

# MDM2-Mangel in Podozyten führt zu gestörter Autophagie und fokal-segmentaler Glomerulosklerose

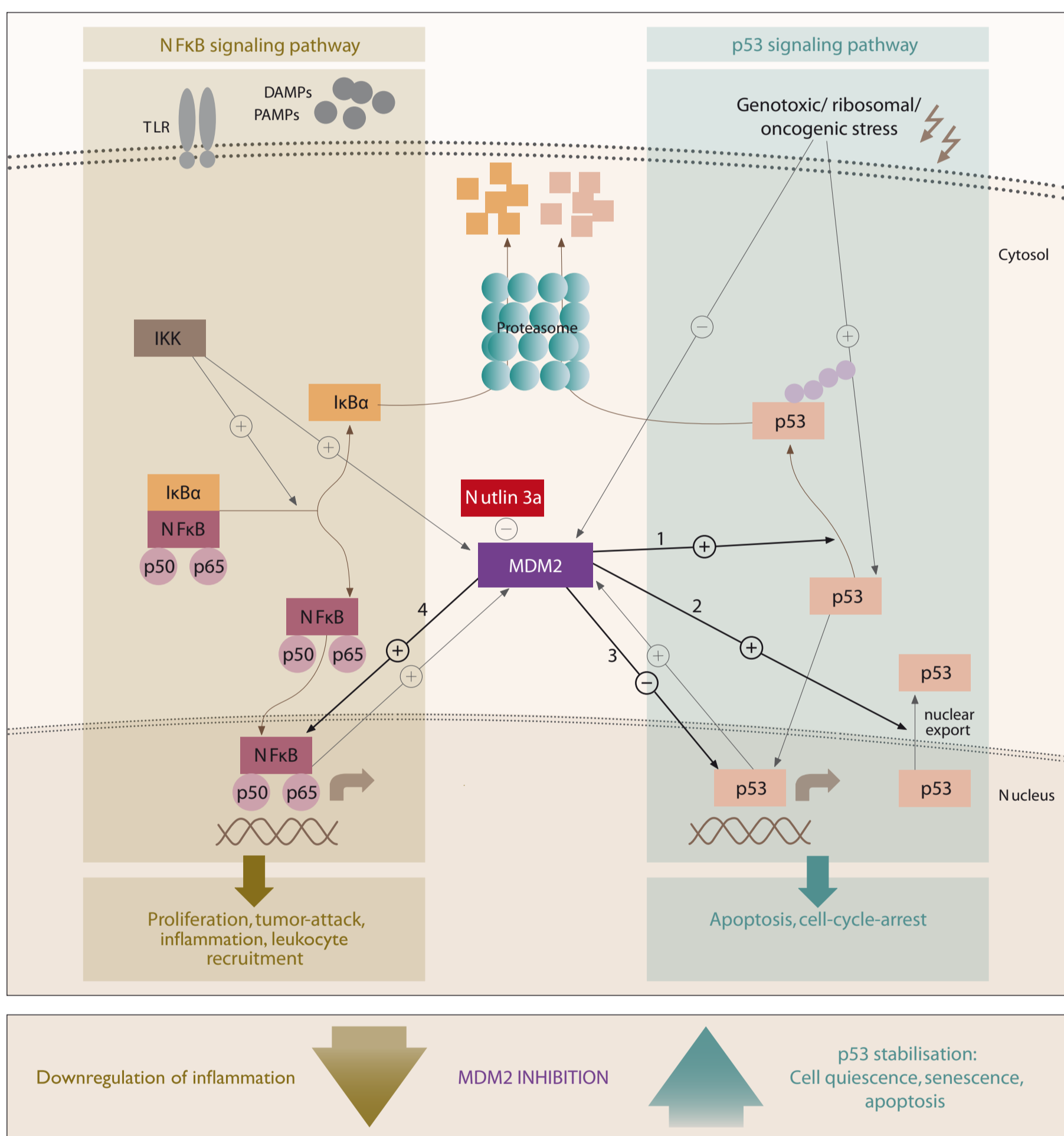
Hauke Arne Bruns, Dana Thomasova, Helen Liapis, Hans-Joachim Anders

Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Ludwig-Maximilians-Universität, München

