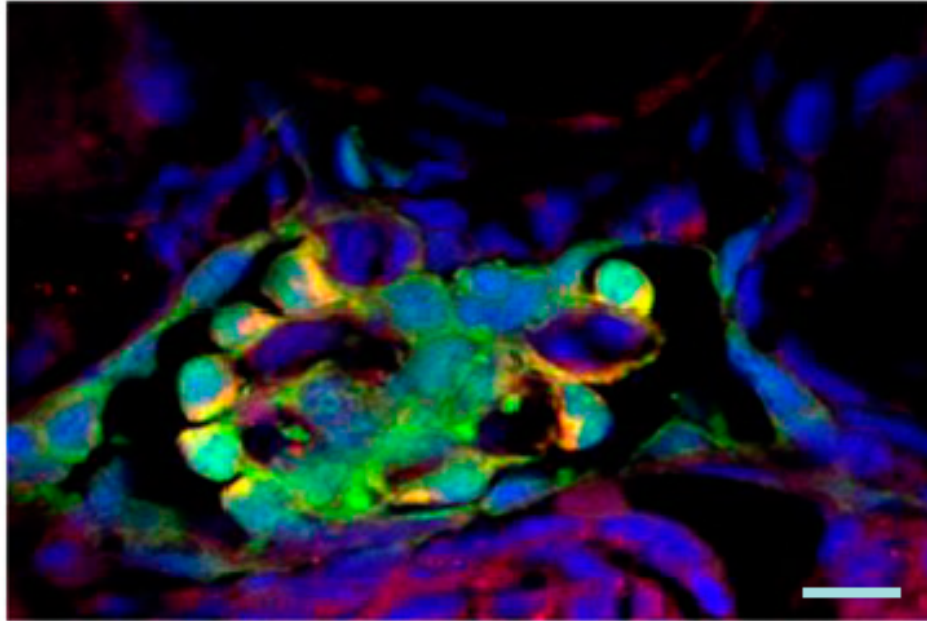


Abbildung 4.5: CADE-Fischlarve, welche mit zMDM2-MO behandelt wurde. In der Färbung zeigt sich unter dem Fluoreszenzmikroskop ein veränderter Glomerulus mit weniger Podozyten (grün), welche kaum Nephrin exprimieren (rot). Bilder überlagert gelblich gefärbt. Maßstabsbalken 10 μm . [173]

sepithelzellen. Die Fischlarven mit dem *Mdm2*-Knockdown zeigten sowohl Dextran als auch DBP-EGFP postglomerulär in den Tubulusepithelzellen [173]. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der großmolekulare Proteinverlust nicht durch eine Leckage in den Blutgefäßen zustande kommt, sondern durch die Filtrationsbarriere hindurchtrat und damit die Funktion der Filtrationsbarriere nicht gewährleistet war. In der Abbildung 4.8 ist der Tubulus dargestellt. Man erkennt, dass in der *Mdm2*- Knockdowngruppe sowohl Dextran (rot) als auch DBP-EGFP (grün) in den Tubulusepithelzellen vorzufinden ist (überlagert ergibt es eine gelbliche Färbung). In der Kontrollgruppe findet man lediglich Dextran (rot; auch in der Überlagerung bleibt es rot) [173].

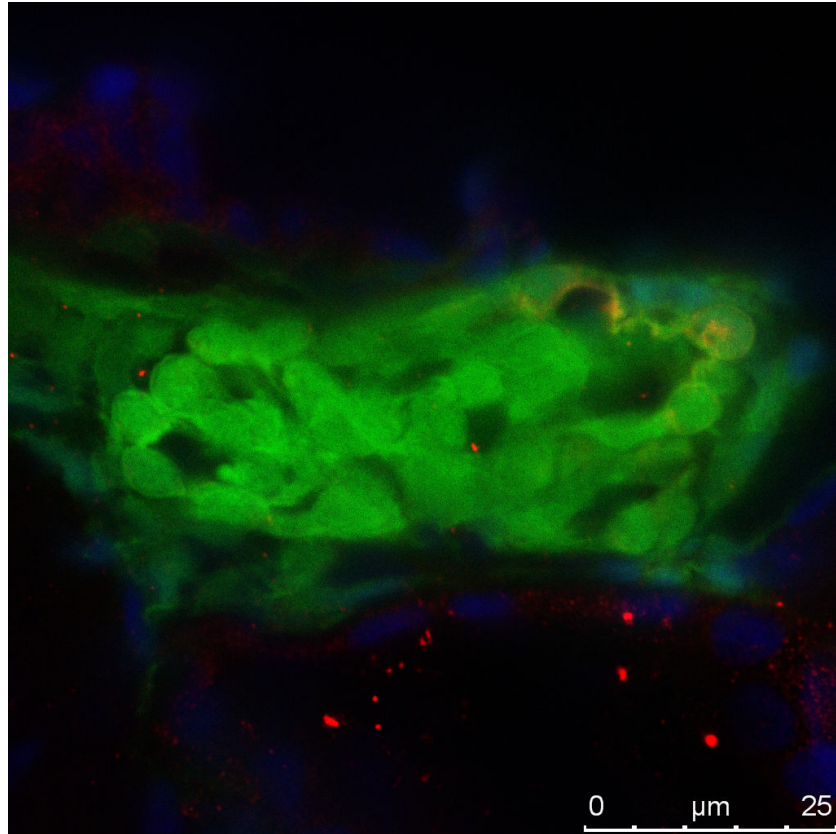


Abbildung 4.6: ET-Fischlarve 3dpf mit *Mdm2*-Knockdown. Kaum Nephrinexpression, langgestreckte Podozyten. Maßstabsbalken 25 μm .

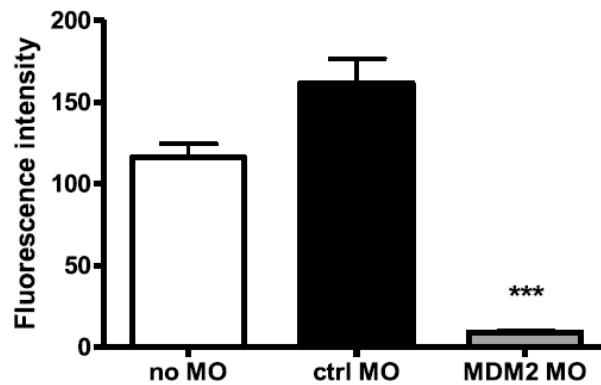


Abbildung 4.7: Signifikanter Verlust vom fluoreszierenden DPB-EGFP Protein in den Zebrafischen mit *Mdm2*-Knockdown, welcher durch einen Funktionsverlust in der Filtrationsbarriere zustande kommt. * $P < 0,05$; *** $P < 0,005$ [173]

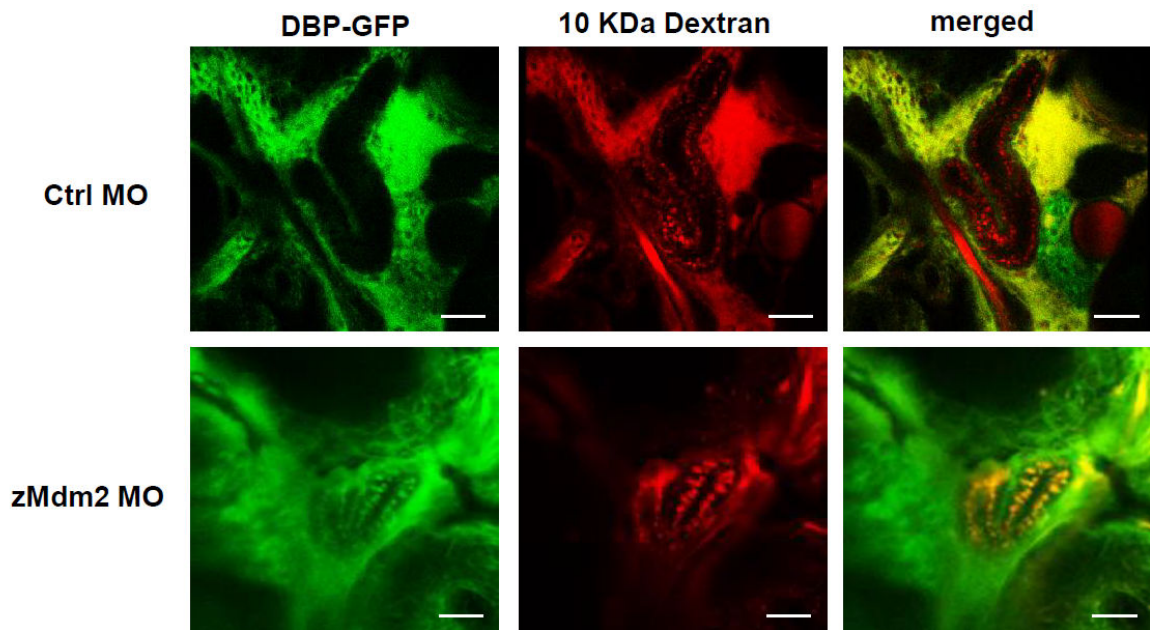


Abbildung 4.8: Injektion von 10kD-Dextran zur Visualisierung der Durchgängigkeit der Filtrationsbarriere: in den Kontroll-MO Fischen 3dpf zeigt sich nur Dextran (rot) in den Tubuluszellen; in den *Mdm2*-Knockdown Fischen ist sowohl Dextran (rot) als auch DPB-EGFP (grün) in den Tubuluszellen. [173]

4.2 Ergebnisse in den Zebrafischen: Knockdown von Mdm2 und p53

4.2.1 Knockdown von p53 und Mdm2 in den Zebrafischen mittels RT-PCR bestätigt

Um sicherzustellen, dass der doppelte Knockdown mittels Morpholino funktionierte, verwendeten wir Fischeier der ET-Linie und Cade-Linie. Wir stellten ein gemischtes Morpholino mit zMDM2 und zp53 her. Dies injizierten wir in die Fischeier in einer Zeitspanne von 40 Minuten nach dem Legen der Fischeier, da die Teilung schnell voranschreitet. Zum Vergleich injizierten wir Kontroll-Morpholino in die ET-Fischeier und ebenfalls verwendeten wir Fischeier ohne Behandlung (no MO). Daraufhin untersuchten wir die Fischeier erneut dahingehend, ob die für MDM2 und p53 kodierende Sequenzen aus dem Genom der Fischlarven beziehungsweise aus dem Genom der Podozyten, entfernte. Es wurden

von jeder Gruppe befruchtete Zebrafische genommen, woraus die mRNA isoliert wurde und im Anschluss in cDNA umgeschrieben wurde. Dann wurde die mRNA-Expression von MDM2 und p53 mittels Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion untersucht. Hierbei wurden p53- und MDM2-mRNA von CTRL MO-Zebrafischen (Kontrollgruppe) mit den MDM2/p53 MO-Zebrafischen (Knockdown) verglichen (siehe Abbildung 4.9). Erneut wurde die Ziel-mRNA-Expressionspiegel als der Mittelwert des Verhältnisses gegenüber dem jeweiligen CTrB1-mRNA-Level ausgedrückt. Es zeigte sich in der *p53/Mdm2*-Knockdown Zebrafischversuchsreihe eine signifikante Verminderung von MDM2-mRNA und p53-mRNA verglichen mit der Kontrollgruppe. Absolut ausgedrückt ergibt sich für die MDM2-Kontrollgruppe ein Wert von circa 0,55 versus 0,15 [173].

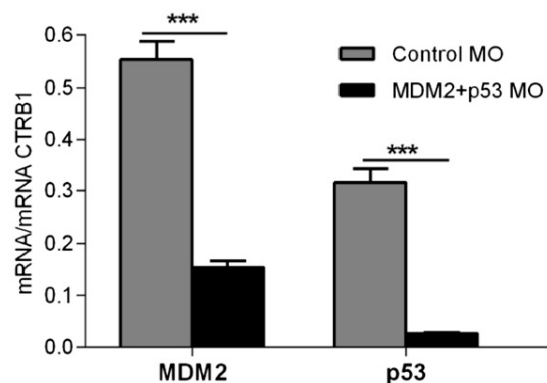


Abbildung 4.9: Nach Injektion der befruchteten Zebrafischeier zeigte sich die mRNA Expression von p53 und MDM2 signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Ziel-mRNA-Expressionslevel wurden mittels RT-PCR quantifiziert. Es wurde der Mittelwert des Verhältnisses gegenüber dem jeweiligen CTrB1-mRNA-Level ausgedrückt. Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM. [173]

4.2.2 Knockdown von p53 und Mdm2 führt zu keinen Malformationen

Zum Vergleich der zuvor beschriebenen makroskopischen Veränderungen untersuchten wir diese bei doppeltem Knockdown ebenfalls. Hierfür injizierten wir erneut zMDM2/zp53 Morpholino in die befruchteten Fischeier, sowie Kontroll-MO. Wir untersuchten die Fischlarven drei Tage nach der Fertilisation unter dem Mikroskop. Es zeigte sich eine makroskopisch normal entwickelte Fischlarve. Im Vergleich zu den vorherigen Ergebnis-

sen beim singulären *Mdm2*-Knockdown erkennt man, dass die Fischlarven keine Ödeme entwickelten und es zu keiner Malformation kam, wie in den exemplarischen Bildern in Abbildung 4.10 und 4.11 zu sehen ist. Der doppelte Knockdown (p53 und MDM2) rettete den Phänotyp.

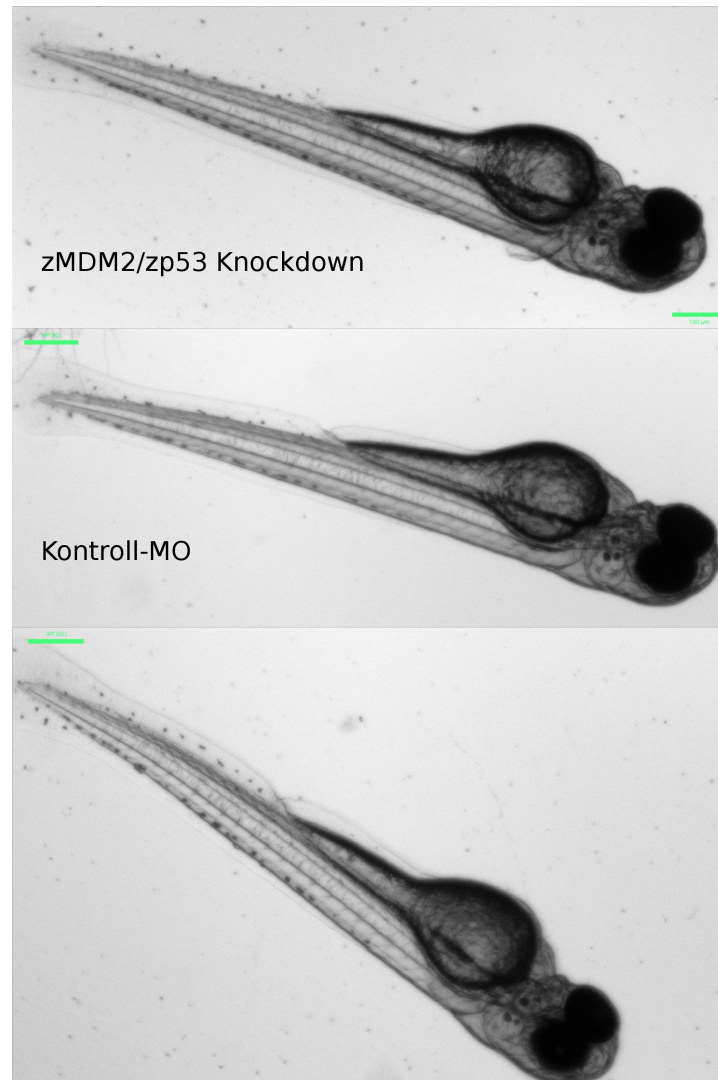
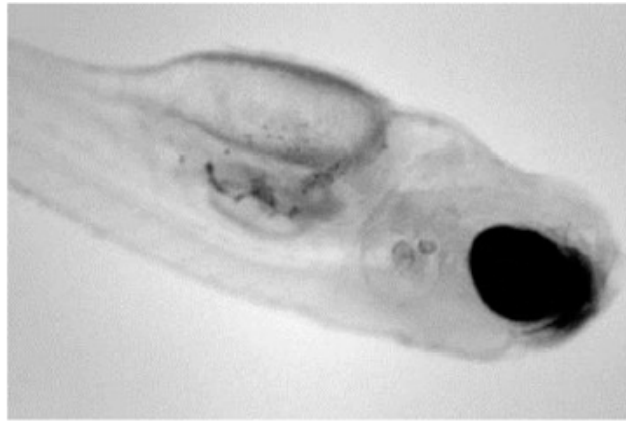


Abbildung 4.10: Vergleich des Phänotyps. Fischlarve 3dpf mit *zMDM2/zp53*-Knockdown zeigt den gleichen Phänotyp wie die Kontroll-Morpholino-Fischlarve, sowie die Fischlarve ohne Morpholino. Maßstabsbalken 100 µm.

