

**Pathomechanismen der
Fokal Segmentalen Glomerulosklerose (FSGS):
Charakterisierung von „Survival“- und
Apoptose-Signalwegen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Irimi Tossidou

geboren am 26.09.1978 in Hildesheim

2008

Referentin: Prof. Dr. Inna Dumler
Institut für Experimentelle Nephrologie
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Walter Müller
Institut für Physiologische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 4.03.2008

Die experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden kumulativen Dissertation wurden in der Zeit von November 2004 bis Oktober 2007 in der Abteilung für Nephrologie (Zentrum Innere Medizin) der Medizinischen Hochschule Hannover unter Betreuung von Dr. med. Mario Schiffer angefertigt.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit wurde nicht zuvor als Prüfungsarbeit eingesetzt.

Wunstorf, den 05.01.2008

Folgende Originalarbeiten sind Teil der vorliegenden kumulativen Dissertation:

Originalarbeit 1:

*Peters, I., ***Tossidou, I.**, Achenbach, J., Woroniecki, R., Mengel, M., Park, J.K., Paschy, M., de Groot, K., Haller, H., Schiffer, M. (2006).

IGF-binding protein-3 modulates TGF- β /BMP-signaling in glomerular podocytes.

Journal of American Society of Nephrology 17, 1644-1656.

*gleichberechtigte Erstautorenschaft

Die Versuche zu den Abb. 3, 4, 5 und 7 wurden von Tossidou, I. durchgeführt.

Originalarbeit 2:

Tossidou, I., Kardinal, C., Peters, I., Kriz, W., Shaw, A., Dikic, I., Tkatchuk, S., Dummler, I., Haller, H., Schiffer, M. (2007).

CD2AP/CIN85 balance determines receptor tyrosine kinase signaling response in podocytes.

Journal of Biological Chemistry 282, 7457-7464.

Die Versuche dieser Veröffentlichung wurden ausschließlich von der Erstautorin Tossidou, I. durchgeführt.

Originalarbeit 3:

Tossidou, I. et al.

Das Wechselspiel der Proteine CD2AP/CIN85 reguliert die Funktion der Schlitzmembran.

Vorgesehener englischer Titel:

CD2AP/CIN85 protein balance regulates the slit diaphragm turnover.

Manuskript in Preparation.

Die vorliegenden Versuche wurden ausschließlich von Tossidou, I. durchgeführt.

Das vorliegende Manuskript muss durch weitere Versuche vervollständigt werden.

Zusammenfassung

Viszerale Epithelzellen der renalen Glomeruli (Podozyten) sind terminal-ausdifferenzierte Zellen, die die glomeruläre Basalmembran mit zahlreichen ineinander greifenden Fußfortsätzen bedecken und durch die Ausbildung der Schlitzmembran die letzte Barriere für hochmolekulare Proteine über den Urin bilden. Die Podozytenschädigung und der Podozytenverlust sind typisch für die Fokal Segmentale Glomerulosklerose (FSGS). *IGF-binding protein-3* (IGFBP-3) konnte als ein Modulator der Apoptose identifiziert werden. In Podozyten wurde durch eine Stimulation mit IGFBP-3 Apoptose induziert und der proapoptotische Effekt von TGF- β 1 verstärkt. Eine Stimulation hingegen mit *Bone morphogenic protein-7* (BMP-7), einem Mitglied der TGF- β -Superfamilie, führte zu einer erhöhten Aktivierung von AKT und somit zum Überleben der Podozyten. Defekte in der Signaltransduktion der Podozyten sind die Basis von vielen erblich bedingten glomerulären Erkrankungen, die zur Glomerulosklerose führen. CD2-assoziiertes Protein (CD2AP) spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der glomerulären Schlitzmembran. CD2AP-Knockout (CD2AP^{-/-}) Mäuse werden gesund geboren, entwickeln aber im Alter von drei Wochen ein rasch voranschreitendes nephrotisches Syndrom, an dem sie im Alter von fünf bis sechs Wochen sterben. Eine Dysregulation der intrazellulären Signalkaskaden mit nachfolgender Podozytenschädigung ist die Ursache für das nephrotische Syndrom. Die Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) aktivieren, führte zur signifikant verminderten Aktivierung der antiapoptotischen Signalkaskaden PI3K/AKT und ERK1/2 in CD2AP^{-/-} im Vergleich zu CD2AP-Wildtyp (CD2AP^{+/+}) Podozyten. *Cbl-interacting protein of 85 kDa* (CIN85) gehört zur selben Adapterprotein-Familie wie CD2AP und zeigte eine starke Expression in CD2AP^{-/-} Podozyten. Das Wechselspiel der Proteine CD2AP/CIN85 spielt eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion. CIN85 führte in Podozyten zu einer Monoubiquitinierung und Internalisierung der Schlitzmembranproteine Nephrin und Podocin und somit zu einer verminderten Expression beider Proteine in CD2AP^{-/-} Podozyten. Das empfindliche Gleichgewicht der pro- und antiapoptotischen Signalkaskaden in Podozyten ist somit abhängig von extra- und intrazellulären Modulatoren.

Schlagwörter:

Podozyten, Transforming Growth Factor- β , CD2-assoziiertes Protein

Abstract

Podocytes are visceral epithelial cells of the kidney glomerulus, where ultrafiltration of plasma takes place. They are terminally differentiated cells that built the final barrier to protein loss in the urine by coverage of the glomerular basement membrane with their numerous interdigitating foot processes. Podocyte damage resulting in foot process effacement and loss of podocytes is the hallmark of focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). Podocyte apoptosis is a key event during progression of glomerulosclerosis. Podocytes are highly responsive to a variety of cytokines and chemokines. IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) is identified as a new modulator of apoptosis and survival signaling in podocytes. Stimulation with IGFBP-3 led to apoptosis and could enhance TGF- β 1 induced apoptosis *in vitro*. In contrast to that bone morphogenic protein-7 (BMP-7), another member of the TGF- β superfamily, led to apoptosis opposing signaling effects with a strong increase of activated AKT. Defects in podocyte signaling are the basis of many inherited glomerular diseases leading to glomerulosclerosis. CD2-associated protein (CD2AP) is highly expressed in podocytes and plays an important role in maintenance of the glomerular slit diaphragm. CD2AP knockout (CD2AP^{-/-}) mice appear normal at birth but develop a rapid onset nephrotic syndrome at 3 weeks of age and die at 5-6 weeks at age. Impaired intracellular signaling with subsequent podocyte damage is the reason for this delayed podocyte injury. Stimulation of CD2AP^{-/-} podocytes with various growth factors that activate receptor tyrosine kinases (RTK) resulted in a significantly decreased PI3K/AKT and ERK1/2 signaling response. Increased expression of Cbl-interacting protein of 85 kDa (CIN85), an ubiquitously expressed adaptor protein, which belongs to the same adaptor protein family as CD2AP, was detectable in CD2AP^{-/-} podocytes and led to decreased activation of ERK1/2 *in vitro* and *in vivo*. The sensitive balance of CD2AP/CIN85 expression plays therefore a general role for the signaling response in podocytes and is also responsible for the physiological integrity of the slit diaphragm. Increased protein-levels of CIN85 led to monoubiquitination and internalization of the slit diaphragm proteins Nephrin and Podocin and therefore to decreased protein-expression of both in CD2AP^{-/-} podocytes. The sensitive balance of pro- and antiapoptotic signaling cascades in podocytes is dependent on extra- and intracellular modulators.

Keywords:

Podocytes, Transforming Growth Factor- β , CD2-associated protein

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| AKT | Proteinkinase B |
| AP2 | Adapterprotein-2 |
| BMP | <i>Bone morphogenic protein</i> |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| C- | Carboxy- |
| Ca ²⁺ | Calciumionen |
| cAMP | <i>cyclic Adenosinmonophosphat</i> |
| Caspase | <i>cysteiny-Aspartate specific protease</i> |
| CC | Coiled-Coil |
| CD2AP | CD2-assoziiertes Protein |
| CD2AP+/+ | CD2AP-Wildtyp |
| CD2AP-/- | CD2AP-Knockout |
| cGMP | <i>cyclic Guanosinmonophosphat</i> |
| CHO | chinese hamster ovary |
| CIN85 | <i>Cbl-interacting protein of 85 kDa</i> |
| CNF | kongenital nephrotisches Syndrom vom finnischen Typ |
| Co-Smad | <i>common-partner Smad</i> |
| DAPI | 4-, 6-Diamidino-2-Phenylindol |
| EGF | <i>Epidermal growth factor</i> |
| ERK | Extrazellulär-regulierte Kinase |
| et al. | und andere |
| FACS | Fluorescence-activated cell sorting |
| F-Aktin | filamentöses Aktin |
| FGF | <i>Fibroblast growth factor</i> |
| FGFR | <i>Fibroblast growth factor-receptor</i> |
| FSGS | Fokal Segmentale Glomerulosklerose |
| GBM | glomeruläre Basalmembran |
| GFP | grün-fluoreszierendes Protein |
| Grb2 | <i>Growth factor receptor bound protein-2</i> |

| | |
|----------|--|
| h | Stunde |
| IGF | <i>Insulin-like growth factor</i> |
| IGFBP | <i>IGF-binding protein</i> |
| I-Smad | <i>inhibitory Smad</i> |
| JNK | c-Jun N-terminale Kinase |
| Kap. | Kapitel |
| kDa | Kilodalton |
| m | murin |
| MAD | <i>Mothers against Decapentaplegic</i> |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Kinase |
| MEK | MAPK/ERK Kinase |
| MEKK | MAPK/ERK Kinase Kinase |
| MKK | MAPK Kinase |
| mRNA | <i>messengerRNA</i> |
| N- | Amino- |
| NFκB | <i>nuclear factor-kappa B</i> |
| nm | Nanometer |
| OP-1 | <i>osteogenic protein-1</i> |
| PAI-1 | <i>Plasminogen activator-inhibitor-1</i> |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3-Kinase |
| Pro-rich | Prolin-reich |
| Raf | <i>rapidly growing fibrosarcoma</i> |
| Ras | <i>Rat sarcoma</i> |
| RNAi | RNA interference |
| R-Smad | <i>receptor-activated Smad</i> |
| RTK | Rezeptor-Tyrosin-Kinase |
| RT-PCR | Real-time-PCR |
| SH3 | <i>Src-homology 3</i> |
| siRNA | small interfering RNA |
| SMA | <i>small body size</i> |
| SOS | <i>son of sevenless</i> |
| TGF-β | <i>Transforming growth factor-β</i> |
| TNF-α | Tumor Nekrose Faktor-α |

| | |
|------|---|
| u.a. | unter anderem |
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| ZO-1 | Zonula Occludens-1 |
| µg | Mikrogramm |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Allgemeine Einführung: Die Niere | 1 |
| 1.2 | Die funktionelle Einheit der Filtrationsbarriere | 2 |
| 1.3 | Die Podozyten | 3 |
| 1.3.1 | Die zentrale Stellung der Podozyten bei Glomerulopathien | 4 |
| 1.4 | Die Fokal Segmentale Glomerulosklerose (FSGS) | 5 |
| 1.5 | Proteine der Schlitzmembran und Relevanz der Zell-Zell-Interaktion von Podozyten | 6 |
| 1.5.1 | CD2AP und CIN85 | 7 |
| 1.5.2 | Nephrin | 9 |
| 1.5.3 | Podocin | 10 |
| 1.6 | Die Schlitzmembran als „Signalplattform“ | 11 |
| 1.6.1 | PI3K und AKT | 11 |
| 1.6.2 | MAPK-Signalweg | 11 |
| 1.7 | Extrazelluläre Faktoren und Modulatoren von Signalkaskaden | 13 |
| 1.7.1 | Transforming growth factor (TGF- β) | 13 |
| | TGF- β induziert in Podozyten pro- und antiapoptotische Signalkaskaden | 14 |
| 1.7.3 | Bone morphogenic protein-7 (BMP-7) | 15 |
| 1.7.4 | IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) | 16 |
| 1.8 | Intrazelluläre Mediatoren von Signalkaskaden | 16 |
| 1.8.1 | CD2AP | 16 |
| 1.8.2 | CIN85 | 17 |
| 1.9 | Bedeutung und Probleme der Podozyten-Kultur | 18 |
| 1.10 | Zielsetzung | 19 |
| 2 | IGF-binding protein-3 modulates TGF-β/BMP-signaling in glomerular podocytes | 20 |
| 3 | CD2AP/CIN85 balance determines receptor tyrosine kinase signaling response in podocytes | 34 |
| 4 | Das Wechselspiel der Proteine CD2AP/CIN85 reguliert die Funktion der Schlitzmembran | 43 |
| 4.1 | Expression von CIN85-mRNA in CD2AP+/+ und CD2AP-/- Podozyten | 44 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.2 | Interaktion von CD2AP und CIN85 | 45 |
| 4.3 | Verminderte Expression von Nephtrin und Podocin in CD2AP ^{-/-} Podozyten | 48 |
| 4.4 | Monoubiquitinierung von Proteinen in CD2AP ^{-/-} Podozyten | 49 |
| 4.5 | Vesikuläre Co-Lokalisation von Nephtrin und Podocin mit CIN85 | 51 |
| 5 | Zusammenfassung und Diskussion | 53 |
| 5.1 | IGF-binding protein-3 moduliert TGF- β /BMP-Signaling in glomerular Podocytes | 53 |
| 5.1.1 | IGFBP-3 moduliert die durch TGF- β 1 induzierte Podozytenapoptose | 53 |
| 5.1.2 | BMP-7 als zytoprotektiver Faktor | 55 |
| 5.2 | CD2AP/CIN85 balance determines receptor tyrosine kinase signaling in podocytes | 56 |
| 5.2.1 | Der podozytäre Schaden in CD2AP ^{-/-} Mäuse resultiert aus einer dysregulierten Signaltransduktion | 56 |
| 5.2.2 | CIN85 ist ein Modulator der ERK1/2-Signalkaskade in Podozyten | 57 |
| 5.2.2 | CIN85 führt zur verminderten Aktivierung von ERK1/2 <i>in vivo</i> | 58 |
| 5.3 | Das Wechselspiel der Proteine CD2AP/CIN85 reguliert die Funktion der Schlitzmembran | 59 |
| 5.3.1 | CD2AP moduliert die CIN85-Expression in Podozyten | 59 |
| 5.3.2 | CIN85 führt zur Endozytose von Nephtrin und Podocin | 59 |
| 5.4 | Ausblick | 60 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 61 |
| 7 | Publikationsliste | 68 |
| 7.1 | Originalpublikationen in Peer-Review-Zeitschriften | 68 |
| 7.2 | Manuskripte für Peer-Review-Zeitschriften | 68 |
| 7.3 | Kurzvorträge und Poster | 69 |
| 8 | Lebenslauf | 71 |
| 9 | Danksagung | 72 |

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung: Die Niere

Die Urinausscheidung der Niere läuft in zwei Schritten ab: Im ersten Schritt werden aus dem Blut viele Substanzen zum sogenannten Primärharn filtriert, im zweiten Schritt wird der größte Teil des Primärharns kontrolliert in den Blutkreislauf resorbiert. Der Feinbau der Niere zeichnet sich durch ein hochdifferenziertes Tubulussystem und eine spezifisch angepasste Blutversorgung aus. Das Tubulussystem lässt sich in zwei Teile gliedern, das *Nephron* und das Sammelrohr.

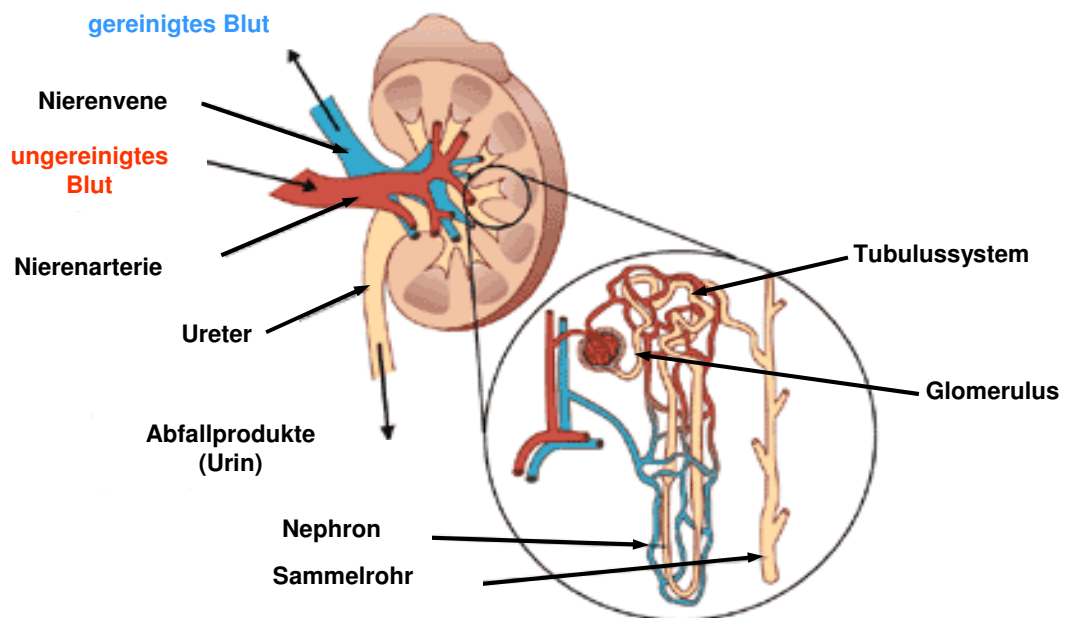


Abb.1 Aufbau von Niere und Nephron

Makroskopischer Aufbau einer Säugetier-Niere (verändert nach Junqueira et al., 1998; Campbell, 1998).

Das Nephron ist eine strukturelle und funktionelle Einheit innerhalb der Nieren. Jede Niere besitzt circa eine Million Nephrone. Ein Nephron setzt sich zusammen aus dem Nierenkörperchen (*Glomerulus*), an das sich ein lang gestrecktes, gewundenes und verschlungenes Kanälchen (*Tubulus*) anschließt, welches in das Sammelrohr mündet (Abb. 1).

Im Glomerulus bilden die Kapillaren zahlreiche Schlingen, die von einem zwischenkapillären Gerüst, dem *Mesangium*, zusammengehalten werden. Dieses

Kapillarknäuel wird von der Bowman'schen Kapsel umgeben, die in das Tubulussystem übergeht (Tryggvason und Wartiovaara, 2001) (Abb.2).

Aus dem durchfließenden Blut in den Glomeruli werden circa 180 Liter Ultrafiltrat, der sogenannte Primärharn, abgepresst und im nachgeschalteten Tubulussystem zum größten Teil rückresorbiert.

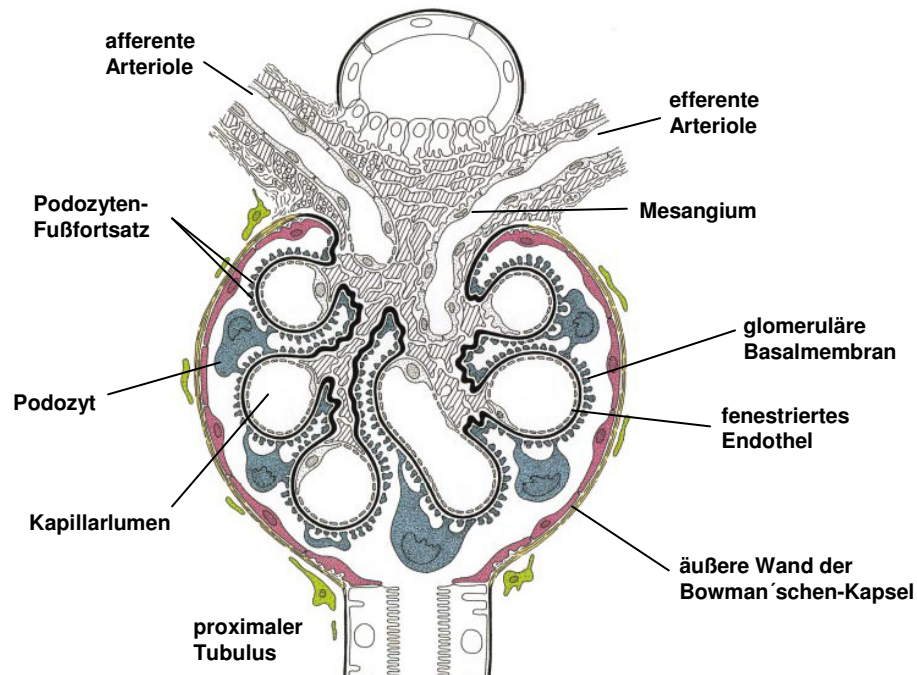


Abb.2 Aufbau eines Glomerulus

Schematische Darstellung der Struktur eines Glomerulus mit den verschiedenen Kompartimenten (verändert nach Kriz et al., 1998a).

1.2 Die funktionelle Einheit der Filtrationsbarriere

Bei der Filtration des Primärharns können niedermolekulare Solute und Wasser den glomerulären Filter ungehindert passieren. Hingegen Makromoleküle wie Blutplasma-Proteine oder andere zelluläre Elemente des Blutes werden zurückgehalten. Der molekulare Aufbau dieser Filtrationsbarriere ermöglicht die Filtration des Blutes nach Größe und Ladung. Die glomeruläre Filtrationsbarriere setzt sich aus drei Komponenten zusammen: Auf der Seite des Blutes befindet sich das fenestrierte Kapillarendothel auf die als zweite Komponente die glomeruläre Basalmembran (GBM) folgt, ein makromolekulares Maschennetzwerk aus spezifischen extrazellulären Matrixproteinen wie Typ 4 Kollagen, Laminin, Nidogen und Proteoglycanen (Tryggvason und

Wartiovaara, 2001). Die dritte Komponente bilden viszerale Epithelzellen auf der Harnseite, die Podozyten, welche mit ihren primären und sekundären Fußfortsätzen Kontakt zur GBM herstellen (Abb.3).

Das glomeruläre Filtrat passiert zuerst die Fenestrierungen der Endothelzellen, die ein Hindernis für makromolekulare und zelluläre Elemente des Blutes darstellen. Die glomeruläre Basalmembran ist ein selektiver Filter für Proteine mit einem Molekulargewicht über 70 kDa und wird zu gleichen Teilen von den Endothelzellen und Podozyten sezerniert. Die letzte Barriere bildet die sogenannte Schlitzmembran (*slit diaphragm*), ein feines Netzwerk aus Makromolekülen, das sich zwischen den podozytären Fußfortsätzen ausspannt (Pavenstädt et al., 2003).



Abb. 3 Detailbild der Filtrationsbarriere

Die Filtrationsbarriere besteht aus dem Endothel mit offenen Poren, der GBM und der zwischen den Podozyten-Fußfortsätzen ausgespannten Schlitzmembran (verändert nach Kriz, 2006)

1.3 Die Podozyten

Podozyten sind hochspezialisierte, terminal-ausdifferenzierte Epithelzellen. Sie bilden zahlreiche ineinander greifende primäre und sekundäre Fußfortsätze aus, mit denen sie an der GBM über Integrin-Bindungen verankert sind; die Zellkörper selbst flotieren frei im Lumen der Bowman'schen Kapsel (Kriz, 2006). Die sekundären Fußfortsätze greifen sehr regelmäßig mit den Fußfortsätzen benachbarter Podozyten ineinander und bilden dadurch ein dichtes Netzwerk, welches das gesamte glomeruläre Kapillarknäuel bedeckt. Dazwischen spannt sich die Schlitzmembran mit einer Weite von 30-40 nm aus (Kriz, 1996, Kriz et al, 1998b, Pavenstädt et al., 2003) (Abb.4). Podozyten sind aufgrund ihrer hohen Permeabilität für Wasser und Solute sowie ihrer Undurchlässigkeit für hochmolekulare Plasmaproteine maßgeblich verantwortlich für die spezifischen

Eigenschaften des Filters. Podozyten haben darüber hinaus entscheidende Funktionen für die Entwicklung, die Aufrechterhaltung und Reparatur des Glomerulus.

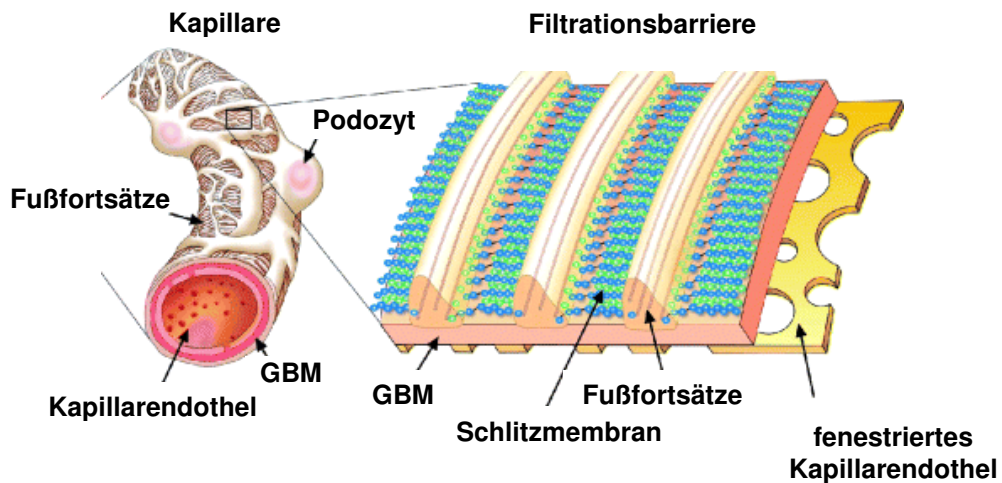


Abb.4 Aufbau der Filtereinheit

Plastische Darstellung der renalen Filtereinheit mit der Schlitzmembran (verändert nach Tryggvason und Pettersson, 2003.)

1.3.1 Die zentrale Stellung der Podozyten bei Glomerulopathien

Die Identifizierung von Gendefekten, welche Podozyten-Störungen und damit assoziierte schwere glomeruläre Erkrankungen induzieren, ermöglichte einen sehr großen Wissenszuwachs in der glomerulären Biologie (Benzing, 2004).

Demzufolge scheint das Fortschreiten einer chronischen Nierenerkrankung in vielen Fällen nach einem einheitlichen Schema zu erfolgen. Ist ein erheblicher Teil des Nierengewebes zerstört, nimmt unabhängig von der Ursache der anfänglichen Schädigung die glomeruläre Filtrationsrate kontinuierlich ab (Kriz et al., 1998b). Dies führt zu einem chronischen Nierenversagen mit drastisch erhöhten Proteinspiegeln im Urin (Proteinurie), was letztlich eine Dialyse-Behandlung und/oder eine Nierentransplantation erforderlich macht. Die Proteinurie ist auf den Verlust der Barrierefunktion durch morphologische Veränderungen der Podozyten und somit der Schlitzmembran zurückzuführen. Im Gegensatz zu anderen Zellen, wie z. B. Endothelzellen oder Mesangialzellen, die ebenfalls an der Aufrechterhaltung der glomerulären Architektur beteiligt sind, können sich Podozyten als terminal-ausdifferenzierte Epithelzellen nicht mehr postnatal replizieren. Dieser Podozytenverlust kann somit nicht mehr ausgeglichen werden (Kriz, 1996; Kriz et

al., 1998b). Der Podozyt ist sowohl Ziel primärer als auch sekundärer Schädigungen bei glomerulären Erkrankungen (Kriz et al., 1995; Kim et al., 2001).

1.4 Die Fokal Segmentale Glomerulosklerose (FSGS)

Bei der Fokal Segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) kommt es initial zu einer phänotypischen Dysregulation der Podozyten mit Verplumpung der Fußfortsätze und konsekutivem Verlust der Filtrationsschlitze. Fortschreitender Zellverlust durch Ablösung von der glomerulären Basalmembran führt schließlich zum Zelltod der Podozyten (Schiffer und Haller, 2006). In der gesamten Niere bilden sich fokale Herde (nicht alle Glomeruli sind gleichzeitig betroffen), in denen es zur segmentalen Sklerosierung (Vernarbung) der Glomeruli kommt (Abb.5). Grundsätzlich unterscheidet man zwischen primären Formen, die familiär gehäuft oder sporadisch auftreten, und sekundären Formen, die Folgestadien verschiedenster Nierenerkrankungen sein können oder infolge von Virusinfektionen, besonders HIV, auftreten können. Die primären Formen gehen meistens mit einem steroid-resistenten nephrotischen Syndrom einher und führen rasch zur terminalen Niereninsuffizienz. Die Therapie der sekundären FSGS besteht in der Behandlung der Grundkrankheit und der allgemeinen Therapie zur Verhinderung einer progressiven Nierenfunktionsverschlechterung. Die Prognose der FSGS ist eher ungünstig; maximale Therapieerfolge mit erhaltener Nierenfunktion über Jahre sind nur bei etwa 50 % der Patienten gegeben. Bei terminaler Niereninsuffizienz bleiben nur die üblichen Nierenersatzverfahren.

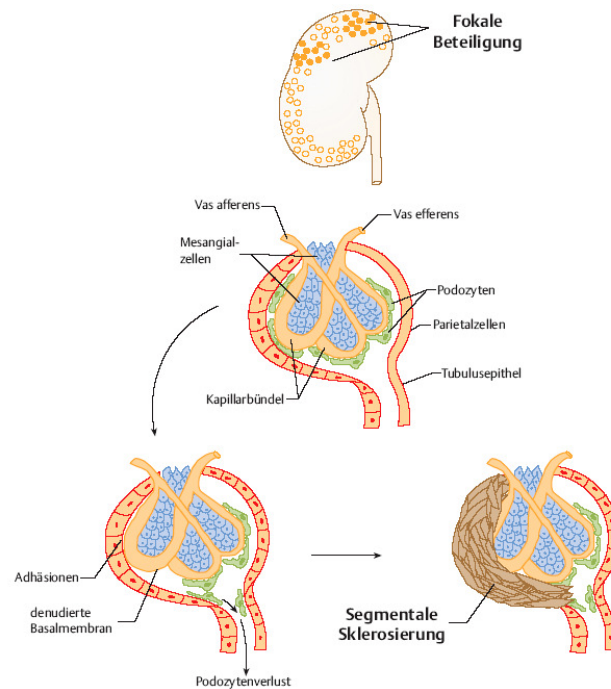


Abb.5 Entstehung der fokalen segmentalen Glomerulosklerose

Im Nierenkortex bilden sich fokale Herde, in denen es zur segmentalen Sklerosierung kommt. Podozyten gehen verloren und die denudierte Basalmembran haftet an der Bowman'schen Kapsel. Im Bereich der Adhäsionen kommt es zur Proliferation und Matrixakkumulation, die zur Degeneration des gesamten Glomerulus führt (Schiffer und Haller, 2006).

1.5 Proteine der Schlitzmembran und Relevanz der Zell-Zell-Interaktion von Podozyten

Bis vor kurzem war die molekulare Zusammensetzung der Schlitzmembran weitgehend unbekannt. Die Schlitzmembran ist ein hochspezialisierter Zell-Zell Kontakt, der aus Proteinen der Fußfortsätze gebildet wird, welche mit ihren extrazellulären Anteilen mit denen der Nachbarzelle interagieren und dadurch ein Maschenwerk bilden. Erst in den letzten Jahren konnten mehrere Proteine identifiziert werden, die für die strukturelle Aufrechterhaltung der Schlitzmembran notwendig sind.

Neben den Proteinen CD2AP/CIN85, Nephrin und Podocin, die im Fokus dieser Arbeit stehen, befinden sich in der Reißverschluß-ähnlichen Struktur der Schlitzmembran noch weitere Proteine, wie z. B. P-Cadherin, FAT, Nephrin-1-3 und ZO-1 (Donoviel et al., 2001; Reiser et al., 2000; Ruoslatinen et al., 1999; Shi et al., 2001) (Abb.6).

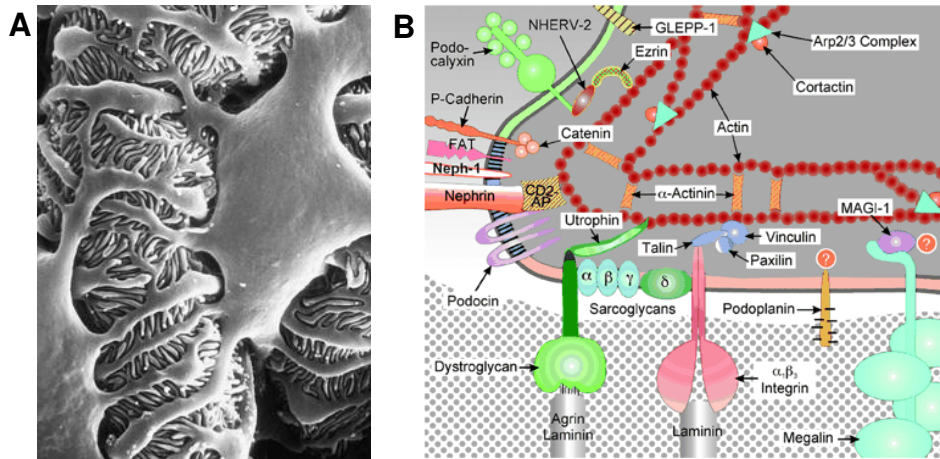


Abb.6 Morphologie und molekularer Aufbau der Podozyten-Fußfortsätze

A: Rasterelektronenmikroskopisches Bild der Außenseite einer Glomeruluskapillare. Zu sehen ist ein Podozyt, von dessen Körper zunächst Primärfortsätze entspringen, die sich in die fingerförmigen Fußfortsätze aufspalten; zwischen letzteren erkennt man die Filtrationsschlitze (Kriz, 2006).