## Einleitung

Podozyten tragen neben dem Kapillarendothel und der Basalmembran einen wesentlichen Teil zur Integrität der Glomerulären Filtrationsbarriere bei. Die Tatsache, dass es sich bei Podozyten um terminal differenzierte Zellen handelt, erklärt, warum Podozyten bei Verlust nicht ausreichend regenerieren und es daher oftmals zu Proteinurie, fokal-segmentaler Glomerulosklerose (FSGS) und progredienter Niereninsuffizienz kommt. Die Faktoren, die Podozyten ihre Jahrzehnte dauernde Widerstandsfähigkeit gegen hämodynamischen, toxischen oder immunologischen Stress verleihen, sind bisher größtenteils unbekannt. Die E3-Ubiquitin-Ligase Murine Double Minute (MDM2) ist Teil der NF- $\kappa$ B Signalkaskade und der wichtigste Negativregulator des Tumorsuppressors p53 und der damit einhergehenden p53-vermittelten Zellzyklus Unterbrechung. MDM2 wirkt somit pro-mitotisch und anti-apoptotisch. In Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass MDM2 Blockade Adriamycin-induzierten Podozytenverlust, Proteinurie und Glomerulosklerose verhindern kann. Die MDM2-Blockade führt zu p53 Anstieg und verhindert damit Podozytenverlust durch aberrante Podozytenmitose (katastrophale Mitose), bei der es zur Ablösung und Verlust der Podozyten kommt. Die physiologische Bedeutung von MDM2 in nicht-stimulierten Podozyten ist bisher nicht abschließend geklärt. Unsere Hypothese ist, dass MDM2 p53 Überaktivierung verhindert, da diese zum Verlust der Podozyten führen könnte.