Durch die makroskopisch physiologische Entwicklung der Fischlarven, hatten die *zMDM2/zp53*-Knockdown-Fischlarven keine Probleme aus ihren Fischeiern zu schlüpfen. Man konnte keinen Unterschied im Erscheinungstyp zwischen der Kontrollgruppe und der Knockdown-

CTRL MO



zMDM2/zp53 MO

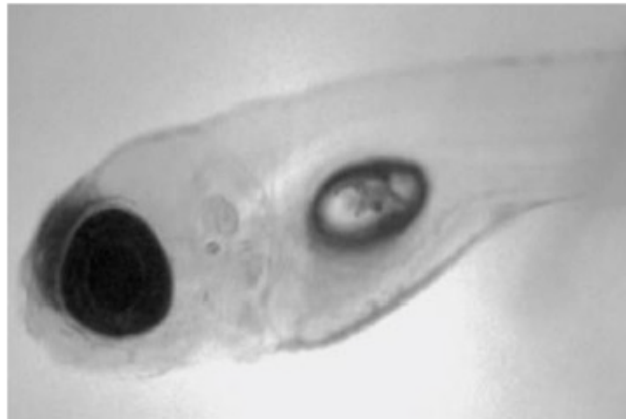


Abbildung 4.11: 3dpf Fischlarve mit *zMDM2/zp53*-Knockdown zeigte keine Bildung eines perikardialen Ödems, genauso wenig wie in der Kontroll-MO-Fischlarve 3dpf. [173]

Gruppe erkennen.

4.2.3 Knockdown von Mdm2 und p53 in den Podozyten führt zu einer vergleichbaren Nephrinexpression wie in der Kontrollgruppe

Nachdem sich morphologisch zeigte, dass es im Vergleich zum *zMdm2*-Knockdown zu einem intakten Phänotyp kommt, wollten wir die Unterschiede auch hinsichtlich der glomerulären Struktur vergleichen. Hierfür verwendeten wir erneut Fischlarven drei Tage nach der Fertilisation. Es wurde eine Kontrollgruppe, welche das Kontroll-Morpholino in die Fischeier injiziert bekam, hergestellt. Ebenso wurde die *zMDM2/zp53*-Gruppe

hergestellt, in welche *zMDM2/zp53*-Morpholino injiziert wurde und somit zu einem Knockdown beider Proteine führte. Erneut wurde hierfür die ET-Zebrafischreihe verwendet, welche sich aufgrund ihrer transparenten Eigenschaft besser für mikroskopische Untersuchungen eignet. Ebenso fluoreszieren hierbei die Podozyten in grün, da sie unter dem *wt1*-Promoter exprimiert werden. Wir stellten 60 µm dicke Kryoschnitte von den Fischlarven vier Tage nach Fertilisation (4dpf) her. Diese färbten wir zum einen mit Hoechst, welche dem Nukleus eine blaue Färbung verleiht. Zum anderen färbten wir mit Nephrin, welche ein Strukturbestandteil der Podozyten ist und sich rot färbt. Im Anschluss untersuchten wir die gefärbten, fixierten Kryoschnitte unter dem Laser scanning Mikroskop. Bei doppeltem Knockdown zeigte sich keine verminderte Nephrinexpression. Im Vergleich dazu hatten wir in der *zMdm2*-Knockdown-Gruppe eine signifikante Reduktion von Nephrin in den Podozyten gesehen [173]. Nun hatten wir ein vergleichbares glomeruläres Bild von der Kontrollgruppe als auch von der *zMDM2/zp53*-Knockdown-Gruppe. Das bedeutete, dass der doppelte Knockdown nicht nur den äußerlichen Phänotyp rettete, sondern auch den strukturellen und funktionellen Phänotyp der *zMdm2*-Knockdown-Morpholino-Gruppe. Abbildung 4.12 zeigt hierbei ein normales Glomerulum aus der Kontrollgruppe und Abbildung 4.13 zeigt ebenfalls ein normales Glomerulum aus der *zMDM2/zp53*-Knockdown-Gruppe.

4.2.4 Die glomeruläre Filtrationsbarriere bleibt bei doppeltem Knockdown (Mdm2 und p53) intakt

Nun interessierte uns die Funktionsfähigkeit der glomerulären Filtrationsbarriere. Hierfür verwendeten wir erneut die CADE-Zebrafischlinie, welche das Vitamin D-binding proteins (DBP) an eGFP bindet, welches wiederum rot fluoreszierend ist. Dadurch kann man mithilfe des Laser scanning Mikroskop den Verlauf des rot fluoreszierenden Farbstoffes, welcher die Örtlichkeit von Vitamin D verrät, verfolgen. Da Vitamin D physiologischerweise die glomeruläre Filtrationsbarriere nicht passieren sollte, kann man hierbei die Intaktheit der filtrierenden Strukturen überprüfen. Die Untersuchungen zeigten, dass es zu keinem Verlust des fluoreszierenden DBP-eGFP Proteins über die glomeruläre Filtrationsbarriere bei doppeltem Knockdown mit p53 und Mdm2 kam [173]. Zuvor zeigte sich beim singulären *Mdm2*-Knockdown ein signifikanter Unterschied des fluoreszierenden DBP-eGFP Proteins im Vergleich zur Kontrollgruppe. Somit konnten wir schlussfolgern, dass auch die Funktion und Struktur der glomerulären Filtrationsbarriere

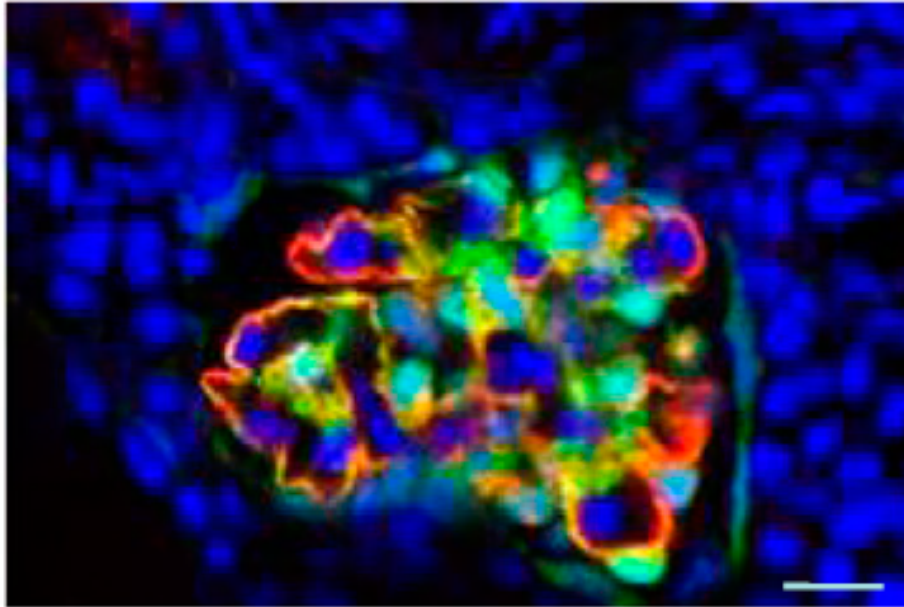


Abbildung 4.12: ET-Zebrafischlinie 4dpf mit Kontroll-MO-Injektion. Podozyten (grün) exprimieren Nephrin (rot). Normal entwickelter Glomerulus. Maßstabsbalken 10 μm . [173]

bei doppeltem Knockdown (p53 und Mdm2) intakt bleibt im Gegensatz zum einseitigen Knockdown von Mdm2 (siehe Abbildung 4.14).

Auch hier interessierte uns der Verlauf kleinmolekularer Proteine wie 10-kD Dextran. Hierfür injizierten wir Alexa Fluor 647-konjugiertes 10-kD Dextran in die CADE-Fischlarve 4dpf und untersuchten es direkt unter dem Mikroskop. Dieses kleinmolekulare Protein tritt physiologischerweise durch die Filtrationsbarriere hindurch, sodass wir unter dem Mikroskop aufgrund des rot fluoreszierenden Farbstoffes die Tubulusepithelzellen beurteilen können. Es zeigte sich in den Tubulusepithelzellen in der MDM2/p53 MO-Gruppe nur das Protein Dextran, ebenso wie in der Kontrollgruppe. Im Gegensatz zu der MDM2-MO-Gruppe, wo mithilfe des Dextrans das Vorhandensein von Vitamin D nach der Filtrationsbarriere in den Tubulusepithelzellen gezeigt werden konnte [173]. Somit bestätigt dies, dass es sich hierbei um eine intakte glomeruläre Filtrationsbarriere handelt und es aufgrund des doppelten Knockdowns zu einer Rettung der Struktur kommt. Wie in Abbildung 4.15 dargestellt, erkennt man nur Dextran (rot) in den Tubulusepithelzellen. DBP-GFP findet sich nicht vor, sodass es in der Überlagerung (merged) auch nicht zur Gelbfärbung kommt.

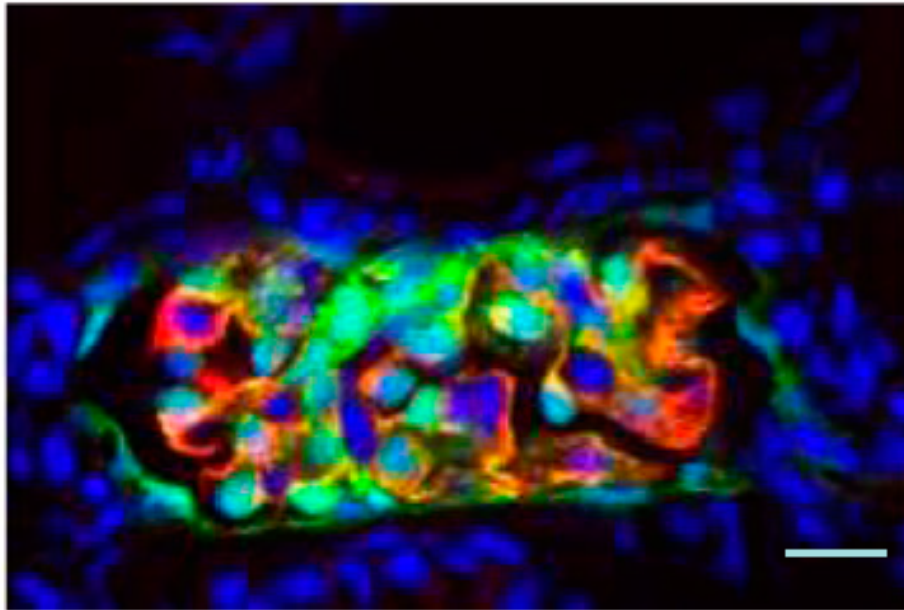


Abbildung 4.13: ET-Zebrafischlinie 4dpf mit *zMDM2/zp53*-Knockdown. Der doppelte Knockdown rettet den Phänotyp. Es zeigt sich ein gut entwickelter Glomerulus, in Größe, Form und Nephrinexpression vergleichbar zur Kontrollgruppe. Maßstabsbalken 10 μ m. [173]

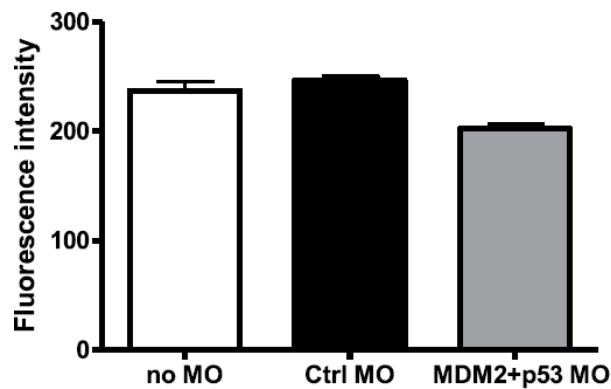


Abbildung 4.14: Die Intensität des fluoreszierenden Proteins DBP-EGFP ist in der Kontrollgruppe und in der MDM2/p53 MO Gruppe vergleichbar. Die Struktur und Funktion der Filtrationsbarriere konnte durch den doppelten Knockdown gerettet werden. [173]

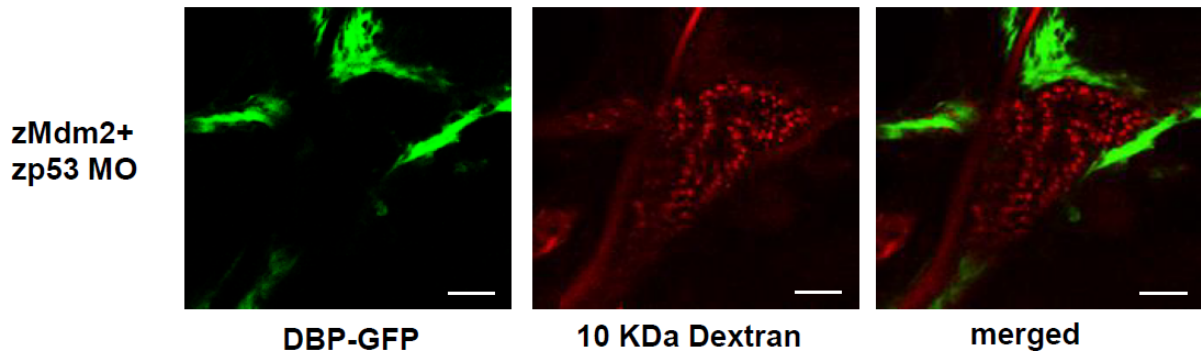


Abbildung 4.15: Tubulusepithelzellen postglomerulär zeigen das Vorhandensein vom kleinmolekularen 10-kD Dextran sowohl in der MDM2/p53-MO-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe. Kein Nachweis von DBP-EGFP, somit ist die Filtrationsbarriere intakt. [173]

4.3 Ergebnisse im Mausmodell

4.3.1 Kreuzung von $MDM2^{flox/flox}$;Nphs2-cre+ Mäusen mit $p53^{flox/flox}$ führt zu Podozyten-spezifischem Doppel-Knockout $MDM2^{flox/flox}$ $p53^{flox/flox}$; Nphs2-cre+ ($MDM2$ / $p53^{Dpod}$)-Mäusen

Nachdem sich im Zebrafischmodell die eben beschriebenen Ergebnisse zeigten, interessierte uns, ob sich diese in einem höheren Organismus ähneln. Dafür verpaarten wir die von uns erzeugten Mäuse, welche einen spezifischen Knockout von Mdm2 in den Podozyten besitzen ($MDM2^{flox/flox}$;Nphs2-cre+ Mäuse) mit $p53^{flox/flox}$ Mäusen, welche einen Podozyten-spezifischen Knockout von p53 besitzen. Nach der Verpaarung führten wir bei den Jungtieren eine Genotypisierung zur Überprüfung des Knockouts. Daraus entstanden die doppelten Knockout-Mäuse $MDM2$ / $p53^{Dpod}$. Als Kontrolle verwendeten wir für unsere Versuche $MDM2^{flox/flox}$ $p53^{flox/wt}$; Nphs2-cre+ ($MDM2^{Dpod}$ / $p53^{f/wt}$) Wurfgeschwister.