B: Das vereinfachte Schema zeigt das Zusammenspiel und die Lokalisation der Podozyten-relevanten Moleküle innerhalb der sekundären Podozytenfortsätze. CD2AP verankert Neph-1 und Podocin an der Schlitzmembran (Kerjaschki, 2001).

1.5.1 CD2AP und CIN85

CD2AP (CD2-assoziiertes Protein) ist im Zytoplasma innerhalb der Podozyten-Fortsätze auf Seiten der Schlitzmembran lokalisiert. CD2AP kommt in einer Vielzahl von Geweben vor (Kirsch et al., 2002). Ursprünglich wurde es in T-Lymphozyten entdeckt, wo es bei der Ausbildung der immunologischen Synapse, der Kontaktstelle zwischen T-Lymphozyt und Antigen-präsentierender Zelle, eine wichtige Rolle spielt (Dustin et al., 1998).

Die CD2AP-Knockout (CD2AP^{-/-}) Maus zeigte jedoch völlig überraschend keine immunologisch-relevanten phänotypischen Veränderungen, sondern einen schweren podozytären Schaden sowie ein nephrotisches Syndrom (Shi et al., 1999). Die CD2AP-defizienten Mäuse werden gesund geboren und zeigen eine intakte Schlitzmembran sowie reguläre Fußfortsätze. Erst im Alter von drei Wochen entwickelt sich eine dramatische Proteinurie und die Mäuse sterben im Alter von fünf bis sechs Wochen an der Folge des nephrotischen Syndroms (Abb.7). Dabei zeigen sich histologische Veränderungen, die den Läsionen der humanen FSGS ähneln (Schiffer, 2006).

CD2AP-heterozygote Mäuse entwickeln keine Proteinurie, zeigen aber auch glomeruläre Abnormalien, die erst im Alter von neun Monaten in Erscheinung treten. Beim Menschen wurde eine Haploinsuffizienz bislang nur bei zwei Patienten mit FSGS beschrieben (Kim

et al., 2003). Die erste homozygote Mutation beim Menschen wurde erst vor kurzem beschrieben (Löwik et al., 2007).

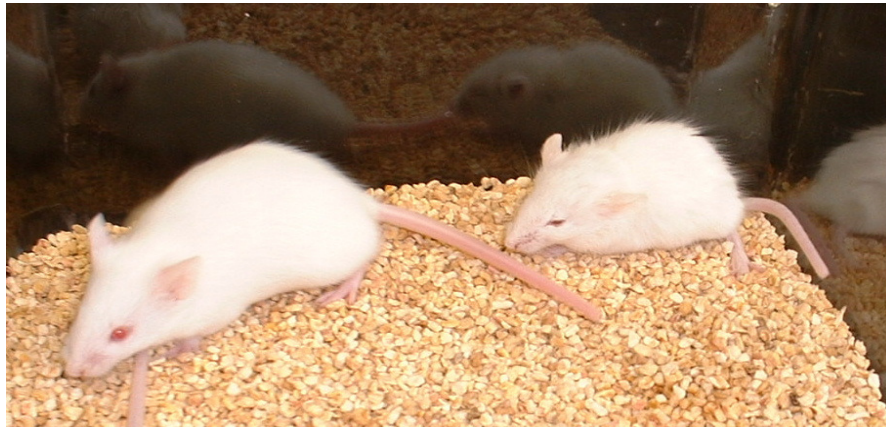
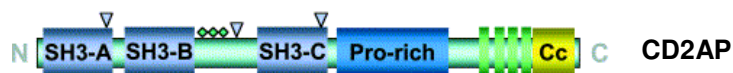


Abb.7 Der Phänotyp der CD2AP-Knockout Maus

Das Foto zeigt zwei fünf Wochen alte Mäuse.

Links: CD2AP-Wildtyp; Rechts: CD2AP-Knockout.

CD2AP hat ein Molekulargewicht von 80 kDa und gehört zu einer neuen Familie von Adapterproteinen, welche mit ihren drei SH3-Domänen, einer Prolin-reichen Domäne, einer Aktin-bindenden Domäne und einer Coiled-Coil-Domäne zahlreiche Bindungsstellen für andere Proteine des Zytoskeletts aufweisen (Abb.8). CD2AP verankert an der Schlitzmembran Nephrin und Podocin mit dem F-Aktin der Zellen (Lehtonen et al, 2002; Shi et al., 2001; Welsch et al., 2001) und kann demzufolge als Schlüsselprotein für die Verbindung zwischen der Schlitzmembran und dem Zytoskelett fungieren (Yuan et al. 2002) und somit essentiell für die strukturelle und funktionelle Aufrechterhaltung der glomerulären Schlitzmembran sein.



▽ FxDxF-Motiv

◊◊ Potentielle Serin/Threonin Phosphorylierungsstellen

| Aktin-bindende Motive

Abb.8 Schematische Darstellung der Struktur von CD2AP

CD2AP weist drei N-terminale SH3-Domänen auf, ein zentrales Prolin-reiches Motiv und eine C-terminale Coiled-Coil-Domäne. Am C-terminalen Ende befinden sich ebenfalls vier Aktin-bindende Motive (verändert nach Dikic, 2002).

Über die Rolle von CIN85 (*Cbl-interacting protein of 85 kDa*) in Podozyten ist bisher nur wenig bekannt. CIN85 gehört zur selben Adapterprotein-Familie wie CD2AP und wird in vielen verschiedenen Zellen und Geweben exprimiert (Buchmann et al., 2002). Über dessen genaue Lokalisation in der Niere und speziell in den Podozyten liegen keine Daten vor. CIN85 und CD2AP sind in Sequenz und Struktur sehr ähnlich. Die Aminosäuresequenz ist zu 39 % identisch. Ein wichtiger Unterschied sind die Aktin-Bindungsstellen am C-terminalen Ende, die nur CD2AP besitzt. Für CIN85 konnten aufgrund von alternativen Spleißvorgängen und unterschiedlichen Promotoren verschiedene Isoformen nachgewiesen werden (Buchmann et al., 2002, Dikic, 2002) (Abb.9). CD2AP und CIN85 können sowohl Homodimere als auch Heterodimere über ihre Coiled-Coil-Domänen bilden (Borinstein et al., 2000; Kirsch et al., 1999; Gaidos et al., 2007). CIN85 wie auch CD2AP interagieren mit Komponenten von Signaltransduktionskaskaden und sind somit an Signalübertragungsprozessen beteiligt (Aissouni et al., 2005; Gout et al., 2000; Huber et al., 2003).

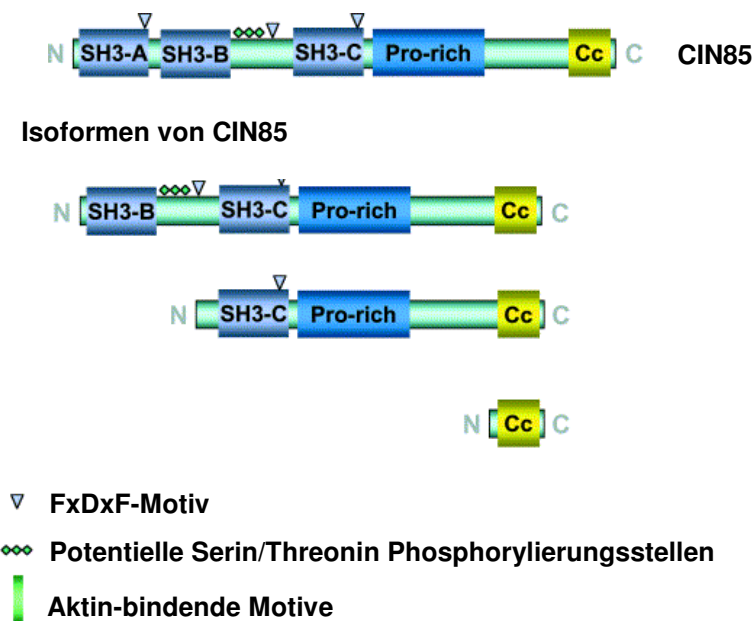


Abb.9 Schematische Darstellung der Struktur von CIN85

CIN85 besitzt drei N-terminale SH3-Domänen, ein zentrales Prolin-reiches Motiv und eine C-terminale Coiled-Coil-Domäne. Alternativen Spleißvarianten von CIN85 fehlen eine bzw. zwei SH3-Domänen oder sie bestehen nur aus der Coiled-Coil-Domäne (verändert nach Dikic, 2002).

1.5.2 Nephrin

Anhand des Krankheitsbildes des kongenitalen nephrotischen Syndroms vom finnischen Typ (CNF) konnte über Positionsklonierung das Gen NPFS1 identifiziert werden. Das

CNF ist eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit, die besonders in Finnland eine hohe Inzidenz hat. 1 von 1000 Neugeborenen ist dort von der Krankheit betroffen, die schon *in utero* zur massiven Proteinurie führt und unbehandelt zur terminalen Niereninsuffizienz fortschreitet (Kestila et al., 1998). Das NPHS1-Gen kodiert das 180 kDa schwere Protein Nephrin, welches zur Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie zählt. Es ist ein großes, transmembranes Protein mit einer extrazellulären Domäne am N-Terminus und einem relativ kurzen C-terminalen zytoplasmatischen Abschnitt (Abb.6, B). Mittels Immunogoldfärbung und Elektronenmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass Nephrin in der Niere ausschließlich in den Podozyten exprimiert wird und in der Schlitzmembran lokalisiert ist (Holthofer et al., 1999; Holzmann et al., 1999; Ruotsalainen et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Nephrin durch die Src-Tyrosin-Kinase Fyn phosphoryliert wird und zusammen mit CD2AP an die p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) bindet und dadurch die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase AKT beeinflusst (Li et al., 2004; Verma et al., 2003; Huber et al., 2003). Eine Gendelektion von NPHS1 in Mäusen führt wie beim Menschen auch zur massiven Proteinurie und zum Tod innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt. Histologisch ist ein Verschmelzen der Podozyten-Fußfortsätze zu erkennen; eine Schlitzmembran kann nicht mehr nachgewiesen werden (Putala et al., 2001).

1.5.3 Podocin

Podocin ist ein Protein der Stomatin-Proteinfamilie mit einem Molekulargewicht von 42 kDa. Es wird ausschließlich in den Podozyten exprimiert. Mutationen in dem zugehörigen Gen NPHS2 verursachen ein autosomal-rezessives, steroid-resistentes nephrotisches Syndrom (Boute et al., 2000; Fuchshuber et al., 1995), welches wenige Monate nach der Geburt zu einer rasch fortschreitenden Niereninsuffizienz führt. Histologisch findet man Zeichen einer FSGS, die gegenüber einer Therapie resistent ist. Podocin besitzt am N-Terminus eine relativ kurze, am C-Terminus eine längere Domäne, die beide im Zytoplasma der Zelle lokalisiert sind. Die transmembrane Domäne zeigt eine haarnadelähnliche Konfiguration. (Boute et al., 2000) (Abb.6, B). Podocin interagiert mit der zytoplasmatischen Domäne von Nephrin und verstärkt die Nephrin-abhängige Signalübertragung (Huber et al., 2001).

1.6 Die Schlitzmembran als „Signalplattform“

Podozyten reagieren sehr empfindlich auf immunologische und humorale Reize, die u. a. durch Zytokine und Chemokine induziert werden, indem spezifische Rezeptoren deren Signale auf intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden weiterleiten. Als Beispiel bilden cGMP-abhängige Signalwege, cAMP-abhängige Signalwege, Ca²⁺-abhängige Signalwege sowie Tyrosin-Kinase und Serin/Threonin-Kinase vermittelte Signalwege ein noch weitgehend unverstandenes Zusammenspiel (Kriz, 2006). Zudem spielen die PI3K- (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und MAPK- (Mitogen-aktivierte Protein Kinase) abhängigen Signalwege eine wichtige Rolle in Podozyten.

1.6.1 PI3K und AKT

Phosphatidylinositole dienen in vielen verschiedenen intrazellulären Signalwegen als Botenstoffe und sind so an der Kontrolle von Zellwachstum, Zellmigration, Endozytose und Zellüberleben beteiligt (Cantley, 2002). Sie werden durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktiviert. Die PI3K bilden Heterodimere aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit (p85 und p110).

Eines der wichtigsten Zielproteine der PI3K ist die Serin/Threonin-Kinase AKT. Die Kinase-Aktivität von AKT wird durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen stimuliert (Abb.10). AKT ist ein wichtiger Mediator für das Zellüberleben und verhindert Zelltod durch Apoptose (programmierter Zelltod) (Downward, 1998). Durch die Bindung an PI3K-generierte Phospholipide an der Innenseite der Plasmamembran kann AKT mit regulatorischen Kinasen interagieren, die dessen Aktivierung durch Phosphorylierung des Threoninrestes 308 und des Serinrestes 473 regulieren (Downward, 1998). Der Regulation und Aktivierung von AKT kommt in Podozyten eine besondere Bedeutung zu (Huber et al., 2003; Schiffer et al., 2004).

1.6.2 MAPK-Signalweg

Eine hinlänglich beschriebene Signalweg-Familie ist die Gruppe der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK). Die einzelnen Kinasen der Signalkaskade können neben ihrer

individuellen Bezeichnung in drei Gruppen (ERK, p38MAPK und JNK) eingeteilt werden, wobei JNK (c-Jun N-terminale Kinase) nicht im Fokus dieser Arbeit steht. Der ERK-Signalweg (Extrazellulär-regulierte Kinase) ist der am besten charakterisierte unter den MAPK. Die beiden Isoformen ERK1 (p44MAPK) und ERK2 (p42MAPK) werden durch eine Vielzahl von Mitogenen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen aktiviert (Arbabi und Maier, 2002). Die Signalkaskade wird durch Signale, die von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren oder Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) vermittelt werden, aktiviert. Über die Schlüssel-moleküle Grb2/SOS (*Growth factor receptor bound protein –2/Son of Sevenless*) wird das Signal nachfolgend über das Proto-Oncogen Ras über Raf-Proteine sowie über die MAPK/ERK-Kinasen MEK1 und MEK2 bis zu ERK1/2 weitergeleitet (Abb.10). Wichtige Funktionen übernimmt ERK bei der Regulation von Zellteilung, Proliferation und Zellüberleben (Chang und Karin, 2001).

Die p38MAPK wird durch physikalischen Stress wie osmotische Gradienten, UV-Exposition, aber auch durch Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert (Johnson und Lapadat, 2002) (Abb.10). Bisher wurden fünf Isoformen der p38MAPK mit unterschiedlicher Gewebeverteilung identifiziert (Arbabi und Maier, 2002). Eine wichtige Rolle spielt p38MAPK in der Induktion von Apoptose (Chang und Karin, 2001).

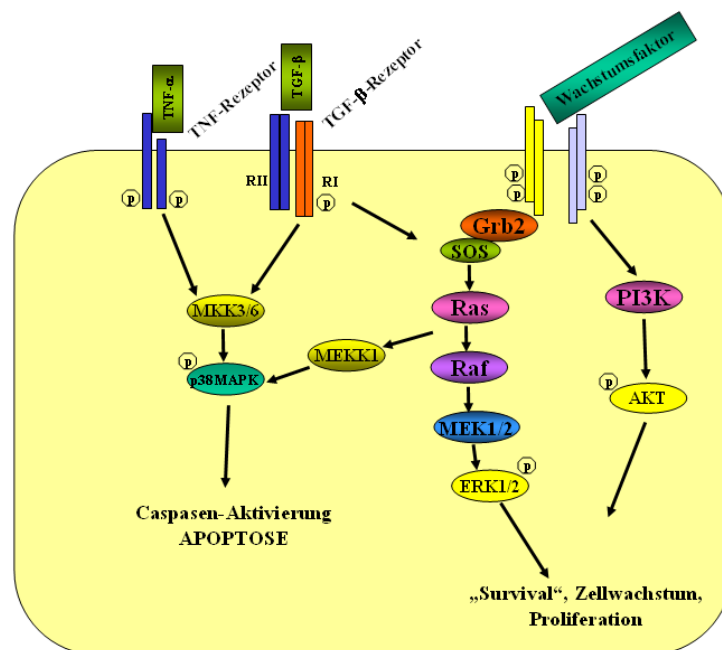


Abb.10 Schematische Darstellung von anti- und proapoptotischen Signalwegen

Die Aktivierung von AKT und ERK1/2 führt zum Überleben von Zellen. Eine Aktivierung der p38MAPK führt zur Apoptose.

1.7 Extrazelluläre Faktoren und Modulatoren von Signalkaskaden

1.7.1 Transforming growth factor- β (TGF- β)

TGF- β spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von progressiven Nierenerkrankungen. TGF- β gehört zu einer Familie von mehreren strukturell ähnlichen Polypeptidwachstumsfaktoren, die eine Vielfalt an zellulären Prozessen wie Apoptose, Proliferation, Differenzierung, Adhäsion und Motilität regulieren. Die TGF- β s (TGF- β 1/2/3) gehören der TGF- β -Superfamilie an. Die Signaltransduktionskaskade wird initiiert durch die Bindung von TGF- β an den TGF- β -TypII-Rezeptor (TGF- β RII). Diese Bindung induziert die Formation eines Heterokomplexes zwischen TGF- β -RII, TGF- β -TypI-Rezeptor (TGF- β RI) und TGF- β , wodurch die Phosphorylierung des TGF- β RI durch die konstitutiv aktive Kinase des TGF- β RII induziert wird. Dieser aktivierte Rezeptorkomplex ermöglicht nun intrazellulär die Phosphorylierung der sogenannten Smad-Proteine. Der Name Smad leitet sich von den bei *Drosophila* gefundenen homologen Proteinen MAD (*Mothers against Decapentaplegic*) und dem *Caenorhabditis elegans* Protein SMA (*small body size*) ab. In Vertebraten wurde aus SMA und MAD zur Vereinfachung der Name SMAD. Es können verschiedene Subfamilien an Smads unterschieden werden. Zu den R-Smads (*receptor-activated Smads*) gehören Smad2/3, die durch den TGF- β -Rezeptor aktiviert werden, und Smad1/5/8, die durch den BMP- (*Bone morphogenic protein*) Rezeptor aktiviert werden (Abb.11). Nach Serin-Phosphorylierung der R-Smads kommt es zu einer Komplexbildung mit Co-Smad4 (*common partner Smad4*), die letztendlich der Anlagerung des Smad-Komplexes an DNA-Promotoren und der Transkriptionsaktivierung dienen. Die dritte Gruppe der Smads sind die I-Smad6/7 (*inhibitory Smads*), die auf transkriptionaler Ebene durch TGF- β und BMP induziert werden. Sie können kompetitiv die durch TGF- β und BMP vermittelte Signaltransduktion antagonisieren (Massague, 2000). Beide I-Smads werden infolge eines großen Angebots an Wachstumsfaktoren vermehrt gebildet, dienen also der negativen Rückkopplung. Sie können sowohl mit den R-Smads um Rezeptorbindung konkurrieren als auch die Wechselwirkung von R-Smad und Co-Smad verhindern. TGF- β ist ein wundheilungsförderndes Zytokin. Der Wundheilungsvorgang ist gekennzeichnet durch eine Ausschüttung von TGF- β aus degranulierenden Thrombozyten, die in das Wundareal einwandern. Auch Fibroblasten vollziehen durch TGF- β stimuliert eine Chemotaxis in

In das betreffende Gewebe, proliferieren stark und sezernieren Matrixmaterial wie Kollagen und Fibronectin. Es gibt viele Studien, die die Regulation und die Aktivierung von TGF- β in der Pathogenese der FSGS demonstrieren (Schiffer et al., 2000). Eine erhöhte Expression von TGF- β führt zur interstitiellen Fibrose, Zell-Proliferation und Zelltod in glomerulären Erkrankungen (Bottinger und Bitzer, 2002; Border und Noble, 1994).

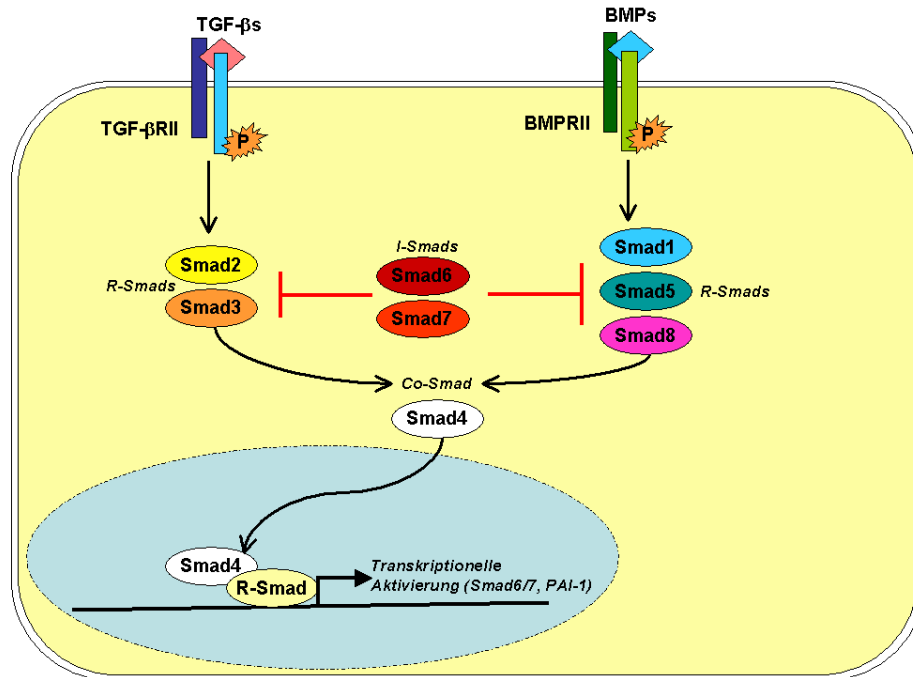


Abb.11 Schematische Darstellung des Smad-Signalweges
 Der Smad-Signalweg wird sowohl durch TGF- β als auch durch BMP aktiviert.

1.7.2.1 TGF- β induziert in Podozyten pro- und antiapoptotische Signalkaskaden

Die Stimulation mit TGF- β induziert in Podozyten eine Vielzahl von intrazellulären Signalantworten, u. a. Smad-abhängige und -unabhängige „Survival“- und Apoptosekaskaden (Abb.12). So aktiviert TGF- β über die Proteine R-Smad2/3 Smad7, was wiederum die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B (*nuclear factor-kappa B*) inhibiert. Zudem aktiviert TGF- β die Serin/Threonin-Kinase AKT, die eine wesentliche Rolle bei der Regulation des „Survival“- und Proliferationszyklus spielt. Parallel induziert TGF- β über die Phosphorylierung von p38MAPK die Aktivierung von Caspasen und somit die Apoptose von Podozyten (Schiffer et al., 2001). Der Effekt von TGF- β auf Podozyten ist jedoch konzentrationsabhängig. Hohe Konzentrationen führen *in vitro*, wie beschrieben, zur Apoptose, hingegen wirken Konzentrationen unter 2 ng/ml eher differenzierungsfördernd. Da es sich hierbei um ein empfindliches Aktivierungs- und

Konzentrationsgleichgewicht handelt (Wu et al., 2005), hat die Dysregulation der pro- und antiapoptotischen Signalkaskaden einen erheblichen Einfluss auf das Überleben der Podozyten (Schiffer et al., 2004).

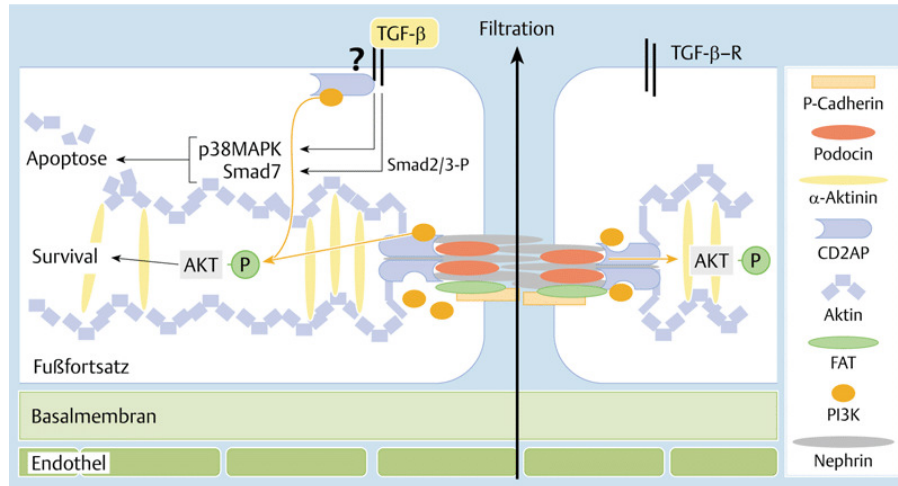


Abb.12 Schematische Darstellung der TGF-β-induzierten Signalkaskaden in der Schlitzmembran

TGF-β induziert proapoptotische Signalkaskaden (p38MAPK und Smad7) und CD2AP-abhängige antiapoptotische (PI3K/AKT) Signalkaskaden (Schiffer, 2006).

1.7.3 Bone morphogenic protein-7 (BMP-7)

Die BMPs gehören zur TGF-β-Superfamilie, wodurch deren Signaltransduktion der von TGF-β ähnelt. Initiiert wird die BMP-vermittelte Signaltransduktion durch Bindung des BMP-Liganden an die BMP-Rezeptoren, wodurch die aktivierte BMP-TypII-Rezeptor-Serin-Kinase die Typ-I-Rezeptor-Serin-Kinase transphosphoryliert, was wiederum die Phosphorylierung von Smad1/5/8 zur Folge hat (Abb.11). Mittlerweile sind über 30 verschiedene BMPs bekannt. BMPs haben eine Schlüsselrolle in der Morphogenese: Sie regulieren entscheidende embryonale Vorgänge wie epithelio-mesenchymale Interaktion (Luo et al., 1995), interdigitale Apoptose bei der Entstehung der Extremitäten (Zou und Niswander, 1997) und Ausbildung einer dorsalen-ventralen Achse des Embryos (Graff, 1997). Mehrere BMPs wurden in der Niere nachgewiesen. BMP-7 wurde ursprünglich OP-1 (*Osteogenic protein-1*) genannt. In der fetalen wie in der adulten Niere ist BMP-7 das am reichhaltigsten vorkommende BMP. Umgekehrt ist die Niere der Ort mit der höchsten BMP-7-Produktion (Kopp, 2000). BMP-7-Knockout Mäuse sterben kurz nach ihrer Geburt wegen kümmerlich entwickelten Nieren (Dudley et al., 1995; Luo et al.,

1995). Den rudimentären Nieren dieser Tiere fehlen die Glomeruli. In der adulten Niere wird BMP-7 mRNA vor allem in den Tubuluszellen und den Podozyten exprimiert (Simon et al., 1999). BMP-7 inhibiert den TGF- β -induzierten profibrotischen Effekt (Dudley et al., 1995; Zeisberg et al., 2003). Über die Rolle von BMPs für podozytäre Zellfunktionen ist nur wenig bekannt.

1.7.4 IGF-binding protein-3 (IGFBP-3)

Die Familie der IGFBPs besteht aus sechs gut charakterisierten, hoch homologen Proteinen (IGFBP-1 bis IGFBP-6), die eine starke Affinität zu IGF (*Insulin-like growth factor*) aufweisen (Agarwal et al., 1991; Ehrenborg et al., 1998). Sie fungieren als zirkulierende Trägermoleküle für IGF-1 und IGF-2 und beeinflussen über ihre Bindungsaffinität die Verfügbarkeit dieser Wachstumsfaktoren für die Wechselwirkung mit ihren Rezeptoren und somit auch deren Signaltransduktionsaktivität (Kelley et al., 1996). Die Freisetzung der IGFs aus den IGFBP/IGF-Komplexen erfolgt durch proteolytische Spaltung der IGFBPs mit spezifischen Proteasen. Neben deren Trägerfunktion modulieren IGFBPs auch IGF-unabhängige physiologische Mechanismen, wie Migration, Apoptose und Zelldifferenzierung (Hong et al., 2002). IGFBPs werden von nahezu allen Zellen sezerniert und können in ihrer Expression durch diverse Effektoren (z.B. TGF- β 1 und Glucose) induziert und freigesetzt werden (Leal et al., 1999).

1.8 Intrazelluläre Mediatoren und Modulatoren von Signalkaskaden

1.8.1 CD2AP

Signaltransduktionskaskaden können durch intrazelluläre Mediatoren beeinflusst werden. Fehlen diese, kann es zu einem Ungleichgewicht in den einzelnen Signaltransduktionskaskaden, die innerhalb der Zelle ein verzweigtes Netzwerk bilden, kommen. Ein wichtiger intrazellulärer Mediator in Podozyten ist das CD2-assoziierte Protein (CD2AP). CD2AP konnte als selektives Schlüsselprotein für antiapoptotische Signaltransduktionsmechanismen identifiziert werden. Fehlt CD2AP in Podozyten, so wird die Aktivierung von AKT durch Insulin oder dem Wachstumsfaktor EGF (*Epidermal*

growth factor) inhibiert. Gleichzeitig wird die proapoptotische Aktivierung von p38MAPK durch TGF- β verstärkt (Schiffer et al., 2004). CD2AP interagiert mit p85, der regulatorischen Untereinheit der PI3K und induziert dadurch die Phosphorylierung und Aktivierung von AKT (Huber et al., 2003).

1.8.2 CIN85

CIN85 ist wie CD2AP als Adapterprotein in verschiedene zelluläre Prozesse involviert. CIN85 verstärkt nach oxidativem Stress bzw. Wachstumsfaktor-Stimulation die Aktivierung von MKK6 und die nachfolgende Phosphorylierung von p38MAPK (Aissouni et al., 2005). In neuronalen Zellen induziert die Überexpression von CIN85 Apoptose durch inhibitorische Bindung der PI3K (Gout et al., 2000). CIN85 spielt eine wichtige Rolle in der Endozytose von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) (Dikic et al., 2003; Haglund et al., 2003; Mosesson et al., 2003). Durch die Endozytose von Rezeptoren wird die Signaldauer von physiologischen Effekten gesteuert (Waterman et al., 2001). Der Ausfall dieses Mechanismus innerhalb einer Signalkaskade führt zu einer Hyperstimulation dieser. Durch Stimulation mit einem Wachstumsfaktor wird die E3-Ubiquitin-Ligase Cbl an den Rezeptor rekrutiert und vermittelt dessen multiple Monoubiquitinierung (Haglund et al., 2003; Thien et al., 2001). Nach Tyrosin-Phosphorylierung von Cbl kommt es zur Rekrutierung von CIN85 an den Rezeptor-assoziierten Komplex, was wiederum die Bindung von Endophilin an den Rezeptor zur Folge hat (Abb.13). Endophiline sind regulatorische Komponenten der Clathrin-ummantelten Vesikel, die an der Invagination der Plasmamembran beteiligt sind und somit die Internalisierung des Rezeptors vermitteln. Der ubiquitinierte Rezeptor-Komplex wird in die Zelle aufgenommen und anschließend entweder in Lysosomen abgebaut oder deubiquitiniert und wieder an die Zelloberfläche zurücktransportiert.

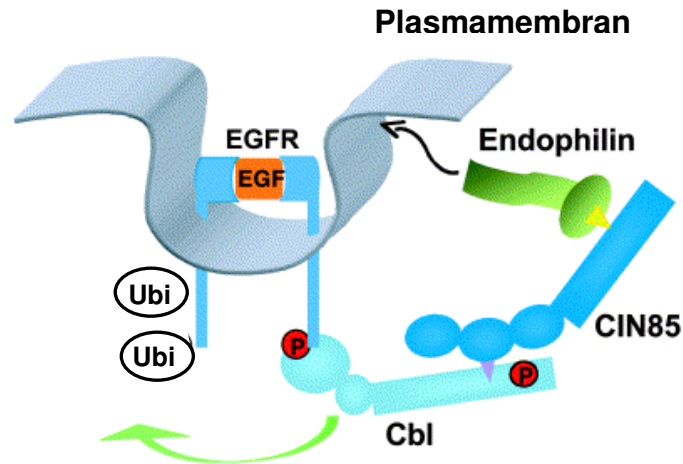


Abb.13 Die Rolle von CIN85 in der Endozytose von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

Nach Ligand-induzierter Aktivierung des EGF-Rezeptors (EGFR), bindet die E3-Ubiquitin-Ligase Cbl an den Rezeptor und führt zu dessen Ubiquitinierung. CIN85 wird an den Rezeptor-Komplex rekrutiert, wodurch Endophilin an den Rezeptor geführt wird. Der Rezeptor wird dadurch internalisiert (Dikic, 2002).