## Effekte von MDM2 auf die NF- $\kappa$ B- und p53-Signalkaskaden

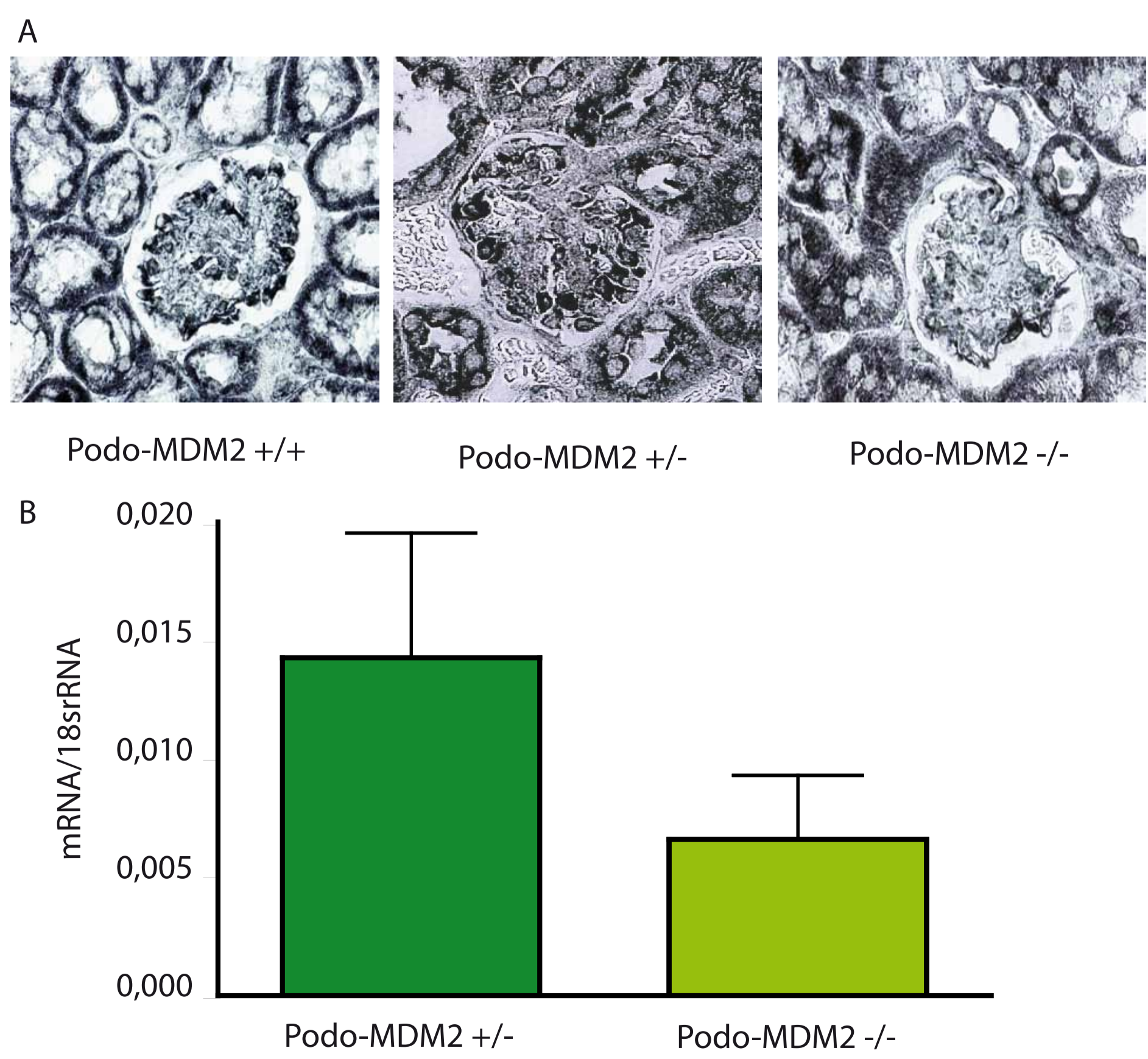


MDM2 hat durch verschiedenen Mechanismen negativ-regulatorische Effekte auf p53: (1) In seiner Funktion als E3-Ubiquitin-Ligase fördert MDM2 den Ubiquitin-bedingten Abbau von p53 durch Proteasomen, (2) MDM2 erhöht den Export von p53 aus dem Nucleus, (3) MDM2 hemmt die Transkriptionsaktivität von p53, (4) MDM2 hat positiven Einfluss auf die NF- $\kappa$ B-Signalkaskade indem es die Transkription