4.3.2 Der doppelte Knockout rettet den vakuolisierenden Phänotyp

Zur Visualisierung der Glomerula, führten wir Färbungen derselben durch. Bereits zuvor wurden in unserem Labor Nierenschnitte bei $\text{MDM2}^{fl/fl}$ Mäusen durchgeführt, wo sich eine Vakuolenbildung zeigte. Dafür führten wir Nierenschnitte bei 14 Wochen alten Mäusen durch, in der Kontrollgruppe, in der doppelten Knockout-Gruppe und in der $\text{MDM2}^{fl/fl}$ Gruppe. Davon fertigten wir eine PAS-Färbung an und untersuchten sie unter dem Elektronenmikroskop. Durch den spezifischen Knockout von *Mdm2* in den Podozyten kam es bildmorphologisch zu einer deutlichen Bildung von Vakuolen in den Podozyten. Dieser vakuolisierende Phänotyp konnte sowohl in der Kontrolle $\text{MDM2}^{fl/fl}$ Gruppe, als auch in der doppelten Knockout $\text{MDM2} / \text{p53}^{Dpod}$ Gruppe nicht gezeigt werden [173]. Abbildung 4.16 vergleicht makroskopisch die Kontrollgruppe, den singulären und den doppelten Knockout in der Elektronenmikroskopie und in der PAS-Färbung.

4.3.3 Der doppelte Knockout führt zu einer höheren Zahl von WT-1/Nephrin positiven Podozyten im Alter von 3 versus 14 Wochen

Wir führten ebenfalls eine Zweifachfärbung der angefertigten Nierenschnitte von der Kontrollgruppe $\text{MDM2}^{Dpod} / \text{p53}^{f/wt}$ und der doppelten Knockout-Gruppe $\text{MDM2} / \text{p53}^{Dpod}$ auf WT-1 und Nephrin durch. Dabei interessierte uns die Anzahl der differenzierten Podozyten in der jeweiligen Gruppe. In den Schnitten erkennt man, dass in der Kontrollgruppe deutlich weniger differenzierte Podozyten zu erkennen sind, im Gegensatz zu der Mäusegruppe mit dem doppelten Knockout. In Abbildung 4.17 sieht man rötlich verfärbt die Podozyten beziehungsweise Nephrin-positiven Zellen. Im doppelten Knockout sind deutlich mehr Podozyten erkennbar [173].

Nachdem sich makroskopisch dieses Bild zeigte, interessierte uns die Anzahl der WT-1/Nephrin-positiven-Zellen. Mittels RT-PCR quantifizierten wir die Anzahl der WT-1/Nephrin-positiven Zellen der Glomerula in der Kontrollgruppe und der doppelten Knockout Gruppe im Alter von 3 beziehungsweise 14 Wochen. Im Alter von drei Wochen war diesbezüglich kein Unterschied erkennbar. Nach 14 Wochen zeigte sich allerdings ein signifikanter Unterschied der WT-1/Nephrin-positiven Zellen [173]. Dies spiegelte das Bild der zuvor angefertigten Zweifachfärbung, ebenfalls im Alter von 14 Wochen,

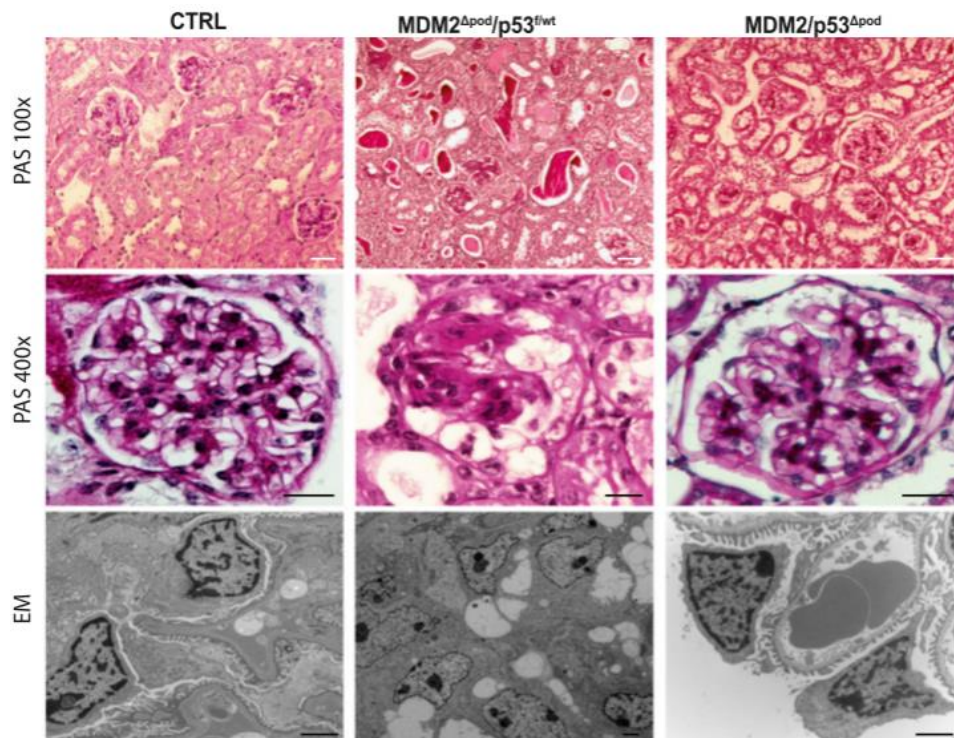


Abbildung 4.16: Repräsentative Nierenschnitte von Mäusen im Alter von 14 Wochen bei $MDM2^{fl/fl}$ Kontrolle, $MDM2^{Dpod}/p53^{fl/wt}$, und $MDM2/p53^{Dpod}$. Maßstabsbalken 100 μm in der oberen Reihe, 20 μm in der mittleren. Die untere zeigt die dazugehörigen Bilder unter dem Elektronenmikroskop. Es zeigt deutlich die Wiederherstellung des vakuolisierenden Phänotyps in den $MDM2/p53^{Dpod}$ Mäusen (Vergrößerung von 4000 – 12,000). Maßstabsbalken 10 μm im unteren linken/mittleren; 2 μm im unteren rechten. PAS = Periodic Acid Schiff; EM = Elektronenmikroskopie [173]

wieder. Zusammenfassend ergab sich in der Kontrollgruppe eine deutlich verminderte Anzahl von WT-1/Nephrin-positiven Zellen (siehe Abbildung 4.18).

4.3.4 Der doppelte Knockout von p53 und Mdm2 in den Podozyten sichert die Funktionsfähigkeit der Filtrationsbarriere im Sinne einer verminderten Proteinurie

Zuvor publizierte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ein Podozyten-spezifischer Knockout von Mdm2 in den Mäusen zu einem progredienten Verlust der Po-

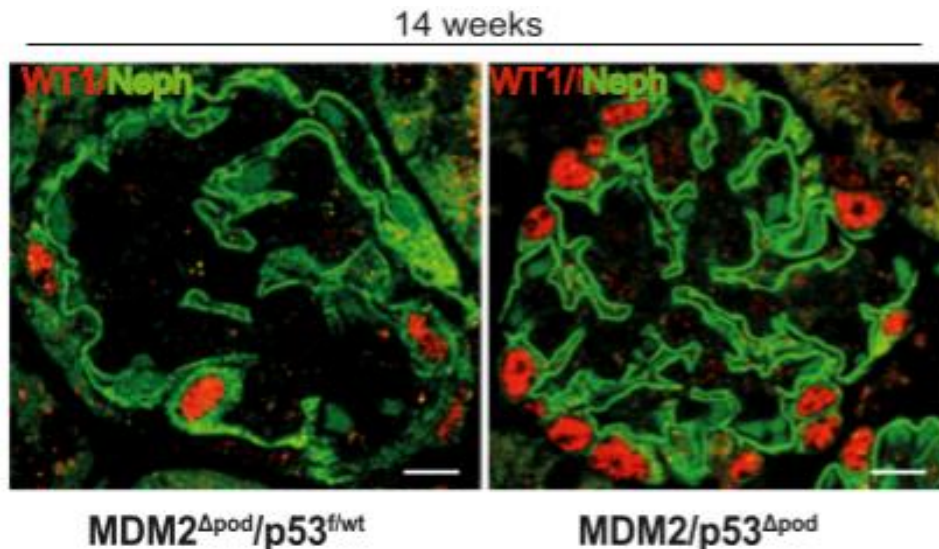


Abbildung 4.17: Zweifachfärbung von WT-1/Nephrin: Vergleich Anzahl der differenzierten Podozyten in der Kontrollgruppe MDM2^{Dpod} / p53^{f/wt} und der doppelten Knockout-Gruppe MDM2 / p53^{Dpod} im Alter von 14 Wochen. In der Kontrollgruppe sind deutlich weniger Podozyten. [173]

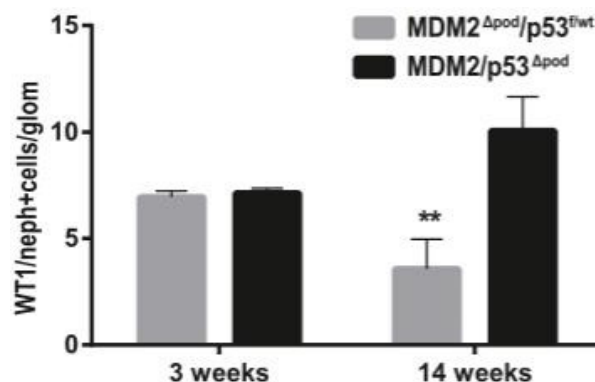


Abbildung 4.18: Anzahl von WT-1/Nephrin-positiven Zellen im Alter von 3 und 14 Wochen im Vergleich der Kontrollgruppe MDM2^{Dpod} / p53^{f/wt} und der doppelten Knockout-Gruppe MDM2 / p53^{Dpod}. Erst nach 14 Wochen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Podozytenanzahl. Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEMs. **P < 0.01 versus Kontrollgruppe. [173]

dozyten führt. Dieser wiederum geht mit einer Proteinurie, Glomerulosklerose, und eingeschränkter Lebenserwartung einher. Daher führten wir zum einen den Mdm2-Knockout in den Zebrafischen zur besseren Vergleichbarkeit durch, zum anderen schlossen wir an die Ergebnisse den doppelten Knockout von p53 und Mdm2 an um deren Interaktion

und jeweilige Funktion besser zu verstehen.

Hierfür untersuchten wir unsere Mäuse in Bezug auf die verminderte Funktionsfähigkeit der Filtrationsbarriere, welche wir im *Mdm2*-Knockout zuvor feststellten. Wir untersuchten die Funktionsfähigkeit der Filtrationsbarriere mittels Messung der Proteinurie (Albumin). Dies ermittelten wir mittels Albumin ELISA und berechneten daraus die Albumin/Kreatinin Ratio im Urin der Mäuse. Wir verglichen die Albumin/Kreatinin Ratio zwischen den doppelten Knockout Mäusen $MDM2 / p53^{Dpod}$ und der Kontrollgruppe $MDM2^{Dpod} / p53^{f/wt}$ im Alter von 8 Wochen beziehungsweise 14 Wochen. Es zeigte sich ein signifikanter Rückgang der Proteinurie bei den doppelten Knockout-Mäusen, sowohl im Alter von 8 Wochen, als auch im Alter von 14 Wochen. Im Alter von 8 Wochen ergab sich in der Kontrollgruppe eine mittlere Proteinurie von 1,4806 versus 0,28079 in der Gruppe mit dem Knockout von p53 und Mdm2 [173]. Zusammenfassend wurde ein Rückgang der Proteinurie bei den doppelten Knockout Mäusen um circa 81 % festgestellt (siehe Abbildung 4.19).

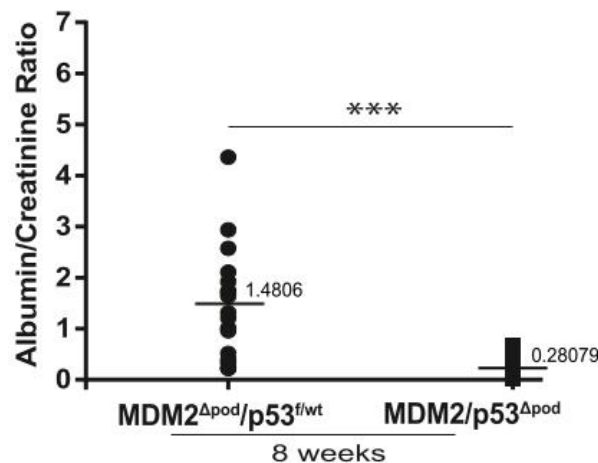


Abbildung 4.19: Ergebnisse der Proteinurie verglichen $MDM2 / p53^{Dpod}$ und $MDM2^{Dpod} / p53^{f/wt}$ (8-Wochen: n = 17 Kontrollgruppe $MDM2^{Dpod} / p53^{f/wt}$. ***P,0.005. Die Daten sind Mittelwerte +/- SEM. [173]

Erneut überprüften wir die Proteinurie im Alter von 14 Wochen. Die Proteinurie war ebenfalls signifikant niedriger im Vergleich von doppelten Knockout Mäusen vs. Kontrollgruppe. In Zahlen ausgedrückt hatten wir eine mittlere Proteinurie von 2,77377 in der Kontrollgruppe versus 0,28079 in der doppelten Knockout Gruppe. Das bedeutet einen signifikanten Rückgang der Proteinurie um circa 90 % [173]. Insgesamt zeigte sich aller-

dings im fortschreitenden Alter eine höhere Proteinurie, sowohl in der Knockout Gruppe als auch in der Kontrollgruppe. Es ergab sich eine mittlere Proteinurie von 2,77377 in der Kontrollgruppe, im Vergleich dazu hatte die Kontrollgruppe in der 8.Lebenswoche eine mittlere Proteinurie von 1,4806 [173]. Sprich, es kam nahezu zu einer Verdopplung der Proteinurie im fortschreitenden Lebensalter von 6 Wochen. Ein ähnliches Bild zeigte die Mäusegruppe mit dem doppelten Knockout (p53 und Mdm2). Dort hatte die Mäusegruppe im Alter von 14 Wochen eine mittlere Proteinurie von 0,43555 im Vergleich zu 0,28079 im Alter von 8 Wochen [173]. Auch hier zeigte sich eine Zunahme um circa ein Drittel (siehe Abbildung 4.20).