1.9 Bedeutung und Probleme der Podozyten-Kultur

Podozyten sind, wie unter Kap. 1.3 detailliert beschrieben, differenzierte, hochspezialisierte Zellen, welche sich analog zu Neuronen nicht teilen und erneuern können. Während der embryonalen Entwicklung der Niere werden Podozyten aus mesenchymalen, renalen Vorläuferzellen gebildet. Dabei findet eine signifikante Veränderung des Phänotyps statt. Mit ihrer Reifung zu differenzierten Zellen ist die Expression unterschiedlicher Proteine verbunden. Während der Entwicklung der glomerulären Kapillarschleife beginnen die Zellen, ihre komplexe Architektur auszubilden, einschließlich der charakteristischen Fußfortsätze. Tight junctions werden durch die Schlitzmembran ersetzt (Reeves et al., 1978), die den Filtrationsschlitz der sich entwickelnden Fortsätze überbrückt. Phänotypische Markerproteine reifer Podozyten wie Nephrin, P-Cadherin, Podocin und Synaptopodin werden erst zu diesem Zeitpunkt exprimiert. Reife Podozyten können nicht mehr proliferieren, wodurch deren Kulturhaltung äußerst schwierig ist. Experimente mit Primärkulturen zeigten, dass sich die hochkomplexe Zell-Architektur der Podozyten in Kulturhaltung signifikant verändert. Wurden die Kulturbedingungen in Richtung einer Differenzierung gesteuert, hatte dies einen Proliferationsstopp zur Folge (Mundel, 1997a; Saleem et al., 2002). Deshalb wurde eine immortalisierte Maus-Zelllinie etabliert, die unter Regulation eines γ -Interferon-induzierbaren Promotors (H-2K^b-tsA58) das temperatursensitive Simian Virus 40 (SV40)

-large T (LT)-Antigen exprimiert (Jat et al., 1991; Mundel et al., 1991). Diese Zelllinie zeigt bei 37 °C morphologische und immunologische Eigenschaften differenzierter Podozyten und exprimiert Synaptopodin (Mundel et al., 1997b). Bei 33 °C proliferiert die Zelllinie, während bei 37°C die Proliferation stoppt und die Differenzierung der Podozyten erfolgt.

1.10 Zielsetzung

Defekte in der Signaltransduktion der Podozyten sind die Basis vieler glomerulärer Erkrankungen. Die Schädigung bzw. der Verlust von Podozyten ist ein Kennzeichen für die fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS). Die Schlitzmembran stellt eine Plattform für viele Signaltransduktionsproteine dar, die eine wichtige Rolle für die Aktivierung von Signalkaskaden spielen und das Überleben des Podozyten kontrollieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war die detaillierte Untersuchung der Faktoren und Mechanismen, die das empfindliche Gleichgewicht der pro- und antiapoptotischen Signaltransduktionskaskaden beeinflussen und somit entweder zum Überleben oder zur Apoptose von Podozyten führen.

IGF-binding protein-3 modulates TGF- β /BMP-signaling in glomerular podocytes.

*Peters, I., *Tossidou, I., Achenbach, J., Woroniecki, R., Mengel, M., Park, J.K., Paschy, M., de Groot, K., Haller, H., Schiffer, M. (2006).

Journal of American Society of Nephrology 17, 1644-1656.

* gleichberechtigte Erstautorenschaft

IGF-Binding Protein-3 Modulates TGF- β /BMP-Signaling in Glomerular Podocytes

Imke Peters,* Irini Tossidou,* Johannes Achenbach,* Robert Woroniecki,[†] Michael Mengel,[‡] Joon-Keun Park,* Melanie Paschy,* Kirsten de Groot,* Hermann Haller,* and Mario Schiffer*

*Division of Nephrology, Department of Medicine, and [†]Department of Pathology, Hannover Medical School, Hannover, Germany; and [‡]Division of Pediatric Nephrology, Children's Hospital at Montefiore, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York

Podocyte apoptosis initiates progressive glomerulosclerosis in TGF- β 1 transgenic and CD2AP-knockout (CD2AP^{-/-}) mice. It was previously shown that in both mouse models, activation of the TGF- β pathway is the key event during development of podocyte apoptosis. Furthermore, CD2AP is an important modifier of TGF- β -induced survival signaling *via* activation of the phosphoinositol 3-kinase/AKT signaling pathway. This article presents IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) as a new modulator of apoptosis and survival signaling in glomerular podocytes. High expression of IGFBP-3 protein in the urine of diseased CD2AP^{-/-} mice was discovered, and IGFBP-3 expression in glomerular podocytes and parietal cells was detected. IGFBP-3 can induce changes in podocyte actin cytoskeleton, leads to apoptosis in cultured murine podocytes, and can enhance TGF- β 1-induced apoptosis *in vitro*. For studying this process on a molecular level, proapoptotic p38 mitogen-activated protein kinase pathways and antiapoptotic phosphoinositol 3-kinase/AKT pathways were examined in cultured murine podocytes. It was found that IGFBP-3 increments the level of TGF- β 1-induced phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase and decreases the phosphorylation of antiapoptotic AKT. This effect is specific for the co-stimulation of IGFBP-3 with TGF- β 1 because a combination of IGFBP-3 with bone morphogenic protein-7 (BMP-7), another member of the TGF- β superfamily, results in apoptosis opposing signaling effects with a strong increase of phosphorylated AKT and subsequent functional effects. These results demonstrate that the IGF/IGFBP axis plays an important role in the development of podocyte apoptosis by modulation of TGF- β and BMP-7-induced pro- and antiapoptotic signals.

J Am Soc Nephrol 17: 1644–1656, 2006. doi: 10.1681/ASN.2005111209

Loss of glomerular podocytes is the key mechanism of disease initiation and disease progression in focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). There is a large body of evidence that a loss of glomerular podocytes of >40% results in progressive glomerular failure (1,2). TGF- β has been shown to be an important mediator of progressive fibrosis, cell proliferation, and cell death in glomerular disease (for detailed review, see Bottinger *et al.* [3]). We demonstrated previously that TGF- β is involved in survival and apoptotic responses in podocytes (4,5). Bone morphogenic protein-7 (BMP-7) is another member of the TGF- β superfamily, so far involved primarily in kidney development and described as an active blocker of TGF- β -induced profibrotic effects (6,7). TGF- β and BMP signaling require an orchestrated pattern of downstream events (for detailed reviews, see Schiffer *et al.* [8] and Chen *et al.* [9]). The signaling is initiated after ligand binding by heteromeric

complex formation of two transmembrane serine/threonine kinase receptors, known as the type I and type II receptors. This leads to receptor transphosphorylation and receptor activation. The activated receptors phosphorylate the receptor associated (R-)Smads, Smad2/3 (in the case of TGF- β) or Smad1/5/8 (in the case of BMP), which form complexes with the common pathway (C-)Smad (Smad4). Only this active complex can translocate to the nucleus, associate with specific DNA-binding partners, and initiate transcriptional responses. Among several target genes, Smad6 and Smad7, the so-called inhibitory (I-)Smads, are transcriptionally induced and act as inhibitory feedback loop, leading to direct interference with the TGF- β /BMP receptors and/or the formation of inactive Smad4 complexes that cannot translocate to the nucleus. Smad6 preferably inhibits BMP signaling, and Smad7 preferably inhibits TGF- β signaling (10,11). In epithelial cells, we and others could show that Smad7 has a dual function by inhibition of the NF- κ B survival signaling cascade and TGF- β -independent induction of apoptosis (5,12). In renal cells, various biologic effects have been described for TGF- β . The nature of the response depends on the cellular state of differentiation and the presence of other growth factors (13,14). Next to Smad-mediated signaling, non-Smad-mediated responses are initiated by TGF- β /BMP binding. This includes activation of the major survival pathway

Received November 23, 2005. Accepted April 4, 2006.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

I.P. and I.T. contributed equally to this work.

Address correspondence to: Dr. Mario Schiffer, Division of Nephrology, Department of Medicine, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Strasse 1, Hannover, 30625 Germany. Phone: +49-5115-324708; Fax: +49-5115-52366; E-mail: schiffer.mario@mh-hannover.de

phosphoinositol 3-kinase (PI3-K)/AKT and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. Disruption of any of these signaling steps can lead to a drastic imbalance in pro- and antiapoptotic signaling responses. We previously demonstrated that the absence of CD2AP leads to a dramatic shift toward proapoptotic signaling after TGF- β treatment *in vitro* and that CD2AP $^{-/-}$ mice develop podocyte apoptosis early in the process of glomerulosclerosis (4).

IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) is the most abundant carrier for IGF in the serum, and the classical role of IGFBP-3 is the modulation of IGF signaling (15). However, more recently, IGF-independent effects on apoptosis (16) and associations among the TGF- β R1, TGF- β R2, and TGF- β BRV/LRP-1 (lipoprotein receptor-related protein-1) have been described (17–19). In this study, we demonstrate that IGFBP-3 is able to induce podocyte apoptosis. We show that in podocytes, treatment with IGFBP-3 induces Smad phosphorylation independent of TGF- β . Furthermore, TGF- β -induced proapoptotic responses are enhanced by co-stimulation with IGFBP-3. We also show that BMP-7 antagonizes TGF- β -induced apoptosis in podocytes and that IGFBP-3 also is able to influence BMP-7-induced Smad and PI3-K/AKT signaling. We detected IGFBP-3 expressed in large quantities in the urine and expressed in podocytes of proteinuric CD2AP $^{-/-}$ mice. These mice develop a nephrotic syndrome at young age and FSGS-like histologic lesions and die of renal failure at 5 to 6 wk of age (20). The pathophysiologic relevance of our observation is supported by measurement of IGFBP-3 excretion in a randomly selected set of urine samples from patients with FSGS and minimal-change disease (MCD) compared with healthy controls. Patients with active FSGS excrete a significantly higher amount of IGFBP-3 in their urine compared with patients with MCD.

In summary, we document a previously unknown signaling cross-talk of TGF- β 1 and BMP-7 in podocytes. These two cytokines obviously have a major role in the determination of podocyte cellular fate. Moreover, we demonstrate that the IGF/IGFBP axis is able to influence podocyte apoptosis *via* enhancement of proapoptotic TGF- β signaling and podocyte survival *via* enhancement of BMP-7-induced survival signaling. Hence, our data suggest a previously undefined pathway for IGFBP-3 modulating TGF- β /BMP signaling with potential relevance in disease initiation and progression in human FSGS.

Materials and Methods

Antibodies and Cytokines

Primary antibodies that were used for Western blotting and immunohistochemical studies were rabbit anti-phospho-Smad2/3, rabbit anti-phospho-Smad1/5/8, rabbit anti-phospho-p38, rabbit anti-phospho-S475 AKT, rabbit anti-Smad2, mouse anti-p38, mouse anti-AKT1 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), goat anti-IGFBP-3 (R&D Systems, Minneapolis, MN), rabbit anti β -tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit, HRP-conjugated goat anti-mouse, and HRP-conjugated donkey anti-goat as secondary antibodies for Western blotting were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Cytokines, inhibitors, and neutralizing antibodies were purchased from the following vendors: Anti-TGF- β (R&D Systems), SB239063 and LY294002 (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany), rmiIGFBP-3 (R&D Systems),

rhBMP-7 (Natutec, Frankfurt, Germany), rhTGF- β 1 and rhIGF-1 (Cell Sciences, Canton, MA), and mIgG1 κ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Western Blot Analysis

For analysis of whole-cell protein lysates from cultivated podocytes, either untreated or treated cells were lysed on ice in RIPA buffer (50 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40, and 0.1% SDS) that contained protease inhibitor (Complete mini; Roche, Mannheim, Germany), 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM NaF, and 200 μ g/L okadaic acid. Lysates were centrifuged at 12,000 rpm, and aliquots of the supernatants (10 μ g protein/lane) were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA). After probing with primary antibodies, antigen-antibody complexes were detected with HRP-labeled anti-rabbit, anti-goat, and anti-mouse antibodies, respectively, and visualized using enhanced chemiluminescence reagents (Pierce, Rockford, IL) according to the manufacturer's protocol. Other protein samples than cell lysates were subjected directly to SDS-PAGE without further treatment. Densitometry analysis was performed using Quantity One Software (Bio-Rad, Hercules, CA).

Podocyte Culture

Cultivation of conditionally immortalized mouse podocytes (gift from Peter Mundel, Mt. Sinai School of Medicine, New York, NY) was performed as described by Mundel *et al.* (21). For propagation of podocytes, cells were cultivated on type I collagen (BD Biosciences, Bedford, MA) at 33°C in the presence of 10 U/ml mouse recombinant γ -IFN (Cell Sciences; permissive conditions) to enhance expression of a thermosensitive T antigen. For inducing differentiation, podocytes were maintained at 37°C for 14 d without γ -IFN, resulting in absence of thermosensitive T antigen (nonpermissive conditions). Podocyte apoptosis was quantified in confluent cell layers after single or combined treatment with cytokines using 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma) as described previously (5). For visualization of actin cytoskeleton and stress fiber bundling, cells were fixed with ice-cold methanol and stained with phalloidin-Alexa Fluor⁵⁴⁶ (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). For quantification of apoptosis and fiber bundle counts, 10 high-power fields per experimental condition were randomly selected and counted by an investigator who was blinded to the experimental conditions. Numbers were expressed as percentage of all cells per high-power field that showed apoptotic nuclei or actin stress fiber bundling, respectively.

Real-Time Quantitative PCR Analysis

Cells were treated with TRIzol reagent (Invitrogen, San Diego, CA), and total RNA was extracted following the protocol recommended by the manufacturer. Two micrograms of total RNA was reverse transcribed using a mix of random hexamers and oligo(dT)12-15 oligonucleotides (Promega, Mannheim, Germany) and M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). Quantitative PCR (qPCR) was performed on an SDS 7700 system (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) using 10 ng of transcribed RNA, Rox dye as internal control (Invitrogen), Fast-Start TaqPolymerase (Roche Diagnostics), and gene-specific primers in combination with SYBR Green chemistry (Molecular Probes, Eugene, OR). PCR amplification was carried out for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles for 10 s at 95°C and 1 min at 60°C. Specificity of the amplification product was verified by melting curve analysis. The samples were measured as multiplexed reactions against β -actin (forward ACC GTG AAA AGA TGA CCC AG; reverse AGC CTG GAT GGC TAC GTA CA) as an endogenous reference. Quantification was carried out using QGene software. Primers for the transcripts were designed using

Primer3 software (plasminogen activator inhibitor-1 [PAI-1] forward ATG TTT AGT GCA ACC CTG GC; PAI-1 reverse CTG CTC TTG GTC GGA AAG AC; Smad6 forward CCA CCA ACT CCC TCA TCA CT; Smad6 reverse GAC ATG CTG GCA TCT GAG AA; Smad7 forward ACC GGG GGA ACG AAT TAT; Smad7 reverse CAG GCT CCA GAA GAA GTT GG).

Animals

Target disruption and generation of CD2AP-deficient homozygous mice on a 129/J background is described elsewhere (20). Mice (gift from Andrey Shaw, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO) were housed at the Hannover Medical School Animal Facility with access to food and water *ad libitum*. The protocol was approved by the Animal Use Committee of Hannover Medical School according to the governmental rules. Kidney tissues were prepared from 3- to 4-wk-old mice. For light microscopy, kidney tissues were fixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4°C. LPS injections in wild-type mice for induction of transient proteinuria was described previously elsewhere (22).

Immunohistochemistry

An avidin-biotin-peroxidase procedure (Vectastain ABC-Kit; Vector Laboratories) was used for antibody localization on paraffin-embedded kidney sections that were deparaffinized serially. These sections were microwaved for 3 × 3 min and incubated overnight at 4°C with goat anti-mIGFBP-3 (R&D Systems) at a dilution of 1 in 100. Biotinylated anti-goat Ig (Vector Laboratories) was used as a secondary antibody. Endogenous peroxidase activity was quenched with methanol-hydrogen-peroxide solution. Avidin/biotin-conjugated HRP complex incubation was performed followed by the addition of diaminobenzidine. Sections were counterstained with hematoxylin.

Flow Cytometry

Cells were incubated for 30 min at 37°C with 5 μM FITC-VAD-fmk (Promega Corp., Madison, WI) in PBS with 0.5% BSA. After incubation, cells were washed three times with PBS/0.5% BSA, isolated with Trypsin/EDTA, and pelleted by centrifugation at 1000 rpm for 8 min at room temperature. Supernatant was removed, and apoptosis was measured by using FACScan flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA); at least 10,000 cells were analyzed. Analysis was quantified by FACSDiva and WinMDI 2.8 Software. All apoptosis studies were performed a minimum of three times.

IGFBP-3 ELISA

A human IGFBP-3 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) was used for quantification of urine IGFBP-3 levels in patient samples. The assay was performed according to the manufacturer's protocol. In brief, samples were diluted 1:2 with provided diluent. Samples then were added to the provided ELISA plate, incubated for 2 hr at 4°C, washed, and incubated with conjugate solution for another 2 hr at 4°C. The ELISA plate was washed, and substrate solution was added and incubated for 30 min at room temperature. Stop solution was added before absorption was measured at 450 nm with a correction wavelength of 540 nm.

Results

IGFBP-3 Is Expressed in Podocytes in Diseased CD2AP^{-/-} Mice and Is Excreted in Glomerular Disease in the Urine of Mice and Patients

We wanted to examine cytokine expression in the urine of proteinuric CD2AP-knockout (CD2AP^{-/-}) mice, and we found by Western blot analysis a strong upregulation of

IGFBP-3 protein levels in the urine of 3-wk-old CD2AP^{-/-} mice (Figure 1A). At this stage of disease, albuminuria (visualized by Coomassie stain after SDS-PAGE) and glomerulosclerosis lesions (visualized by Masson-Goldner's staining of renal cortex sections [Figure 1B, b]) are already present. In contrast to that, we did not find expression of IGFBP-3 in the urine of CD2AP wild-type (CD2AP^{+/+}) mice with transient albuminuria after injection of LPS. Then we examined expression of IGFBP-3 on kidney sections of CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} mice. We found strong expression of IGFBP-3 in glomerular podocytes (Figure 1B, d, black solid arrows) and parietal cells (open arrows) compared with no expression in CD2AP^{+/+} glomeruli (Figure 1B, a and c). Next, we wanted to examine whether IGFBP-3 is detectable in the urine of patients with podocyte diseases. We examined IGFBP-3 concentration in spot urine of seven control patients, nine patients with MCD, and 23 patients with FSGS. The FSGS group could be differentiated further into patients with active FSGS and patients in partial or full remission. The results are summarized in Figure 1C and Table 1. The level of IGFBP-3 in the urine of normal healthy control patients was on average 0.17 ng/ml (range 0 to 0.482 ng/ml). In patients with MCD, we found compared with normal control patients a significantly higher expression level in the urine with an average level of 3.08 ng/ml (range 0.23 to 7.4; $P < 0.003$, Mann-Whitney test). Patients with active FSGS had expression levels of IGFBP-3 in the urine with an average level of 28.4 ng/ml (range 0.6 to 94.3). This was a significantly different level compared with the MCD group ($P < 0.007$). Patients with biopsy-proven FSGS in partial or full remission were at significantly lower levels compared with patients with active FSGS ($P < 0.0005$), with an average level of IGFBP-3 of 1.05 ng/ml (range 0 to 4.21), which was not different compared with levels that were measured in control patients ($P = 0.09$). It is interesting that the urinary IGFBP-3 levels did not correlate with urinary protein excretion levels (data not shown) in the samples measured. Furthermore, we wanted to examine whether increased glomerular IGFBP-3 staining is detectable in biopsies of patients with FSGS. We detected IGFBP-3 expression only in vascular endothelium in the glomerulus and in renal blood vessels, but no staining was detectable in podocytes in FSGS-affected glomeruli, and the overall staining pattern was not different from the staining pattern in normal control patients or in individuals with active MCD (Figure 1D). In summary, these data indicate that IGFBP-3 is upregulated during the development of glomerular disease in diseased mice. In humans, IGFBP-3 levels are significantly higher in patients with active glomerular disease, and it is expressed by glomerular cells that neighbor podocytes.

IGFBP-3 Induces Apoptosis and Stress Fiber Formation in Podocytes and Enhances TGF-β-Induced Effects

We examined the effect of IGFBP-3 on apoptosis induction and stress fiber formation in cultured, murine podocytes. Differentiated podocytes were treated with IGFBP-3, TGF-β1, or a combination of both for 24 h, and apoptosis was quantified using DAPI counts. We found that stimulation with TGF-β alone led to the expected significant increase in condensed

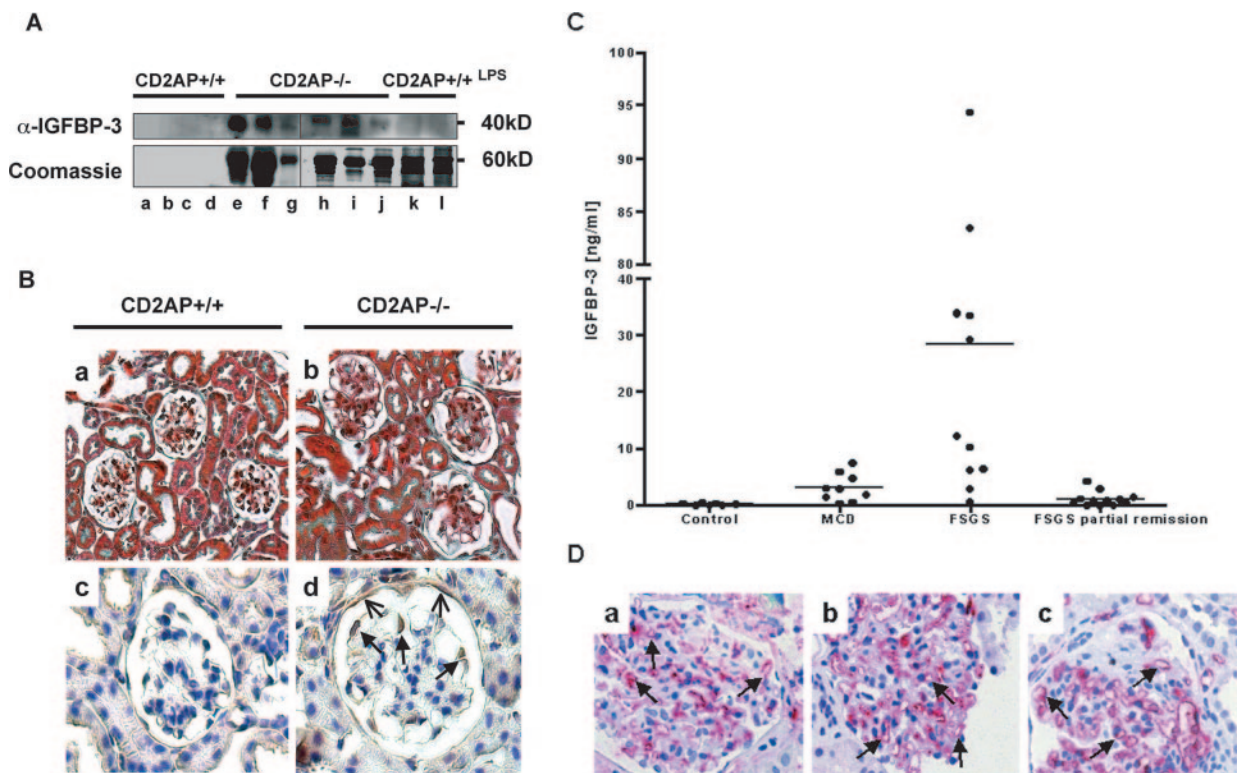


Figure 1. IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) is excreted in the urine of CD2AP $^{-/-}$ mice and is elevated in the urine in patients with minimal-change disease (MCD) and active focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). (A) Spot urine of 3-wk-old CD2AP $^{+/+}$ (a through d), CD2AP $^{-/-}$ (e through j), and CD2AP $^{+/+}$ mice treated with LPS (k and l) was used for SDS-PAGE and stained with Coomassie-Blue or blotted on polyvinylidene difluoride membrane, and immunoblot was carried out using anti-IGFBP-3 antibody. (B) Masson-Goldner's stain (a and b) and immunohistochemistry using an anti-IGFBP-3 antibody (c and d) was performed on tissue sections from 3-wk-old CD2AP $^{+/+}$ (a and c) and CD2AP $^{-/-}$ (b and d) mice. Black full arrows depict IGFBP-3 expression in glomerular podocytes, and open arrows depict IGFBP-3 expression in parietal cells (d) in CD2AP $^{-/-}$ mice at early disease stages with beginning glomerulosclerosis (see b). (C) Urine IGFBP-3 concentrations were measured using an ELISA in a random set of healthy control individuals, patients with MCD, patients with active FSGS, and patients in partial remission (see Table 1 for detailed patient information). (D) Immunohistochemistry using an anti-IGFBP-3 antibody shows expression of IGFBP-3 in human biopsy samples of a healthy control individual (a), a patient with active MCD (b), and a patient with active FSGS (c). Black arrows depict IGFBP-3 expression in glomerular endothelial cells.

Table 1. Excretion of free IGFBP-3 in the urine^a

| | <i>n</i> | Age (yr) | Male/Female | Proteinuria (g/d) | IGFBP-3 (ng/ml) |
|-------------------|----------|---------------|-------------|----------------------|----------------------------------|
| Control | 7 | 30 (23 to 36) | 4/3 | 0 | 0.17 (0 to 0.482) |
| MCD | 9 | 16 (3 to 72) | 5/4 | 3.43 (0 to 9.94) | 3.08 (0.23 to 7.4) ^b |
| FSGS | 11 | 22 (6 to 67) | 3/8 | 6.33 (3.76 to 13.08) | 28.42 (0.6 to 94.3) ^c |
| FSGS in remission | 12 | 19 (4 to 51) | 7/5 | 0.76 (0 to 2.48) | 1.05 (0 to 4.21) ^d |

^aConcentration of free IGF binding protein-3 (IGFBP-3) was measured using a commercial ELISA kit in a random set of urine from healthy control patients, patients with minimal-change disease (MCD), patients with active focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), or patients with FSGS in remission. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test.

^b*P* = 0.002 MCD *versus* control.

^c*P* = 0.0006 FSGS *versus* control.

^dNS, control *versus* FSGS in remission.

nuclei (Figure 2A, b and e) that we had observed previously (4). Untreated differentiated podocytes showed a typical pattern of F-actin filaments distributed as stress fiber-like bundles along the axis of the cells into the processes of arborized cells. Treatment with TGF- β 1 led to a redistribution of F-actin fibers. The

treated cells showed radial stress fibers with an actin rich center (ARC; Figure 2B, b and e). Treatment with IGFBP-3 also leads to apoptosis induction and F-actin redistribution (Figure 2, A, c, and B, c), but it is interesting that after 24 h, we observed very few ARC and less radial stress fibers but still a strong bundling

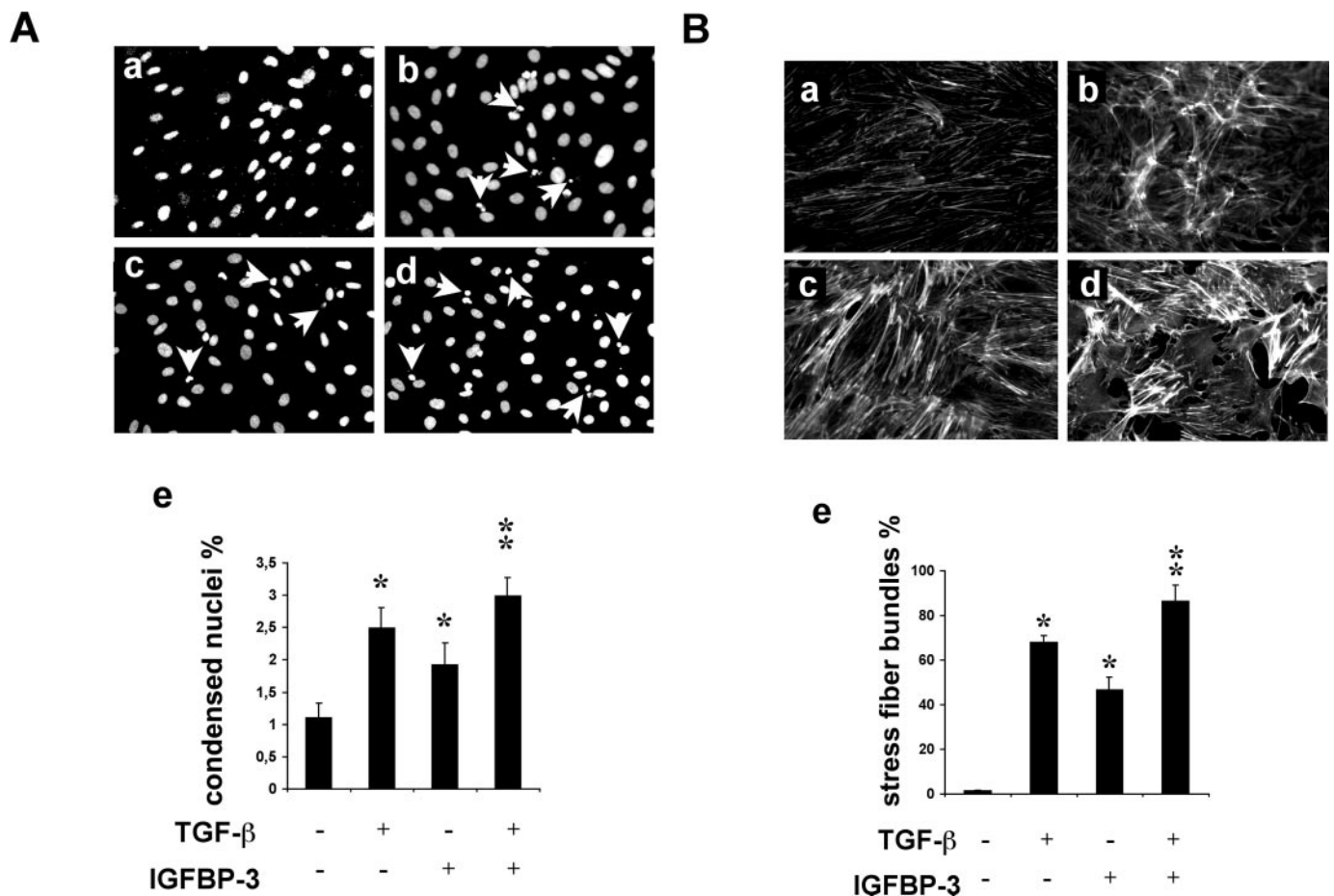


Figure 2. IGFBP-3 induces apoptosis and stress fiber bundling in murine podocytes and enhances the TGF- β -induced effects. Podocytes were maintained for 14 d under nonpermissive culture conditions and were left untreated (a) or stimulated with TGF- β 1 (5 ng/ml; b), IGFBP-3 (500 ng/ml; c), or both (d). For visualization of nuclear morphology, slides were stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (A), and apoptosis was quantified as percentage of condensed nuclei in 15 random high-power fields (hpf; e). Stimulation with TGF- β 1 or IGFBP-3 leads to a significant increase in apoptosis compared with untreated cells (e; $*P < 0.03$ for TGF- β 1; $*P < 0.04$ for IGFBP-3). Treatment with TGF- β 1 and IGFBP-3 leads to a further increase in the number of apoptotic nuclei ($**P < 0.02$ for IGFBP-3 in combination with TGF- β 1 *versus* IGFBP-3 alone; $P < 0.05$ for the combination *versus* treatment with TGF- β 1 alone). (B) Stress fiber formation was visualized using phalloidin staining and quantified (e) as percentage of cells with stress fiber bundling in 10 random hpf ($*P < 0.001$ for TGF- β 1 and $P < 0.004$ for IGFBP-3 *versus* untreated; $**P < 0.003$ for IGFBP-3 in combination with TGF- β 1 *versus* IGFBP-3 alone and $P < 0.04$ for the combination *versus* treatment with TGF- β 1 alone). Data shown are average values of three independent experiments.

of transversal stress fibers. The co-treatment of podocytes with IGFBP-3 and TGF- β 1 led to a marked increase in apoptosis compared with IGFBP-3 or TGF- β 1 alone (Figure 2A, d and e). Radial F-actin fiber bundles were present in a higher percentage of cells, and most of them showed ARC after 24 h (Figure 2B, d and e). These data demonstrate that IGFBP-3 alone can induce apoptosis and actin cytoskeleton changes in glomerular podocytes; moreover, the TGF- β 1-induced effects on podocytes are enhanced in the presence of IGFBP-3.

IGFBP-3 Enhances TGF- β 1-Induced Proapoptotic Signaling in Murine Podocytes

Because IGFBP-3 has been shown to interact with TGF- β receptors in other cell types, we wanted to examine whether the combination of TGF- β 1 and IGFBP-3 leads to a modification in the TGF- β -specific activation of R-Smads response in podocytes.