von NF- $\kappa$ B/p65 fördert und außerdem als Kotretranskriptionsfaktor für NF- $\kappa$ B-Zielgene fungiert.

## Methoden

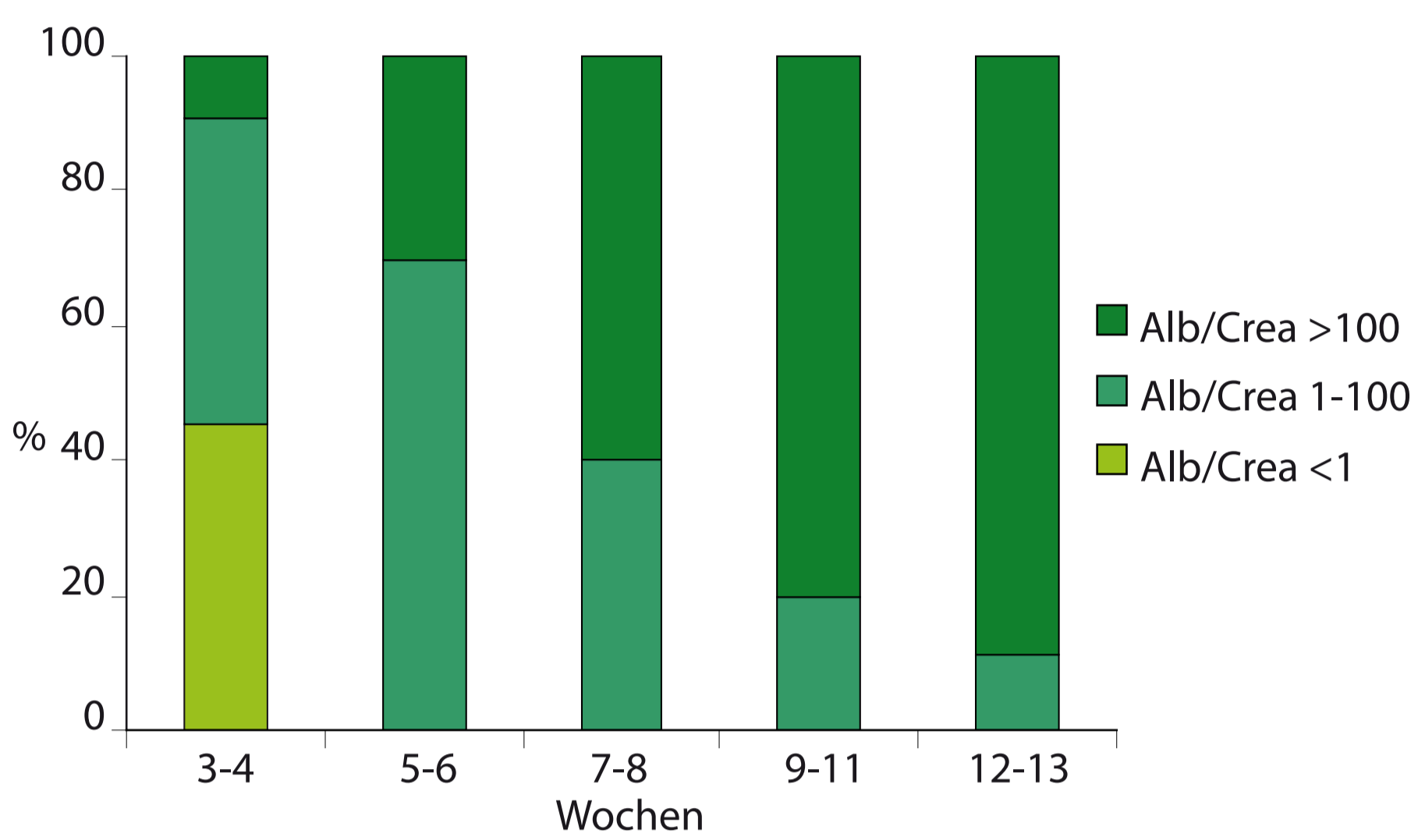
Mit dem Cre/loxP Recombinations-System generierten wir Podozyten-spezifische MDM2-Knockout Mäuse (Podocin-Cre/MDM2<sup>fllox</sup>), bei denen das MDM2-Gen auf DNA-Ebene ausgeknockt wurde. Die anschließende Charakterisierung erfolgte mit Hilfe von Albumin-ELISA, Kreatinin-Essay, Immunhistologie, Elektronenmikroskopie und realTime PCR.