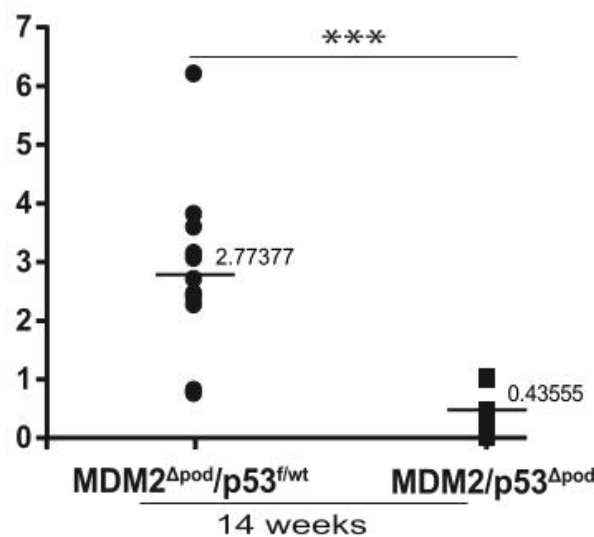
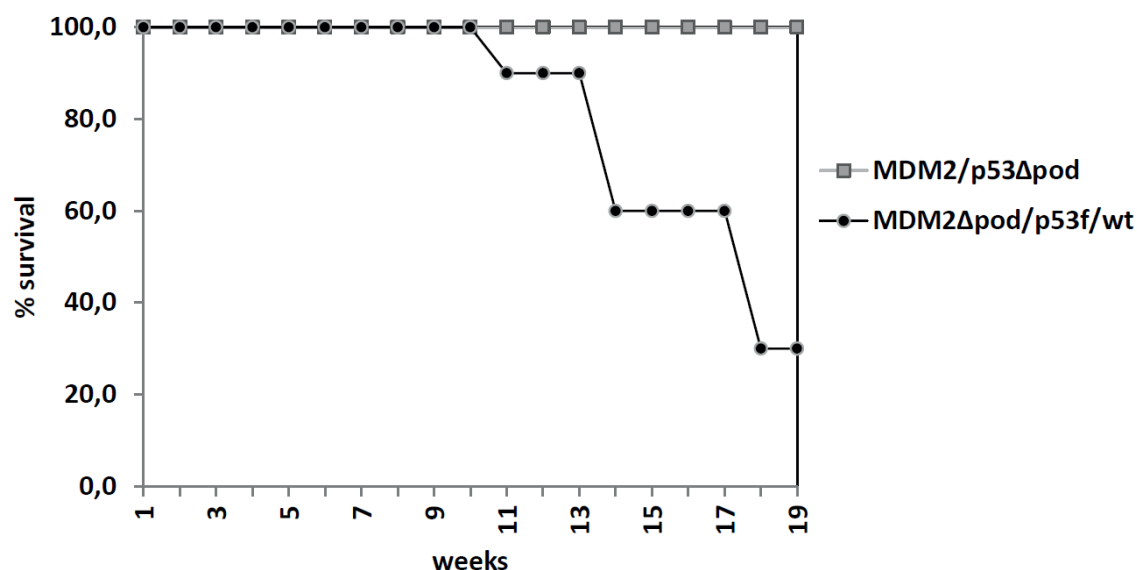


Abbildung 4.20: Ergebnisse der Proteinurie verglichen MDM2 / p53^{Dpod} und MDM2^{Dpod} / p53^{f/wt} (14-Wochen: n = 10 Kontrollgruppe MDM2^{Dpod} / p53^{f/wt} und n = 8 MDM2 / p53^{Dpod}). ***P,0.005. Die Daten sind Mittelwerte +/- SEM. [173]

4.3.5 Knockout von p53 und Mdm2 in den Podozyten verlängert das Überleben

Zuletzt verglichen wir die Überlebenszeit der beiden Gruppen, sprich von der Kontrollgruppe MDM2^{Dpod} / p53^{f/wt} versus der doppelten Knockout-Gruppe MDM2 / p53^{Dpod} über einen Zeitraum von 19 Wochen. Dabei zeigte sich deutlich, dass in der doppelten Knockout-Gruppe ein 100 % Überleben über den genannten Zeitraum herrschte. Wo hingegen in der Kontrollgruppe (Knockout von Mdm2) bis zur 10.Woche auch noch

ein 100 %iges Überleben vorlag. Danach kam es allerdings zu einer erhöhten Mortalität. Nach 19 Wochen überlebten in der Kontrollgruppe nur noch circa 30 % [173]. Die Überlebenskurve ist in Abbildung 4.21 dargestellt.



Abbildungung 4.21: Vergleich des Überlebens zwischen der Kontrollgruppe $MDM2^{Dpod} / p53^{f/wt}$ und der doppelten Knockout-Gruppe $MDM2 / p53^{Dpod}$. Nach 19 Wochen lebten in der doppelten Knockout-Gruppe noch 100 %. In der Kontrollgruppe allerdings nur noch circa 30 %. Der doppelte Knockout führte zu einem längeren Überleben. [173]

4.4 Ergebnisse in vitro

4.4.1 *Mdm2*-Knockdown führt zur Überexpression von p53 und p53-Zielgenen, die den Zellzyklus , Zelltod und Autophagie regulieren

Wir führten ebenfalls in vitro Experimente durch mit Zellpopulationen von Maus-podozyten. Die RNA wurde von den Maus-podozyten isoliert. In der einen Gruppe wurde eine Transfektion mit MDM2 siRNA durchgeführt, in der anderen mit Kontroll siRNA für 48 Stunden. Daraufhin wurde die RNA in cDNA umgeschrieben um im Anschluss eine quantitative RT-PCR durchzuführen. Die mRNA Expression wurde mittels 18S als

sogenanntes „Housekeeping“ Gen ermittelt. Es wurden Primer verwendet, welche Zielgene von p53 sind, die den Zellzyklus, Zelltod und Autophagie regulieren. Es zeigte sich zum einen, dass, nachdem Mdm2 supprimiert wurde, es zu einem Anstieg von p53 kam. Allerdings führte es neben dem Anstieg von p53 auch zum Anstieg von p53-Zielgenen wie FAS, p21 und ATG5. Diese sind bekannt als Gene, welche den Zellzyklus, Zelltod und Autophagie regulieren [198] [200] [187]. Die untersuchten Gene und ihre Expression ist in Abbildung 4.22 dargestellt.

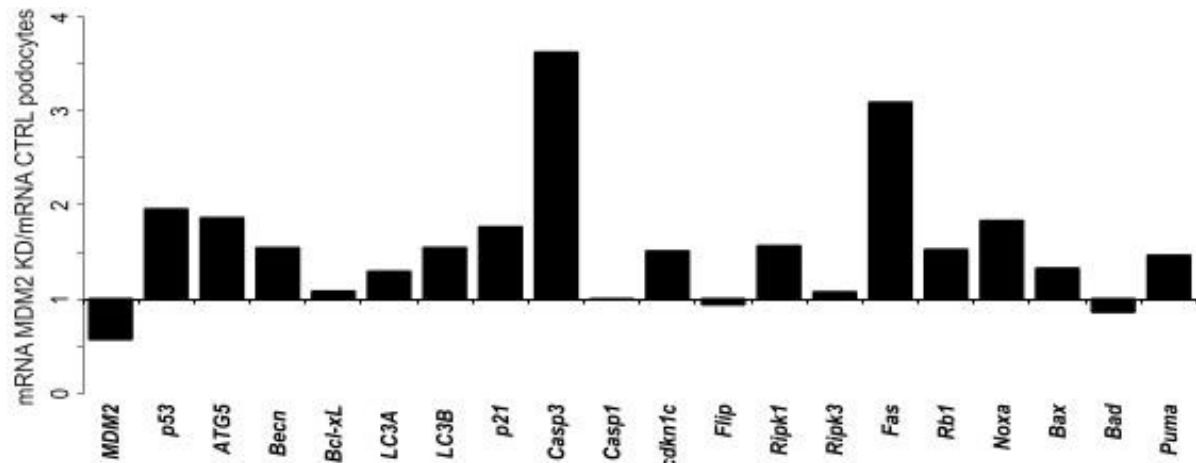


Abbildung 4.22: RNA, welche von Mauspodozyten isoliert wurde, wurden für 48h mit MDM2 siRNA oder Kontroll siRNA behandelt. Es erfolgte die Umschreibung in cDNA. Im Anschluss eine RT-PCR, 18S wurde als „Housekeeping“ Gen verwendet um mRNA Expression zu ermitteln. Die Expressionsniveaus sind im Balkendiagramm dargestellt. Es erfolgte der Vergleich mit Kontroll siRNA-transfizierten Podozyten (=Kontrolle). Bei supprimiertem Mdm2 zeigte es p53 hochreguliert, sowie Gene, welche für den Zellzyklus, Zelltod und Autophagie verantwortlich sind (wie zum Beispiel FAS, p21, ATG5). [173]

4.4.2 Der doppelte Knockdown (p53+Mdm2) führt zu einem verminderten Zelluntergang

Zur Überprüfung des Zelltods der Podozyten wurde ein LDH Assay durchgeführt. Beim Zelluntergang jeglicher Zellen wird Laktatdehydrogenase (LDH) freigesetzt. Dies wurde nun gemessen um damit eine Auskunft über das Ausmaß des Zellunterganges zu bekommen. In unserem Fall wurde dies in vitro bei den murinen Podozyten durchgeführt.

Hierfür führten wir eine Transfektion mit siRNA für MDM2, p53 und MDM2+p53 durch. Nach 24 Stunden konnte mittels LDH der Zelltod gemessen werden. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der MDM2 siRNA und der MDM2+p53 siRNA [173]. Es kam zu einem deutlich vermehrten Zelluntergang der Podozyten in der MDM2 siRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Gruppe mit dem doppelten Knockdown (p53+MDM2). Die Ergebnisse des LDH- Assays sind in Abbildung 4.23 dargestellt.

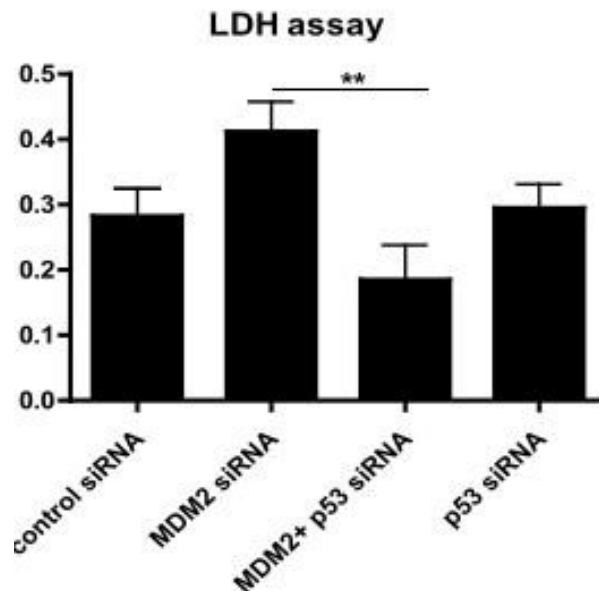


Abbildung 4.23: LDH Assay zur Quantifizierung des Zelluntergangs in murinen Podozyten. Verglichen werden MDM2 siRNA und MDM2+p53 siRNA. Der Zelluntergang ist in MDM2+p53 siRNA signifikant geringer als in MDM2 siRNA. Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEMs. **P,0.01; ***P,0.005. [173]

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mittels Experimenten in den Zebrafischen versuchten wir herauszufinden, ob der doppelte Knockout von Mdm2 und p53 unsere Hypothese bestätigt, dass diese Gegenspieler in den Podozyten sind. Vorangegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass ein singulärer Knockout von Mdm2 in den Podozyten zu einem Verlust der Podozyten führt und es dadurch zu einer Proteinurie, Glomerulosklerose und eingeschränkten Lebenserwartung kommt. Die Ergebnisse sind Gegenstand einer separaten Promotionsarbeit.

Aufgrund dessen führten wir vorerst mit der Hilfe von Morpholinos einen einfachen Knockdown von Mdm2 in den Zebrafischen durch. Es zeigte sich, dass es dadurch zu Malformationen in der makroskopischen Entwicklung (perikardiale Ödeme) und zu einem Funktionsverlust der glomerulären Filtrationsbarriere mit erhöhter Proteinurie kam. In den angefertigten Färbungen zeigten sich zudem veränderte Glomerula, eine verminderte Podozytenanzahl und eine reduzierte Nephrinexpression.

Im Anschluss daran interessierte uns, zu welchen Ergebnissen wir gelangen, wenn sowohl p53 als auch Mdm2 nicht mehr vorhanden sind. Erneut führten wir mittels Morpholinos einen Knockdown in den Zebrafischen durch, von Mdm2 und p53. Die anschließenden Versuche zeigten, dass wir dadurch den Phänotyp retten konnten. Wir sahen keine makroskopischen Veränderungen mehr, die Zebrafische glichen sich in Form und Länge. Zudem kam es zu keinem Funktionsverlust der Filtrationsbarriere. Die Zebrafische entwickelten keine Proteinurie, die Podozyten waren in ihrer Anzahl ähnlich zwischen der doppelten Knockout Gruppe und der Vergleichsgruppe. Nephrin wurde gleichermaßen exprimiert. Zur Bestätigung der Ergebnisse in höheren Organismen führten wir mittels Cre/loxP-System einen doppelten Knockout von p53 und Mdm2 in den Podozyten von Mäusen durch. Auch hier zeigte sich, dass der doppelte Knockout zu einem verlängerten Überleben führte. Sowie zu einer höheren Anzahl von wt-1/ Nephrin positiven Podozyten und einer verminderten Proteinurie, sprich die Funktionsfähigkeit der Podozyten konnte dadurch beibehalten werden. Der zuvor beobachtete vakuolisierende Phänotyp bei einfachem Knockout von Mdm2 in den Podozyten, war im doppelten Knockout nicht wiederholbar. Zuletzt zeigten in vitro Experimente, dass es durch den Knockout von Mdm2 in den Podozyten zu einer reaktiv gesteigerten Expression von p53 und den damit verbundenen Zielgenen wie p21, FAS und ATG5 kommt, welche Autophagie, Zelltod und Zellzyklus regulieren. Ebenfalls konnte mittels LDH Assay gezeigt werden, dass mehr Zellen in den Podozyten zugrunde gehen im *Mdm2*-Knockdown im Vergleich zum doppelten Knockout mit Mdm2 und p53. MDM2 ist für das Überleben von Podozyten essentiell. Bei seinem Fehlen kommt es zu einer gesteigerten Expression des Negativregulators p53 und das führt zu einer erhöhten Mortalität. Der doppelte Knockout verhindert eine Überexpression von p53 und dadurch wird die Funktionsfähigkeit der Podozyten aufrechterhalten. MDM2 hilft die Homöostase zu gewähren und garantiert ein längerfristiges Überleben, indem es p53-abhängige Formen des Zellunterganges verhindert.