We stimulated differentiated murine podocytes and found that the phosphorylation profile of Smad2/3 is extended profoundly in podocytes that are stimulated with TGF- β 1 and IGFBP-3 (Figure 3A). A single stimulation with TGF- β 1 resulted in a fast activation of Smad2/3 with a maximum phosphorylation peak 30 min after treatment. After 4 h, the phosphorylation was significantly reduced with no visible phospho-Smad2/3 after 8 h. In contrast to that, co-stimulation of podocytes with a combination of TGF- β 1 and IGFBP-3 leads to a prolonged signaling answer with a strong phosphorylation of Smad2/3 for up to 8 h and a slight phosphorylation still visible 24 h after treatment. We also examined non-Smad-dependent signaling in response to TGF- β 1 and found also a significant enhancement of early p38MAPK activation as well as a shifted and prolonged phosphorylation profile with continued and enhanced phosphorylation, especially

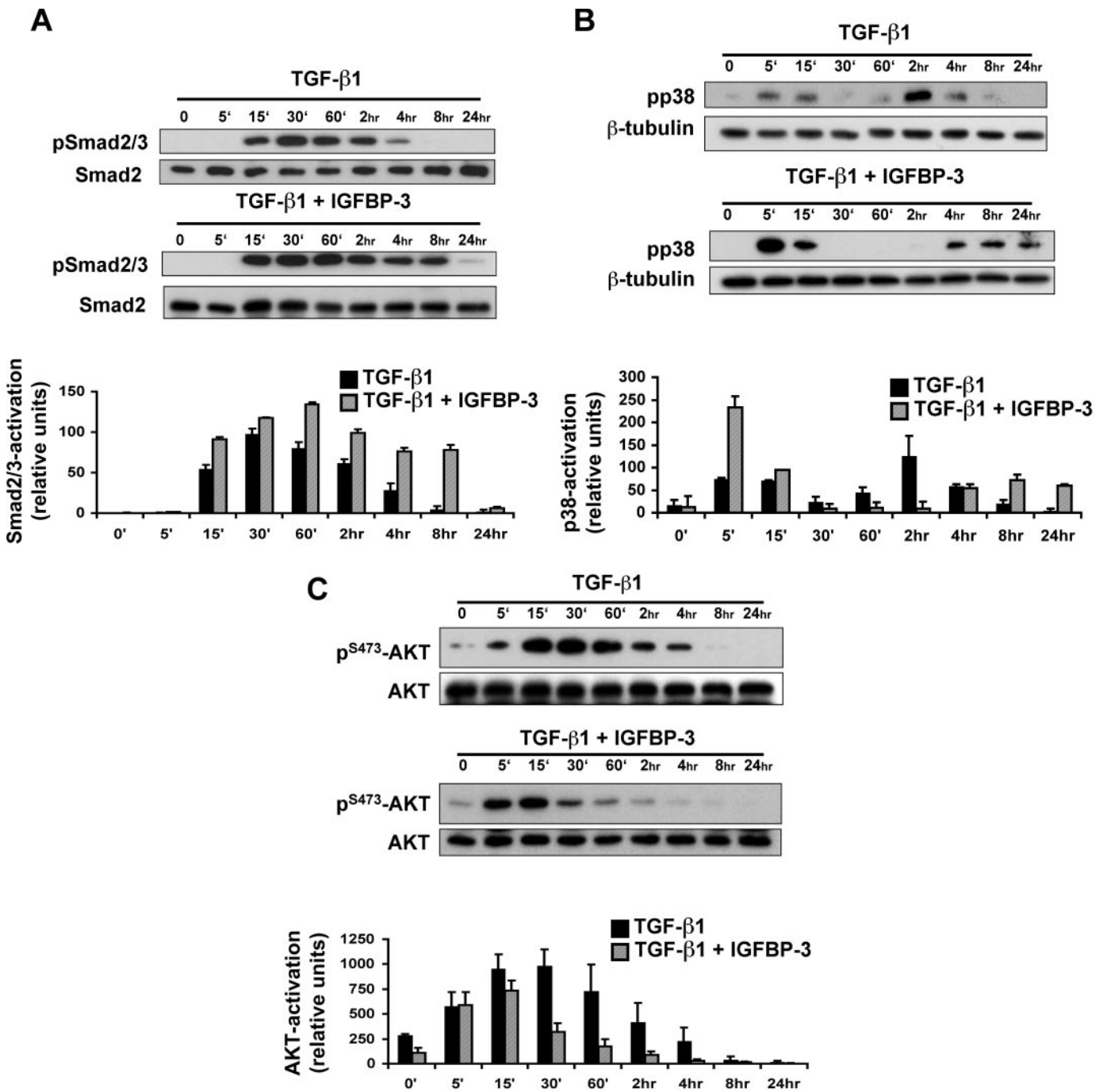


Figure 3. IGFBP-3 enhances TGF- β -induced proapoptotic signaling in murine podocytes. Western blot analysis demonstrates levels of phosphoproteins as indicated in total cell protein lysates of differentiated murine podocytes after treatment with TGF- β 1 (5 ng/ml) alone or co-stimulation with IGFBP-3 (500 ng/ml) for up to 24 h. Membranes were reprobed with antibodies that detect phospho-Smad2/3 and total-Smad2 (A), phospho-p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and β -tubulin (B), and p^{S473}-AKT and total AKT (C). Data shown are representative of three independent experiments (one original Western blot and pooled relative densitometry values normalized for total protein of two experiments).

at later time points (4 to 24 h after treatment; Figure 3B). It is interesting that the TGF- β 1- and IGFBP-3-induced p38MAPK activation response is biphasic. This may indicate that direct and indirect signaling events influence activity of p38MAPK or the expression of two isoforms of this MAPK in podocytes that migrate at the same size; one is activated early and the other is

activated later. Because we previously described that stimulation with TGF- β leads to an induction of PI3-K-mediated AKT phosphorylation (4), we also wanted to examine whether a combined treatment interferes with the phosphorylation profiles of antiapoptotic survival p^{S473}-AKT. We found that the combination leads to a significant decrease of AKT phosphorylation

(>50%) as early as 30 min after treatment with IGFBP-3 and TGF- β 1 (Figure 3C). In summary, these results demonstrate that IGFBP-3 leads to an enhancement of the TGF- β -induced Smad signaling response. Moreover, the TGF- β 1-induced activation profile of p38MAPK is shifted and enhanced whereas the AKT phosphorylation response is shifted and decreased after co-treatment with TGF- β 1 and IGFBP-3.

IGFBP-3 Stimulates the TGF- β Signaling Cascade in Murine Podocytes and Enhances Paracrine TGF- β Signaling

Because treatment with IGFBP-3 itself led to podocyte apoptosis, we wanted to examine whether a single dose of IGFBP-3 is able to stimulate TGF- β receptors. We detected after a single treatment with IGFBP-3 (500 ng/ml) a strong induction of Smad2/3 phosphorylation (Figure 4A). When we examined the activation profiles of p38MAPK and AKT, we found that stimulation with a single dose of IGFBP-3 would lead to a strong induction of p38MAPK phosphorylation as well as to a tran-

sient induction of AKT phosphorylation similar to the single-dose treatments with TGF- β 1 alone (Figure 4, B and C). These data indicate that IGFBP-3 alone induces TGF- β receptor activation and leads to apoptosis *via* p38MAPK activation. Next, we wanted to examine whether the IGFBP-3-induced effect depends on the presence of endogenous TGF- β . To test this, we stimulated cells with IGFBP-3 that were cultivated in the presence of a TGF- β -neutralizing antibody in a concentration that was high enough to block phosphorylation of Smad2/3 after stimulation of cells with 5 ng/ml recombinant TGF- β 1. Addition of the neutralizing antibody significantly reduced Smad2/3 phosphorylation but could not completely abolish the phosphorylation effect (Figure 4D). The presence of equal amounts of control IgG did not change the Smad2/3 phosphorylation level. These data suggest that IGFBP-3 is able to activate or recruit endogenous TGF- β in glomerular podocytes to the TGF- β receptor.

IGFBP-3 Induces Phosphorylation of Smad1/5/8 and Modulates BMP-7-Induced Receptor Signaling

Next, we wanted to examine whether the effects of IGFBP-3 are specific for TGF- β signaling. Therefore, we tested signaling mediators of the BMP pathway. We found that treatment of murine podocytes with IGFBP-3 leads to a transient phosphorylation peak of Smad1/5/8, demonstrating that IGFBP-3 also has potential to interfere with BMP-induced signaling in murine podocytes (Figure 5A). We also stimulated podocytes with BMP-7 and the combination with IGFBP-3 and found that treatment with BMP-7 alone leads to strong and sustained phosphorylation of Smad1/5/8 for up to 24 h (Figure 5B). In contrast to our combined stimulation experiments with TGF- β 1 and IGFBP-3, we found that IGFBP-3 co-stimulation had an inhibitory effect on phosphorylation of Smad1/5/8 (Figure 5B). Then we tested the effects of BMP-7 and combination with IGFBP-3 on AKT phosphorylation and found that BMP-7 treatment leads to a strong phosphorylation of AKT that is sustained for up to 4 h (Figure 5C). It is interesting that combination with IGFBP-3 leads to a strong enhancement of early phosphorylation response and to a more sustained phosphorylation for up to 24 h. In summary, these data indicate that IGFBP-3 has the potential to interfere with BMP receptor signaling and that the combination with BMP-7 leads to increased PI3-K/AKT survival signaling in murine podocytes.

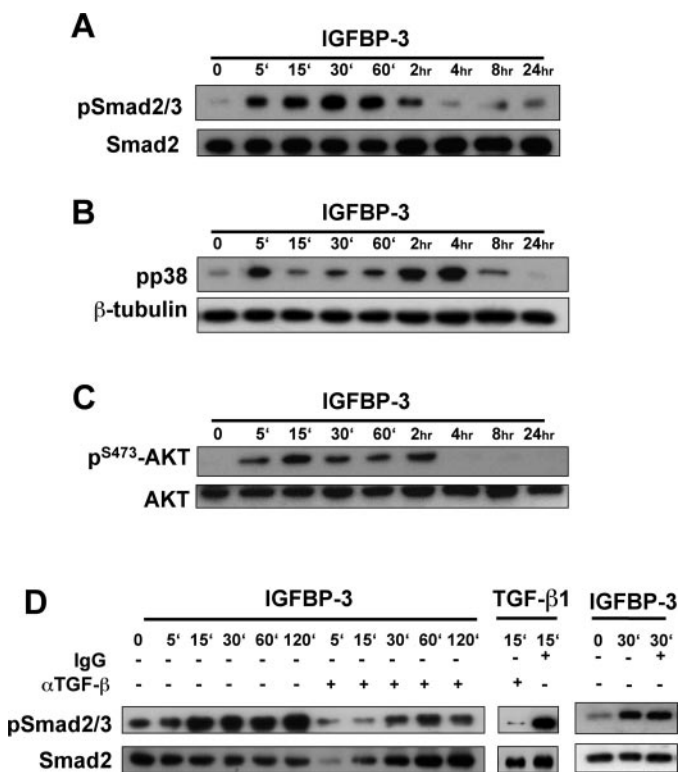


Figure 4. IGFBP-3 stimulates the TGF- β signaling cascade and induces Smad-dependent and -independent signaling. Western blot analysis demonstrates levels of phospho-Smad2/3 (A), phospho-p38MAPK (B), and p^{S473}-AKT (C) after stimulation of differentiated podocytes with IGFBP-3 (500 ng/ml). (D) IGFBP-3 enhances paracrine TGF- β signaling. Phospho-Smad2/3 levels are shown for differentiated murine podocytes that were stimulated with IGFBP-3 for indicated time points in the presence of a TGF- β -neutralizing antibody. Neutralizing antibody was used in concentrations with capacity to block Smad2/3 phosphorylation after adding 5 ng/ml of recombinant TGF- β 1 (middle insert). Incubation with IgG control did not change phospho-Smad2/3 levels after stimulation with IGFBP-3. Membranes were reprobed for level of total proteins or β -tubulin as indicated.

Co-Stimulation of Podocytes with TGF- β 1/IGFBP-3 Leads to a Prolonged Transcriptional Induction of TGF- β -Dependent Genes

We demonstrated earlier that TGF- β induces transcription of Smad7 mRNA in podocytes (5). Smad7 itself is a strong inducer of apoptosis in podocytes and other epithelial cells *via* inhibition of the survival factor NF- κ B (5,12). We performed quantitative real-time PCR and found that a single treatment of podocytes with TGF- β 1 leads to immediate early induction of Smad7 mRNA with a peak of induction after 1 to 2 h and returns to normal levels after 8 h. Treatment with a single dose of IGFBP-3 also leads to a transient induction of Smad7 mRNA. In contrast

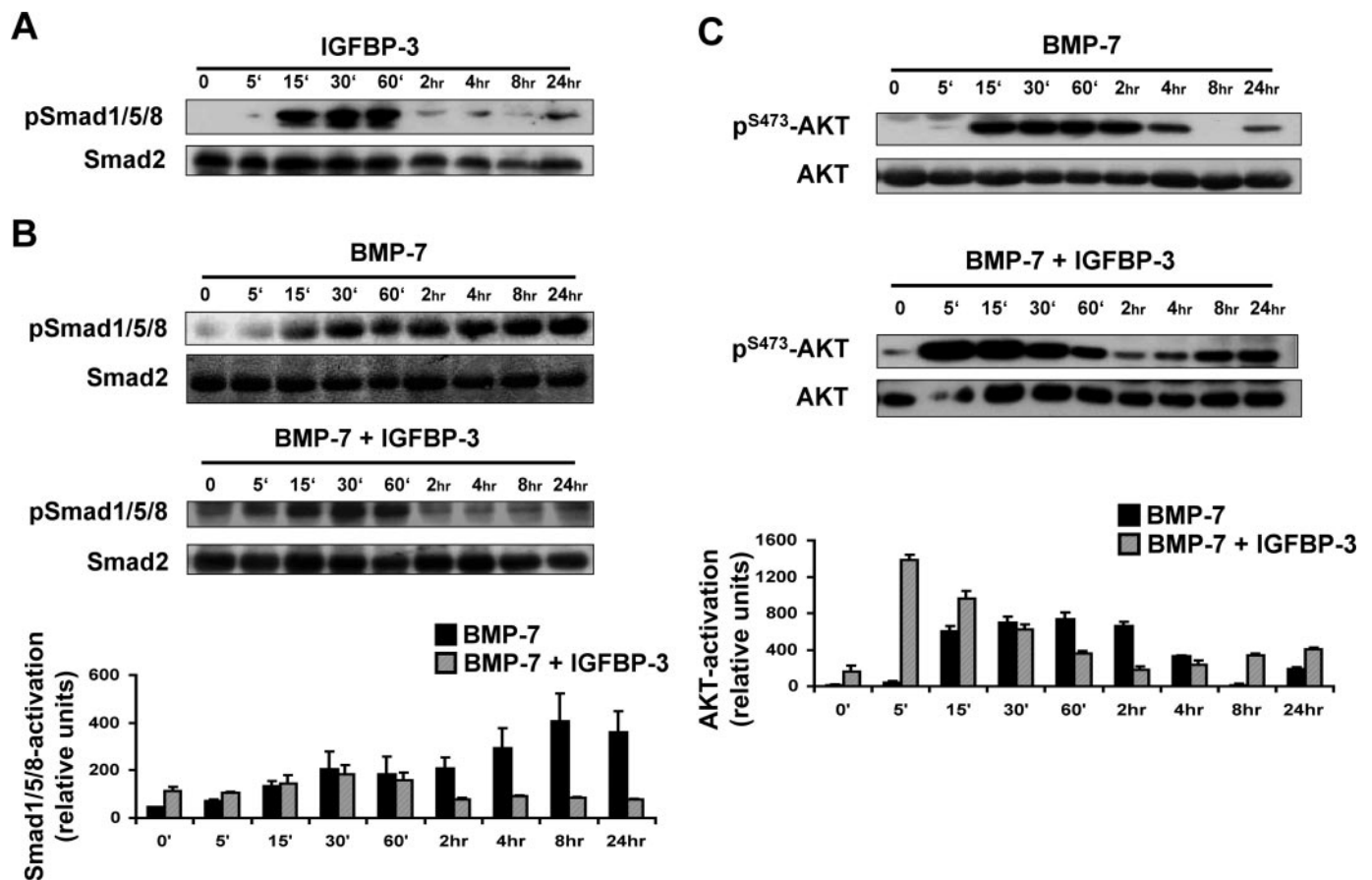


Figure 5. IGFBP-3 stimulates the bone morphogenic protein (BMP) receptor and modifies BMP-7–mediated Smad-dependent and -independent signaling in podocytes. Western blot analysis demonstrates levels of phospho-Smad1/5/8 after treatment with IGFBP-3 (500 ng/ml; A) and BMP-7 (50 ng/ml) or the combination (B). (C) Western blot analysis demonstrates levels of p^{S473}-AKT after stimulation with BMP-7 alone or combination with IGFBP-3. Data shown are representative of three independent experiments (one original Western blot and pooled relative densitometry values normalized for total protein of two experiments).

to that, transcription of Smad7 mRNA is induced continuously at later time points after combined TGF- β 1/IGFBP-3 treatment, with a significant difference after 8 and 24 h (Figure 6). We observed the same effect for mRNA induction of the PAI-1 gene, another classical gene target of TGF- β signaling (Figure 6). Another inhibitor of Smad signaling, Smad6, is not induced by TGF- β 1, IGFBP-3, or the combination. This observation is consistent with our previous observation that TGF- β stimulation leads to induction of Smad7 protein but does not lead to Smad6 protein induction in podocytes (23). We also tested the transcriptional induction of these three genes after stimulation with BMP-7 and the combination with IGFBP-3 and found that BMP-7 is able to induce Smad6 mRNA expression in podocytes; however, there was no additional effect on BMP-7–induced transcriptional activity of the examined target genes after combination with IGFBP-3 (Figure 6). These data clearly indicate that IGFBP-3 has a stimulatory effect on transcription of TGF- β target genes and that the combination and co-stimulation with TGF- β 1 leads to a prolonged signaling response. Moreover, this effect is TGF- β specific because a combination with BMP-7 does not lead to a change in BMP-7–induced transcriptional activity.

IGFBP-3 Induces Caspase-3 Activation and Enhances TGF- β –Induced Caspase-3 Activation

We established a FACS-based assay system to examine the influence of IGFBP-3, TGF- β 1, and the combination in single cells. Using FITC-VAD-fmk, a fluorescent dye that irreversibly binds to active caspase-3, we tested apoptotic activity in podocytes. We again could show that IGFBP-3 itself can induce apoptosis (Figure 7A, b), that TGF- β 1 leads to a higher proapoptotic caspase-3 response (Figure 7A, c), and that the combination TGF- β with IGFBP-3 has an additive effect (Figure 7A, d). The FACS assay enabled us to quantify the percentage of cells with caspase-3 activation (Figure 7B). Using this assay, we could show that the combination of TGF- β 1 and IGFBP-3 leads to a statistically significant difference in caspase-3 activation. Because we demonstrated that addition of a TGF- β –neutralizing antibody decreased the Smad2/3 signaling response after IGFBP-3 treatment, we wanted to explore whether this also has an effect on caspase-3 activation. We detected a significant decrease in caspase-3 activation after stimulating podocytes with IGFBP-3 in the presence of a TGF- β –neutralizing antibody (Figure 7B). This is consistent with our observation that neutralization of endogenous TGF- β decreases Smad2/3 phosphor-

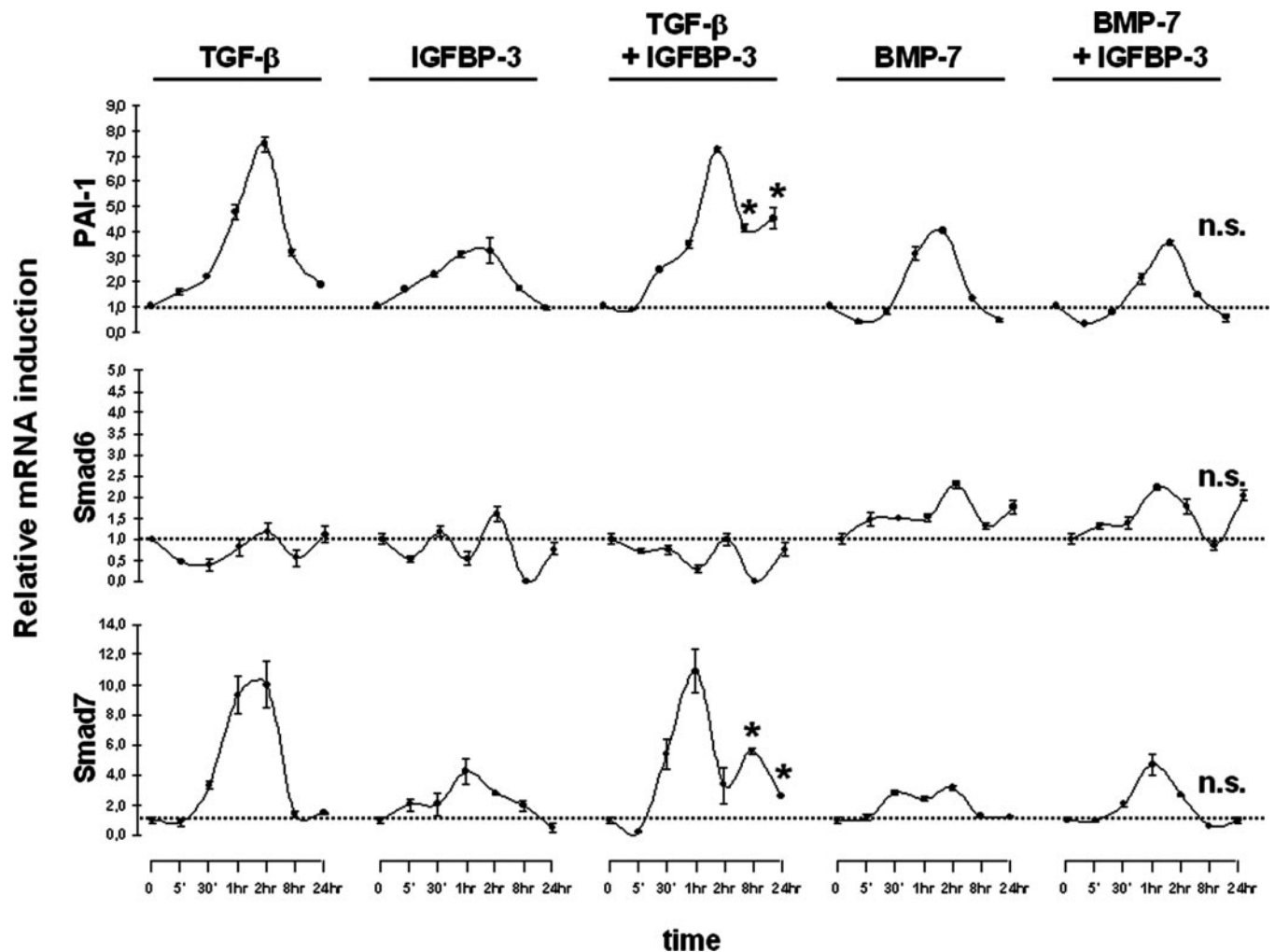


Figure 6. IGFBP-3 modulates transcriptional activity of TGF- β but not of BMP-7. Quantitative real-time PCR demonstrates mRNA levels of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), Smad6, and Smad7 in differentiated murine podocytes after treatment with TGF- β 1 (5 ng/ml), IGFBP-3 (500 ng/ml), BMP-7 (50 ng/ml), and their combinations as indicated over 24 h. Induction profiles were normalized for expression of murine β -actin expression. Combination of TGF- β 1 and IGFBP-3 leads to a prolonged transcriptional activity and mRNA accumulation for PAI-1 and Smad7 (* P < 0.02) after 8 and 24 h. Combination of IGFBP-3 with BMP-7 does not lead to a significant change in transcriptional activity for examined genes.

ylation after IGFBP-3 treatment (Figure 4). Next, we wanted to test whether the caspase-3 activation after IGFBP-3 treatment is p38MAPK dependent, and we found that the presence of a chemical p38MAPK inhibitor (SB239063) can inhibit caspase-3 activation after single treatment or combination treatment with TGF- β 1 and IGFBP-3 (Figure 7C). Then we wanted to test whether caspase activation could be functionally inhibited by neutralization of IGFBP-3 activity with IGF-1. To test this, we preincubated the cells with IGF-1 before treating them with IGFBP-3. As expected, caspase-3 activation was significantly reduced in the presence of IGF-1 (Figure 7D). Because BMP-7 has been described as an antagonist of TGF- β signaling, we also wanted to examine the effects of BMP-7 on caspase-3 activation in combination with TGF- β 1 and IGFBP-3. We found that caspase-3 activation was significantly reduced after treatment with TGF- β 1 or IGFBP-3 in the presence of BMP-7. Finally, we wanted to examine the effects of PI3-K/AKT activation on

caspase-3 activation in our system. We stimulated the cells with TGF- β 1 and IGFBP-3 in the presence of a PI3-K inhibitor (LY294002). Preincubation with the PI3-K inhibitor resulted in a significant increase in caspase-3 activation after stimulation with TGF- β 1. In contrast to that, caspase-3 activation was not significantly changed after combination of LY294002 and IGFBP-3 compared with IGFBP-3 alone. Pretreatment of cells with the PI3-K inhibitor also did not lead to a further increase in caspase-3 activation after combined stimulation with TGF- β 1 and IGFBP-3. This underscores the important role for an intact PI3-K/AKT signaling axis as an antagonist of TGF- β 1-induced caspase-3 activation and demonstrates the functional involvement of this pathway in the additive effects of a combined treatment with TGF- β 1 and IGFBP-3. In summary, our data demonstrate that the TGF- β 1 and BMP-7 cross-talk has opposing effects on podocyte survival and that IGFBP-3 is able to modulate the major pathways that are involved in this cross-talk and lead to an increase in caspase-3 activation.

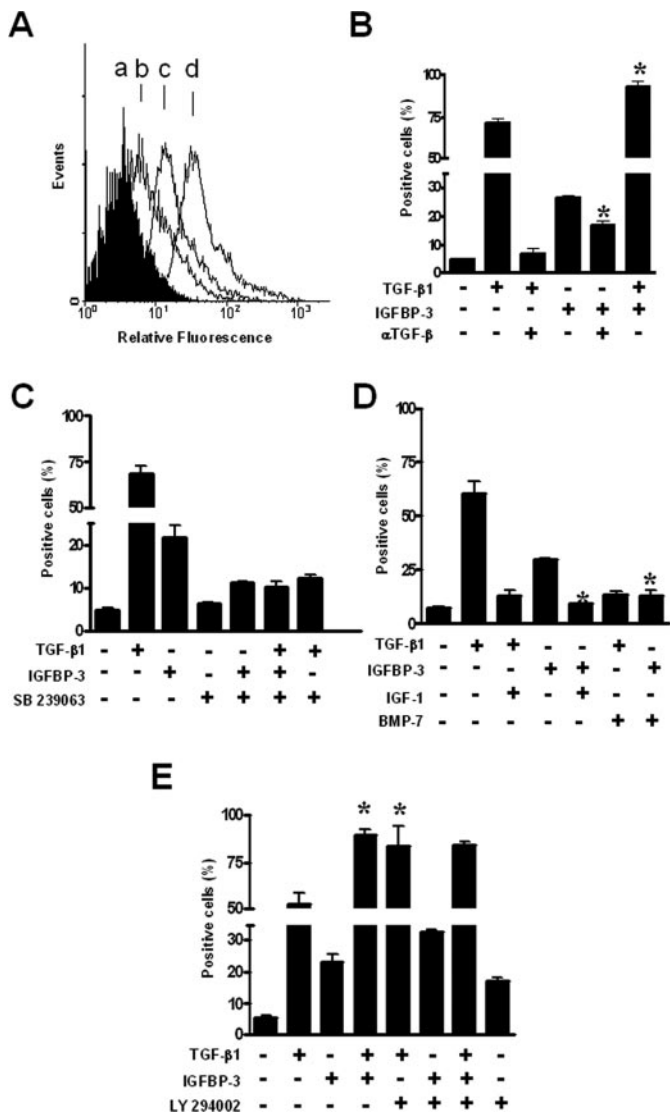


Figure 7. IGFBP-3 modulates TGF- β -induced activation of caspase-3. (A) Representative histogram demonstrates various levels of relative fluorescence in differentiated murine podocytes left untreated (a) or treated with IGFBP-3 (500 ng/ml; b), TGF- β 1 (5 ng/ml; c), and the combination of IGFBP-3 and TGF- β 1 (d) for 24 h, stained with caspase-3-specific fluorescent dye FITC-VAD-fmk, and subjected to FACS analysis. (B) Bar graphs demonstrate percentage of cells positive for FITC-VAD-fmk after treatment with TGF- β 1 and IGFBP-3 in the presence or absence of TGF- β -neutralizing antibody for 24 h as indicated (* P < 0.05, IGFBP-3 alone versus IGFBP-3 and neutralizing antibody; * P < 0.03, TGF- β 1 alone versus TGF- β 1 and IGFBP-3). (C) Percentage of FITC-VAD-fmk-positive cells after treatment with TGF- β 1 and IGFBP-3 in the presence or absence of p38MAPK inhibitor SB 239063 (10 μ M) for 24 h (P < 0.04 IGFBP-3 versus IGFBP-3 and SB 239063). (D) Percentage of FITC-VAD-fmk-positive cells after treatment with TGF- β 1 and IGFBP-3 in the presence of IGF-1 (100 ng/ml) or BMP-7 (50 ng/ml) for 24 h as indicated (* P < 0.03, IGFBP-3 alone versus IGFBP-3 and IGF-1 and IGFBP-3 versus IGFBP-3 and BMP-7). (E) Percentage of FITC-VAD-fmk-positive cells after treatment with TGF- β 1 and IGFBP-3 or the combination for 24 h in the presence or absence of the phosphoinositol 3-kinase inhibitor LY294002 as indicated (* P < 0.02, TGF- β 1 alone versus TGF- β 1 with IGFBP-3; * P < 0.04, TGF- β 1 alone versus TGF- β 1 with LY294002).

Discussion

The development of FSGS is initiated and maintained by the progressive loss of glomerular podocytes. We previously demonstrated that the activation of TGF- β leads to podocyte apoptosis and progressive loss of podocytes in TGF- β transgenic and CD2AP-/- mice (4,5). In both models with progressive glomerulosclerosis and in CD2AP-/- mice with features similar to human FSGS, we found activation of the TGF- β pathway *in vivo* leading to an induction of mRNA and protein of the TGF- β immediate early gene Smad7 (5). We also could detect a higher number of Smad7-positive podocytes in human biopsies from patients with FSGS (23). Here we present the involvement of two new cytokines in podocyte survival and apoptosis with the potential to modify the critical steps in podocyte apoptosis induction. We give for the first time evidence that BMP-7 has signaling activity in podocytes and demonstrate that BMP-7 can antagonize proapoptotic TGF- β signals and prevent TGF- β 1-induced caspase activation. In addition, we found IGFBP-3 present in high concentrations in the urine of mice and patients with active podocyte diseases, and we give functional evidence that IGFBP-3 can modify TGF- β 1- and BMP-7-induced signaling signatures. We conclude that the balance between TGF- β 1 and BMP-7 activation is an important part of glomerular cell integrity. Therefore, an increase in IGFBP-3 could be an important modifier in the initiation and progression phase of glomerular disease.

To support our hypothesis, we provide the following lines of evidence. First, IGFBP-3 is excreted in the urine of diseased CD2AP-/- mice as well as in patients with active MCD or FSGS. Several studies have demonstrated higher levels of IGFBP-3 in patients with chronic renal failure (24), diabetic nephropathy (25), or glomerulonephritis (26), but, so far, these findings have been discussed only in the context of regulation of levels of IGF-1 and the acute insulin-like effects of IGF-1. Direct effects of IGFBP-3 on renal epithelial cells have been described only as antiproliferative effects in renal proximal tubular cells (27). We find appreciable expression of IGFBP-3 in glomerular podocytes and parietal cells in proteinuric 3-wk-old CD2AP-/- mice. As demonstrated earlier, at this disease stage, a significant amount of podocyte and parietal cell apoptosis is present *in vivo* and coincides with increased expression of TGF- β 1 (4). We demonstrate *in vitro* evidence for direct effects of IGFBP-3 on podocytes. Addition of recombinant IGFBP-3 to differentiated podocyte cultures induced a significant amount of podocyte apoptosis but less pronounced as TGF- β 1 treatment. The combination of IGFBP-3 with TGF- β 1 leads to a significant increase in podocyte apoptosis measured by DAPI counts. In addition, we found actin cytoskeletal remodeling after treatment with IGFBP-3, TGF- β 1, and the combination of both in a similar induction pattern with significant induction after IGFBP-3 single treatment, induction of actin stress fiber bundling in a higher number of cells after TGF- β 1, and additive effects in combination. Our observations are supported by a large body of evidence showing direct effects of IGFBP-3 on apoptosis in other epithelial cells (28,29), endothelial cells (30), and, recently, in mesangial cells (31). Stress fiber bundling and the formation of ARC in podocytes have been

reported after shear stress (32) and after TGF- β 1 treatment in mesangial cells (33). Our data document that IGFBP-3 has independent effects on apoptosis and actin cytoskeletal rearrangements and that it potentiates the TGF- β effects.

Second, we find that TGF- β -induced Smad- and non-Smad-dependent signaling is modulated by IGFBP-3. We show that IGFBP-3 itself has the potential to stimulate the TGF- β R and induce phosphorylation of Smad2/3, AKT, and p38MAPK. It is interesting that we found a strong increase in early p38MAPK activation and a significant prolongation of Smad2/3 phosphorylation after combination treatment with TGF- β 1. However, the combination of TGF- β 1 and IGFBP-3 *in vitro* leads to a significant reduction of the TGF- β -induced AKT survival signaling and to a shift in the kinetics of the signaling response with early signal termination. These observations are supported by functional data demonstrating p38MAPK-dependent caspase-3 activation after single and combinatory treatments of TGF- β 1 and IGFBP-3. In addition, we can demonstrate that PI3-K/AKT signal antagonizes caspase-3 activation. TGF- β 1 treatment in the presence of the PI3-K inhibitor LY294002 leads to a significant increase in caspase-3 activation similar to the increase that we detect in combination with IGFBP-3. We conclude that IGFBP-3 is able to shift the signaling response after TGF- β treatment toward apoptosis because the TGF- β -induced survival axis is blocked and the proapoptotic response is enhanced by IGFBP-3. Our findings are consistent with observations in other epithelial cells. Leal *et al.* (19) reported that IGFBP-3 binds to the type V TGF- β receptor in mink lung epithelial cells. Recently, Fanayan *et al.* (17,18) reported a synergistic signaling effect of IGFBP-3 and TGF- β *via* the Smad pathway with additive functional consequences in breast cancer cells. Additional evidence for enhancement of proapoptotic responses by IGFBP-3 comes from studies in endothelial cells, demonstrating a reduction of AKT phosphorylation in the presence of IGFBP-3 after vascular endothelial growth factor stimulation (34). Further evidence for regulatory interactions of TGF- β and IGFBP-3 were described in human neonatal fibroblasts that showed increased IGFBP-3 mRNA production and release after treatment with TGF- β 1 (35).