## Verminderte MDM2-Expression in Podozyten



A Nierenschnitte, 8 Wochen alte Mäuse, MDM2-Färbung  
B qPCR mit glomerulärer mRNA. +/- idem -/+ (nicht dargestellt).

## Proteinurie Podo MDM2<sup>-/-</sup>

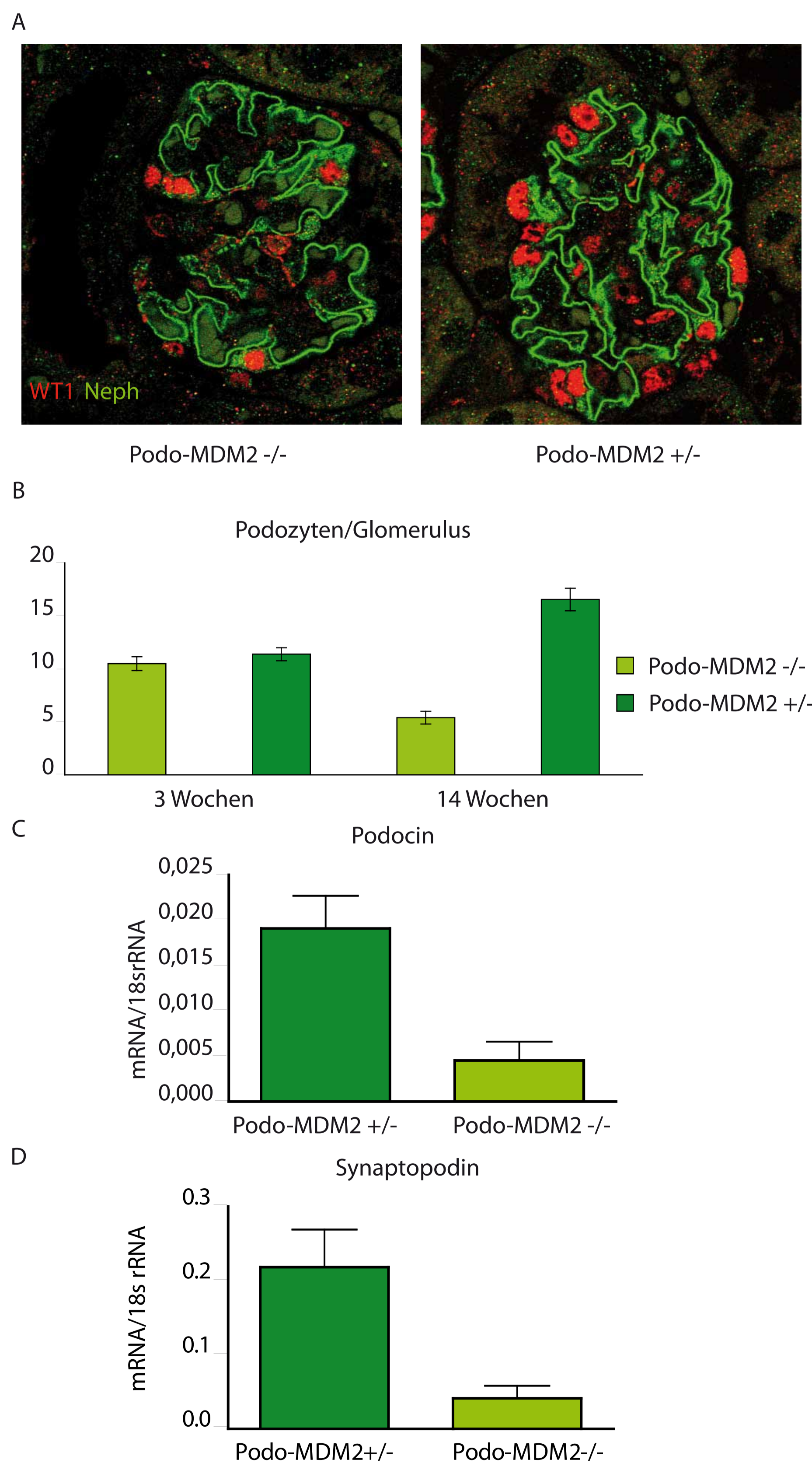


Urinalyse mittels Albumin-ELISA und Kreatinin-Assay. n=11. Über einen Zeitraum von 13 Wochen entwickeln nahezu alle -/- Tiere eine schwere Proteinurie. +/- und +/+ Tiere ohne Proteinurie (nicht dargestellt).