5 Diskussion

MDM2 ist eine U3-Ubiquitin-Ligase und uuhat als Hauptnegativregulator von p53 die Aufgabe zu dessen proteasomalen Abbau zu führen oder seine Transkription zu vermindern. Das wiederum führt zu einer Minderung der durch p53-induzierten Apoptose beziehungsweise zu einem Zellzyklusarrest und führt stattdessen zu einem verlängerten Überleben der Zellen und zum Wachstum [181]. Dagegen führen Mutationen im Mdm2-Gen zur Entstehung von Tumoren. Zudem konnte festgestellt werden, dass Mdm2 überproportional viel in den Podozyten vorherrscht [126]. Sodass unsere Hypothese war, dass MDM2 zum einen für den Organismus nicht redundant ist zum Überleben und dass es speziell in der Niere, beziehungsweise in den Podozyten benötigt wird um die Homöostase aufrecht zu erhalten.

Durch vorangegangene Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe hatten wir Kenntnis darüber, dass es bei einem Knockout von Mdm2 in den Podozyten der Mäuse zu einem Funktionsverlust der Filtrationsleistung kommt und mit einer erhöhten Letalität einhergeht. Daher bestand die Motivation für diese Arbeit nun darin diese Ergebnisse in den Zebrafischen zu bestätigen. Zudem, ob dieser Effekt durch den doppelten Knockout rückgängig gemacht werden kann. Nachdem sich unsere Hypothese, dass MDM2 zum einen für das Überleben von Podozyten unersetzlich ist, solange p53 aktiv ist und zum anderen dieser Phänotyp durch das doppelte Ausschalten gerettet werden kann, bestätigte, begannen wir mit den Experimenten in der Maus mit doppeltem Knockout in den Podozyten.

Insgesamt konnten wir folgende Schlussfolgerungen festhalten:

- 5.1** MDM2 ist essenziell als Gegenspieler von p53 um für das Überleben der Podozyten zu sorgen und deren Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischem, toxischem und immunologischem Stress. Besteht ein Ungleichgewicht zugunsten von p53, kommt es zu einer gesteigerten Expression von p53, was wiederum zu einer erhöhten Mortalität führt.

- 5.2 Durch den doppelten Knockout, kann es zu keiner Überexpression von p53 kommen und die Funktionsfähigkeit der Podozyten scheint nicht beeinträchtigt. Dadurch bestätigt sich das enge Zusammenspiel dieser beiden Moleküle mit ihren unterschiedlichen Aufgaben.
- 5.3 Durch MDM2 kann die Aktivität von p53 reguliert werden. Das ist essentiell für das lebenslange Überleben der Podozyten und zur Gewährleistung der Homöostase in der Niere.
- 5.4 Bei einem Knockout von Mdm2 kommt es neben der Überaktivität von p53 ebenfalls zur vermehrten Expression von Zielgenen, welche für Autophagie, Zelltod und Zellzyklus zuständig sind. Dadurch ergeben sich verschiedene Möglichkeiten des Zelltods. Durch Ausschluss verschiedener Zelluntergangsvarianten wie Apoptose, Pyroptose, Pyronekrose, Nekroptose oder Ferroptose, stellten wir am ehesten eine Zelluntergangsform namens Podoptose fest. Eine durch p53-Überaktivität-induzierte Form des Zelltods.

5.1 MDM2 als essenzieller Gegenspieler von p53 für das Überleben der Podozyten

Der systemische Knockout von Mdm2 führt zur embryonalen Letalität, sprich ein komplettes Fehlen von MDM2 ist nicht mit dem Überleben vereinbar. Wohingegen der doppelte Knockout, von Mdm2 und p53, wiederum den Phänotyp rettet [79] [31]. Bei spezifischerem Knockout von Mdm2 in verschiedenen Geweben führt die Deletion zu unterschiedlichen Auswirkungen wie ein letaler Ausgang [16], Fehlbildungen der spezifischen Organe [76] oder auch Regeneration der betroffenen Zellen [177]. Vorangegangene Ergebnisse zeigten, dass eine Überaktivität des pro-apoptotischen Tumorsuppressors schwerwiegende Folgen für die Niere, und im Besonderen in den Podozyten, darstellt [76]. Durch die Durchführung der Experimente in den Zebrafischen zum vorerst singulären Knockdown von Mdm2 mithilfe von Morpholinos, zeigte sich, dass sich die durch die fehlende Funktion von Mdm2 entstandenen Folgen, bestätigten. Durch den Knockdown von Mdm2 in den Zebrafischen bestätigten wir die wichtige Rolle von MDM2 in der Entwicklung eines Organismus. Bereits vorhergehende Arbeiten in Mäusen konnten zeigen, dass ein kompletter Knockout von Mdm2 nicht mit dem Überleben vereinbar ist. In unseren Experimenten zeigte sich dies, indem es zu fehlerhafter Entwicklung kam. Die

Tiere zeigten perikardiale Ödeme, degenerative Entwicklung und speziell in den Nieren eine Veränderung der Glomerula mit einhergehender Proteinurie. Vorangegangene Arbeiten untersuchten den singulären Knockout von Mdm2 im höheren Organismus, der Maus. Dort konnte festgestellt werden, dass ein Knockout von Mdm2 in den Podozyten nicht zu einer embryonalen Letalität führt [126]. Erst postnatal, im Laufe der ersten Lebenswochen, zeigte sich eine verminderte Podozytenzahl und die damit verbundene reduzierte Nierenfunktion. So lässt sich vermuten, dass MDM2 in den Podozyten nicht notwendig ist während der Embryogenese. Es kommt dennoch zur regelrechten Anlage. Das ist nicht in allen Geweben mit spezifischem Knockout von Mdm2 der Fall. Wie zum Beispiel in Kardiomyozyten. Der gewebespezifische Knockout führte dabei noch während der Embryogenese zum Verlust von Kardiomyozyten, worauf es zum Herzversagen kam [53]. Ein weiteres Beispiel sind neuronale Zellen. Dort führte der gewebespezifische Knockout von Mdm2 zur embryonalen Letalität [195]. Zusammenfassend benötigen Zellen MDM2 um die durch p53-induzierte Form des Zelltods zu kontrollieren und somit ein längeres Überleben zu gewährleisten.

5.2 Doppelter Knockout verhindert Überexpression

Wie bereits gezeigt werden konnte hat das Fehlen von MDM2 schwerwiegende Folgen. Es führt im Mausmodell mit genetischer Entfernung von Mdm2 zum embryonalen Tod. Durch die dadurch entstandene Überexpression von p53 und die damit verbundene fehlende Kontrolle von p53 kommt es zum Versterben der Tiere. Das kann durch ein Co-Knockdown komplett gerettet werden [31] [79]. Durch unsere Ergebnisse konnten wir zeigen, dass es bei fehlendem MDM2 zu einem Versterben der Tiere kommt. Zum anderen konnten wir in den Zebrafischen zeigen, dass der zuvor entstandene Phänotyp durch das doppelte Ausschalten der zwei Gegenspieler p53 und Mdm2 sich nicht ausprägt. Dadurch bestätigte sich vorerst unsere Hypothese, dass ein enges und wichtiges Zusammenspiel zwischen MDM2 und p53 herrscht. Außerdem kommt es durch die Abwesenheit von MDM2 zu Veränderungen, welche zum Teil nicht mit dem Leben vereinbar sind. Sprich MDM2 verhindert den p53-induzierten Zelltod. Darüber hinaus erweiterten wir die Experimente auf die Maus als höherem Organismus, um zu sehen, ob sich die Hypothese erneut bestätigen lässt. Auch hier zeigte sich, dass die zuvor beobachteten Veränderungen bei singulärem Knockdown von Mdm2 in den Podozyten nicht auftreten. Die Lebenszeit der Mäuse verlängerte sich. Die Proteinurie war niedriger beziehungsweise

se nicht vorhanden, die Glomerula sahen unverändert aus. Ebenfalls wurden schon die Veränderungen dokumentiert bei gegensätzlichem, singulärem Knockout: dem Knockout von p53. Es wurden einige Mausmodelle entwickelt, um p53 und seine Auswirkungen besser verstehen und untersuchen zu können. Wie sich vermuten ließ, kam es bei Mäusen mit einem homozygoten *p53*-Knockout im Durchschnitt nach 4,5 Lebensmonaten zur Tumorgenese [33] [142]. Im Gegensatz dazu kam es bei einem heterozygoten *p53*-Knockout zur deutlich späteren Tumorentwicklung. Im Vergleich, bei den homozygoten Mäusen nach 4,5 Monaten und bei den heterozygoten Knockout-Mäusen nach ungefähr 17 Lebensmonaten. Die Tiere entwickelten Lymphome, vor allem B-Zell-Lymphome, Osteosarkome, Weichteilsarkome und einige Kazinome [34]. Das Tumorspektrum der homozygoten Knockout-Mäuse zeigt auch hier einige Unterschiede. Dabei kam es hauptsächlich zur Bildung von ebenfalls Lymphomen, aber vor allem T-Zell-Lymphome und einige wenige Sarkome [65]. Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass je weniger p53 vorhanden ist, desto anfälliger sind die Zellen für die Entwicklung eines Tumors. Spannend ist dennoch, dass es im Gegensatz zum Knockout von Mdm2 nicht zu einer embryonalen Letalität kommt. Dadurch wird die wichtige und entscheidende Rolle von MDM2 bei der Regulierung und Kontrolle der p53-Aktivität verdeutlicht. Das bedeutet, es herrscht ein enges Zusammenspiel. Denn zum einen wird durch MDM2 die Bildung von p53 unterbunden und die Podozyten werden in die Mitose gedrängt, wo es zum Versterben der Podozyten durch die sogenannte mitotische Katastrophe kommt [126]. Zum anderen haben auch unsere Daten erneut gezeigt, dass es durch das Fehlen von MDM2 zu einer unkontrollierten Aktivität von p53 kommt und dies ebenfalls zu einem Ableben der Podozyten führt.

5.3 Regulierung der Aktivität von p53 durch MDM2

Vorangegangene Experimente konnten zeigen, dass in den Podozyten im Vergleich zu anderen Geweben, eine relativ hohe Menge an MDM2 vorliegt [126]. Wie wichtig MDM2 für die Entwicklung ist, zeigen viele Experimente in den unterschiedlichsten Geweben. Zum Beispiel ein Mausmodell, wo ein MDM2-Mangel postnatal in den glatten Muskulaturzellen induziert wurde. Es folgten funktionelle Komplikationen, vor allem in der gastrointestinalen Muskulatur was zum Versterben der Mäuse führte [16]. Auch hierbei wurden, wie wir in unseren Experimenten bestätigen konnten, erhöhte p53-Spiegel festgestellt. Ein anderes Beispiel sind Untersuchungen der Augen bei *Mdm2*-Knockout.

Hierbei folgte eine deutliche Mikrophthalmie [76]. Bei Untersuchungen an neuronalen Stammzellen aus der subventrikulären Zone des Gehirns, führten die induzierten Veränderungen mit Mdm2-Deletion ebenfalls zur Apoptose. Durch eine ungehemmte und unregelte Aktivität von p53 [45] [186]. Aber nicht in allen epithelialen Geweben gleichen sich die Ergebnisse. Ein Beispiel ist hierfür, dass das Fehlen von MDM2 in intestinalen Epithelzellen zu keinem lang anhaltenden Phänotyp führt. Der Grund hierfür ist das schnelle Wachstum der Zellen mit einer unzureichenden Cre-Rekombinase-Aktivität, was zu einem vermindertem Knockdown von Mdm2 führt [177]. Im Vergleich zu oben genannten Beispielen, schaffen es die benachbarten Zellen, welche eine Resistenz gegenüber der Mdm2 Suppression zeigen, durch Proliferation den entstandenen Schaden zu kompensieren und damit die Funktionalität des Zellverbands zu gewährleisten. Dieses Phänomen kann allerdings in den Podozyten nicht auftreten, da diese nicht die Fähigkeit besitzen sich zu teilen, genauso wie zum Beispiel bei den Neuronen. Das bedeutet, dass es bei Verlust von Podozyten kaum zu Neubildungen kommt und somit werden sie nicht ersetzt [188]. Das führt uns zurück zu der Frage, warum es dann in den Podozyten, im Vergleich zu anderen Epithelien, physiologisch ein vergleichbar hoher MDM2-Spiegel vorherrscht. Das lässt vermuten, dass in den Podozyten ein engerer Spielraum für die Aktivität von p53 geschaffen werden muss. Denn im ausdifferenzierten Zellverband der Podozytenpopulation besteht keine Möglichkeit zur Regeneration durch Proliferation [188]. Dadurch erscheint es für Zellen, die eine rasche und ständige Proliferation vorweisen, wichtiger, dass sie empfindlicher auf die Aktivität von p53 sind. Denn eine hohe Proliferationsrate weist ein höheres Mutationsrisiko auf und dieses möchte man durch p53-induzierte Apoptose verhindern. Im Gegensatz dazu besteht bei den Podozyten zum einen durch die fehlende Proliferation ein geringeres Risiko zur Entartung. Zum anderen scheint es durch die fehlende Regenerationsfähigkeit umso wichtiger die p53-Aktivität durch tendenziell höhere MDM2-Spiegel zu mindern um damit unnötigen Zellverlust zu vermeiden. Somit ist MDM2 zum lebenslangen Überleben der Podozyten und zur Gewährleistung der Homöostase in der Niere essenziell.

5.4 Bei *Mdm2*-Knockdown vermehrte Expression von Zielgenen, die Zelluntergangsformen induzieren

Durch unsere Ergebnisse konnten wir zeigen, dass es bei einem Knockdown von Mdm2 nicht nur zu einer Hochregulation von p53 kam, sondern auch zu einer vermehrten Expression von durch p53-aktivierten Zielgenen. Doch welche Art des Zelltods wird durch MDM2 verhindert? Durch verschiedene Untersuchungen, konnte zum Beispiel Apoptose als Zelltodform ausgeschlossen werden [108]. Dies war insofern interessant, da p53 vor allem zur Induktion von Apoptose zuständig ist, sodass man schlussfolgern konnte, dass eine andere Art des Zellunterganges vorliegen muss. Durch Untersuchung der Zielgene von p53 konnten weitere Formen des Zellunterganges ausgeschlossen werden wie Pyroptose, Pyronekrose, Nekroptose oder Ferroptose [59] [13]. Auf dieser Suche, konnte eine vermehrte und dysregulierte Autophagie registriert werden. Allerdings könnte dies auch eher unspezifisch auftreten und nur in Zusammenhang mit vermehrtem Zellstress stehen. Ebenfalls ist es fraglich, ob es in den ersten Lebenswochen alleinig ursächlich für den Zelltod ist [63]. Durch die morphologischen Veränderungen, welche sich durch zytoplasmatische Vakuolisierung und Zeichen von ER Stress zeigten, ähnelte es dem Zelltod namens Paraptose [168] [157]. Für die Einstufung eines Zelltods allerdings benötigt man neben den morphologischen Veränderungen auch die dahinterstehenden Signale und vor allem den Signalweg. Dieser scheint bislang unbekannt zu sein [48]. Sodass, nachdem keine der etablierten Zelltodarten hervorgehoben werden konnte, eine neue Art des Zelltods ins Spiel gebracht wurde: Podoptose. Sodass Podozyten MDM2 nicht nur zur Aufrechterhaltung der Homöostase und der Nierenfunktion benötigt wird, sondern auch um eine durch p53-Überaktivität-induzierte Form des Zelltods namens Podoptose oder auch Paraptose-ähnlich zu verhindern. Eventuell resultiert diese eigene Form des Zelltods auch aus der fehlenden Regenerierbarkeit der Podozyten. Dadurch soll die Schwelle, im Gegensatz zu anderen Zellen, deutlich höher sein, bevor der Zelltod induziert wird.