It is interesting that we also can provide evidence that IGFBP-3 has the opposite functional effects on BMP-7 signaling. We can demonstrate that IGFBP-3 is able to stimulate the BMP receptor and induces phosphorylation of Smad1/5/8 in murine podocytes. However, in contrast to the effects that we see on Smad signaling after a combined stimulation with TGF- β 1, we found that BMP-7-induced Smad signaling is disrupted in the presence of IGFBP-3. The disrupted BMP/Smad signaling effect itself might have profound effects on downstream transcriptional activation of various other factors that influence the balance of pro- and antiapoptotic signaling in podocytes. Detailed analysis of these factors is on the way in our laboratory. In addition, we detected a dramatic enhancement effect on early phosphorylation of AKT after a combined stimulation of podocytes with BMP-7 and IGFBP-3. We also find a continuous activation profile for 24 h that could account for the protective effects on podocytes. Even though BMP-7 expression has been reported in glomerular podocytes (36), nothing is known about the cellular

action or functional role of BMP-7 in podocytes. So far, BMP-7 was described as an important opponent of TGF- β production (37) and profibrotic signaling after TGF- β activation (38) in proximal renal tubular cells and mesangial cells. BMP-7 has been implicated as an antagonist of TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in tubular epithelial cells and could successfully reverse chronic renal injury (7). More recently, Zeisberg *et al.* (39) provided strong evidence that BMP-7 contributes to renal tissue regeneration by induction of mesenchymal-to-epithelial transition, a mechanism that so far has been implicated only in embryonic development of the kidney (6). In this article, we provide for the first time evidence that there is signaling cross-talk of BMP-7 and TGF- β 1 in podocytes and that BMP-7 functions as a cytoprotective factor for podocytes. Our data on IGFBP-3 signaling in podocytes demonstrate the importance of the IGF system in the regulation of podocyte survival. Recently, Bridgewater *et al.* (40) showed a direct protective effect of IGF-1 *via* activation of PI3-K/AKT on apoptosis in human fetal podocytes. Here we also demonstrate that IGF-1 is able to antagonize TGF- β 1- and IGFBP-3-induced caspase-3 activation. We conclude that IGFBP-3 has multiple effects on modulation of podocyte apoptosis: As a carrier and storage pool of free IGF-1, as a direct proapoptotic factor, and as a modulator of TGF- β - and BMP-7-induced signaling pathways. Therefore, actions of IGFBP-3 are highly dependent on the surrounding cellular milieu and the presence and the concentration of various cytokines. Our observations of significantly higher concentrations of IGFBP-3 that are excreted in the urine of patients with active FSGS in combination with our functional analysis underscore a potential pathophysiologic role in this disease. Because we demonstrate that IGFBP-3, a secreted protein, is expressed by glomerular endothelial cells in humans, we speculate that IGFBP-3 might play a role in modifying podocyte function *via* paracrine signaling from endothelial cells.

Podocytes are highly responsive to a variety of cytokines. We hypothesize that cytokine treatments lead to synchronized activation of pro- and antiapoptotic signaling cascades in podocytes and that, depending on the concentration or combination of cytokines, the net effect of survival signals defines the cellular fate. On the basis of our work and the work of others, we propose that one of the key survival events in this context is the net effect on PI3-K/AKT activation in podocytes (4,40,41). Direct stimulation and/or enhancement of this signaling cascade could have a potential role as a supportive podocyte protective therapy in the initiation and progression phase of glomerular disease.

Acknowledgments

This work was supported by an Emmy-Noether-Fellowship to M.S. granted by Deutsche Forschungsgemeinschaft (SCHI 587/2-1).

We thank Barbara Hertel for excellent technical assistance.

References

1. Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Sanden SK, Hussain S, Filipiak WE, Saunders TL, Dysko RC, Kohno K, Holzman LB, Wiggins RC: Podocyte depletion causes glomeruloscle-

- rosis: Diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *J Am Soc Nephrol* 16: 2941–2952, 2005
2. Matsusaka T, Xin J, Niwa S, Kobayashi K, Akatsuka A, Hashizume H, Wang QC, Pastan I, Fogo AB, Ichikawa I: Genetic engineering of glomerular sclerosis in the mouse via control of onset and severity of podocyte-specific injury. *J Am Soc Nephrol* 16: 1013–1023, 2005
 3. Bottinger EP, Bitzer M: TGF- β signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 2600–2610, 2002
 4. Schiffer M, Mundel P, Shaw AS, Bottinger EP: A novel role for the adaptor molecule CD2-associated protein in transforming growth factor- β -induced apoptosis. *J Biol Chem* 279: 37004–37012, 2004
 5. Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, ten Dijke P, Mundel P, Bottinger EP: Apoptosis in podocytes induced by TGF- β and Smad7. *J Clin Invest* 108: 807–816, 2001
 6. Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ: A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 9: 2795–2807, 1995
 7. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R: BMP-7 counteracts TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 9: 964–968, 2003
 8. Schiffer M, von Gersdorff G, Bitzer M, Susztak K, Bottinger EP: Smad proteins and transforming growth factor- β signaling. *Kidney Int Suppl* 77: S45–S52, 2000
 9. Chen D, Zhao M, Mundy GR: Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22: 233–241, 2004
 10. Massague J: How cells read TGF- β signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 169–178, 2000
 11. Miyazono K: Positive and negative regulation of TGF- β signaling. *J Cell Sci* 113: 1101–1109, 2000
 12. Lallemand F, Mazars A, Prunier C, Bertrand F, Kornprost M, Gallea S, Roman-Roman S, Cherqui G, Atfi A: Smad7 inhibits the survival nuclear factor kappaB and potentiates apoptosis in epithelial cells. *Oncogene* 20: 879–884, 2001
 13. Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB: Type beta transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 119–123, 1985
 14. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, de Crombrughe B: Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor- β . *J Cell Biol* 105: 1039–1045, 1987
 15. Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto T, Hwa V, Ng L, Simpson DM, Rosenfeld RG: Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 28: 619–637, 1996
 16. Hong J, Zhang G, Dong F, Rechler MM: Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 mutants that do not bind IGF-I or IGF-II stimulate apoptosis in human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 277: 10489–10497, 2002
 17. Fanayan S, Firth SM, Baxter RC: Signaling through the Smad pathway by insulin-like growth factor-binding protein-3 in breast cancer cells. Relationship to transforming growth factor- β 1 signaling. *J Biol Chem* 277: 7255–7261, 2002
 18. Fanayan S, Firth SM, Butt AJ, Baxter RC: Growth inhibition by insulin-like growth factor-binding protein-3 in T47D breast cancer cells requires transforming growth factor- β (TGF- β) and the type II TGF- β receptor. *J Biol Chem* 275: 39146–39151, 2000
 19. Leal SM, Huang SS, Huang JS: Interactions of high affinity insulin-like growth factor-binding proteins with the type V transforming growth factor- β receptor in mink lung epithelial cells. *J Biol Chem* 274: 6711–6717, 1999
 20. Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, Miner JH, Shaw AS: Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 286: 312–315, 1999
 21. Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia BA, Pavenstadt H, Davidson GR, Kriz W, Zeller R: Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 236: 248–258, 1997
 22. Reiser J, von Gersdorff G, Loos M, Oh J, Asanuma K, Giardino L, Rastaldi MP, Calvaresi N, Watanabe H, Schwarz K, Faul C, Kretzler M, Davidson A, Sugimoto H, Kalluri R, Sharpe AH, Kreidberg JA, Mundel P: Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 113: 1390–1397, 2004
 23. Schiffer M, Schiffer LE, Gupta A, Shaw AS, Roberts IS, Mundel P, Bottinger EP: Inhibitory Smads and TGF- β signaling in glomerular cells. *J Am Soc Nephrol* 13: 2657–2666, 2002
 24. Iglesias P, Diez JJ, Fernandez-Reyes MJ, Mendez J, Bajo MA, Aguilera A, Selgas R: Growth hormone, IGF-I and its binding proteins (IGFBP-1 and -3) in adult uraemic patients undergoing peritoneal dialysis and haemodialysis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60: 741–749, 2004
 25. Shinada M, Akdeniz A, Panagiotopoulos S, Jerums G, Bach LA: Proteolysis of insulin-like growth factor-binding protein-3 is increased in urine from patients with diabetic nephropathy. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1163–1169, 2000
 26. Hasegawa Y, Cohen P, Yorgin P, Rosenfeld RG: Characterization of urinary insulin-like growth factor binding proteins. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 830–835, 1992
 27. Cheung CW, Vesey DA, Nicol DL, Johnson DW: The roles of IGF-I and IGFBP-3 in the regulation of proximal tubule, and renal cell carcinoma cell proliferation. *Kidney Int* 65: 1272–1279, 2004
 28. Rajah R, Khare A, Lee PD, Cohen P: Insulin-like growth factor-binding protein-3 is partially responsible for high-serum-induced apoptosis in PC-3 prostate cancer cells. *J Endocrinol* 163: 487–494, 1999
 29. Rajah R, Valentinis B, Cohen P: Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor- β 1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem* 272: 12181–12188, 1997
 30. Granata R, Trovato L, Garbarino G, Taliano M, Ponti R, Sala G, Ghidoni R, Ghigo E: Dual effects of IGFBP-3 on endothelial cell apoptosis and survival: Involvement of the sphingolipid signaling pathways. *FASEB J* 18: 1456–1458, 2004
 31. Vasylyeva TL, Chen X, Ferry RJ Jr: Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates cytokine-induced mesangial cell apoptosis. *Growth Horm IGF Res* 15: 207–214, 2005
 32. Endlich N, Kress KR, Reiser J, Uttenweiler D, Kriz W, Mundel P, Endlich K: Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *J Am Soc Nephrol* 12: 413–422, 2001
 33. Hubchak SC, Runyan CE, Kreisberg JJ, Schnaper HW: Cytoskeletal rearrangement and signal transduction in TGF- β 1-stimulated mesangial cell collagen accumulation. *J Am Soc Nephrol* 14: 1969–1980, 2003

34. Franklin SL, Ferry RJ Jr, Cohen P: Rapid insulin-like growth factor (IGF)-independent effects of IGF binding protein-3 on endothelial cell survival. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 900–907, 2003
35. Martin JL, Ballesteros M, Baxter RC: Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and transforming growth factor-beta 1 release IGF-binding protein-3 from human fibroblasts by different mechanisms. *Endocrinology* 131: 1703–1710, 1992
36. Gould SE, Day M, Jones SS, Dorai H: BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells. *Kidney Int* 61: 51–60, 2002
37. Zhang XL, Selbi W, de la Motte C, Hascall V, Phillips AO: Bone morphogenic protein-7 inhibits monocyte-stimulated TGF-beta1 generation in renal proximal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 16: 79–89, 2005
38. Wang S, Hirschberg R: Bone morphogenetic protein-7 signals opposing transforming growth factor beta in mesangial cells. *J Biol Chem* 279: 23200–23206, 2004
39. Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R: Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem* 280: 8094–8100, 2005
40. Bridgewater DJ, Ho J, Sauro V, Matsell DG: Insulin-like growth factors inhibit podocyte apoptosis through the PI3 kinase pathway. *Kidney Int* 67: 1308–1314, 2005
41. Bussolati B, Deregibus MC, Fonsato V, Doublier S, Spatola T, Procida S, Di Carlo F, Camussi G: Statins prevent oxidized LDL-induced injury of glomerular podocytes by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-signaling pathway. *J Am Soc Nephrol* 16: 1936–1947, 2005

CD2AP/CIN85 balance determines receptor tyrosine kinase signaling response in podocytes.

Tossidou, I., Kardinal, C., Peters, I., Kriz, W., Shaw, A., Dikic, I., Tkatchuk, S., Dumler, I., Haller, H., Schiffer, M. (2007).

Journal of Biological Chemistry 282, 7457-7464.

CD2AP/CIN85 Balance Determines Receptor Tyrosine Kinase Signaling Response in Podocytes*

Received for publication, September 5, 2006, and in revised form, December 18, 2006. Published, JBC Papers in Press, January 9, 2007, DOI 10.1074/jbc.M608519200

Irini Tossidou[‡], Christian Kardinal[§], Imke Peters[‡], Wilhelm Kriz[¶], Andrey Shaw^{||}, Ivan Dikic^{**}, Sergej Tkachuk[‡], Inna Dumler[‡], Hermann Haller[‡], and Mario Schiffer^{‡1}

From the [‡]Division of Nephrology, Department of Medicine, and [§]Division of Pediatric Hematology and Oncology, Hannover Medical School, Carl Neuberg Strasse 1, 30625 Hannover, Germany, [¶]Department of Anatomy and Cell Biology, University of Heidelberg, INF 307, 69120 Heidelberg, Germany, ^{||}Department of Pathology and Immunology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri 63110, and ^{**}Molecular Signaling Group, Department of Biochemistry 2, Building 75, Goethe University Medical School, Theodor-Stern Kai 7, 60590 Frankfurt am Main, Germany

Defects in podocyte signaling are the basis of many inherited glomerular diseases leading to glomerulosclerosis. CD2-associated protein (CD2AP) is highly expressed in podocytes and is considered to play an important role in the maintenance of the glomerular slit diaphragm. Mice deficient for CD2AP (CD2AP^{-/-}) appear normal at birth but develop a rapid onset nephrotic syndrome at 3 weeks of age. We demonstrate that impaired intracellular signaling with subsequent podocyte damage is the reason for this delayed podocyte injury in CD2AP^{-/-} mice. We document that CD2AP deficiency in podocytes leads to diminished signal initiation and termination of signaling pathways mediated by receptor tyrosine kinases (RTKs). In addition, we demonstrate that CIN85, a paralog of CD2AP, is involved in termination of RTK signaling in podocytes. CIN85 protein expression is increased in CD2AP^{-/-} podocytes *in vitro*. Stimulation of CD2AP^{-/-} podocytes with various growth factors, including insulin-like growth factor 1, vascular endothelial growth factor, and fibroblast growth factor, resulted in a significantly decreased phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and ERK signaling response. Moreover, increased CIN85 protein is detectable in podocytes in diseased CD2AP^{-/-} mice, leading to decreased base-line activation of ERK and decreased phosphorylation after growth factor stimulation *in vivo*. Because repression of CIN85 protein leads to a restored RTK signaling response, our results support an important role of CD2AP/CIN85 protein balance in the normal signaling response of podocytes.

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)² and Ras/ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathways are key factors for determining the specificity of cellular responses, including

cell proliferation, cell differentiation, and cell survival (1, 2). We and others have previously demonstrated that the PI3K/AKT signaling response plays an important role for podocyte survival in particular in the presence of active transforming growth factor β (3, 4). We recently demonstrated that the PI3K/AKT response is directly targeted by cytokine cross-talk and subsequently influences the cellular outcome (5). The adaptor molecules CD2-associated protein (CD2AP) and CIN85 belong to a family of adaptor molecules that selectively control the spatial and temporal assembly of multiprotein complexes that transmit intracellular signals. For both molecules various interaction partners have been described placing them at the center of regulatory pathways involving signaling (6, 7), cytoskeletal arrangement (8, 9), vesicular trafficking (10), and endocytosis (11, 12). In this study we demonstrate that CD2AP and CIN85 contribute to the balance of RTK signaling in podocytes. The anatomical localization of the podocyte exposes this highly specialized cell type to a variety of cellular stressors like stretch force, reactive oxygen species, osmotic milieu changes, cytokines and chemokines, filtrated toxins, and waste products. Therefore, this location requires the cells to have a highly effective cellular response system to counteract proapoptotic cell programs induced by these factors. Deficiency in CD2AP leads to a differentiation-dependent increase in expression of its paralog CIN85 *in vitro* and *in vivo*. This leads subsequently to a severe signaling defect in podocytes. Our results could explain the sudden and uniform disease onset and the rapid progression of the disease in this mouse model. We hypothesize that any inherited or acquired change in the CD2AP/CIN85 protein balance may lead to a debilitation in podocyte survival signaling with subsequent podocyte loss and the development of glomerulosclerosis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies and Reagents—Primary antibodies used for co-immunoprecipitation, Western blotting, and immunocytochemical studies were rabbit anti-phospho^{S473}AKT, mouse anti-phospho^{Y204}ERK, mouse anti-AKT1, rabbit anti-ERK, rabbit anti-FLAG, rabbit anti-Myc (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), rabbit anti-CD2AP, rabbit anti-Grb2, rabbit anti- β -tubulin (Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-SOS1 (Transduction Laboratories), rabbit anti-Cin85 (CT) (gift from Ivan Dikic), mouse anti-Synaptopodin (Progen, Heidelberg,

* This work was supported by an Emmy-Noether fellowship granted by Deutsche Forschungsgemeinschaft (SCHI 587/2-1/2) (to M. S.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 49-5115324708; Fax: 49-511552366; E-mail: schiffer.mario@mh-hannover.de.

² The abbreviations used are: PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; ERK, extracellular-regulated kinase; MEKK, mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase; FGF, fibroblast growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; siRNA, small interference RNA; RTK, receptor tyrosine kinase; GST, glutathione S-transferase; SH domain, Src homology domain; SOS, son of sevenless.

Germany). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse as secondary antibodies for Western blotting were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Cytokines and inhibitors were purchased from the following vendors: rhIGF-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN), rhFGF4, rhVEGF1 (Cell Sciences, Canton, MA), LY294002, PD98059 (Calbiochem), farnesylthiosalicylic acid (Sigma).

Podocyte Culture, Cytokine Stimulation, and Inhibition of MEKK, PI3K, and Ras—Cultivation of conditionally immortalized mouse podocytes was performed as described by Mundel *et al.* (13). To propagate podocytes, cells were cultivated on type I collagen (BD Biosciences) at 33 °C in the presence of 10 units/ml mouse recombinant γ -interferon (Cell Sciences) (permissive conditions) to enhance expression of a thermo-sensitive T antigen. To induce differentiation, podocytes were maintained at 37 °C for 14 days without γ -interferon, resulting in absence of thermo-sensitive T antigen (non-permissive conditions). Differentiated podocytes were stimulated with fibroblast growth factor (FGF) (20 ng/ml) and vascular endothelial growth factor (VEGF) (20 ng/ml). To inhibit AKT and ERK activation, cells were pretreated with 20 μ M LY294002, PD98059, or farnesylthiosalicylic acid for 20 min prior to cytokine stimulation.

Western Blot Analysis—To analyze whole cell protein lysates from cultivated podocytes, either untreated or treated cells were lysed on ice in immunoprecipitation buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS) containing protease inhibitor (complete mini; Roche Applied Sciences), 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM NaF, and 200 μ g/liter okadaic acid. Lysates were centrifuged at 12,000 rpm, and aliquots of the supernatants were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA). After probing with primary antibodies, antigen-antibody complexes were detected with horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit and anti-mouse antibodies, respectively, and visualized using enhanced chemiluminescence reagents (Pierce) according to the manufacturer's protocol.

GST Pulldown Assays—For pull-down assay 500 μ g of total cell lysate was incubated with 1 μ g of GST Grb2 full-length (gift from S. M. Feller, Oxford, UK) and glutathione-Sepharose beads in pull-down buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM dithiothreitol, 30 mM MgCl₂, 40 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, and protease inhibitors) overnight at 4 °C. The pellets were washed in pull-down buffer and separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Western blot was performed using the methods mentioned above.

Animals—Target disruption and generation of CD2AP-deficient homozygous mice on a 129/J background is described elsewhere (14). Kidney tissue was prepared from 2- and 3-week-old mice.

Immunohistochemistry—After dissection, kidneys were washed with phosphate-buffered saline and immediately frozen in tissue molds containing optimal cutting temperature compound. Sections were collected onto slides, blocked with 10% donkey serum, stained with the appropriate primary antibody followed by Cy3-conjugated donkey anti-rabbit and fluorescein

isothiocyanate-conjugated donkey anti-mouse secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch). For light microscopy slides and electron microscopy the tissue was perfusion-fixed and processed following a standard protocol.

Isolation and Processing of Glomeruli—Glomeruli were isolated from kidneys of 3-week-old CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} mice using a sequential sieving technique with mesh sizes of 180, 100, and 71 μ m. The fraction collected from the 71- μ m sieve was maintained in tissue culture dishes at 37 °C for 24 h before stimulation. After stimulation glomeruli were resuspended in immunoprecipitation buffer and disrupted with a dounce homogenizer by hand with 50 up-and-down strokes. For immunohistochemistry, glomeruli were washed with phosphate-buffered saline and the pellets were immediately frozen in optimal cutting temperature. 2- μ m cryosections were cut and fluorescence staining was performed using the methods mentioned above.

Design and Cloning of Lentiviral siRNA Vectors—The pLVTHM-deltaH-2K lentivirus transfer vector used in this study was generated by replacing enhanced green fluorescent protein sequences in the pLVTHM vector (kindly provided by Dr. Didier Trono, Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Medicine, University of Geneva, Switzerland) on delta H-2K from pMACS K^k.II vector encoding the truncated H-2K^k surface marker (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). The pLVTHM-deltaH-2K lentivirus transfer vector was used as a first step to ligate the Cin85 siRNA oligonucleotides (Cin85si): sense, 5'-CGCGT-CCCCgaggcacaga atgatgatgaattTCAAGAGAaattcatcatcattctgtgctcTTTTTGGAAAT; antisense, 5'-CGATTTCCA-AAAAGaggcacagaatgatgatgaattTCTC TTGAAaattcatcatcattctgtgctcGGGGA. The hybridized oligonucleotides were ligated into the lentivirus transfer vector between MluI and ClaI restriction sites.

Lentiviral Vector Production and Cell Infection—Lentiviral vectors were produced by transient transfection of 293T cells according to standard protocols. 293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% fetal calf serum and, when subconfluent, transfected with FuGENE 6 (Roche Diagnostics) using ratio of pCMV-dR8.74: pMD2G:pLVTHM-deltaH-2K-Cin85si or pLVTHM-deltaH-2K as a control = 3:2:1. After 48 h post-transfection cell supernatants, containing viral particles, were filtered using 0.4 μ m Steriflip vacuum filtration system (Millipore) and concentrated by ultracentrifugation at 50,000 \times g for 1.5 h at 4 °C. For lentiviral infection, differentiated CD2AP^{-/-} podocytes were grown until 70–80% confluence and infected in the presence of 8 μ g/ml polybrene with viruses and used for experiments 3 days after infection.

Transfection—The day before transfection the podocytes were seeded on 60-mm dishes. On the day of transfection cells were transfected using Effectene transfection reagent (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol using FLAG-mCIN85, Myc-mCD2AP (gift from T. Huber), and pcDNA3.1 as a control. Cells were cultured in normal growth medium for 72 h after transfection, serum-starved overnight, and stimulated with FGF.

RESULTS

Podocyte Damage in 3-Week-old CD2AP^{-/-} Mice Occurs Simultaneously in All Glomeruli—Previously we described that podocyte apoptosis is an early lesion during the development of the disease in CD2AP^{-/-} mice and that apoptotic cell death is detectable in the endocapillary/mesangial compartments only at later time points (3). It still remains unclear why CD2AP^{-/-} mice are born normal, develop a regular glomerular filtration barrier, and then within a time frame of 1–2 days become severely nephrotic. With detailed morphological analysis of diseased kidneys, we revealed global podocyte damage in a uniform temporal fashion. Glomerular damage was evaluated by periodic acid-Schiff staining at 2 and 3 weeks of age in CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} mice ($n = 5$ in each group). We found in CD2AP^{-/-} mice at 2 weeks of age no mesangial matrix accumulation or damage in 221 examined glomerular profiles. However, at 3 weeks of age we found glomerular profiles with mesangial expansion and damage in 288 of 302 (95.4%) examined, compared with 378 normal-appearing glomerular profiles in CD2AP^{+/+} mice. When we examined glomerular profiles of CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} mice ($n = 2$ in each group) using 1- μ m sections (Fig. 1*a*) we found that in 192 examined glomerular profiles all of them (100%) showed mesangial proliferation in at least one lobule. Next, foot process effacement was evaluated in 10 complete glomerular profiles by transmission electron microscopy. In all of them the majority of loops exhibited complete foot process effacement (Fig. 1*b*), whereas controls were negative. Thus, there is a 100% penetrance of the damage in the CD2AP^{-/-} mice. Within the cytoplasm sheets of podocytes that adhere broadly to the GBM we detected a prominent basal cytoskeletal layer consisting of a dense network of actin filaments (Fig. 1*c*, insert). The parietal epithelial cells (PECs) were affected and also developed lesions (*i.e.* vacuolization of the cytoplasm) (Fig. 1*b*). However, the parietal cell damage was not as uniform as in the podocytes. Because epithelial cells, the podocytes, and the PECs were all affected, the tuft adhesions were of an advanced type for the GBM directly attached to the parietal basement membrane over large distances without any interposed cells. Concurrently, we detected mesangial expansion with close meshed mesangiolytic followed by mesangial cell proliferation and matrix deposition in every lobule prominently including the vascular pole, resulting in a conspicuous broadening of the glomerular entrance and stalk. In 171 examined CD2AP^{-/-} profiles and 61 examined CD2AP^{+/+} profiles ($n = 2$ in each group) with a visible stalk broadening, we detected mesangial thickening in the afferent vessel portion in 100% of the CD2AP^{-/-} glomeruli and 0% of the CD2AP^{+/+} glomeruli. Taken together, these results indicate that the disease in CD2AP^{-/-} mice is neither focal nor segmental. The uniformity of the lesions seems highly suggestive for the dysregulation of a physiological process necessary for the maintenance of normal glomerular tuft architecture.

CD2AP^{-/-} Podocytes Show Dysregulated Activation Profiles for PI3K/AKT and ERK1/2 after Growth Factor Stimulation of Receptor Tyrosine Kinases (RTKs)—When we tested the PI3K/AKT and ERK1/2 signaling response after stimulation of RTKs with different growth factors, we detected diminished activa-

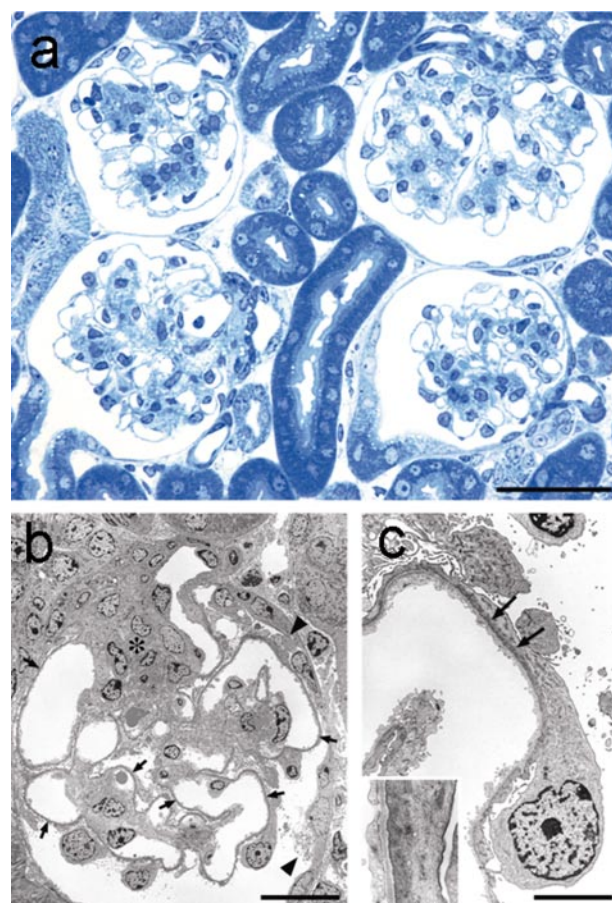


FIGURE 1. Structural damage in 3-week-old CD2AP^{-/-} mice concerns the podocytes simultaneously in all glomeruli. *a*, overview of cortical tissue with four glomerular profiles, all of them exhibiting prominent mesangial expansion in the center of each lobule. *b*, low power transmission electron microscopy showing an entire glomerular profile. Foot process effacement is universally encountered as indicated by the continuous dark line (arrows) along the entire glomerular basement membrane. As seen by higher magnification in panel *c*, this dark line represents the dense actin-based cytoskeletal mat (arrows) that resulted from the fusion of the foot processes. Insert in panel *c* shows part of the area between the two arrows; the actin cytoskeleton including α -actinin densities is clearly visible. Note the broadening of the glomerular stalk (asterisk). Already at this stage injuries are also seen at parietal epithelial cells (arrowheads in panel *b*). Bar length, 50 μ m (*a*), 20 μ m (*b*), and 5 μ m (*c*).

tion profiles in various CD2AP^{-/-} podocytes clones (see “Podocyte Culture” under “Materials and Methods”). Depending on the growth factors tested we detected a more pronounced effect on signal initiation or on signal termination in the activation profiles of PI3K/AKT or ERK1/2. After stimulation with insulin-like growth factor 1 (100 ng/ml) we could not detect a significant difference in phosphorylation of AKT in CD2AP^{-/-} podocytes compared with CD2AP^{+/+} podocytes. However, in CD2AP^{-/-} podocytes phosphorylation of ERK1/2 was terminated already at 4 h after stimulation, whereas strong phosphorylation was still visible 24 h after stimulation in CD2AP^{+/+} podocytes (Fig. 2, *A* and *B*). In contrast, treatment of the cells with FGF (20 ng/ml) or VEGF (20 ng/ml) resulted in weak AKT phosphorylation (Fig. 2*A*) or ERK1/2 phosphorylation (Fig. 2*B*) in CD2AP^{-/-} podocytes compared with CD2AP^{+/+} cells.

Treatment of the cells with platelet-derived growth factor, hepatocyte growth factor, or epidermal growth factor revealed

CD2AP/CIN85 Balance Determines RTK Signaling in Podocytes

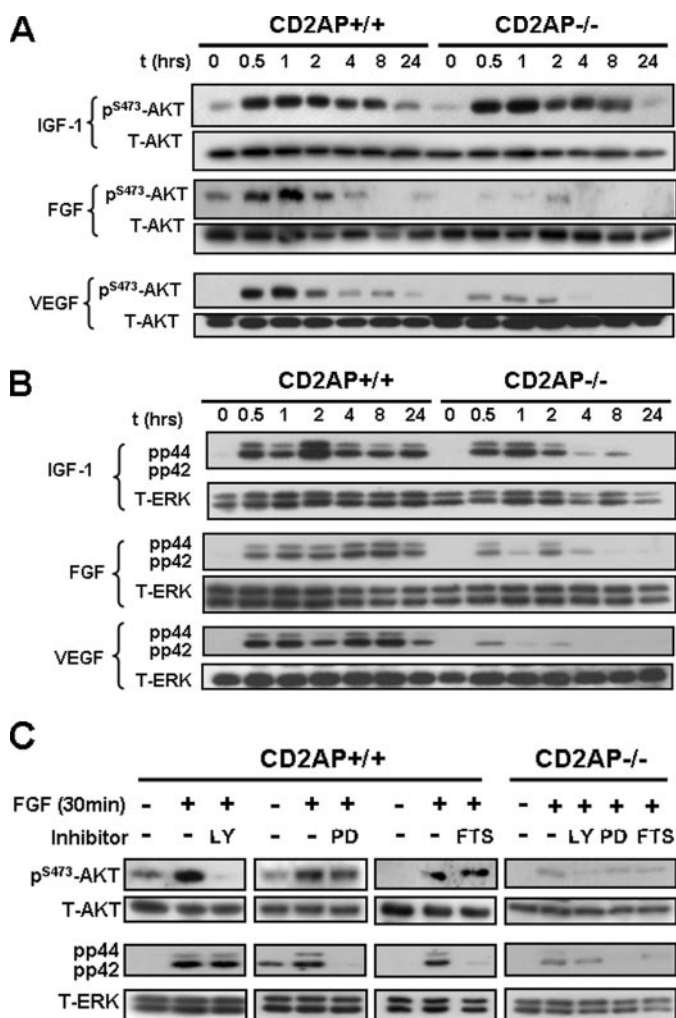


FIGURE 2. CD2AP deficiency results in disturbed signal initiation and/or signal termination of RTK-induced PI3K/AKT and ERK1/2 signaling in podocytes. CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} podocytes were maintained for 14 days under non-permissive conditions and were treated with insulin-like growth factor 1 (*IGF-1*), FGF, or VEGF for the time points indicated. CD2AP deficiency results in severely disturbed PI3K/AKT (A) and ERK1/2 signal (B) activation profiles after stimulation with insulin-like growth factor 1, FGF, or VEGF compared with wild-type control cells. C, ERK pathway activation in podocytes is independent of PI3K activation but dependent on Ras-Raf-MEK activation. CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} podocytes were treated with FGF for 30 min in the absence or presence of PI3K inhibitor LY294002 (LY), Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid (FTS), or MEK inhibitor PD98059 (PD). Inhibition of PI3K/AKT had no effect on ERK activation and inhibition of MEK or Ras had no effect on PI3K/AKT activation in podocytes. Results are representative for three independent experiments in different clones.

activation defects similar to the treatment with insulin-like growth factor 1 with comparable phosphorylation levels for AKT and ERK1/2 but earlier signal termination in CD2AP^{-/-} podocytes (data not shown).