## Ergebnisse

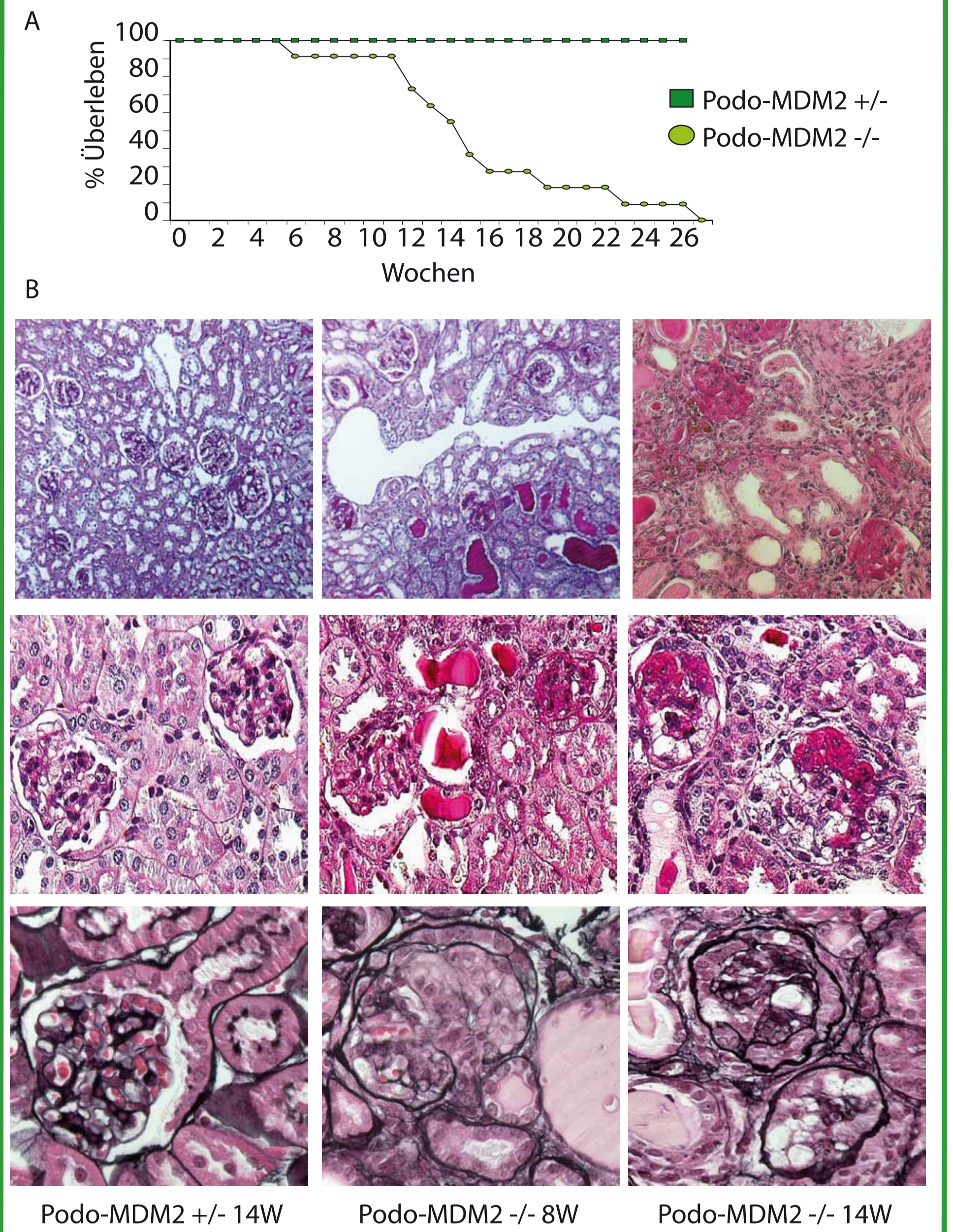
Im Vergleich mit +/- Littermates zeigen Podo-MDM2<sup>-/-</sup> Mäuse immunohistochemisch eine verminderte MDM2-Expression in Podozyten. In der Analyse von glomerulärer RNA mittels qPCR finden sich verminderte MDM2-mRNA Level. Der Quotient aus Podozyten/Glomeruli ist in 3 Wochen alten Mäusen für beide Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Der Quotient vergrößert sich bei älteren (16 Wochen) +/- Mäusen, wohingegen er bei -/- Tieren abnimmt. Der relative Mangel an Podozyten manifestiert sich histologisch als fortschreitende fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS). Die Tiere weisen eine progrediente Proteinurie und erhöhte Mortalität auf. qPCR mit glomerulärer RNA zeigt eine verringerte renale Expression von podozyten-spezifischen Genen, wie z.B. Podocin und Synaptopodin. Elektronenmikroskopisch werden spezifische morphologische Veränderungen in Form von massiven Vakuolen und ER Veränderungen in den Podozyten auffällig, welche auf Autophagie und dadurch bedingten Zelltod hinweisen. Im Gegensatz dazu zeigen heterozygote Tiere innerhalb von 26 Wochen keine Anzeichen einer Proteinurie und normale Sterblichkeit.