Limitationen:

- Zebrafische sind einfache Organismen, deswegen können sie lediglich als Grundlage dienen um vorerst erstellte Hypothesen zu überprüfen um sie dann an höheren Organismen wie Mäusen zu testen und deren Auswirkungen festzustellen. Aber auch die Durchführung der Experimente im Mausmodell können nur eingeschränkt die physiologische Rolle von MDM2 und p53 widerspiegeln.

- Die Modelle sind lediglich auf das Zusammenspiel zwischen p53 und MDM2 beschränkt. Natürlich sind das nicht die einzigen, die miteinander interagieren, sodass viele andere Entwicklungen/Entstehungen möglich sind, die nicht in Betracht gezogen wurden. Man darf daher nicht vermuten, dass bei einer Mutation des einen eine einfache Elimination des Gegenspielers das Problem löst. Dafür gibt es zu viele Interaktionen von beispielsweise MDM2 wie Abbildung 5.1 zeigt. Zudem müsste man in den Tiermodellen den Beobachtungszeitraum verlängern um verlässlichere Aussagen über Langzeitentwicklungen treffen zu können.
- Natürlich ist nicht nur MDM2 wichtig zur Aufrechterhaltung von Podozyten und damit zur Sicherung der Homöostase in der Niere. Es ist nur ein Bestandteil davon. Dafür muss man die Struktur noch besser verstehen/untersuchen und natürlich bei den jeweiligen Erkrankungen die Pathogenese herausarbeiten. Dies scheint elementar auch für die Behandlung der Millionen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, denn Podopathie ist immer noch zu 90 % ursächlich für die Entwicklung einer CKD. Deshalb ist es auch für unser Gesundheitssystem wichtig und interessant.
- Natürlich muss neben dem Erforschen der Veränderungen nach Verlust der MDM2-Funktion, auch die Ursache für den Funktionsverlust herausgearbeitet werden. Damit man dies verhindern kann und eventuell präventive Behandlungsoptionen zur Verfügung stehen kann. Ist es zum Beispiel möglich, dass zu hoher Stress für die Podozyten, sei es durch zu hohen Filtrationsdruck, zu hohe Akkumulation von Noxen, zu viele Proteine/Glucose dazu führt MDM2 herunter zu regulieren um damit den Zelltod p53-induziert einzuleiten? Wenn ja, wie kann dies verhindert werden?

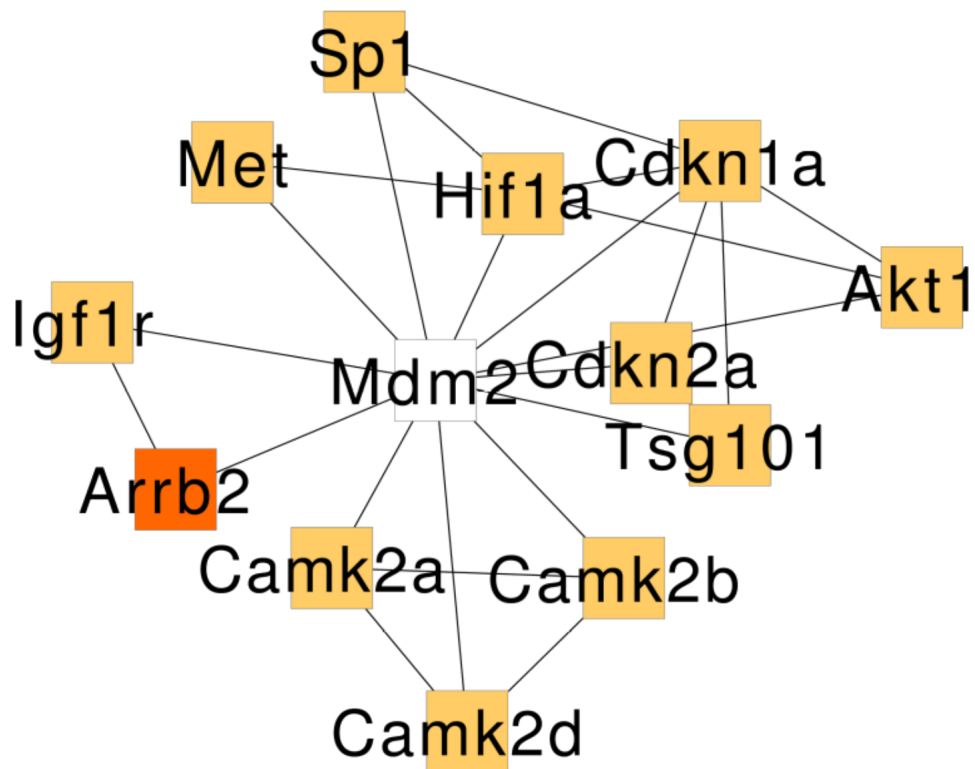


Abbildung 5.1: Interaktionsmöglichkeiten von MDM2

Literaturverzeichnis

- [1] I. Abubakar, T. Tillmann, and A. Banerjee. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the global burden of disease study 2013. *Lancet*, 385(9963):117–171, 2015.
- [2] P. Alhopuro, S. Ylisaukko-Oja, W. Koskinen, P. Bono, J. Arola, H. J. Järvinen, J.-P. Mecklin, T. Atula, R. Kontio, A. Mäkitie, et al. The MDM2 promoter polymorphism snp309t – g and the risk of uterine leiomyosarcoma, colorectal cancer, and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of medical genetics*, 42(9):694–698, 2005.
- [3] R. Allam, S. G. Sayyed, O. P. Kulkarni, J. Lichtnekert, and H.-J. Anders. MDM2 promotes systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(11):2016–2027, 2011.
- [4] H.-J. Anders, A. J. Peired, and P. Romagnani. Sglt2 inhibition requires reconsideration of fundamental paradigms in chronic kidney disease, ‘diabetic nephropathy’, iga nephropathy and podocytopathies with fsgs lesions. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2020.
- [5] E. Appella and C. W. Anderson. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European Journal of Biochemistry*, 268(10):2764–2772, 2001.
- [6] K. Arastéh, H.-W. Baenkler, C. Bieber, R. Brandt, and T. T. Chatterjee. *Duale Reihe Innere Medizin*. Georg Thieme Verlag, 2018.
- [7] M. R. Arkin and J. A. Wells. Small-molecule inhibitors of protein–protein interactions: progressing towards the dream. *Nature reviews Drug discovery*, 3(4):301, 2004.
- [8] K. Asanuma and P. Mundel. The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Journal of Clinical and Experimental Nephrology*, 7(4):255–259, 2003.
- [9] Y. Barak, T. Juven, R. Haffner, and M. Oren. MDM2 expression is induced by wild type p53 activity. *The EMBO journal*, 12(2):461–468, 1993.
- [10] L. Barisoni and P. Mundel. Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases. *American journal of nephrology*, 23(5):353–360, 2003.

- [11] J. Beijnen. p53 selected as molecule of the year 1993. *Pharmacy world & science*, 16(1):1–1, 1994.
- [12] A. Benigni, M. Morigi, P. Rizzo, E. Gagliardini, C. Rota, M. Abbate, S. Ghezzi, A. Remuzzi, and G. Remuzzi. Inhibiting angiotensin-converting enzyme promotes renal repair by limiting progenitor cell proliferation and restoring the glomerular architecture. *The American journal of pathology*, 179(2):628–638, 2011.
- [13] T. V. Berghe, A. Linkermann, S. Jouan-Lanhouet, H. Walczak, and P. Vandena-beele. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(2):135, 2014.
- [14] J. F. Bertram, R. N. Douglas-Denton, B. Diouf, M. D. Hughson, and W. E. Hoy. Human nephron number: implications for health and disease. *Pediatric nephrology*, 26(9):1529–1533, 2011.
- [15] A. C. Blackburn and D. J. Jerry. Knockout and transgenic mice of Trp53: what have we learned about p53 in breast cancer? *Breast Cancer Research*, 4(3):101, 2002.
- [16] L. Boesten, S. Zadelaar, S. De Clercq, S. Francoz, A. van Nieuwkoop, E. Biesen, F. Hofmann, S. Feil, R. Feil, A. Jochemsen, et al. MDM2, but not MDM4, protects terminally differentiated smooth muscle cells from p53-mediated caspase-3-independent cell death. *Cell death and differentiation*, 13(12):2089, 2006.
- [17] A. Bouska and C. M. Eischen. MDM2 affects genome stability independent of p53. *Cancer research*, 69(5):1697–1701, 2009.
- [18] N. Boute, O. Gribouval, S. Roselli, F. Benessy, H. Lee, A. Fuchshuber, K. Dahan, M.-C. Gubler, P. Niaudet, and C. Antignac. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nature genetics*, 24(4):349, 2000.
- [19] A. Brekman, K. E. Singh, A. Polotskaia, N. Kundu, and J. Bargonetti. A p53-independent role of MDM2 in estrogen-mediated activation of breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Research*, 13(1):R3, 2011.
- [20] A. N. Bullock and A. R. Fersht. Rescuing the function of mutant p53. *Nature Reviews Cancer*, 1(1):68, 2001.
- [21] A. Burgess, K. M. Chia, S. Haupt, D. Thomas, Y. Haupt, and E. Lim. Clinical overview of MDM2/x-targeted therapies. *Frontiers in oncology*, 6:7, 2016.
- [22] L. Cahilly-Snyder, T. Yang-Feng, U. Francke, and D. L. George. Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somatic cell and molecular genetics*, 13(3):235–244, 1987.
- [23] J. R. Charlton, C. H. Springsteen, and J. B. Carmody. Nephron number and its determinants in early life: a primer. *Pediatric nephrology*, 29(12):2299–2308, 2014.

- [24] J. Chen, V. Marechal, and A. J. Levine. Mapping of the p53 and MDM-2 interaction domains. *Molecular and cellular biology*, 13(7):4107–4114, 1993.
- [25] L. Chen, S. Agrawal, W. Zhou, R. Zhang, and J. Chen. Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1):195–200, 1998.
- [26] P. Chène. Inhibiting the p53–MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nature reviews cancer*, 3(2):102, 2003.
- [27] H. V. Clegg, K. Itahana, and Y. Zhang. Unlocking the MDM2-p53 loop: ubiquitin is the key. *Cell Cycle*, 7(3):287–292, 2008.
- [28] J. Coresh, E. Selvin, L. A. Stevens, J. Manzi, J. W. Kusek, P. Eggers, F. Van Lente, and A. S. Levey. Prevalence of chronic kidney disease in the united states. *Jama*, 298(17):2038–2047, 2007.
- [29] V. D. D’agati, F. J. Kaskel, and R. J. Falk. Focal segmental glomerulosclerosis. *New England Journal of Medicine*, 365(25):2398–2411, 2011.
- [30] M. J. Dane, B. M. van den Berg, M. C. Avramut, F. G. Faas, J. van der Vlag, A. L. Rops, R. B. Ravelli, B. J. Koster, A. J. van Zonneveld, H. Vink, et al. Glomerular endothelial surface layer acts as a barrier against albumin filtration. *The American journal of pathology*, 182(5):1532–1540, 2013.
- [31] R. M. de Oca Luna, D. S. Wagner, and G. Lozano. Rescue of early embryonic lethality in MDM2-deficient mice by deletion of p53. *Nature*, 378(6553):203, 1995.
- [32] A. Denic, J. Mathew, L. O. Lerman, J. C. Lieske, J. J. Larson, M. P. Alexander, E. Poggio, R. J. Glasscock, and A. D. Rule. Single-nephron glomerular filtration rate in healthy adults. *New England Journal of Medicine*, 376(24):2349–2357, 2017.
- [33] L. A. Donehower, M. Harvey, B. L. Slagle, M. J. McArthur, C. A. Montgomery Jr, J. S. Butel, and A. Bradley. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356(6366):215, 1992.
- [34] L. A. Donehower and G. Lozano. 20 years studying p53 functions in genetically engineered mice. *Nature Reviews Cancer*, 9(11):831, 2009.
- [35] D. B. Donoviel, D. D. Freed, H. Vogel, D. G. Potter, E. Hawkins, J. P. Barrish, B. N. Mathur, C. A. Turner, R. Geske, C. A. Montgomery, et al. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Molecular and cellular biology*, 21(14):4829–4836, 2001.
- [36] D. Drenckhahn and R. Franke. Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 59(5):673–682, 1988.

- [37] K.-U. Eckardt, J. Coresh, O. Devuyst, R. J. Johnson, A. Köttgen, A. S. Levey, and A. Levin. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *The Lancet*, 382(9887):158–169, 2013.
- [38] G. Eknoyan, N. Lameire, K. Eckardt, B. Kasiske, D. Wheeler, A. Levin, P. Stevens, R. Bilous, E. Lamb, J. Coresh, et al. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int*, 3(1):5–14, 2013.
- [39] W. S. El-Deiry, S. E. Kern, J. A. Pietenpol, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature genetics*, 1(1):45, 1992.
- [40] D. G. Eng, M. W. Sunseri, N. V. Kaverina, S. S. Roeder, J. W. Pippin, and S. J. Shankland. Glomerular parietal epithelial cells contribute to adult podocyte regeneration in experimental focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney international*, 88(5):999–1012, 2015.
- [41] V. Eremina, M. Sood, J. Haigh, A. Nagy, G. Lajoie, N. Ferrara, H.-P. Gerber, Y. Kikkawa, J. H. Miner, and S. E. Quaggin. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *The Journal of clinical investigation*, 111(5):707–716, 2003.
- [42] M. Fischer, M. Quaas, L. Steiner, and K. Engeland. The p53-p21-DREAM-CDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes. *Nucleic acids research*, 44(1):164–174, 2015.
- [43] T. Fojo. p53 as a therapeutic target: unresolved issues on the road to cancer therapy targeting mutant p53. *Drug resistance updates*, 5(5):209–216, 2002.
- [44] O. S. Foord, P. Bhattacharya, Z. Reich, and V. Rotter. A DNA binding domain is contained in the c-terminus of wild type p53 protein. *Nucleic acids research*, 19(19):5191–5198, 1991.
- [45] S. Francoz, P. Froment, S. Bogaerts, S. De Clercq, M. Maetens, G. Doumont, E. Bellefroid, and J.-C. Marine. MDM4 and MDM2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(9):3232–3237, 2006.
- [46] D. Freedman, L. Wu, and A. Levine. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55(1):96–107, 1999.
- [47] D. A. Freedman and A. J. Levine. Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Molecular and cellular biology*, 18(12):7288–7293, 1998.
- [48] L. Galluzzi, I. Vitale, J. Abrams, E. Alnemri, E. Baehrecke, M. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. Dawson, W. El-Deiry, S. Fulda, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. *Cell death and differentiation*, 19(1):107, 2012.