It has been demonstrated that direct interaction of CD2AP with the p85 subunit of PI3K resulted in AKT phosphorylation (6). However, so far only little is known about potential interaction partners of CD2AP resulting in phosphorylation of ERK1/2 (15). To dissect the possible pathway defects we first investigated whether phosphorylation of AKT and ERK1/2 are dependent on each other. In some cell types PI3Ks have been identified as effectors of Ras proteins (16). Therefore, we used chemical inhibitors of PI3K, Ras, and MEK activation to selec-

tively mimic the situation found in CD2AP^{-/-} cells. Using the PI3K inhibitor LY294002 we detected specific inhibition of PI3K/AKT phosphorylation but no effect on ERK1/2 phosphorylation (Fig. 2C). Preincubation of the cells with farnesylthiosalicylic acid or PD98059 for specific inhibition of Ras and MEK activation resulted in complete abrogation of ERK1/2 phosphorylation but no effect was detectable on PI3K/AKT signaling. To elucidate whether the signaling defect in CD2AP^{-/-} podocytes is localized upstream of Ras-GTP we examined phospho-Raf in CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} cells. In CD2AP^{-/-} podocytes we did not detect phospho-Raf, indicating that the CD2AP-dependent effect is localized upstream of Ras-Raf activation (data not shown). Taken together these results indicate that CD2AP is essential for the normal course of both signaling cascades. Furthermore, in podocytes the activation of both pathways is not dependent on each other, suggesting an autonomous role for CD2AP in the regulation of these two pathways.

CD2AP^{-/-} Podocytes Show an Inducible Disruption of Grb2-SOS Binding Profile and an Inducible Binding of Grb2-CIN85 after Stimulation of RTK with FGF or VEGF—Because Ras activation is directly influenced by Grb2-SOS (son of sevenless) binding, we wanted to examine whether CD2AP deficiency has an influence on Grb2-SOS binding activity in podocytes. Therefore, we performed GST-Grb2 pull-down experiments with cell lysates of CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} podocytes. On stimulation of CD2AP^{-/-} podocytes with FGF (20 ng/ml) we detected significant reduction of Grb2-SOS binding after 30 min. Interestingly, we also detected binding of CIN85 to Grb2 after stimulation of CD2AP^{-/-} podocytes with FGF for 30 min (Fig. 3A). Investigating a time course in CD2AP^{+/+} cells, we detected a reduction of Grb2-SOS binding 4 h after stimulation with FGF accompanied by binding of CIN85 to Grb2. Stimulation of podocytes with VEGF also resulted in inducible binding of CIN85 and reduced binding of SOS to Grb2. Again reduction of Grb2-SOS binding was detectable at later time points in CD2AP^{+/+} podocytes as well (Fig. 3B). To further evaluate our Grb2 pull-down experiments, we examined the base-line expression levels of involved proteins in unstimulated CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} podocyte clones. We found no difference in the basic expression levels of SOS or Grb2; however, in lysates of CD2AP^{-/-} clones we detected a marked increase in basic expression of two isoforms of CIN85, a paralog of CD2AP (Fig. 3C). In summary, these results demonstrate that CD2AP deficiency leads to a dysregulation of Grb2-SOS binding in podocytes. Moreover, loss of CD2AP results in up-regulation of CIN85, a binding partner of Grb2, competing with SOS for Grb2 binding. The inducible binding of CIN85 to Grb2 in CD2AP^{+/+} podocytes at later time points may indicate that this interaction is part of the physiological ERK1/2 signal termination in podocytes.

Dysregulated Expression of CIN85 and Subsequent Signaling Defects Are Dependent on the Differentiation State of Podocytes—Interestingly, examination of the signaling response in undifferentiated, proliferating CD2AP^{-/-} podocytes showed that these cells were not affected in activation of ERK1/2 after stimulation with FGF. In contrast to differentiated cells in undifferentiated, proliferating CD2AP^{+/+} and

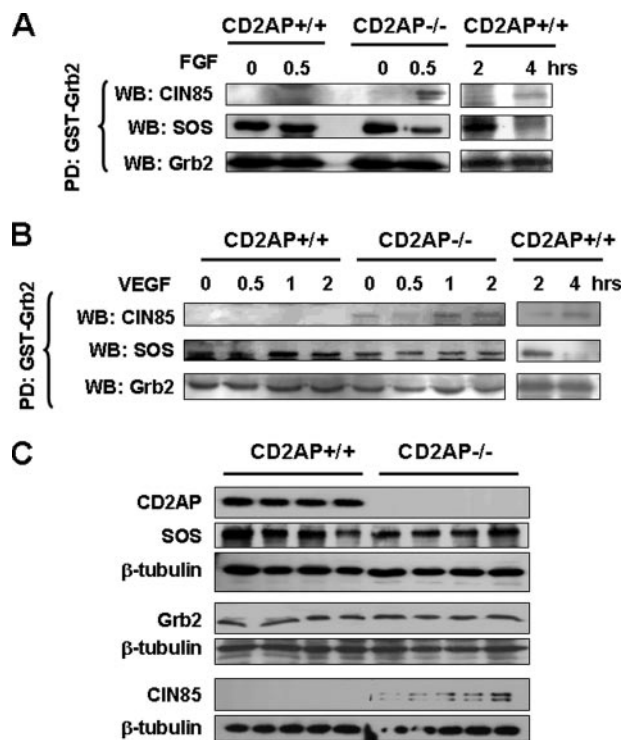


FIGURE 3. GST-Grb2 pull-down experiments reveal cytokine-inducible disruption of Grb2-SOS binding and inducible interaction of CIN85 with Grb2. Pull-down experiments with full-length GST-Grb2 were performed in lysates of CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} podocytes left untreated or treated with FGF (A) or VEGF (B) for the time points indicated. Grb2-SOS binding is disrupted earlier in CD2AP^{-/-} podocytes compared with CD2AP^{+/+} cells. Cytokine-inducible binding of CIN85 to Grb2 is detected earlier in CD2AP^{-/-} podocytes. Results are representative for three independent experiments in different clones. C, Western blot shows basic expression levels of proteins involved in ERK1/2 activation in CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} podocyte clones. Podocytes were maintained for 14 days under non-permissive conditions, and Western blot was performed and developed with antibodies specific for CD2AP, SOS, Grb2, and Cin85. Blots were reincubated with a β -tubulin-specific antibody to normalize for protein content.

CD2AP^{-/-} podocytes the signal initiation and termination profiles of ERK1/2 were identical (Fig. 4A). When we examined CIN85 protein expression levels, we detected low expression of CIN85 that was identical to undifferentiated wild-type cells. When we harvested the cells after 2, 6, 8, and 12 days of differentiation, we found in CD2AP^{-/-} podocytes an accumulation of CIN85 protein. In contrast, in CD2AP^{+/+} podocytes the expression level of CIN85 was unchanged (Fig. 4B). The degree of differentiation was not different between CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} podocytes as indicated by comparable levels of the differentiation marker synaptopodin. However, when we examined the expression of CIN85 mRNA in differentiating cells we did not detect a difference in CIN85 mRNA levels between CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} cells over time (data not shown). Next we examined the phosphorylation response of ERK1/2 after stimulation with FGF at different points of differentiation and found that in CD2AP^{-/-} cells ERK1/2 activation decreased with ongoing differentiation in CIN85-expressing cells (Fig. 4C). To confirm that the effect on ERK1/2 phosphorylation had been modulated by CIN85 in differentiated CD2AP^{-/-} cells, we selectively down-regulated CIN85 expression using a lentivirus-based CIN85 siRNA expression vector. As expected, ERK1/2 phosphorylation had been restored in dif-

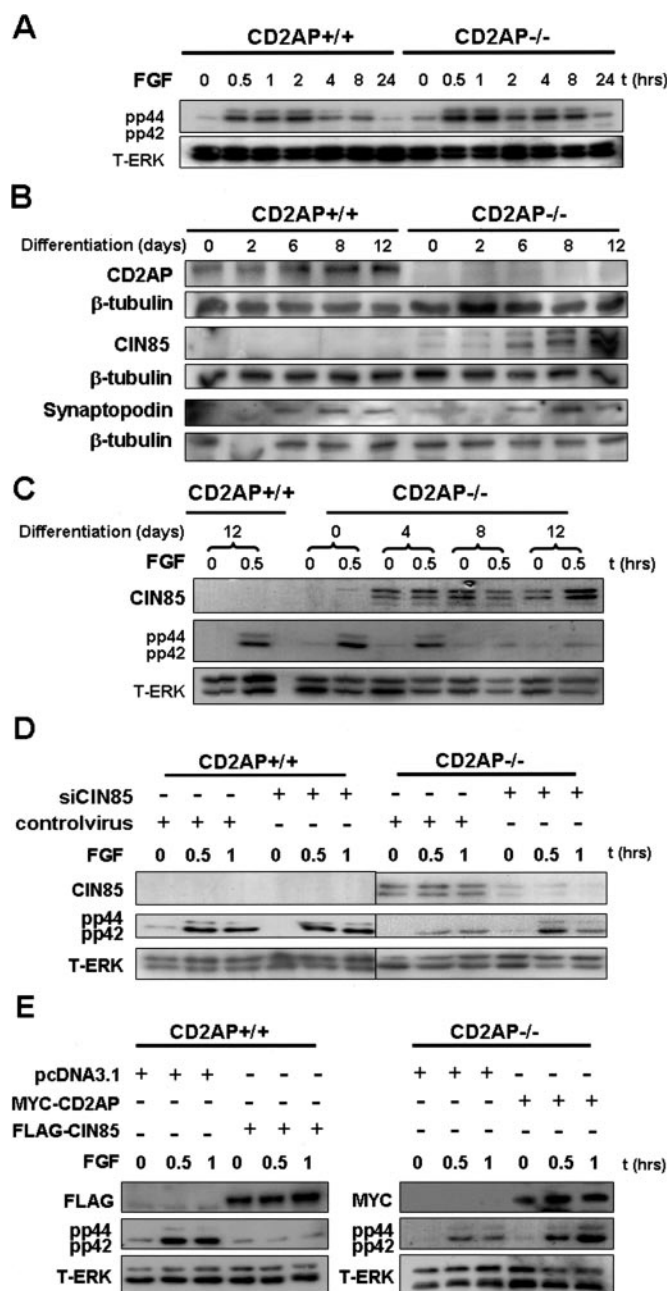


FIGURE 4. CIN85 expression depends on differentiation state, and the expression level of CIN85 determines the signaling response in podocytes. A, CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} podocytes kept under permissive conditions at 33 °C in the proliferating state were treated with FGF for the time points indicated. CD2AP deficiency in undifferentiated cells had no effect on ERK1/2 signal activation profiles after stimulation with FGF compared with CD2AP^{+/+} cells. B, Western blot demonstrates increase in CIN85 protein expression levels in CD2AP^{-/-} podocytes compared with CD2AP^{+/+} podocytes with days of culture in non-permissive conditions. C, CD2AP^{+/+} cells after 12 days of differentiation and CD2AP^{-/-} cells after 0, 4, 8, and 12 days of differentiation were stimulated with FGF for 0.5 h, and ERK1/2 activation was visualized by Western blot. ERK1/2 activation decreases with increase of CIN85 protein expression. D, CIN85 expression was silenced in CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} podocytes differentiated for 12 days using a lentivirus-based siRNA vector, and ERK1/2 activation was monitored on a Western blot after stimulation with FGF for the time points indicated. Signaling response is restored after silencing of CIN85 in CD2AP^{-/-} podocytes. E, Western blot demonstrates disrupted signaling response in CD2AP^{+/+} podocytes transiently transfected with a FLAG-tagged CIN85 expression construct (left panel) and restored signaling response in CD2AP^{-/-} podocytes transiently transfected with a Myc-tagged CD2AP expression construct compared with control pcDNA3.1-transfected cells (right panel). Results are representative for three independent experiments in different clones.

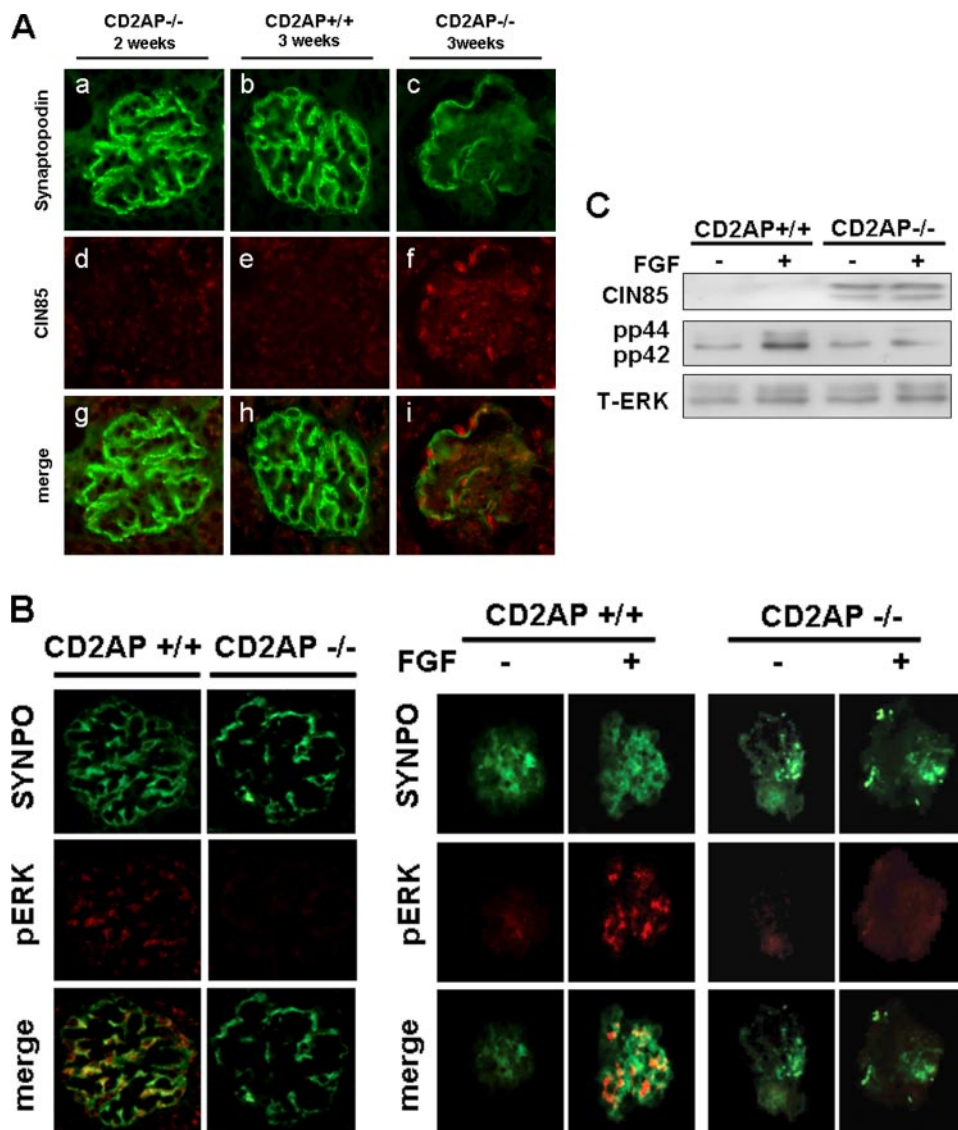


FIGURE 5. CIN85 is expressed in the majority of podocytes in 3-week-old CD2AP^{-/-} mice and leads to a suppressed glomerular signaling response. A, fluorescence labeling demonstrates expression of CIN85 (red fluorescence) and synaptopodin (green fluorescence) in renal cortex sections of 2-week-old CD2AP^{-/-} (a, d, g), 3-week-old CD2AP^{+/+} (b, e, h), and 3-week-old CD2AP^{-/-} (c, f, i) mice using anti-CIN85 (d, e, f) and anti-synaptopodin (a, b, c) antibodies, merged in panels g, h, i. B, fluorescence labeling demonstrates reduced base-line expression of pERK (red fluorescence) in synaptopodin-labeled podocytes (green fluorescence) in renal cortex sections of 3-week-old CD2AP^{-/-} mice (left panel) and reduced activation in isolated glomeruli after stimulation with FGF (right panel). C, Western blot demonstrates increase in CIN85 protein expression levels in glomerular extracts of 3-week-old CD2AP^{-/-} mice and attenuated phosphorylation response after stimulation with FGF compared with 3-week-old CD2AP^{+/+} mice.

ferentiated podocytes by suppression of CIN85 expression (Fig. 4D). Introduction of the siRNA expression vector in CD2AP^{+/+} cells did not result in a changed signaling response after growth factor stimulation. In contrast, transient overexpression of CIN85 in CD2AP^{+/+} cells resulted in a significant decrease of ERK phosphorylation whereas the transient expression of CD2AP in CD2AP^{-/-} cells could partially rescue the activation response (Fig. 4E). Taken together, these data indicate that a changed CD2AP/CIN85 balance leads to a severe dysregulation of RTK-mediated signaling in podocytes *in vitro*.

CIN85 Is Up-regulated in Podocytes in Diseased CD2AP^{-/-} Mice and Leads to a Reduced ERK Signaling Response—CD2AP^{-/-} mice are born normal and develop a nephrotic syn-

drome only 3 weeks after birth. Before the onset of proteinuria there is complete integrity of podocytes and the slit diaphragm proteins nephrin and podocin, the two well described interaction partners of CD2AP at the glomerular filtration slit, are completely unaffected (14, 17, 18). We examined expression of CIN85 in CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} mice and found that CIN85 is up-regulated in glomeruli and tubuli in diseased 3-week-old CD2AP^{-/-} mice. In the glomerulus we observed strong expression of CIN85 in the majority of podocytes throughout the whole kidney in diseased 3-week-old CD2AP^{-/-} mice (Fig. 5A, panels c, f, i). In contrast, in 2-week-old non-proteinuric CD2AP^{-/-} mice no CIN85 expression was detected (Fig. 5A, a, d, g), similar to CD2AP^{+/+} control animals (Fig. 5A, panels b, e, h). Interestingly, this corresponds to a lower base-line expression level of pERK in podocytes *in vivo* (Fig. 5B, left panel). To link increased CIN85 expression with impaired ERK signaling response *in vivo* we isolated glomeruli of CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} mice, treated them in a culture dish with FGF, and examined pERK levels in cryosections and by Western blot analysis. As expected, we detected a reduced ERK signaling response in podocytes in CD2AP^{-/-} glomeruli after FGF stimulation (Fig. 5B, right panel). These data are supported by a reduced pERK response detected in protein lysates of CD2AP^{-/-} glomeruli (Fig. 5C). Consistently, we detected a high level of CIN85 protein in the examined glomerular extracts.

Taken together, these data indicate that CD2AP deficiency leads to a dysregulated expression of CIN85 in podocytes *in vivo* resulting in a changed signaling response.

DISCUSSION

PI3K and Ras/ERK MAPK are two of the most important signaling pathways in eukaryotic cells. Recruitment of PI3K to the plasma membrane requires the regulatory subunit p85. The SH2 domain of p85 binds to phosphorylated tyrosine residues in specific docking sites of the intracellular domain of RTKs or adaptor proteins (1). MAPK pathways convey signals via phosphorylation events and form a complex with their cognate MAPKs utilizing their common docking domain, and a vari-

ety of scaffolding proteins interact with several components of the MAPK cascades to tether both enzymes and substrates specifically to achieve accurate signal transduction (19). CD2AP and CIN85 are ubiquitously expressed adaptor molecules containing three SH3 domains, a proline-rich region, and a coiled-coil domain (20). In this study we report the regulatory involvement of the CD2AP/CIN85 balance in the orchestrated signal transduction response induced by RTKs in podocytes. We hypothesize that in podocytes CD2AP and CIN85 are the key components influencing initiation, maintenance, and termination of RTK-transduced signals. Further on, dysregulation in this balance, as induced by the CD2AP knock out, affects all signaling networks influenced by RTKs. As a consequence, important differentiation and survival signaling cascades necessary for the maintenance of a normal glomerular tuft are disturbed.

To support our hypothesis we provide the following lines of evidence:

First, we showed that CD2AP deficiency in mice results in a synchronized podocyte damage with global foot process effacement simultaneously in all glomeruli. Moreover, our results from CD2AP-deficient podocytes indicate a profound defect in AKT and ERK1/2 signaling response after stimulation of RTKs with various growth factors. Therefore, we presume that CD2AP acts in podocytes as a necessary cofactor for early and continuous activation of PI3K/AKT and ERK1/2 signaling response after stimulation of RTKs. Particularly in the case of VEGF this is of great interest because this would directly affect paracrine signaling activity via VEGF in podocytes. Depending on recent data, this mechanism is discussed as important for podocyte survival *in vitro* (21, 22). Because these signaling effects were demonstrated for the activation of the PI3K/AKT and the Ras-ERK-MAPK pathway, we confirmed that these two pathways are not dependent on each other. We demonstrated that selective inhibition of MEK or Ras in wild-type podocytes did not affect PI3K/AKT activation and, in turn, inhibition of PI3K/AKT did not affect ERK1/2 phosphorylation. Depending on these data, we suggest that in podocytes the activation of these two distinct pathways is clearly not dependent on each other.

Second, when we examined Grb2-SOS binding we detected a dynamic binding using GST-Grb2 pull-down experiments. Grb2-SOS binding is reduced in CD2AP^{-/-} cells after growth factor stimulation, and there is inducible binding of CIN85 to Grb2 already 30 min after growth factor stimulation. When we performed extended time course experiments growth factor-inducible reduction of Grb2-SOS and inducible Grb2-CIN85 binding was also detectable in wild-type cells, but at later time points. Interestingly, Grb2 was identified earlier in association with CIN85 complexes in other cells; however, a time-dependent dynamic of this interaction was not previously described (23). In other epithelial cells, CIN85 is a well known mediator of ligand-dependent ubiquitination and down-regulation of RTKs (12, 24, 25), and is also described as a regulator of MEKK activity (26). Therefore we assume that the dysregulated expression of CIN85 in podocytes accounts for the detected signaling effects on different levels. To further confirm our results we also examined the potential role of disabled-2 (Dab-2) in our

system. Dab-2 is a tumor suppressor gene with a C-terminal proline-rich SH3-binding domain. Binding of Dab-2 to Grb2 is described as disrupting SOS binding and suppressing downstream ERK phosphorylation in other cells (27). When we examined Grb2-Dab-2 interaction in CD2AP^{+/+} and CD2AP^{-/-} podocytes, we did not detect a difference in binding of Grb2-Dab-2 in the presence or absence of growth factors (data not shown).

Third, our *in vitro* data confirm that the expression of CIN85 and the associated signaling effects are dependent on the differentiation state of the podocytes. We demonstrated in CD2AP^{-/-} podocytes that with ongoing degree of differentiation the expression of CIN85 protein increased. Depending on the differentiation a diminished ERK1/2 phosphorylation coincided with up-regulated CIN85 expression in the CD2AP^{-/-} podocytes. Silencing of CIN85 can restore the signaling answer in fully differentiated CD2AP^{-/-} podocytes. Transient overexpression of CIN85 in CD2AP^{+/+} cells leads to a similar disruption of ERK signaling, whereas transient expression of CD2AP in CD2AP^{-/-} cells can partially restore the signaling response.

Fourth, we detected in podocytes of 3-week-old CD2AP^{-/-} mice a dramatic increase of CIN85 protein expression. In the diseased mice expression of CIN85 protein is detectable in the majority of podocytes. In contrast, in 2-week-old CD2AP^{-/-} mice and CD2AP^{+/+} mice we did not detect CIN85 expression in podocytes. We detected decreased base-line ERK activity in podocytes of 3-week-old CD2AP^{-/-} mice and demonstrated a diminished response to growth factor stimulation on isolated glomeruli. Finally, we take our findings of synchronized podocyte damage and the uniformity of the lesions as additional evidence that we elucidated a dysregulated physiological mechanism in podocytes. We conclude from our results that CD2AP and CIN85 are responsible for a very delicate physiological balance that is important for RTK response in podocytes. The up-regulation of CIN85 *in vivo* in podocytes might have devastating effects on the normal physiological paracrine and exocrine signals that are necessary to maintain functional podocytes. Secondary to that, the regulatory axis involving a cross-talk of podocytes to endothelial cells and/or mesangial cells is severely deteriorated, leading to the observed phenotype in CD2AP^{-/-} mice. Because the podocyte-specific rescue of CD2AP in the mouse model system leads to a normal phenotype with no other abnormality detected (28), we presume that this mechanism is specific for podocytes. In other cell types CIN85 function might compensate for CD2AP deficiency. The podocyte-specific rescue model also demonstrates that the concomitant and prominent mesangiolysis and mesangial proliferation, as well as the parietal cell damage, are secondary to the podocyte damage. So far, work from various groups has demonstrated similar functions for CD2AP and CIN85 in receptor down-regulation (12, 29). Our data demonstrate for the first time that these molecules might have antagonizing functions.

Acknowledgments—We thank Melanie Paschy, Herle Chlebusch, Robert Laudeley, Brunhilde Hähnel, and Hiltraud Hosser for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Vanhaesebroeck, B., and Waterfield, M. D. (1999) *Exp. Cell Res.* **253**, 239–254
2. Chang, L., and Karin, M. (2001) *Nature* **410**, 37–40
3. Schiffer, M., Mundel, P., Shaw, A. S., and Bottinger, E. P. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 37004–37012
4. Bridgewater, D. J., Ho, J., Sauro, V., and Matsell, D. G. (2005) *Kidney Int.* **67**, 1308–1314
5. Peters, I., Tossidou, I., Achenbach, J., Woroniecki, R., Mengel, M., Park, J. K., Paschy, M., de Groot, K., Haller, H., and Schiffer, M. (2006) *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1644–1656
6. Huber, T. B., Hartleben, B., Kim, J., Schmidts, M., Schermer, B., Keil, A., Egger, L., Lecha, R. L., Borner, C., Pavenstadt, H., Shaw, A. S., Walz, G., and Benzing, T. (2003) *Mol. Cell Biol.* **23**, 4917–4928
7. Gout, I., Middleton, G., Adu, J., Ninkina, N. N., Drobot, L. B., Filonenko, V., Matsuka, G., Davies, A. M., Waterfield, M., and Buchman, V. L. (2000) *EMBO J.* **19**, 4015–4025
8. Lynch, D. K., Winata, S. C., Lyons, R. J., Hughes, W. E., Lehrbach, G. M., Wasinger, V., Corthals, G., Cordwell, S., and Daly, R. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 21805–21813
9. Bruck, S., Huber, T. B., Ingham, R. J., Kim, K., Niederstrasser, H., Allen, P. M., Pawson, T., Cooper, J. A., and Shaw, A. S. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 19196–19203
10. Cormont, M., Meton, I., Mari, M., Monzo, P., Keslair, F., Gaskin, C., McGraw, T. E., and Marchand-Brustel, Y. (2003) *Traffic* **4**, 97–112
11. Kowanetz, K., Husnjak, K., Holler, D., Kowanetz, M., Soubeyran, P., Hirsch, D., Schmidt, M. H., Pavelic, K., De Camilli, P., Randazzo, P. A., and Dikic, I. (2004) *Mol. Biol. Cell* **15**, 3155–3166
12. Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W. Y., and Dikic, I. (2002) *Nature* **416**, 183–187
13. Mundel, P., Reiser, J., Zuniga Mejia, B. A., Pavenstadt, H., Davidson, G. R., Kriz, W., and Zeller, R. (1997) *Exp. Cell Res.* **236**, 248–258
14. Shih, N. Y., Li, J., Karpitskii, V., Nguyen, A., Dustin, M. L., Kanagawa, O., Miner, J. H., and Shaw, A. S. (1999) *Science* **286**, 312–315
15. Kirsch, K. H., Georgescu, M. M., Ishimaru, S., and Hanafusa, H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6211–6216
16. Pacold, M. E., Suire, S., Perisic, O., Lara-Gonzalez, S., Davis, C. T., Walker, E. H., Hawkins, P. T., Stephens, L., Eccleston, J. F., and Williams, R. L. (2000) *Cell* **103**, 931–943
17. Shih, N. Y., Li, J., Cotran, R., Mundel, P., Miner, J. H., and Shaw, A. S. (2001) *Am. J. Pathol.* **159**, 2303–2308
18. Schwarz, K., Simons, M., Reiser, J., Saleem, M. A., Faul, C., Kriz, W., Shaw, A. S., Holzman, L. B., and Mundel, P. (2001) *J. Clin. Investig.* **108**, 1621–1629
19. Gaestel, M. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 120–130
20. Dikic, I. (2002) *FEBS Lett.* **529**, 110–115
21. Guan, F., Villegas, G., Teichman, J., Mundel, P., and Tufro, A. (2006) *Am. J. Physiol.* **291**, F422–F428
22. Foster, R. R., Satchell, S. C., Seckley, J., Emmett, M. S., Joory, K., Xing, C. Y., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., Bates, D. O., and Harper, S. J. (2006) *Am. J. Physiol.* **291**, F196–F207
23. Watanabe, S., Take, H., Takeda, K., Yu, Z. X., Iwata, N., and Kajigaya, S. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **278**, 167–174
24. Szymkiewicz, I., Kowanetz, K., Soubeyran, P., Dinarina, A., Lipkowitz, S., and Dikic, I. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 39666–39672
25. Petrelli, A., Gilestro, G. F., Lanzardo, S., Comoglio, P. M., Migone, N., and Giordano, S. (2002) *Nature* **416**, 187–190
26. Aissouni, Y., Zapart, G., Iovanna, J. L., Dikic, I., and Soubeyran, P. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 808–814
27. Zhou, J., and Hsieh, J. T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 27793–27798
28. Grunkemeyer, J. A., Kwok, C., Huber, T. B., and Shaw, A. S. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 29677–29681
29. Lee, K. H., Dinner, A. R., Tu, C., Campi, G., Raychaudhuri, S., Varma, R., Sims, T. N., Burack, W. R., Wu, H., Wang, J., Kanagawa, O., Markiewicz, M., Allen, P. M., Dustin, M. L., Chakraborty, A. K., and Shaw, A. S. (2003) *Science* **302**, 1218–1222

Das Wechselspiel der Proteine CD2AP/CIN85 reguliert die Funktion der Schlitzmembran.

CD2AP/CIN85 protein balance regulates the slit diaphragm turnover

Tossidou, I. et al..

Manuskript in Preparation.

4 Das Wechselspiel der Proteine CD2AP/CIN85 reguliert die Funktion der Schlitzmembran

CD2AP und CIN85 sind Mediatoren bzw. Modulatoren der intrazellulären Signaltransduktionskaskaden PI3K/AKT und ERK (Aissouni et al., 2005; Dikic, 2002; Huber et al., 2003; Tossidou et al., 2007, eigene Originalarbeit). Eine Störung dieser Signalwege führt *in vivo* und *in vitro* zur Apoptose (Schiffer et al., 2004). Das Wechselspiel zwischen den beiden Proteinen CD2AP und CIN85 spielt eine entscheidende Rolle für die Aktivierung der meisten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. In CD2AP^{-/-} Podozyten führt die Hochregulation der CIN85-Expression zu einer Verminderung der Aktivierung von ERK1/2 bzw. zu einer schnellen Terminierung der ERK1/2-Aktivität (Tossidou et al., 2007, eigene Originalarbeit). Da CD2AP ein wichtiger Interaktionspartner von Nephrin und Podocin an der Schlitzmembran ist, soll die Beteiligung von CIN85 an der physiologischen Funktion der Schlitzmembran geklärt werden. Ziel dieser, als „Manuskript in Preparation“ vorliegenden Teil-Arbeit dieser kumulativen Dissertation ist es, die Auswirkungen des Wechselspiels der Proteine CD2AP/CIN85 auf die Integrität der Schlitzmembranproteine Nephrin und Podocin zu analysieren.

4.1 Expression von CIN85-mRNA in CD2AP^{+/+} und CD2AP^{-/-} Podozyten

CIN85 wird als Protein in differenzierten CD2AP^{-/-} Podozyten exprimiert. CD2AP^{+/+} Podozyten dagegen zeigen eine sehr schwache Expression des CIN85-Proteins (Tossidou et al., 2007, eigene Originalarbeit). Aufgrund von alternativem Spleißen und unterschiedlichen Promotoren konnten verschiedene mRNAs von CIN85 nachgewiesen werden, die zur Expression unterschiedlicher Protein-Varianten führten. (Buchmann et al., 2002; Gout et al., 2000). Wir haben die Expression von CIN85-mRNA in CD2AP^{+/+} und CD2AP^{-/-} Podozyten mittels einer Real-Time-PCR (RT-PCR) untersucht.

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem RNeasy Kit (Qiagen). 2 µg RNA wurden mittels Random-Primern in cDNA transkribiert. Der N- und C-terminale Teil von CIN85 wurde mittels einer Standard-PCR (30 Zyklen) amplifiziert. Folgende Maus-CIN85 Primer wurden benutzt (genaue Position der Primer siehe Abb.14):

m1:5'-TTCCGCCAACTTTCACTCTG-3' (Buchmann et al., 2002)

mmn: 5'-GGCAGGAAGTCATTTTCCAC-3' (Buchmann et al., 2002)

m6: 5'-GGCATCCTGGATAAGGCCTC-3' (Gaidos et al., 2007)

mc: 5'-TTCACCTCCATCTGCAACCG-3' (Buchmann et al., 2002)

Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarose-Gel analysiert (Abb.14).