## Podozytenverlust in MDM2<sup>-/-</sup> Tieren



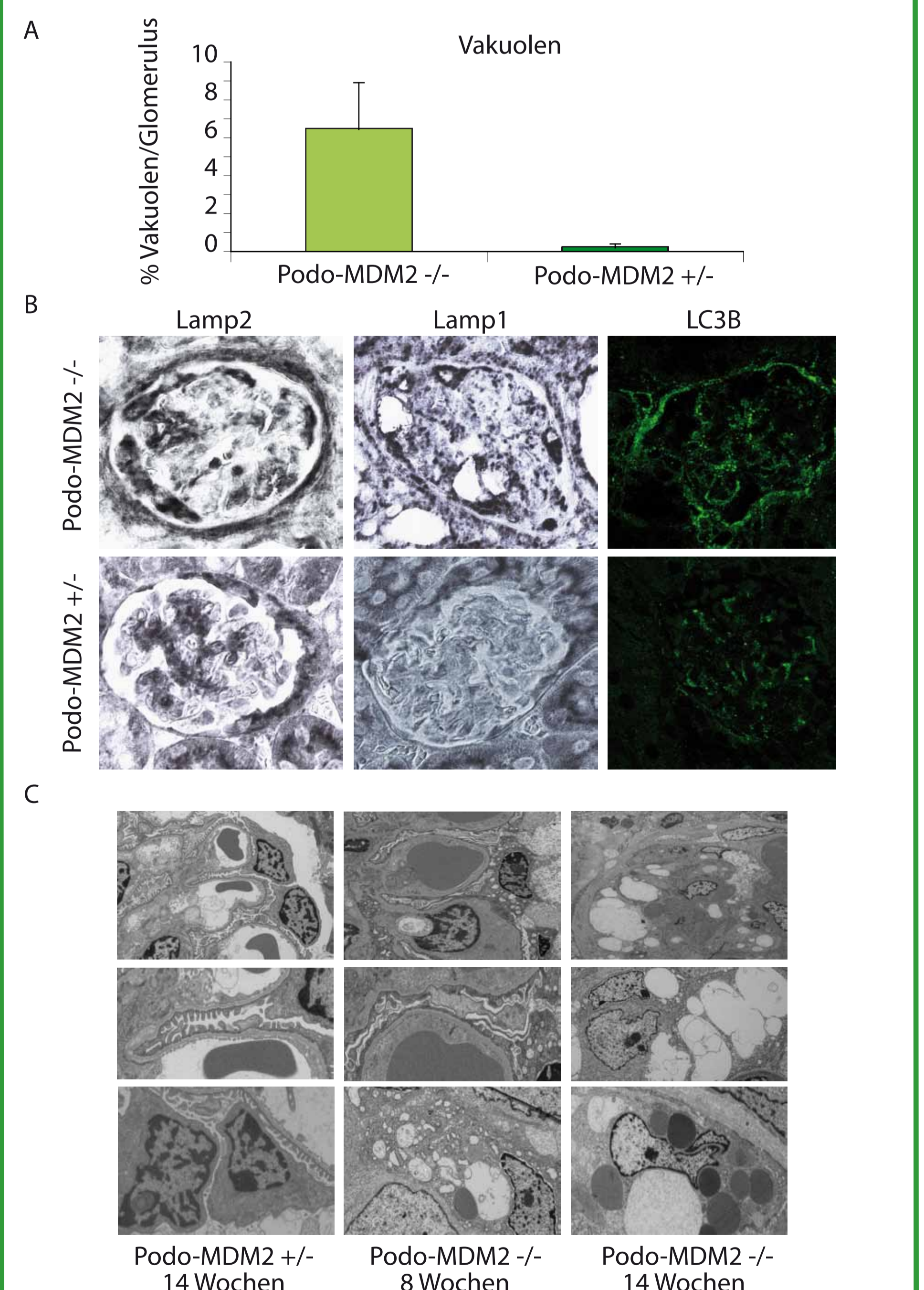
A Nierenschnitte 14W, WT1/Nephrin Färbung. Podozyten erscheinen rot, GBM grün. B Anzahl Podozyten/Glomerulus. n=3/Gruppe, 3x20Gloms ausgezählt. C, D qPCR mit glomerulärer mRNA. +/- idem -/+ (nicht dargestellt).

## MDM2 Mangel in Podozyten führt zu FSGS



A Überleben, n=12. +/- Tiere mit normalem Überleben (nicht dargestellt).  
B Nierenschnitte, PAS-Färbung. Deutlich progrediente segmentale Sklerosen bei -/- Tieren, +/- und +/+ (nicht dargestellt) unauffällig.

## MDM2-Mangel in Podozyten führt zu gestörter Autophagie



A In +/- und +/+ (nicht dargestellt) Tieren finden sich im Gegensatz zu -/- nahezu keine Vakuolen. B Färbungen zeigen erhöhte Expression von Lamp2 und Lamp1 (Lysosomen-spezifisch), und LC3B (Autophagosomen-spezifisch). C Nierenparenchym. Deutliche Vakuolenbildung in -/- Mäusen, mit Progredienz (EM-Aufnahmen).

## Zusammenfassung & Schlussfolgerung

Podozyten-spezifische MDM2 Deletion führt zu Podozytenverlust mit einhergehender Proteinurie und progredienter FSGS. Die histologischen Veränderungen lassen auf Autophagie-bedingten Zelltod schließen. Wir schließen daraus, dass MDM2 für die Homöostase und Widerstandsfähigkeit von Podozyten bedeutsam ist.