- [49] J. Gao, B. A. Aksoy, U. Dogrusoz, G. Dresdner, B. Gross, S. O. Sumer, Y. Sun, A. Jacobsen, R. Sinha, E. Larsson, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signaling*, 6(269):pl1–pl1, 2013.
- [50] M. Gasco, S. Shami, and T. Crook. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 4(2):70, 2002.
- [51] S. Giglio, F. Mancini, F. Gentiletti, G. Sparaco, L. Felicioni, F. Barassi, C. Martella, A. Prodosmo, S. Iacovelli, F. Buttitta, et al. Identification of an aberrantly spliced form of HDMX in human tumors: a new mechanism for HDM2 stabilization. *Cancer research*, 65(21):9687–9694, 2005.
- [52] A. S. Go, G. M. Chertow, D. Fan, C. E. McCulloch, and C.-y. Hsu. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *New England Journal of Medicine*, 351(13):1296–1305, 2004.
- [53] J. D. Grier, S. Xiong, A. C. Elizondo-Fraire, J. M. Parant, and G. Lozano. Tissue-specific differences of p53 inhibition by MDM2 and MDM4. *Molecular and cellular biology*, 26(1):192–198, 2006.
- [54] S. V. Griffin, A. T. Petermann, R. V. Durvasula, and S. J. Shankland. Podocyte proliferation and differentiation in glomerular disease: role of cell-cycle regulatory proteins. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 18(suppl_6):vi8–vi13, 2003.
- [55] L. Gu, N. Zhu, H. Zhang, D. L. Durden, Y. Feng, and M. Zhou. Regulation of xiap translation and induction by MDM2 following irradiation. *Cancer cell*, 15(5):363–375, 2009.
- [56] D. Häckl, N. Kossack, and T. Schoenfelder. Prävalenz, kosten der versorgung und formen des dialysepflichtigen chronischen nierenversagens in deutschland: Vergleich der dialyseversorgung innerhalb und außerhalb stationärer pflegeeinrichtungen. *Das Gesundheitswesen*, 83(10):818–828, 2021.
- [57] J. H. Hagemann, D. Thomasova, S. R. Mulay, and H.-J. Anders. Nrf2 signalling promotes ex vivo tubular epithelial cell survival and regeneration via murine double minute (MDM)-2. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28(8):2028–2037, 2013.
- [58] P. Hainaut and M. Hollstein. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. In *Advances in cancer research*, volume 77, pages 81–137. Elsevier, 1999.
- [59] S. Hakrrouch, A. Cebulla, T. Schaldecker, D. Behr, P. Mundel, and A. Weins. Extensive podocyte loss triggers a rapid parietal epithelial cell response. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(5):927–938, 2014.
- [60] B. Haraldsson and J. Nyström. The glomerular endothelium: new insights on function and structure. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 21(3):258–263, 2012.

- [61] B. Haraldsson, J. Nyström, and W. M. Deen. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiological reviews*, 88(2):451–487, 2008.
- [62] B. S. Haraldsson. The endothelium as part of the integrative glomerular barrier complex. *Kidney international*, 85(1):8–11, 2014.
- [63] B. Hartleben, M. Gödel, C. Meyer-Schwesinger, S. Liu, T. Ulrich, S. Köbler, T. Wiech, F. Grahammer, S. J. Arnold, M. T. Lindenmeyer, et al. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *The Journal of clinical investigation*, 120(4):1084–1096, 2010.
- [64] J. Hartmann. *Intensivkurs Physiologie*. Elsevier, Urban&FischerVerlag, 2006.
- [65] M. Harvey, M. J. McArthur, C. A. Montgomery, J. S. Butel, A. Bradley, and L. A. Donehower. Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nature genetics*, 5(3):225, 1993.
- [66] S. J. Harvey, G. Jarad, J. Cunningham, A. L. Rops, J. van der Vlag, J. H. Berden, M. J. Moeller, L. B. Holzman, R. W. Burgess, and J. H. Miner. Disruption of glomerular basement membrane charge through podocyte-specific mutation of agrin does not alter glomerular permselectivity. *The American journal of pathology*, 171(1):139–152, 2007.
- [67] Y. Haupt, R. Maya, A. Kazaz, and M. Oren. MDM2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387(6630):296, 1997.
- [68] C. Hick and A. Hick. *Intensivkurs Physiologie*. Elsevier, Urban & Fischer, 2012.
- [69] S. Hilliard, K. Aboudehen, X. Yao, and S. S. El-Dahr. Tight regulation of p53 activity by MDM2 is required for ureteric bud growth and branching. *Developmental biology*, 353(2):354–366, 2011.
- [70] S. A. Hilliard, X. Yao, and S. S. El-Dahr. MDM2 is required for maintenance of the nephrogenic niche. *Developmental biology*, 387(1):1–14, 2014.
- [71] J. Himmelfarb, R. Vanholder, R. Mehrotra, and M. Tonelli. The current and future landscape of dialysis. *Nature Reviews Nephrology*, 16(10):573–585, 2020.
- [72] R. Honda, H. Tanaka, and H. Yasuda. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS letters*, 420(1):25–27, 1997.
- [73] I. Hossain, C. Levy, and C. Rindge. Investigating KNOX gene expression in aquilegia petal spur development. *Jouranal Emerg Investig*, pages 1–6, 2014.
- [74] Y. Imai, T. G. Strohmeier, M. Fleischhacker, D. J. Slamon, and H. P. Koeffler. p53 mutations and MDM-2 amplification in renal cell cancers. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 7(7):766–770, 1994.

- [75] T. Inoue, E. Yaoita, H. Kurihara, F. Shimizu, T. Sakai, T. Kobayashi, K. Ohshiro, H. Kawachi, H. Okada, H. Suzuki, et al. FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney international*, 59(3):1003–1012, 2001.
- [76] G. Jaramillo-Rangel, M. Ortega-Martínez, J. Sepúlveda-Saavedra, O. Saucedo-Cárdenas, and R. Montes-de Oca-Luna. p53 e3 ubiquitin protein ligase homolog regulates p53 in vivo in the adult mouse eye lens. *Molecular vision*, 19:2468, 2013.
- [77] V. Jha, G. Garcia-Garcia, K. Iseki, Z. Li, S. Naicker, B. Plattner, R. Saran, A. Y.-M. Wang, and C.-W. Yang. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *The Lancet*, 382(9888):260–272, 2013.
- [78] L. Jiang, N. Kon, T. Li, S.-J. Wang, T. Su, H. Hibshoosh, R. Baer, and W. Gu. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*, 520(7545):57–62, 2015.
- [79] S. N. Jones, A. E. Roe, L. A. Donehower, and A. Bradley. Rescue of embryonic lethality in MDM2-deficient mice by absence of p53. *Nature*, 378(6553):206, 1995.
- [80] T. L. Joseph, A. Madhumalar, C. J. Brown, D. P. Lane, and C. S. Verma. Differential binding of p53 and nutlin to MDM2 and MDMX: computational studies. *Cell cycle*, 9(6):1167–1181, 2010.
- [81] M. B. Kastan. Wild-type p53: tumors can’t stand it. *Cell*, 128(5):837–840, 2007.
- [82] H. Kawai, D. Wiederschain, H. Kitao, J. Stuart, K. K. Tsai, and Z.-M. Yuan. DNA damage-induced MDMX degradation is mediated by MDM2. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46):45946–45953, 2003.
- [83] D. Kerjaschki. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *The Journal of clinical investigation*, 108(11):1583–1587, 2001.
- [84] D. Kerjaschki, D. J. Sharkey, and M. G. Farquhar. Identification and characterization of podocalyxin—the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *The Journal of cell biology*, 98(4):1591–1596, 1984.
- [85] M. Kestilä, U. Lenkkeri, M. Männikkö, J. Lamerdin, P. McCready, H. Putaala, V. Ruotsalainen, T. Morita, M. Nissinen, R. Herva, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein – nephrin – is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Molecular cell*, 1(4):575–582, 1998.
- [86] D. D. K. Khalsa, H. A. Beydoun, and J. B. Carmody. Prevalence of chronic kidney disease risk factors among low birth weight adolescents. *Pediatric Nephrology*, 31(9):1509–1516, 2016.
- [87] Y. H. Kim, M. Goyal, D. Kurnit, B. Wharram, J. Wiggins, L. Holzman, D. Kershaw, and R. Wiggins. Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney international*, 60(3):957–968, 2001.

- [88] N. Kobayashi, J. Reiser, W. Kriz, R. Kuriyama, and P. Mundel. Nonuniform microtubular polarity established by CHO1/MKLP1 motor protein is necessary for process formation of podocytes. *J Cell Biol*, 143(7):1961–1970, 1998.
- [89] W. Kriz. The role of podocytes in the development of glomerular sclerosis. *Kidney International*, 45:s64–s72, 1994.
- [90] W. Kriz. Progressive renal failure – inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 11(9):1738–1742, 1996.
- [91] W. Kriz. Podocyte is the major culprit accounting for the progression of chronic renal disease. *Microscopy research and technique*, 57(4):189–195, 2002.
- [92] W. Kriz. Biologie des podozyten. *Der Nephrologe*, 1(3):144–152, 2006.
- [93] J.-P. Kruse and W. Gu. Modes of p53 regulation. *Cell*, 137(4):609–622, 2009.
- [94] P. H. Kussie, S. Gorina, V. Marechal, B. Elenbaas, J. Moreau, A. J. Levine, and N. P. Pavletich. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*, 274(5289):948–953, 1996.
- [95] D. P. Lane. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358:15–16, 1992.
- [96] D. P. Lane and L. V. Crawford. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature*, 278(5701):261, 1979.
- [97] N. A. Laurie, S. L. Donovan, C.-S. Shih, J. Zhang, N. Mills, C. Fuller, A. Teunisse, S. Lam, Y. Ramos, A. Mohan, et al. Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature*, 444(7115):61, 2006.
- [98] F. S. Leach, T. Tokino, P. Meltzer, M. Burrell, J. D. Oliner, S. Smith, D. E. Hill, D. Sidransky, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. p53 mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer research*, 53(10):2231–2234, 1993.
- [99] J. W. Leeuwis, T. Q. Nguyen, A. Dendooven, R. J. Kok, and R. Goldschmeding. Targeting podocyte-associated diseases. *Advanced drug delivery reviews*, 62(14):1325–1336, 2010.
- [100] S. Lehtonen, F. Zhao, and E. Lehtonen. CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 283(4):F734–F743, 2002.
- [101] A. S. Levey and J. Coresh. Chronic kidney disease. *The lancet*, 379(9811):165–180, 2012.
- [102] A. S. Levey, P. E. De Jong, J. Coresh, M. E. Nahas, B. C. Astor, K. Matsushita, R. T. Gansevoort, B. L. Kasiske, and K.-U. Eckardt. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a kdigo controversies conference report. *Kidney international*, 80(1):17–28, 2011.

- [103] A. Levine, M. Perry, A. Chang, A. Silver, D. Dittmer, M. Wu, and D. Welsh. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *British journal of cancer*, 69(3):409, 1994.
- [104] A. J. Levine. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *cell*, 88(3):323–331, 1997.
- [105] M. Li, C. L. Brooks, F. Wu-Baer, D. Chen, R. Baer, and W. Gu. Mono-versus poly-ubiquitination: differential control of p53 fate by MDM2. *Science*, 302(5652):1972–1975, 2003.
- [106] D. I. Linzer and A. J. Levine. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 17(1):43–52, 1979.
- [107] G. Liu, B. Kaw, J. Kurfis, S. Rahmanuddin, Y. S. Kanwar, and S. S. Chugh. Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *The Journal of clinical investigation*, 112(2):209–221, 2003.
- [108] G. Liu, T. Terzian, S. Xiong, C. Van Pelt, A. Audiffred, N. Box, and G. Lozano. The p53–MDM2 network in progenitor cell expansion during mouse postnatal development. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 213(4):360–368, 2007.
- [109] K. Lundgren, R. M. de Oca Luna, Y. B. McNeill, E. P. Emerick, B. Spencer, C. R. Barfield, G. Lozano, M. P. Rosenberg, and C. A. Finlay. Targeted expression of MDM2 uncouples s phase from mitosis and inhibits mammary gland development independent of p53. *Genes & development*, 11(6):714–725, 1997.
- [110] M. J. Lysaght. Maintenance dialysis population dynamics: current trends and long-term implications. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(suppl 1):S37–S40, 2002.
- [111] J.-C. Marine and G. Lozano. MDM2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. *Cell death and differentiation*, 17(1):93, 2010.
- [112] C. P. Martins, L. Brown-Swigart, and G. I. Evan. Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell*, 127(7):1323–1334, 2006.
- [113] P. W. Mathieson. Update on the podocyte. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 18(3):206–211, 2009.
- [114] G. Matlashewski, P. Lamb, D. Pim, J. Peacock, L. Crawford, and S. Benchimol. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *The EMBO journal*, 3(13):3257–3262, 1984.

- [115] K. Matsui, S. Breitender-Geleff, A. Soleiman, H. Kowalski, and D. Kerjaschki. Podoplanin, a novel 43-kDa membrane protein, controls the shape of podocytes. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association*, 14(suppl_1):9–11, 1999.
- [116] T. Matsusaka, J. Xin, S. Niwa, K. Kobayashi, A. Akatsuka, H. Hashizume, Q.-c. Wang, I. Pastan, A. B. Fogo, and I. Ichikawa. Genetic engineering of glomerular sclerosis in the mouse via control of onset and severity of podocyte-specific injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(4):1013–1023, 2005.
- [117] W. Metcalfe. How does early chronic kidney disease progress? a background paper prepared for the UK consensus conference on early chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 22(suppl_9):ix26–ix30, 2007.
- [118] J. H. Miner. The glomerular basement membrane. *Experimental cell research*, 318(9):973–978, 2012.
- [119] N. Miosge, T. Sasaki, and R. Timpl. Evidence of nidogen-2 compensation for nidogen-1 deficiency in transgenic mice. *Matrix biology*, 21(7):611–621, 2002.
- [120] U. M. Moll and O. Petrenko. The MDM2-p53 interaction. *Molecular cancer research*, 1(14):1001–1008, 2003.
- [121] J. Momand, D. Jung, S. Wilczynski, and J. Niland. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic acids research*, 26(15):3453–3459, 1998.
- [122] J. Momand, G. P. Zambetti, D. C. Olson, D. George, and A. J. Levine. The MDM-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *cell*, 69(7):1237–1245, 1992.
- [123] S. R. Mulay. *Role of murine double minute (MDM)-2 in kidney injury and repair*. PhD thesis, lmu, 2013.
- [124] S. R. Mulay, S. Romoli, J. Desai, M. M. Honarpisheh, S. V. Kumar, H.-J. Anders, and D. Thomasova. Murine double minute-2 inhibition ameliorates established crescentic glomerulonephritis. *The American journal of pathology*, 186(6):1442–1453, 2016.
- [125] S. R. Mulay, D. Thomasova, M. Ryu, and H.-J. Anders. MDM2 (murine double minute-2) links inflammation and tubular cell healing during acute kidney injury in mice. *Kidney international*, 81(12):1199–1211, 2012.
- [126] S. R. Mulay, D. Thomasova, M. Ryu, O. P. Kulkarni, A. Migliorini, H. Bruns, R. Gröbmayer, E. Lazzeri, L. Lasagni, H. Liapis, et al. Podocyte loss involves MDM2-driven mitotic catastrophe. *The Journal of pathology*, 230(3):322–335, 2013.
- [127] P. Mundel and W. Kriz. Structure and function of podocytes: an update. *Anatomy and embryology*, 192(5):385–397, 1995.