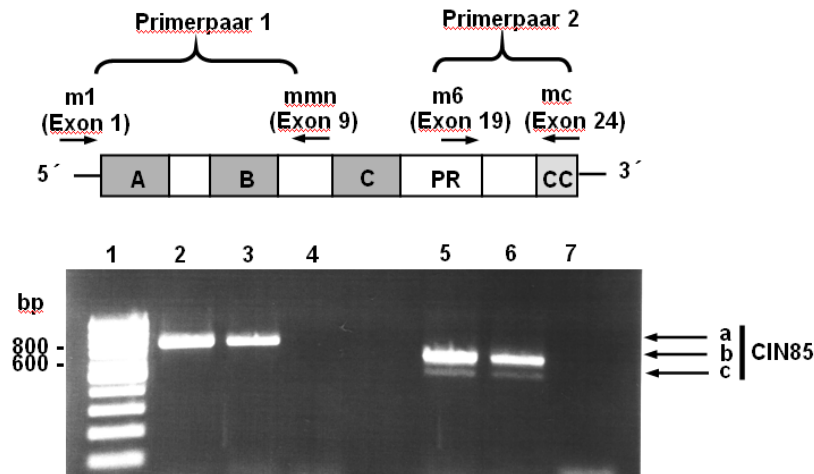


Abb.14 Expression von CIN85-mRNA-Isoformen in CD2AP+/+ und CD2AP-/- Podozyten
RT-PCR-Produkte aus cDNA von CD2AP+/+ und CD2AP-/- Podozyten wurden auf einem Agarose-Gel visualisiert.

1: Standard; 2/5: CD2AP+/+; 3/6: CD2AP-/-; 4/7: Kontrolle (PCR ohne cDNA)

2-4: Amplifiziert mit Primerpaar 1

5-7: Amplifiziert mit Primerpaar 2

a, b und c amplifizierte cDNA

Es konnten drei CIN85-Isoformen in CD2AP+/+ und CD2AP-/- Podozyten identifiziert werden. Auf transkriptioneller Ebene war kein Unterschied in der Expression von CIN85 zwischen CD2AP+/+ und CD2AP-/- Podozyten nachweisbar. Auch von einer anderen Gruppe konnten erst vor kurzem diese drei Isoformen (a, b und c) in Podozyten nachgewiesen werden (Gaidos et al., 2007) (Abb.14). Nach Sequenzierung der drei cDNA-Produkte zeigte sich, dass die dominanten Varianten a und b full-length-Varianten von CIN85 sind und das PCR-Produkt c eine CIN85-Variante ist, der Exon 21 fehlt (Gaidos et al., 2007).

4.2 Interaktion von CD2AP und CIN85

CD2AP und CIN85 sind als wichtige Adapterproteine in Signaltransduktionskaskaden verschiedenster Zelllinien involviert (Aissouni et al., 2005; Gout et al., 2000; Huber et al.,

2003; Schiffer et al., 2004). Überexpressions-Experimente in der humanen, embryonalen Nierenepithelzelllinie 293T konnten erst vor kurzem zeigen, dass CD2AP und CIN85 über ihre Coiled-Coil-Domäne heterodimerisieren (Gaidos et al., 2007). In Podozyten wurde eine molekulare Interaktion von CD2AP und CIN85 bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht beschrieben. Um eine Interaktion in Podozyten detektieren zu können, müssen beide Proteine überexprimiert werden, da endogenes CIN85-Protein in CD2AP^{+/+} Podozyten unter Normalbedingungen nur sehr gering nachweisbar ist (Tossidou et al., 2007, eigene Originalarbeit).

Dazu wurden CD2AP^{+/+} Podozyten mit 1 µg mCIN85-GFP-Plasmid und 1 µg mCD2AP-flag-Plasmid transient transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit der Effectene-Transfektions-Methode (Qiagen). Der Nachweis der Interaktion erfolgte über eine Immunpräzipitation. Dazu wurden die jeweiligen Lysate mit einem anti-flag-Antikörper und Sepharose A angesetzt und über Nacht inkubiert. Als Negativkontrolle diente Lysat untransfizierter Zellen. Um eine unspezifische Bindung von CIN85 an das flag-Peptid auszuschließen, wurde als Kontrolle ein Plasmid transfiziert, das nur die flag-Sequenz enthielt. Die Präzipitate wurden mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abb.15).

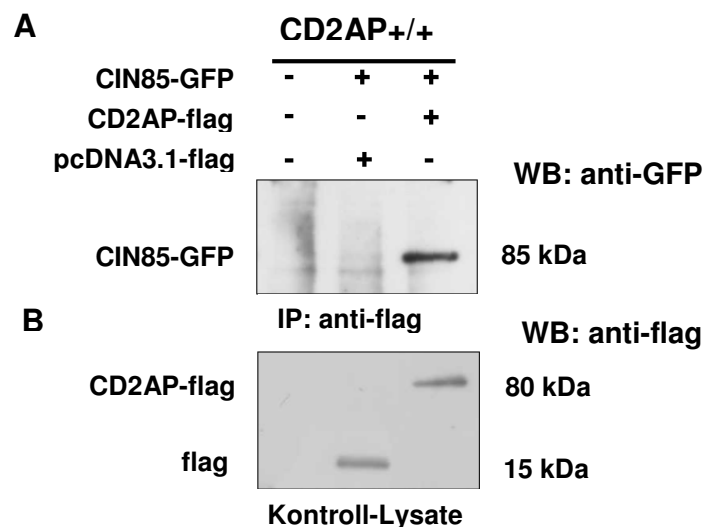


Abb.15 Molekulare Interaktion von CIN85 mit CD2AP in Podozyten

A: Lysate von mit mCIN85-GFP und mCD2AP-flag transient transfizierten CD2AP^{+/+} Podozyten wurden einer Immunpräzipitation mit einem anti-flag-Antikörper unterzogen.

B: Expressionskontrolle von CD2AP-flag und des flag-Peptids in den für die Immunpräzipitation eingesetzten Lysate.

Die Versuche ergaben, dass CIN85 und CD2AP in Podozyten interagieren. Die Regulation der CIN85-Expression wurde bisher nicht untersucht. Eine andere Arbeitsgruppe detektierte CIN85 ebenfalls in Glomeruli von erkrankten CD2AP^{-/-}

Mäusen und stellte die Hypothese auf, dass CIN85 kompensatorisch für das fehlende CD2AP exprimiert wird (Huber et al., 2005).

CIN85 wird *in vitro* sehr stark in differenzierten CD2AP^{-/-} Podozyten exprimiert. In undifferenzierten, proliferierenden CD2AP^{-/-} Podozyten ist es auf Protein-Ebene nicht nachweisbar. Mit zunehmender Differenzierung der CD2AP^{-/-} Podozyten wird die Expression von CIN85 hochreguliert (Tossidou et al., 2007, eigene Originalarbeit). Um den Beweis zu erstellen, dass CD2AP für die Regulation der CIN85-Expression verantwortlich ist, wurde mittels RNAi (RNA interference) die Expression von CD2AP in CD2AP^{+/+} Podozyten inhibiert. In einem differenzierungsabhängigen Zeitverlauf wurde die Expression von CIN85 untersucht. Hierfür wurde kommerziell erhältliche siRNA (small interfering RNA) verwendet (Santa Cruz). Die Transfektion der CD2AP^{+/+} Podozyten mit der CD2AP-siRNA erfolgte mit der Oligofectamine-Methode (Invitrogen) entsprechend der Herstellerangaben. Parallel wurde eine identische Versuchsreihe mit einer Kontroll-siRNA durchgeführt, die eine unspezifische Sequenz besitzt und somit keine bekannte mRNA inhibiert. Die Transfektion erfolgte während der proliferativen, undifferenzierten Phase. Die transfizierten Podozyten wurden danach bei 37 °C zur Differenzierung kultiviert. Die Expression von CIN85 wurde mittels Western-Blot analysiert (Abb.16).

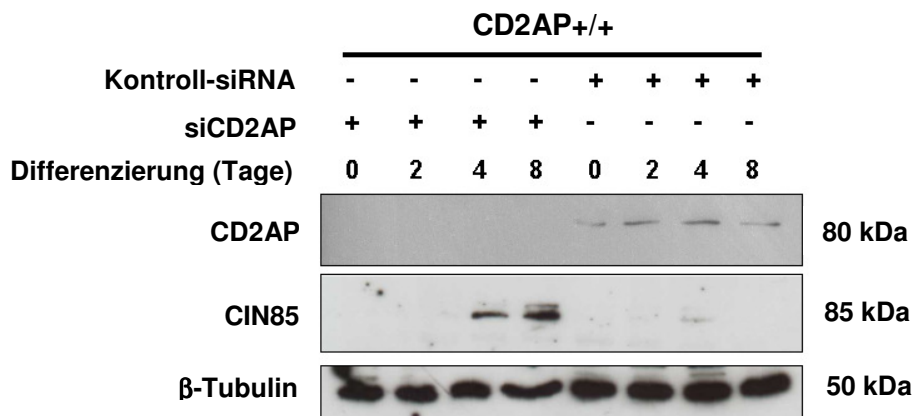


Abb.16 Regulation der CIN85-Expression durch CD2AP

CD2AP^{+/+} Podozyten wurden mit einer CD2AP siRNA transfiziert. Die Expression von CIN85 wurde in einem differenzierungsabhängigen Zeitverlauf (0, 2, 4 und 8 Tage) mittels Western-Blot untersucht. Als Kontrolle wurde eine identische Versuchsreihe mit einer Kontroll-siRNA angesetzt. Die Transfektionskontrolle erfolgte mit einem anti-CD2AP-Antikörper. Als Ladungskontrolle wurde ein anti-β-Tubulin-Antikörper verwendet.

Die Versuchsreihe ergab, dass bei Expressionsinhibition von CD2AP die Expression von CIN85 differenzierungsabhängig in CD2AP^{+/+} Podozyten hochreguliert wird.

4.3 Verminderte Expression von Nephrin und Podocin in CD2AP^{-/-} Podozyten

Nephrin und Podocin sind Schlüsselproteine, die für die Aufrechterhaltung und Integrität der Schlitzmembran eine wichtige Rolle spielen. CD2AP verankert Nephrin und Podocin an der Schlitzmembran (Abb.6, B). Beide Proteine sind in Podozyten Bestandteil von wichtigen Signaltransduktionskaskaden. Die Nephrin-induzierte Signalweiterleitung wird durch Podocin verstärkt. Mutationsanalysen an Nephrin und Podocin ergaben, dass eine unzureichende Signalweiterleitung durch den Nephrin-Podocin-Komplex *in vivo* zur Proteinurie führt (Huber et al., 2001). Wir haben die Expression von Nephrin und Podocin im Zeitverlauf in CD2AP^{+/+} und CD2AP^{-/-} Podozyten mittels Western-Blot untersucht (Abb.17).

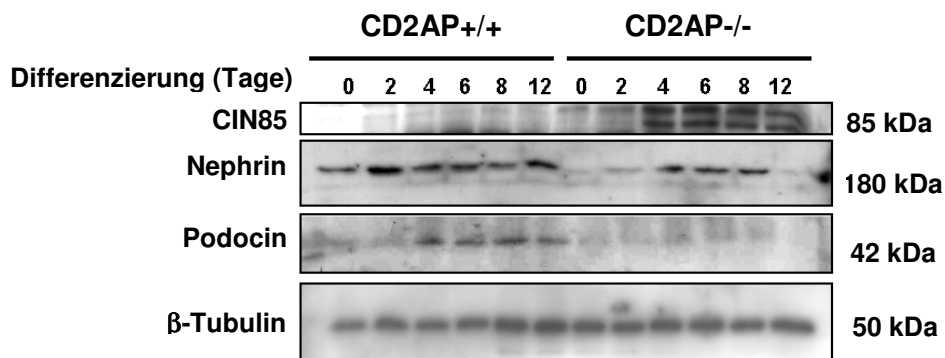


Abb.17 Differenzierungsabhängige Expression von Nephrin und Podocin in CD2AP^{+/+} und CD2AP^{-/-} Podozyten

CD2AP^{+/+} und CD2AP^{-/-} Podozyten wurden 0, 2, 4, 6, 8 und 12 Tage differenziert und mittels Western-Blot die Expression von Nephrin, Podocin und CIN85 analysiert. Als Ladungskontrolle wurde ein anti-β-Tubulin-Antikörper verwendet.

Die Versuche ergaben, dass die Expression von Nephrin mit zunehmender Differenzierung in CD2AP^{-/-} Podozyten herunterreguliert wird. Gleichzeitig erfolgte eine verstärkte Expression von CIN85. Die Expression von Podocin war in CD2AP^{-/-} Podozyten nur schwach zu erkennen. In CD2AP^{+/+} Podozyten hingegen werden Nephrin und auch Podocin differenzierungsabhängig verstärkt exprimiert. Nur differenzierte Podozyten zeigen charakteristische Fußfortsätze und somit eine vorhandene Schlitzmembran (Pavenstädt et al., 2003). Aus unseren Arbeiten kann somit gefolgert werden, dass sich eine funktionell intakte Schlitzmembran in CD2AP^{-/-} Podozyten durch die differenzierungsabhängige Hochregulation der CIN85-Expression nicht ausbilden kann.

4.4 Monoubiquitinierung von Proteinen in CD2AP^{-/-} Podozyten

Eine besondere Art der posttranslationalen Modifikation ist die Ubiquitinierung. Ubiquitin ist ein kleines, 8 kDa großes, ubiquitär exprimiertes Protein, welches kovalent an Lysinreste von Substraten gebunden wird. Die bedeutendste Rolle der Ubiquitinierung ist die Markierung von Proteinen für den proteasomalen Abbau. Substrate, die mit Ubiquitin-Ketten markiert sind (Polyubiquitinierung), werden im Proteasom abgebaut. Die Monoubiquitinierung ist nicht nur charakteristisch für die Endozytose von Rezeptoren sondern auch für transmembrane Proteine. Dabei kann ein Ubiquitin-Molekül oder mehrere (multiple Monoubiquitinierung) an verschiedene Stellen des Zielprotein binden (Haglund et al., 2003; Hicke, 2001). Die Ubiquitinierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in Podozyten sollte nun überprüft werden. Hierzu wurden differenzierte CD2AP^{+/+} und CD2AP^{-/-} Podozyten mit den Wachstumsfaktoren VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) und FGF (*Fibroblast growth factor*) in einem Zeitverlaufsexperiment stimuliert. Mittels Immunpräzipitationen und anschließender Analyse der Präzipitate im Western-Blot konnten die Ubiquitinierungsprofile des VEGF-TypI-Rezeptors (VEGFR1) und FGF-TypI-Rezeptors (FGFR1) in CD2AP^{+/+} und CD2AP^{-/-} Podozyten anhand eines anti-Ubiquitin-Antikörpers untersucht werden (Abb.18).

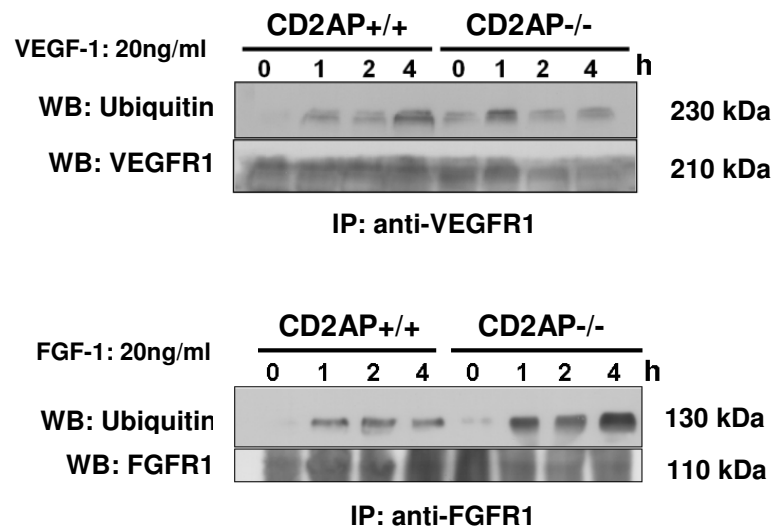


Abb.18 Ubiquitinierungsprofile des VEGFR1 und FGFR1 in CD2AP^{+/+} und CD2AP^{-/-} Podozyten

CD2AP^{+/+} und CD2AP^{-/-} Podozyten wurden mit VEGF-1 oder FGF-1 0, 1, 2 und 4 Stunden stimuliert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem jeweiligen Rezeptor-Antikörper.

Diese Ergebnisse demonstrieren sowohl für den VEGFR1 als auch für den FGFR1 eine schnelle Ubiquitinierung in CD2AP^{-/-} Podozyten. In CD2AP^{-/-} Podozyten wurden beide Rezeptoren bereits nach einer Stunde ubiquitiniert. Da die Größenzunahme der ubiquitinierten Rezeptoren gering war, wird eine Monoubiquitinierung angenommen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Nephrin und Podocin in CD2AP^{-/-} Podozyten differenzierungsabhängig herunterreguliert wird, wobei die Expression von Podocin nur sehr schwach ausgeprägt war. Gleichzeitig konnte eine Hochregulation in der CIN85-Expression beobachtet werden (Abb.17). Im Anschluss sollte die verminderte Expression beider Proteine anhand von Ubiquitinierungsprofilen näher untersucht werden. Differenzierte CD2AP^{+/+} und CD2AP^{-/-} Podozyten wurden mit dem Wachstumsfaktor FGF-1 in einem Zeitverlaufsexperiment stimuliert. Mittels Immunpräzipitation beider Proteine und anschließender Analyse der Präzipitate im Western-Blot konnten die Ubiquitinierungsprofile anhand eines anti-Ubiquitin-Antikörpers erstellt werden (Abb.19).

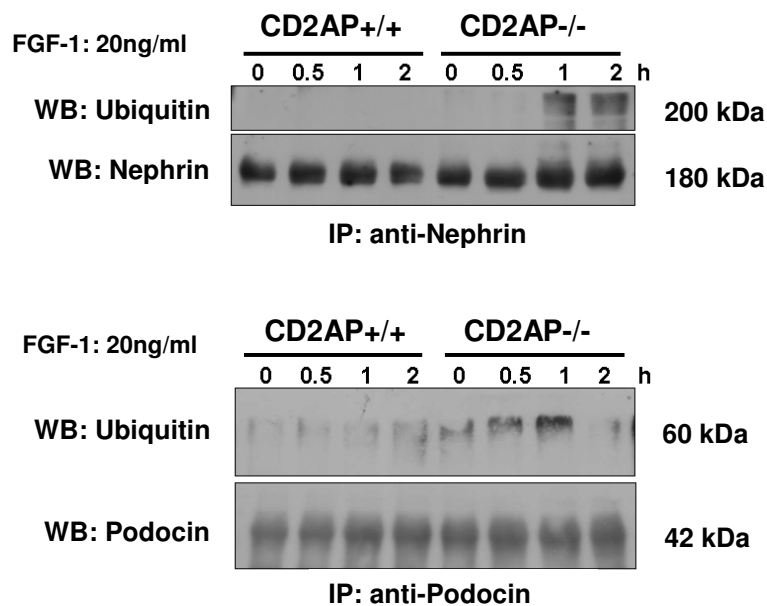


Abb.19 Ubiquitinierungsprofile von Nephrin und Podocin in CD2AP^{+/+} und CD2AP^{-/-} Podozyten

CD2AP^{+/+} und CD2AP^{-/-} Podozyten wurden mit FGF-1 0, 0,5, 1 und 2 Stunden stimuliert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem jeweiligen Antikörper gegen Nephrin bzw. Podocin.

Diese Versuche zeigen sowohl für Nephrin als auch für Podocin nach Stimulation mit FGF-1 eine Ubiquitinierung in CD2AP^{-/-} Podozyten. Auch hier wird aufgrund der geringen Größenzunahme der ubiquitinierten Proteine von einer Monoubiquitinierung ausgegangen.

4.5 Vesikuläre Co-Lokalisation von Nephrin und Podocin mit CIN85

Während der CIN85-vermittelten, rezeptorabhängigen Endozytose, kommt es zur Einstülpung der Zellmembran und Bildung von sogenannten Clathrin-ummantelten Vesikeln. Dabei bindet CIN85 an den Adapterprotein-Komplex AP2, der die Clathrin-Bindung an die Zellmembran vermittelt (Brett et al., 2002; Dikic, 2002). CIN85 nimmt nicht nur eine wichtige Rolle in der RTK-Internalisierung ein, sondern ist ebenso an post-Internalisierungs-Prozessen wie Vesikel-Transport und RTK-Degradation in den Lysosomen beteiligt (Petrelli et al., 2002; Soubeyran et al., 2002). Nach erfolgter Internalisierung kommt es zur Bildung von sogenannten Endosomen, die sich zu multivesikulären-Komplexen formieren, in das Zellinnere wandern und mit Lysosomen fusionieren (Haglund et al., 2002, Hicke, 2001).

Es konnte eine Monoubiquitinierung von Nephrin und Podocin nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor FGF-1 in CD2AP^{-/-} Podozyten nachgewiesen werden (Abb.19). Nun sollte auf immunzytologischer Ebene untersucht werden, ob die Monoubiquitinierung zu einer CIN85-vermittelten Endozytose beider Proteine führt. Dazu wurden CD2AP^{+/+} Podozyten mit 0,2 µg mNephrin-flag-Plasmid, 0,2 µg mPodocin-flag-Plasmid und 0,2 µg mCIN85-GFP-Plasmid auf Cover-Slides mit der Effectene-Transfektions-Methode (Qiagen) transfiziert. Um eine stimulationsabhängige Endozytose beider Proteine einzuleiten, wurden die Zellen mit dem Wachstumsfaktor FGF-1 eine Stunde stimuliert. Die Zellen wurden mit 4% PFA (Paraformaldehyd) fixiert und anschließend Nephrin und Podocin mit einem anti-flag-Primärantikörper und Cy3-konjugierten Sekundärantikörper (rot) detektiert. Aufgrund der grünen Eigenfluoreszenz des GFP musste CIN85 nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper detektiert werden (Abb.20).

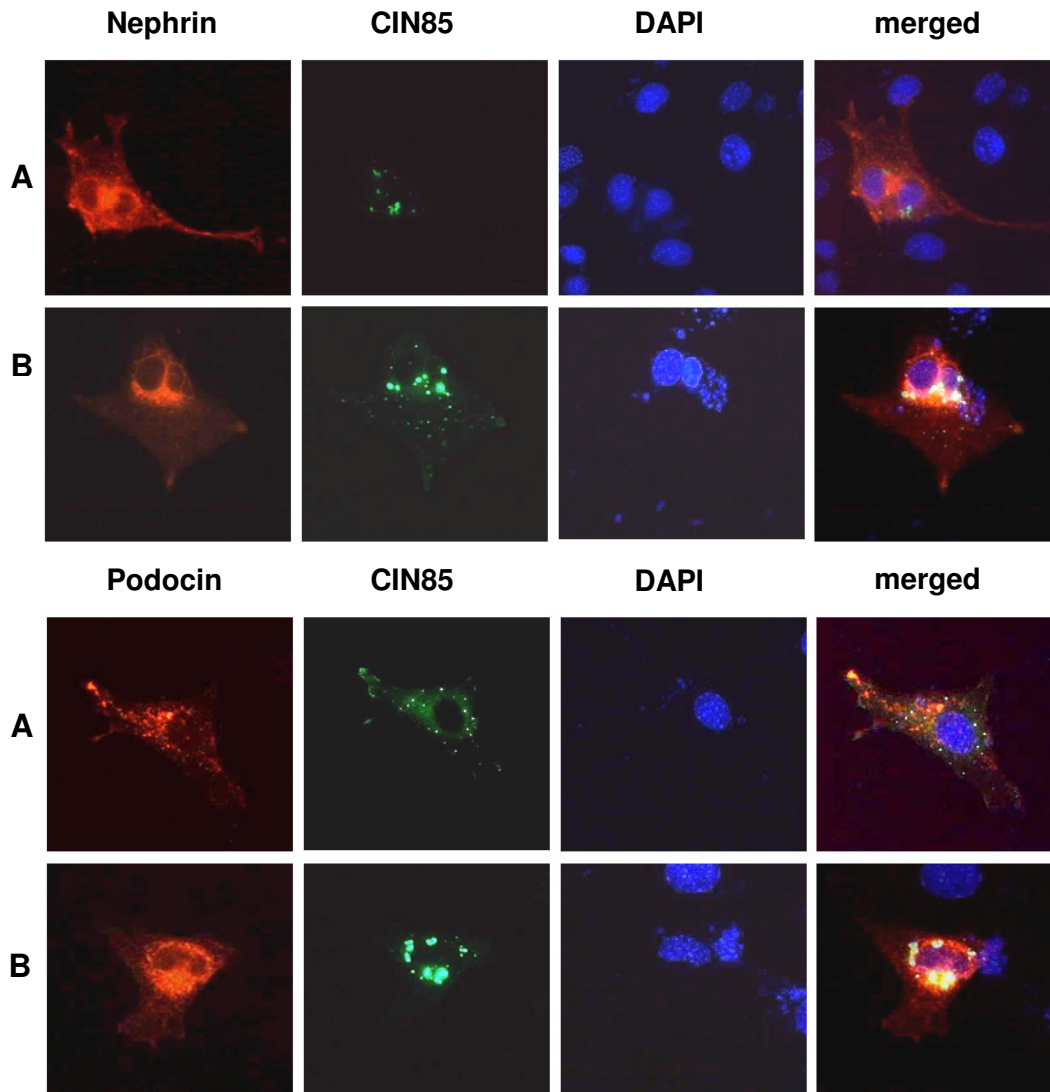


Abb.20 Co-Lokalisation von Nephrin und Podocin mit CIN85 nach Stimulation mit FGF-1
 CD2AP^{+/+} Podozyten wurden mit mPodocin-flag und mCIN85-GFP (grün) transfiziert und für eine Stunde mit FGF-1 (20 ng/ml) stimuliert. Nephrin-flag und Podocin-flag wurden mit einem anti-flag-Antikörper und anschliessendem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper (rot) detektiert. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Im „merged“ zeigt sich die Co-Lokalisation als gelbes Signal. **A:** Unstimuliert; **B:** Stimuliert mit FGF-1 (20 ng/ml, 1 Stunde).

In der Doppel-Immunfluoreszenz zeigte sich, dass CIN85 in vesikelartigen Strukturen lokalisiert ist. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse anderer Gruppen, die zeigen konnten, dass CIN85 mit Clathrin co-lokalisiert. (Dikic, 2002; Soubeyran et al., 2002). Die Vesikel formierten sich nach Stimulation mit FGF-1 zu multivesikulären Komplexen, die perinukleär lokalisiert waren. In diesen multivesikulären Vesikeln zeigte sich eine Co-Lokalisation von Nephrin und Podocin mit CIN85. Nephrin und Podocin waren vor Stimulation relativ gleichmäßig in der gesamten Zelle und in der Membran lokalisiert. Nach Stimulation war für beide Proteine eine perinukleäre Lokalisation zu beobachten.

5 Zusammenfassung und Diskussion

Podozyten bilden die äußere Zellschicht des glomerulären Kapillarknäuels. Es sind hochspezialisierte, terminal-ausdifferenzierte Zellen, die für die Entwicklung, Aufrechterhaltung und Reparatur des Glomerulus verantwortlich sind (Kriz, 2006). Die Schädigung dieser Zellen bildet die pathogenetische Grundlage einer Vielzahl primärer und sekundärer glomerulärer Erkrankungen, die letztendlich zur terminalen Niereninsuffizienz führen können. Die Fokal Segmentale Glomerulosklerose gilt als Endzustand glomerulärer Erkrankungen, die durch eine Dysfunktion der Podozyten verursacht wird. Die phänotypische Dysregulation äußert sich durch Verplumpung der Fußfortsätze, konsekutivem Verlust der Filtrationsschlitze und durch fortschreitenden Zellverlust mit Ablösung von der glomerulären Basalmembran und Zelltod (Kriz und Lemley, 1999). Dem empfindlichen Gleichgewicht der pro- und antiapoptotischen Signalkaskaden in Podozyten kommt dabei eine tragende Rolle zu. Eine Dysregulation dieser Signalkaskaden kann einen erheblichen Einfluss auf das Überleben der Podozyten zur Folge haben. Extrazelluläre Faktoren und Modulatoren (z. B. IGF-BPs und BMPs) sowie intrazelluläre Adaptermoleküle (z.B. CD2AP und CIN85) können diese Signaltransduktionskaskaden erheblich beeinflussen.

5.1 Originalarbeit 1:

IGF-binding protein-3 modulates TGF- β /BMP-signaling in glomerular podocytes

5.1.1 IGFBP-3 moduliert die durch TGF- β 1 induzierte Podozytenapoptose

IGFBP-3 ist im Blut einer der wichtigsten Bindungspartner für freies IGF-1. Daher spielt es bei der Regulation von IGF-1-induzierten antiapoptotischen Prozessen eine wichtige Rolle. Zusätzlich reguliert IGFBP-3, unabhängig von IGF-1, noch weitere zellbiologische Effekte, wie Zellproliferation und Apoptose. (Kelley et al., 1996; Hong et al., 2002).

Mehrere Studien zeigten hohe Konzentrationen von IGFBP-3 im Serum von Patienten mit verschiedenen glomerulären Erkrankungen (Iglesias et al., 2004; Shinada et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass IGFBP-3 ein wichtiger Modulator für die Initiierung und Progression von glomerulären Erkrankungen ist. Folgende Ergebnisse führen zu dieser Hypothese: Wir konnten zeigen, dass erkrankte CD2AP^{-/-} Mäuse hohe

IGFBP-3-Konzentrationen mit dem Urin ausscheiden. Parallel dazu fanden wir hohe IGFBP-3-Konzentrationen im Urin von Patienten mit aktiver FSGS. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte kein direkter Effekt von IGFBP-3 auf die Signaltransduktion in renalen, epithelialen Zellen gezeigt werden. Der Effekt wurde bislang als indirekter Effekt durch Regulation und Inhibition von IGF-1 beschrieben (Hasegawa et al., 1992). Der Wachstumsfaktor IGF-1 nimmt eine wichtige Rolle in der Erhaltung und Funktion der Niere ein (Roelfsema und Clark, 2001). Wir konnten immunhistologisch zeigen, dass die Expression von IGFBP-3 in Podozyten und Parietal-Zellen von drei Wochen alten, proteinurischen CD2AP^{-/-} Mäusen im Vergleich zu altersentsprechenden CD2AP^{+/+} Mäusen hochreguliert ist. Zu diesem Zeitpunkt der Erkrankung kann *in vivo* eine erhöhte Apoptose von Podozyten und Parietal-Zellen mit gleichzeitig zunehmender Expression von TGF- β 1 beobachtet werden (Schiffer et al., 2004). Unsere Daten zeigen, dass IGFBP-3 *in vitro* Apoptose in Podozyten induziert. Der proapoptotische Effekt von IGFBP-3 wurde zusätzlich durch TGF- β 1 potenziert. Außerdem konnten wir zeigen, dass IGFBP-3 zur Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts führt. IGFBP-3 bewirkte eine mikrofilamentäre Stressfaserbildung, die durch Stimulation mit TGF- β 1 gesteigert wurde. Auf Signaltransduktionsebene konnten wir demonstrieren, dass IGFBP-3 über den TGF- β -Rezeptor die Aktivierung von Smad2/3, AKT und p38MAPK induziert. Des weiteren verstärkte IGFBP-3 die TGF- β 1-induzierte Aktivierung von proapoptotischem p38MAPK und Smad2/3 und reduzierte gleichzeitig die Aktivierung von antiapoptotischem AKT. Zudem führte IGFBP-3 zur gesteigerten Transkription von proapoptotischem Smad7 und PAI-1 (*Plasminogen Activator-Inhibitor-1*). PAI-1 ist ein Protease-Inhibitor, der den Matrixabbau hemmt. In der Niere korreliert insbesondere die Zunahme von Narbengewebe eng mit dem Grad der renalen Funktionseinschränkung (Bohle, 1982). PAI-1 gilt als profibrotischer Faktor in vielen Nierenerkrankungen (Huang und Noble, 2007). In Mesangialzellen konnte eine gesteigerte Expression von PAI-1 nach Stimulation mit TGF- β 1 beobachtet werden (Villamediana et al., 1990). In einem für diese Studien etablierten FACS-Assay zur Erfassung der Caspase-3 Aktivität konnten wir zeigen, dass IGFBP-3 zur gesteigerten Caspase-3 Aktivierung in Podozyten führt. Die durch TGF- β 1-induzierte Caspase-3 Aktivität wurde zusätzlich durch IGFBP-3 gesteigert. Caspasen (*Cysteiny-Aspartate specific protease*), eine Familie von Proteasen, sind die wichtigsten Enzyme der Apoptose. Zum Auslösen des Zelltods werden Initiator-Caspasen (z. B. Caspase-8/9) aktiviert. Diese wiederum spalten nachgeschaltete Caspasen (u. a. Caspase-3/6/7), wodurch diese aktiviert werden und schließlich Proteine nach der Aminosäure

Aspartat schneiden. Wir konnten zeigen, dass eine Inhibierung der PI3K z. B. durch LY294002. und anschließende Stimulation mit TGF- β 1 zu einer ähnlich erhöhten Caspase-3 Aktivität führt, wie dies bei der kombinatorischen Gabe von IGFBP-3 und TGF- β 1 der Fall ist. Eine Vorinkubation mit IGF-1 dagegen antagonisierte die durch IGFBP-3 und TGF- β 1-induzierte Caspase-3 Aktivität. Bridgewater und Kollegen konnten einen protektiven Effekt von IGF-1 auf die Apoptose von humanen, embryonalen Podozyten über die Aktivierung von PI3K/AKT zeigen (Bridgewater et al., 2005). Diese Ergebnisse zeigen, dass IGFBP-3, unabhängig von der Regulation und Inhibition von IGF-1, ein direkter Modulator von Signaltransduktionskaskaden in Podozyten ist. IGFBP-3 moduliert die durch TGF- β 1-induzierte Signal-Antwort und induziert somit die Apoptose, da es die Aktivierung von AKT inhibiert und dadurch die proapoptotische Signalantwort verstärkt (Abb.21). IGFBP-3 wurde demnach von uns als direkter proapoptotischer Faktor für Podozyten identifiziert.