- [128] M. Murshed, N. Smyth, N. Miosge, J. Karolat, T. Krieg, M. Paulsson, and R. Nischt. The absence of nidogen 1 does not affect murine basement membrane formation. *Molecular and Cellular Biology*, 20(18):7007–7012, 2000.
- [129] I. F. Nevis, A. Reitsma, A. Dominic, S. McDonald, L. Thabane, E. A. Akl, M. Hladunewich, A. Akbari, G. Joseph, W. Sia, et al. Pregnancy outcomes in women with chronic kidney disease: a systematic review. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6(11):2587–2598, 2011.
- [130] P. G. Noakes, J. H. Miner, M. Gautam, J. M. Cunningham, J. R. Sanes, and J. P. Merlie. The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin $\beta 2$: nephrosis despite molecular compensation by laminin $\beta 1$. *Nature genetics*, 10(4):400, 1995.
- [131] M. Obeidat, M. Obeidat, and B. J. Ballermann. Glomerular endothelium: a porous sieve and formidable barrier. *Experimental cell research*, 318(9):964–972, 2012.
- [132] J. Oliner, K. W. Kinzler, P. Meltzer, D. George, and B. Vogelstein. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, 358(6381):80, 1992.
- [133] K. Onel and C. Cordon-Cardo. MDM2 and prognosis. *Molecular Cancer Research*, 2(1):1–8, 2004.
- [134] S. Patel and M. R. Player. Small-molecule inhibitors of the p53-hdm2 interaction for the treatment of cancer. *Expert opinion on investigational drugs*, 17(12):1865–1882, 2008.
- [135] J. Patrakka and K. Tryggvason. New insights into the role of podocytes in proteinuria. *Nature Reviews Nephrology*, 5(8):463, 2009.
- [136] J. Patrakka and K. Tryggvason. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(1):164–169, 2010.
- [137] B. Perner, C. Englert, and F. Bollig. The wilms tumor genes wt1a and wt1b control different steps during formation of the zebrafish pronephros. *Developmental biology*, 309(1):87–96, 2007.
- [138] M. E. Perry and A. J. Levine. Tumor-suppressor p53 and the cell cycle. *Current opinion in genetics & development*, 3(1):50–54, 1993.
- [139] M. E. Perry, J. Piette, J. A. Zawadzki, D. Harvey, and A. J. Levine. The MDM-2 gene is induced in response to UV light in a p53-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24):11623–11627, 1993.
- [140] W. Pichaiwong, K. L. Hudkins, T. Wietecha, T. Q. Nguyen, C. Tachaudomdach, W. Li, B. Askari, T. Kobayashi, K. D. O'Brien, J. W. Pippin, et al. Reversibility of structural and functional damage in a model of advanced diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(7):1088–1102, 2013.

- [141] S. M. Picksley, B. Vojtesek, A. Sparks, and D. P. Lane. Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2;—fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides. *Oncogene*, 9(9):2523–2529, 1994.
- [142] C. Purdie, D. Harrison, A. Peter, L. Dobbie, S. White, S. Howie, D. Salter, C. Bird, A. Wyllie, and M. Hooper. Tumour incidence, spectrum and ploidy in mice with a large deletion in the p53 gene. *Oncogene*, 9(2):603–609, 1994.
- [143] D. Reisman, P. Takahashi, A. Polson, and K. Boggs. 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.
- [144] G. Remuzzi, C. Zoja, and T. Bertani. Glomerulonephritis. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 2(3):465–474, 1993.
- [145] S. L. Renninger, H. B. Schonhaler, S. C. Neuhauss, and R. Dahm. Investigating the genetics of visual processing, function and behaviour in zebrafish. *Neurogenetics*, 12(2):97–116, 2011.
- [146] H. G. Rennke. How does glomerular epithelial cell injury contribute to progressive glomerular damage? *Kidney International Supplement*, (45), 1994.
- [147] T. Riley, E. Sontag, P. Chen, and A. Levine. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(5):402, 2008.
- [148] B. Robert, X. Zhao, and D. R. Abrahamson. Coexpression of neuropilin-1, flk1, and VEGF164 in developing and mature mouse kidney glomeruli. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 279(2):F275–F282, 2000.
- [149] R. Rodewald and M. J. Karnovsky. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *The Journal of cell biology*, 60(2):423–433, 1974.
- [150] P. Romagnani, G. Remuzzi, R. Glasscock, A. Levin, K. J. Jager, M. Tonelli, Z. Massy, C. Wanner, and H.-J. Anders. Chronic kidney disease. *Nature reviews Disease primers*, 3(1):1–24, 2017.
- [151] M. Rosner, E. Abdel-Rahman, M. E. Williams, A. A. G. on Geriatric Nephrology, et al. Geriatric nephrology: responding to a growing challenge. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5(5):936–942, 2010.
- [152] J. Roth, M. Dobbelstein, D. A. Freedman, T. Shenk, and A. J. Levine. Nucleocytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *The EMBO journal*, 17(2):554–564, 1998.
- [153] K. M. Ryan, A. C. Phillips, and K. H. Vousden. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current opinion in cell biology*, 13(3):332–337, 2001.
- [154] P. Sabbatini and F. McCormick. MDMX inhibits the p300/CBP-mediated acetylation of p53. *DNA and cell biology*, 21(7):519–525, 2002.

- [155] M. A. Saleem, M. J. O'Hare, J. Reiser, R. J. Coward, C. D. Inward, T. Farren, C. Y. Xing, L. Ni, P. W. Mathieson, and P. Mundel. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(3):630–638, 2002.
- [156] A. H. Salmon, J. K. Ferguson, J. L. Burford, H. Gevorgyan, D. Nakano, S. J. Harper, D. O. Bates, and J. Peti-Peterdi. Loss of the endothelial glycocalyx links albuminuria and vascular dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(8):1339–1350, 2012.
- [157] D. Schneider, E. Gerhardt, J. Bock, M. Müller, H. Wolburg, F. Lang, and J. Schulz. Intracellular acidification by inhibition of the Na^+/H^+ -exchanger leads to caspase-independent death of cerebellar granule neurons resembling paraptosis. *Cell death and differentiation*, 11(7):760, 2004.
- [158] J. Schymeinsky, S. Nedbal, N. Miosge, E. Pöschl, C. Rao, D. R. Beier, W. C. Skarnes, R. Timpl, and B. L. Bader. Gene structure and functional analysis of the mouse nidogen-2 gene: nidogen-2 is not essential for basement membrane formation in mice. *Molecular and Cellular Biology*, 22(19):6820–6830, 2002.
- [159] P. Secchiero, R. Bosco, C. Celeghini, and G. Zauli. Recent advances in the therapeutic perspectives of nutlin-3. *Current pharmaceutical design*, 17(6):569–577, 2011.
- [160] S. Shangary, D. Qin, D. McEachern, M. Liu, R. S. Miller, S. Qiu, Z. Nikolovska-Coleska, K. Ding, G. Wang, J. Chen, 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*, 105(10):3933–3938, 2008.
- [161] S. Shangary and S. Wang. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 49:223–241, 2009.
- [162] S. Shankland, J. Pippin, J. Reiser, and P. Mundel. Podocytes in culture: past, present, and future. *Kidney international*, 72(1):26–36, 2007.
- [163] S. J. Shankland, J. W. Pippin, and J. S. Duffield. Progenitor cells and podocyte regeneration. In *Seminars in nephrology*, volume 34, pages 418–428. Elsevier, 2014.
- [164] L. Shapiro, A. M. Fannon, P. D. Kwong, A. Thompson, M. S. Lehmann, G. Grubel, J.-F. Legrand, J. Als-Nielsen, D. R. Colman, and W. A. Hendrickson. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*, 374(6520):327, 1995.
- [165] A. Sigal and V. Rotter. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer research*, 60(24):6788–6793, 2000.

- [166] W. E. Smoyer and P. Mundel. Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome. *Journal of molecular medicine*, 76(3):172–183, 1998.
- [167] S. Somlo and P. Mundel. Getting a foothold in nephrotic syndrome. *Nature genetics*, 24(4):333, 2000.
- [168] S. Sperandio, I. de Belle, and D. E. Bredesen. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26):14376–14381, 2000.
- [169] J. H. Suh and J. H. Miner. The glomerular basement membrane as a barrier to albumin. *Nature Reviews Nephrology*, 9(8):470, 2013.
- [170] J. Summerton and D. Weller. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 7(3):187–195, 1997.
- [171] Y. Sun. Targeting e3 ubiquitin ligases for cancer therapy. *Cancer biology & therapy*, 2(6):623–629, 2003.
- [172] R. Tang, A. Dodd, D. Lai, W. C. McNabb, and D. R. Love. Validation of zebrafish (*danio rerio*) reference genes for quantitative real-time rt-pcr normalization. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 39(5):384–390, 2007.
- [173] D. Thomasova, H. A. Bruns, V. Kretschmer, M. Ebrahim, S. Romoli, H. Liapis, A. M. Kotb, N. Endlich, and H.-J. Anders. Murine double minute-2 prevents p53-overactivation-related cell death (podoptosis) of podocytes. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(7):1513–1523, 2015.
- [174] C. Tovar, J. Rosinski, Z. Filipovic, B. Higgins, K. Kolinsky, H. Hilton, X. Zhao, B. T. Vu, W. Qing, K. Packman, et al. Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(6):1888–1893, 2006.
- [175] K. Tryggvason, J. Patrakka, and J. Wartiovaara. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *New England Journal of Medicine*, 354(13):1387–1401, 2006.
- [176] D. A. Turbin, M. C. Cheang, C. D. Bajdik, K. A. Gelmon, E. Yorida, A. De Luca, T. O. Nielsen, D. G. Huntsman, and C. B. Gilks. MDM2 protein expression is a negative prognostic marker in breast carcinoma. *Modern pathology*, 19(1):69, 2006.
- [177] Y. Valentin-Vega, H. Okano, and G. Lozano. The intestinal epithelium compensates for p53-mediated cell death and guarantees organismal survival. *Cell death and differentiation*, 15(11):1772, 2008.
- [178] A. V. Vaseva, N. D. Marchenko, K. Ji, S. E. Tsirka, S. Holzmann, and U. M. Moll. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*, 149(7):1536–1548, 2012.

- [179] L. T. Vassilev. MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends in molecular medicine*, 13(1):23–31, 2007.
- [180] L. T. Vassilev, B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*, 303(5659):844–848, 2004.
- [181] A. Vazquez, E. E. Bond, A. J. Levine, and G. L. Bond. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature reviews Drug discovery*, 7(12):979, 2008.
- [182] A. Ventura, D. G. Kirsch, M. E. McLaughlin, D. A. Tuveson, J. Grimm, L. Lintault, J. Newman, E. E. Reczek, R. Weissleder, and T. Jacks. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*, 445(7128):661, 2007.
- [183] B. Vogelstein, D. Lane, and A. J. Levine. Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810):307, 2000.
- [184] K. H. Vousden and X. Lu. Live or let die: the cell’s response to p53. *Nature Reviews Cancer*, 2(8):594, 2002.
- [185] K. H. Vousden and G. F. V. Woude. The ins and outs of p53. *Nature cell biology*, 2(10):E178, 2000.
- [186] M. Wade, Y.-C. Li, and G. M. Wahl. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 13(2):83, 2013.
- [187] Y. Wang, Z.-j. Zheng, Y.-j. Jia, Y.-l. Yang, and Y.-m. Xue. Role of p53/mir-155-5p/sirt1 loop in renal tubular injury of diabetic kidney disease. *Journal of translational medicine*, 16(1):1–9, 2018.
- [188] N. Wanner, B. Hartleben, N. Herbach, M. Goedel, N. Stickel, R. Zeiser, G. Walz, M. J. Moeller, F. Grahammer, and T. B. Huber. Unraveling the role of podocyte turnover in glomerular aging and injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(4):707–716, 2014.
- [189] J. Wartiovaara, L.-G. Öfverstedt, J. Khoshnoodi, J. Zhang, E. Mäkelä, S. Sandin, V. Ruotsalainen, R. H. Cheng, H. Jalanko, U. Skoglund, et al. Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *The Journal of clinical investigation*, 114(10):1475–1483, 2004.
- [190] M. Westerfield. The zebrafish book, ed 4. eugene, 2000.
- [191] B. L. Wharram, M. Goyal, J. E. Wiggins, S. K. Sanden, S. Hussain, W. E. Filipiak, T. L. Saunders, R. C. Dysko, K. Kohno, L. B. Holzman, et al. Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: Diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(10):2941–2952, 2005.

- [192] R.-C. Wiggins. The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney international*, 71(12):1205–1214, 2007.
- [193] A. S. Woolf, L. Gnudi, and D. A. Long. Roles of angiopoietins in kidney development and disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(2):239–244, 2009.
- [194] X. Wu, J. H. Bayle, D. Olson, and A. J. Levine. The p53-MDM-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & development*, 7(7a):1126–1132, 1993.
- [195] S. Xiong, C. S. Van Pelt, A. C. Elizondo-Fraire, G. Liu, and G. Lozano. Synergistic roles of MDM2 and MDM4 for p53 inhibition in central nervous system development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(9):3226–3231, 2006.
- [196] W. Xue, L. Zender, C. Miething, R. A. Dickins, E. Hernando, V. Krizhanovsky, C. Cordon-Cardo, and S. W. Lowe. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, 445(7128):656, 2007.
- [197] Y. Yang, R. L. Ludwig, J. P. Jensen, S. A. Pierre, M. V. Medaglia, I. V. Davydov, Y. J. Safiran, P. Oberoi, J. H. Kenten, A. C. Phillips, et al. Small molecule inhibitors of hdm2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells. *Cancer cell*, 7(6):547–559, 2005.
- [198] G. Zhang, M. A. Park, C. Mitchell, T. Walker, H. Hamed, E. Studer, M. Graf, M. Rahmani, S. Gupta, P. B. Hylemon, et al. Multiple cyclin kinase inhibitors promote bile acid-induced apoptosis and autophagy in primary hepatocytes via p53-cd95-dependent signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 283(36):24343–24358, 2008.
- [199] J. Zhang, J. W. Pippin, R. D. Krofft, S. Naito, Z.-H. Liu, and S. J. Shankland. Podocyte repopulation by renal progenitor cells following glucocorticoids treatment in experimental FSGS. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 304(11):F1375–F1389, 2013.
- [200] X. Zhang, N. Tang, T. J. Hadden, and A. K. Rishi. Akt, foxo and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(11):1978–1986, 2011.
- [201] X.-P. Zhang, F. Liu, and W. Wang. Two-phase dynamics of p53 in the DNA damage response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(22):8990–8995, 2011.
- [202] J. T. Zilfou and S. W. Lowe. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(5):a001883, 2009.