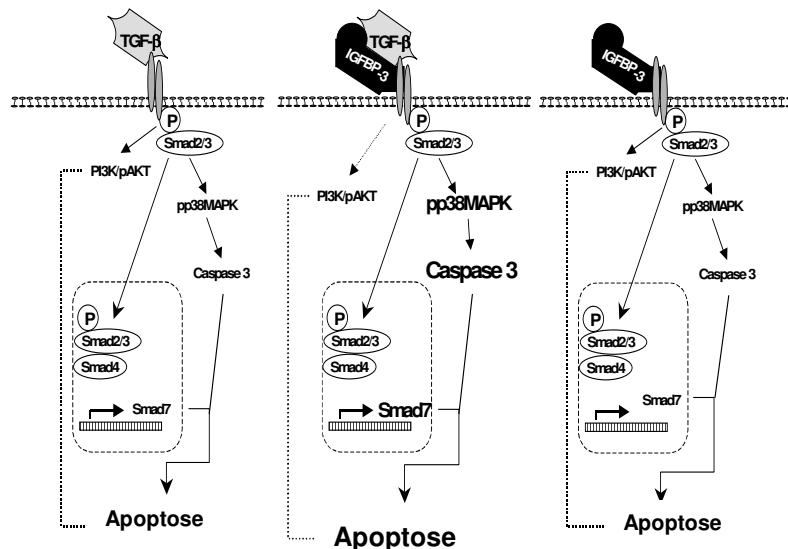


Abb.21 Schematische Darstellung der Modulation der Podozytenapoptose durch IGFBP-3

5.1.2 BMP-7 als zytoprotektiver Faktor für Podozyten

BMP-7 wurde als wichtiger Antagonist der durch TGF- β -induzierten profibrotischen Signalantwort in proximalen Tubulus- und Mesangialzellen beschrieben (Wang et al., 2004). Wir konnten zeigen, dass BMP-7 direkten Einfluss auf die Signaltransduktionskaskaden in Podozyten nimmt. BMP-7 induzierte die

Phosphorylierung von Smad1/5/8 in Podozyten. Die durch BMP-7 induzierte Aktivierung von Smad1/5/8 wurde durch IGFBP-3 antagonisiert. Gleichzeitig wurde durch eine Co-Stimulation von BMP-7 und IGFBP-3 die Aktivierung von AKT potenziert. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass BMP-7 die antiapoptotische Signalantwort verstärkt. Weiterhin moduliert BMP-7 die TGF- β 1-induzierte Signalantwort und führt zum Überleben von Podozyten. Die intrazellulären Signalnetzwerke in Podozyten werden durch eine Vielzahl von Zyto- und Chemokinen beeinflusst. Für das Überleben der Podozyten ist das Gleichgewicht der anti- und proapoptotischen Signalkaskaden somit entscheidend.

5.2 Originalarbeit 2:

CD2AP/CIN85 balance determines receptor tyrosine kinase signaling response in podocytes

5.2.1 Der podozytäre Schaden in CD2AP^{-/-} Mäusen resultiert aus einer dysregulierten Signaltransduktion

Die homozygote Deletion von CD2AP führt im Mausmodell zu einem etwa drei Wochen nach der Geburt einsetzenden nephrotischen Syndrom mit der Ausbildung histologischer Veränderungen, die den Läsionen der humanen FSGS ähneln (Kim et al., 2001). Bisher war jedoch nicht bekannt, warum CD2AP^{-/-} Mäuse gesund geboren werden, aber im Alter von drei Wochen innerhalb eines Zeitrahmens von ein bis zwei Tagen eine starke Proteinurie entwickeln und nephrotisch werden. Unsere Daten belegen, dass der podozytäre Schaden in CD2AP^{-/-} Mäusen ein synchronisierter Prozess ist und auf eine generelle Störung in der „Survival“-Signaltransduktion beruht. Wir konnten zeigen, dass Stimulationen *in vitro* mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) aktivieren, zu einer verminderten Aktivierung von AKT und ERK1/2 in CD2AP^{-/-} im Vergleich zu CD2AP^{+/+} Podozyten führt. Dabei konnte zwischen einer Störung in der Signal-Initiierung und Signal-Terminierung unterschieden werden. Aus unseren Arbeiten kann somit gefolgert werden, dass CD2AP ein wichtiger Co-Faktor für die Aktivierung von PI3K/AKT und ERK1/2 nach Stimulation von RTKs ist.

5.2.2 CIN85 ist ein Modulator der ERK1/2-Signalkaskade in Podozyten

CIN85 interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen, die an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind (Aissouni et al., 2005; Soubeyran et al., 2002). Unter anderem interagiert CIN85 mit dem Adaptermolekül Grb2, welches innerhalb der ERK-Signalkaskade direkt am Rezeptor gebunden ist (Dikic, 2002). Wir konnten zeigen, dass in CD2AP^{-/-} Podozyten bereits nach 30-minütiger Stimulation mit den Wachstumsfaktoren FGF-1 und VEGF-1 die Grb2/SOS-Bindung unterbunden wird und gleichzeitig eine induzierte CIN85-Bindung an Grb2 detektierbar ist. Im Gegensatz dazu konnte nach 30-minütiger Stimulation eine gesteigerte Grb2/SOS-Bindung in den CD2AP^{+/+} Podozyten beobachtet werden. Interessanterweise konnte ebenfalls in den CD2AP^{+/+} Podozyten eine Bindung von CIN85 an Grb2 beobachtet werden. Diese erfolgte jedoch erst nach 4-stündiger Stimulation bei gleichzeitiger Abnahme der Grb2/SOS-Bindung. Diese Daten belegen, dass durch die schnelle Bindung von CIN85 an Grb2 in den CD2AP^{-/-} Podozyten die Interaktion von Grb2 und SOS frühzeitig unterbrochen wird, wodurch es zu einer verminderten Aktivierung und zusätzlich zu einer schnellen Terminierung des ERK1/2-Signals kommt. Andere Gruppen konnten zeigen, dass die Bindung von CIN85 an Grb2 die Bindung von Cbl an den aktivierten Rezeptor induziert und so zu dessen schneller Internalisierung und somit zur Terminierung der Signalantwort führt (Soubeyran et al., 2002; Szymkiewicz et al., 2002). Weiterhin belegen unsere Daten, dass die Expression von CIN85 und die dadurch verminderte ERK1/2-Aktivierung in CD2AP^{-/-} Podozyten differenzierungsabhängig ist. Eine Inhibierung der CIN85-Expression durch eine Lentivirus-basierte CIN85-siRNA führte zu einer erhöhten Aktivierung von ERK1/2. Parallel dazu führte eine Überexpression von CIN85 in CD2AP^{+/+} Podozyten zu einer verminderten Aktivierung von ERK1/2, wohingegen eine Überexpression von CD2AP in CD2AP^{-/-} Podozyten zu einer erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2 nach Stimulation mit FGF-1 führte. Aus unseren Arbeiten kann somit gefolgert werden, dass CIN85 und CD2AP in Podozyten wichtige intrazelluläre Mediatoren bzw. Modulatoren sind, die die antiapoptotischen Signalkaskaden beeinflussen können (Abb. 22). Das Gleichgewicht der CD2AP/CIN85-Expression ist entscheidend für die antiapoptotische Signaldauer. Der physiologische Prozess der Signal-Terminierung ist durch die Hochregulation der CIN85-Expression in CD2AP^{-/-} Podozyten gestört.

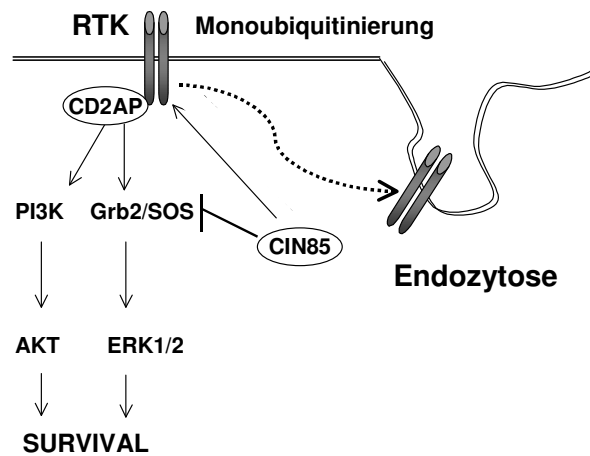


Abb.22 Schematische Darstellung der Modulation von antiapoptotischen Signalkaskaden in Podozyten

5.2.3 CIN85 führt zur verminderten Aktivierung von ERK1/2 *in vivo*

Andere Arbeitsgruppen konnten die CIN85-Expression in Podozyten von CD2AP^{-/-}-Mäusen *in vivo* detektieren. Sie nahmen an, dass die Expression von CIN85 kompensatorisch für das fehlende CD2AP-Protein hochreguliert wird (Grunkemeyer et al., 2005). Unsere Daten belegen, dass die Expression von CIN85 *in vivo* in Podozyten von erkrankten, proteinurischen CD2AP^{-/-}-Mäusen hochreguliert ist. In Podozyten von gesunden CD2AP^{-/-} sowie CD2AP^{+/+}-Mäusen war kaum eine CIN85-Expression detektierbar. Weiterhin zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die basale ERK1/2-Aktivierung in Podozyten von erkrankten CD2AP^{-/-}-Mäusen vermindert ist. Zusätzlich dazu führte eine Stimulation mit FGF-1 in isolierten Glomeruli von CD2AP^{-/-}-Mäusen zu einer verminderten Phosphorylierung von ERK1/2 im Vergleich zu isolierten Glomeruli aus CD2AP^{+/+}-Mäusen. Aus unseren Arbeiten kann somit gefolgert werden, dass die Hochregulation der CIN85-Expression in Podozyten für die phänotypischen Veränderungen und somit für den Krankheitsverlauf von CD2AP^{-/-}-Mäusen verantwortlich ist.

5.3 Originalarbeit 3, Manuskript in Preparation:

Das Wechselspiel der Proteine CD2AP/CIN85 reguliert die Funktion der Schlitzmembran

5.3.1 CD2AP moduliert die CIN85-Expression in Podozyten

Der regulatorische Mechanismus der CIN85-Expression ist unbekannt. Wir konnten zeigen, dass drei mRNA-Varianten von CIN85 sowohl in CD2AP^{-/-} als auch in CD2AP^{+/+} Podozyten exprimiert werden. Interessanterweise konnten unsere Daten belegen, dass die Expression des CIN85-Proteins in CD2AP^{+/+} Podozyten nur gering nachweisbar ist. Aus diesen Daten kann somit gefolgert werden, dass die Expression von CIN85 auf Protein-Ebene in CD2AP^{+/+} Podozyten inhibiert wird. In anderen Zellen konnte erst vor kurzem eine Interaktion von CD2AP und CIN85 gezeigt werden (Gaidos et al., 2007). Wir konnten zeigen, dass CD2AP und CIN85 in Podozyten interagieren. Zusätzlich belegen unsere Daten, dass eine Inhibierung der CD2AP-Expression in CD2AP^{+/+} Podozyten zu einer differenzierungsabhängigen Hochregulation der CIN85-Expression führt. Somit kann gefolgert werden, dass durch CD2AP die Expression des CIN85-Proteins moduliert wird.

5.3.2 CIN85 führt zur Endozytose von Nephtrin und Podocin

Nephtrin und Podocin sind mit CD2AP an der Schlitzmembran verankert und für die Aufrechterhaltung und Integrität dieser verantwortlich. Sowohl Nephtrin als auch Podocin spielen eine entscheidende Rolle in der Signalweiterleitung (Huber et al., 2001). Die Rolle von CIN85 hinsichtlich der funktionellen Integrität der Schlitzmembran war bis zu diesem Zeitpunkt unbekannt. CIN85 vermittelt durch Monoubiquitinierung die Rezeptor-abhängige Endozytose (Dikic, 2002). Unsere Versuche ergaben, dass eine Hochregulation der CIN85-Expression in CD2AP^{-/-} Podozyten zu einer verminderten Expression von Nephtrin und Podocin führt. Zusätzlich führte eine Stimulation mit dem Wachstumsfaktor FGF-1 in CD2AP^{-/-} Podozyten zu einer Monoubiquitinierung von Nephtrin und Podocin. Diese Daten belegen, dass es in CD2AP^{-/-} Podozyten nicht nur zu einer schnellen, CIN85-vermittelten Monoubiquitinierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen kommt, wodurch nachfolgend die ERK1/2-Aktivität frühzeitig terminiert wird, sondern zudem zu einer

Monoubiquitinierung von Nephrin und Podocin. Es ist bekannt, dass die Monoubiquitinierung nicht nur spezifisch für Rezeptoren, sondern auch für transmembrane Proteine ist (Hicke, 2001). Eine stimulationsbedingte, CIN85-vermittelte Endozytose von transmembranen Proteinen, wie es Nephrin und Podocin sind, ist jedoch nicht bekannt. Um eine CIN85-vermittelte Endozytose von Nephrin und Podocin nachzuweisen, wurde mittels Doppel-Immunfluoreszenzfärbung die Co-Lokalisation von Nephrin und Podocin mit CIN85 untersucht. Die Bilder belegen, dass die Expression von CIN85 zur Internalisierung und Endozytose von Nephrin und Podocin nach Stimulation mit FGF-1 führt. Sowohl Nephrin als auch Podocin co-lokalisierten in vesikulären Strukturen mit CIN85. Diese Strukturen formierten sich zu multivesikulären Komplexen, die perinukleär lokalisiert waren. Bei der Endozytose fusionieren die multivesikulären Komplexe mit Lysosomen, in denen der Proteinabbau stattfindet (Haglund et al., 2002; Hicke, 2001). Die gesteigerte Endozytose und der daraus resultierende lysosomale Abbau von Nephrin und Podocin könnte der Grund der verminderten Expression beider Proteine in CD2AP^{-/-} Podozyten sein. Aus dieser Arbeit kann gefolgert werden, dass das Wechselspiel der Expression von CD2AP und CIN85 für die Expression von Nephrin und Podocin und somit für die Aufrechterhaltung und Integrität der Schlitzmembran eine wichtige Rolle spielt. Diese Ergebnisse müssen zur Vervollständigung des vorliegenden Manuskriptes durch weitere Versuche bestätigt werden.

5.4 Ausblick

Die Aufklärung der komplexen Mechanismen, die bei einer neu entstehenden oder bereits vorangeschrittenen Nierenschädigung ablaufen, ist wichtig für die erfolgreiche Therapie dieser Erkrankungen. Mit dieser Arbeit konnten extra- und intrazelluläre Modulatoren und molekulare Regulationsmechanismen aufgezeigt werden, die bei der Entstehung von Nierenerkrankungen innerhalb der hoch spezialisierten, für die Filtration und Funktion der Filtrationsbarriere verantwortlichen Podozyten, eine wichtige Rolle spielen. Die Ergebnisse stellen potentielle Ziele für therapeutische Ansätze dar und sollten im Fokus weiterer Untersuchungen bleiben.

6 Literaturverzeichnis

- Agarwal, N., Hsieh, C.L., Sills, D., Swaroop, M., Desai, B., Francke, V., Swaroop, A.** 1991. Sequence analysis, expression and chromosomal location of a gene, isolated from a subtracted human retina cDNA library, that encodes an insulin-like growth factor binding protein (IGFBP2). *Exp Eye Res* 52, 549-561.
- Aissouni, Y., Lapart, G., Iovanna, J.L., Dikic, I., Soubeyran, P.** 2005. CIN85 regulates the ability of MEKK4 to activate the p38 MAP-kinase pathway. *BBRC* 338, 808-814.
- Arbabi, S., Maier, R.V.** 2002. Mitogen-activated protein kinases. *Crit Care Med* 30, S74-S79.
- Benzing, T.** 2004. Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 15, 1382-1391.
- Bohle, A.** 1982. importance of the renal interstitium for kidney function. *Klin Wochenschr* 60, 1186-60.
- Border, W.A., Noble, N.A.** 1997. TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int* 51, 1388-1396.
- Borinstein, S.C., Hyatt, M.A., Sykes, V.W., Straub, R.E., Lipkowitz, S., Boulter, J., Bogler, O.** 2000. SETA is a multifunctional adapter protein with three SH3 domains that binds Grb2, Cbl and the novel SB1 proteins. *Cell Signal* 12, 769-779.
- Bottinger, E.P., Bitzer, M.** 2002. TGF- β signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13, 2600-210.
- Boute, N., Gribouval, O., Roselli, S., Benessy, F., Lee, H., Fuchshuber, A., Dahan, K., Gubler, M.C., Niaudet, P., Antignac, C.** 2000. NPHS2, encoding the glomerular protein Podocin is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 24, 349-354.
- Brett, T.J., Traub, L.M., Tremont, D.H.** 2002. Accessory protein recruited motifs in clathrin-mediated endocytosis. *Structure (Camb)* 10, 797-808.
- Bridgewater, D.J., Ho, J., Sauro, V., Matsell, D.G.** 2005. Insulin-like growth factors inhibit podocyte apoptosis through the PI3 kinase pathway. *Kidney Int* 67, 1308-1314.
- Buchmann, V.L., Lue, C., Bortwick, E.B., Gout, I., Ninkina, N.** 2002. Organization of mouse RUK locus and expression of isoforms in mouse tissues. *Gene* 295, 13-17.
- Campbell, N.A.** 1998. Biologie: Spektrum Akademischer Verlag.
- Cantley, L.C.** 2002. The phosphoinositide 3-Kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.
- Chang, L., Karin, M.** 1999. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Moll Life Sci* 55, 1230-1254.

- Donoviel, D.B., Freed, D.D., Vogel, H., Potter, D.G., Hawkins, E., Barrish, J.P., Martur, B.N., Turner, C.A., Geske, R., Montgomery, C.A., Starbuck, M., Brandt, M., Gupta, A., Ramirez-Solis, R., Zambrowicz, B.P., Powell, D.R.** 2001. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to Neph1. *Mol Cell Biol* 21, 4829-4836.
- Downward, J.** 1998. Mechanism and consequences of activation of protein kinase B/AKT. *Curr Opin Cell Biol* 10, 262-267.
- Dikic, I.** 2002. CIN85/CMS family of adaptor molecules. *FEBS* 529, 110-115.
- Dikic, I., Giordano, S.** 2003. Negative receptor signaling. *Curr Opin Cell Biol* 15, 128-15
- Dudley, A.T., Lyons, K.M., Robertson, E.J.** 1995. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 9, 2795-2808.
- Dustin, M.L., Oszowy, M.W., Holdorf, A.D., Li, J., Bromley, S., Desai, N., Widder, P., Rosenberger, F., van der Merwe, P.A., Allen, P.M., Shaw, A.S.** 1998. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* 4, 667-677.
- Ehrenborg, E., Zazzi, H., Lagercrantz, S., Granquist, M., Hillerbrand, M., Allander, S.V., Larsson, C., Luthman, H.** 1999. Characterization and chromosomal localization of the human insulin-like growth factor-binding protein 6 gene. *Mamm Genome* 10, 376-380.
- Fuchshuber, A., Jean, G., Gribouval, O., Gubler, M.C., Broyer, M., Beckmann, J.S., Niaudet, P., Atignac, C.** 1995. Mapping a gene (SRN1) to chromosome 1q25-q31 in idiopathic nephrotic syndrome confirms a distinct entity of autosomal recessive nephrosis. *Hum Mol Genet* 4, 2155-2158.
- Gaidos, G., Soni, S., Oswald, D.J., Toselli, P.A., Kirsch, K.H.** 2007. Structure and function analysis of the CMS/CIN85 protein family identifies actin-bundling properties and heterotypic-complex formation. *J Cell Science* 12, 2366-2377.
- Gout, I., Middleton, G., Adu, J., Ninkina, N.N., Drobot, L.B., Filonenko, V., Matsuka, G., Davies, A.M., Waterfield, M., Buchmann, V.L.** 2000. Negative regulation of PI 3-kinase by RUK, a novel adaptor protein. *Embo* 19, 4015-4025.
- Graff, J.M.** 1997 Embryonic patterning to BMP or not to BMP, that's the question. *Cell* 89, 171-174.
- Grunkemeyer, J.A., Kwoh, C., Huber, T.B., Shaw, A.S.** 2005. CD2-associated protein (CD2AP) expression in podocytes rescues lethality of CD2AP deficiency. *J Biol Chem* 280, 29677-29681.
- Haglund, K., Shimikawa, N., Szymkiewicz, I., Dikic, I.** 2002. Cbl-directed monoubiquitination of CIN85 is involved in regulation of ligand-induced degradation of EGF receptors. *PNAS* 99, 12196-12196.

- Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P., Dikic, I.** 2003. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for the endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 5, 461-466.
- Hasegawa, Y., Cohen, P., Yorgin, P., Rosenfeld, R.G.** 1992. Characterization of urinary insulin-like growth factor binding proteins. *J Clin Endocrinol Metab* 74, 830-835
- Hershko, A., Ciechanover, A.** 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
- Hicke, L.** 2001. A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* 106, 527-530.
- Holthofer, H., Ahola, H., Solin, M.L., Wang, S., Palmen, T., Liumula, P., Kerjaschki, D.** 1999. Nephrin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney. *Am J Pathol* 155, 1681-1687.
- Holzmann, L.B., St. John, P.L., Kovari, I.A., Verma, R., Holthofer, H., Abrahamson, D.R.** 1999. Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. *Kidney Int* 56, 1481-1491.
- Hong, J., Zang, G., Dong, F., Reckler, M.M.** Insulin-like growth (IGF)- binding protein (IGFBPs) mutants, that do not bind IGF-1 or IGF-2 stimulate apoptosis in human prostate cancer cell. *J Biol Chem* 277, 10489-10497.
- Huang, Y., Noble, N.A.** 2007. PAI-1 as a target in kidney disease. *Curr Drug Targets* 9, 1007-1015.
- Huber T.B., Kottgen, M., Schilling, B., Walz, G., Benzing, T.** 2001. Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J Biol Chem* 276, 41543-41546.
- Huber, T.B., Hartleben, B., Kim, J., Schmidts, M., Schermer, B., Keil, A., Egger, L., Lecha, R.L., Borner, C., Pavenstädt, H., Shaw, A.S., Walz, G., Benzing, T.** 2003. Nephrin and CD2AP associate with Phosphoinositide 3-OH-Kinase and stimulate AKT-dependent signaling. *Mol Cell Biol* 23, 4917-4928.
- Iglesias, P., Diez, J.J., Fernandez-Reyes, M.J., Mendez, J., Bajo, M.A., Aquilera, A., Selgas, R.** 2004. Growth hormone, IGF-1 and its binding proteins (IGFBP-1 and -3) in adult uraemic patients undergoing peritoneal dialysis and haemodialysis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60, 741-749.
- Jat, P.S., Noble, M.D., Ataliotis, P., Tanaka, Y., Yannoutsos, N., Larsen, L., Kioussis, D.** 1991. Direct derivation of conditionally immortalized cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 5069-5100.
- Johnson, G.L., Lapadat, R.** 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., R.O., K.** 1998. Basic Histology. 9th Edition.

- Kelley, K.M., Oh, Y., Gergosky, S.E., Gucev, Z., Matsumoto, T., Hwa, V., Ng, L., Simpson, D.M., Rosenfeld, R.G.** 1996. Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and the regulatory dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 619-637.
- Kerjaschki, D.** 2001. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 108, 1583-1587.
- Kestila, M., Lenkkeri, M., Manniki, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R.** 1998. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin-is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1, 575-582.
- Kim, Y.M., Goyal, M., Kurnit, D., Wharram, B., Wiggins, J., Holzmann, L., Kershaw, D., Wiggins, R.** 2001. Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int* 60, 957-968.
- Kim, J.M., Wu, H., Green, G., Shaw, A.S.** 2003. CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science* 300, 1298-1300.
- Kirsch, K.H., Georgescu, M.M., Ishimaru, S., Hanafusa, H.** 1999. CMS: An adapter molecule involved in cytoskeletal rearrangements. *Proc Natl. Acad. Sci USA* 96, 6211-6216.
- Kopp, J.B.** 2000. BMP receptors in kidney. *Kidney Int* 58, 2237-2238.
- Kriz, W., Hähnel, B., Rösener, S., Elger, M.** 1995. Long-term treatment of rats with FGF-2 results in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 48, 1435-1450.
- Kriz, W.** 1996. Progressive renal failure- inability of podocytes to replicate and the consequence for development of glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 11, 1738-1742.
- Kriz, W., Kretzler, M., Provoost, A.P., Shirato, I.** 1996. Stability and leakiness: opposing challenges to the glomerulus. *Kidney Int* 49, 1570-1574.
- Kriz, W., Hosser, W., Hähnel, B., Gretz, N., Provoost, A.P.** 1998a. From glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: a histopathological study in rat models and human glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant* 13, 2781-2798.
- Kriz, W., Gretz, N., Lemley, K.V.** 1998b. Progression of glomerular diseases: Is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 54, 687-697.
- Kriz, W.** 2006. Biologie des Podozyten. *Nephrologe* 1, 144-152.
- Leal, S.M., Huang, S.S.** 1999. Interaction of high affinity insulin-like growth factor-binding proteins with type V transforming growth factor-beta receptor in mink lung epithelial cells. *J Biol Chem* 274, 6711-6717.
- Lehtonen, S., Zhao, F., Lehtonen, E.** 2002. CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* 283, F734-F743.

- Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A.L., Sohocki, M., Bradley, A., Karsenty, G.** 1995. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* 9 2808-2820.
- Löwik, M.M., Groenen, P.J.T.A., Pronk, I., Lilien, M.R., Goldschmeding, R., Dijkman, H.B., Levtchenko, E.N., Monnens, L.A., van den Heuvel, L.P.** 2007. Focal segmental glomerulosclerosis in a patient homozygous for a CD2AP mutation. *Kidney Int* 72, 1198-1203.
- Massague, J.** 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Moll Cell Biol* 1, 169-178.
- Mossesson, Y., Shtiegman, K., Katz, M., Zuang, G., Vereb, J., Szallosi, Y., Yarden, Y.** 2003. Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by mono-, not poly-ubiquitination. *J Biol Chem* 278, 21323-21326.
- Mundel, P., Reiser, J., Zuniga Mieja Borja, A., Pavenstädt, H., Davidson, G.R., Kriz, W., Zeller, R.** 1997a. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce foot process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 10, 248-258.
- Mundel, P., Heid, H.W., Mundel, T.M., Krüger, M., Reiser, J., Kriz, W.** 1997b. Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 139, 193-204.
- Pavenstädt, H., Kriz, W., Kretzler, M.** 2003. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 83, 253-307.
- Petrelli, A., Gilestro, G.F., Lanzardo, S., Comoglio, P.M., Migone, N., Giordano, S.** 2002. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of cMet. *Nature* 416, 187-190.
- Putaala, H., Soinen, R., Kilpelainen, P., Wartiovaara, J., Tryggvason, K.** 2001. The murin Nephin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas. Inactivation of gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mo Genet* 10, 1-8.
- Reeves, W., Caulfield, J.P., Farquhar, M.G.** 1978. Differentiation of epithelial foot processes and filtration slits: sequential appearance of occluding junctions, epithelial polyanion, and slit membranes in developing glomerulus. *Lab Invest* 39, 90-100.
- Reiser, J., Kriz, W., Kretzler, M., Mundel, P.** 2000. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 1-8.
- Roelfsema, V., Clark, R.G.** 2001. the growth hormone and insuline-like growth factor axis: its manipulation for the benefit of growth disorders in renal failure. *J Am Soc Nephrol* 12, 1297-1306.
- Ruotsalainen, V., Ljungberg, P., Wartiovaara, J., Lenkkers, V., Kestila, M., Jalanko, H., Holmberg, C., Tryggvason, K.** 1999. Nephin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1962-7967.

- Saleem, M.A., Ni, L., Witherden, I., Tryggvason, K., Ruotsalainen, V., Mundel, P., Matthieson, P.W.** 2002. Co-localization of nephrin, podocin and the actin cytoskeleton: evidence for a role in podocyte foot process. *Am J Pathol* 161, 1459-1466.
- Schiffer, M., Bitzer, M., Roberts, I.S.D., Kopp, J.B., tenDijke, P., Mundel, P., Böttinger, E.P.** 2001. Apoptosis in podocytes induced by TGF- β and Smad7. *J Clin Invest* 108, 807-816.
- Schiffer, M., Mundel, P., Shaw, A.S., Böttinger, E.P.** 2004. A novel role for the adapter molecule CD2-associated protein in transforming growth factor-beta-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279, 37004-37012.
- Schiffer, M.** 2006. Pathogenese der fokal segmentalen Glomerulosklerose: Eine Morphe, viele Erkrankungen. *Nephrologe* 1, 153-162.
- Schiffer, M., Haller, H.** 2006. Fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS): Molekulare Defekte und klinische Relevanz. *Dtsch Med Wochenschr* 131, 1541-1545.
- Shi, N.Y., Li, J., Karpitskii, V., Nguyen, A., Dustin, M.L., Kangawa, O., Miner, J.H., Shaw, A.S.** 1999. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 286, 312-315.
- Shi, N.Y., Cotran, R., Mundel, P., Miner, J., Shaw, A.S.** 2001. CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol* 159, 2303-2308.
- Shinada, M., Akdeniz, A., Panagiotopoulos, S., Jerums, G., Bach, L.A.** 2000. Proteolysis of insulin-like growth factor-binding protein-3 is increased in urine from patients with diabetic nephropathy. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 1163-1169.
- Simon, M., Maresh, J.G., Harris, S.E., Hernandez, J.D., Arar, M., Olson, M.S., Abboud, H.E.** 1999. Expression of bone morphogenetic protein-7 mRNA in normal and ischemic adult rat kidney. *Am J Physiol* 276, F382-F389.
- Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, Y.W., Dikic, I.** 2002. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF-receptors. *Nature* 416, 183-187.
- Thien, C.B., Langdon, W.Y.** 2001. Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinase. *Nat Rev Moll Cell Biol* 2; 294-207.
- Tryggvason, K., Wartiovaara, J.** 2001. Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr Opin Nephrol hypertens* 10, 543-549.
- Tryggvason, K., Pettersson, E.** 2003. Causes and consequences of proteinuria: the kidney filtration barrier and progressive renal failure. *J Intern Med* 254, 216-224.
- Welsch, T., Endlich, N., Kriz, W., Endlich, K.** 2001. CD2AP and p130Cas localize to different T-actin structures in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 281, F769-F777.

Wu, D.T., Bitzer, M., Ju, W., Mundel, P., Böttinger, E.P., 2005. TGF-beta concentration specifies differential signaling profiles of growth arrest/differentiation and apoptosis in podocytes. *J Am Soc Nephrol* 16, 3211-3221.

Verma, R., Wharram, B., Kovari, I., Kunkel, R., Nihalani, D., Wary, K.K., Wiggins, R.C., Killen, P., Holzmann, L.B. 2003. Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephlin. *J Biol Chem* 278, 20716-20723.

Villamediana, L.M., Rondeau, E., He, C.J., Mendelf, R.L., Peraldi, M.N., Lacave, R., Delarue, F., Sraer, J.D. 1990. Thrombin regulates components of the fibrinolytic system in human mesangial cells. *Kidney Int* 38, 956-961.

Yuan, H., Takeuchi, E., Salant, D.J. 2002. Podocyte slit-diaphragm protein nephrin is linked to the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F585-591.

Zeisberg, M., Shah, A.A., Kalliri, R. 2005. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelia transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem* 280, 8094-8100.

Zuo, H., Niswander, L. 1997. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* 278, 305.

7 Publikationsliste

7.1 Originalpublikationen in Peer-Review-Zeitschriften

Kümpers, P., Gueler, F., Rong, S., Mengel, M., **Tossidou, I.**, Peters, I., Haller, H., Schiffer, M. (2007).

Leptin is a coactivator of TGF-beta in unilateral ureteral obstructive kidney disease.
American Journal of Physiology and Renal Physiology, 293 (4), F1355-1362. Epub 2007 August 8.

Tossidou, I., Kardinal, C., Peters, I., Kriz, W., Shaw, A., Dikic, I., Tkachuk, S., Dumler, I., Haller, H., Schiffer, M. (2007).

CD2AP/CIN85 balance determines receptor tyrosine kinase signaling response in podocytes.

Journal of Biological Chemistry, 282 (10), 7457-7464. Epub 2007 January 9

*Peters, I., ***Tossidou, I.**, Achenbach, J., Woroniecki, R., Mengel, M., Park, J.K., Paschy, M., de Groot, K., Haller, H., Schiffer, M. (2006).

IGF-binding protein-3 modulates TGF-beta/BMP-signaling in glomerular podocytes.

Journal of American Society of Nephrology, 17 (6), 1644-1656. Epub 2006 May 3

* gleichberechtigte Erstautorenschaft

7.2 Manuskripte für Peer-Review-Zeitschriften

Tossidou, I. et al.

Das Wechselspiel der Proteine CD2AP/CIN85 reguliert die Funktion der Schlitzmembran.

Vorgesehener englischer Titel:

CD2AP/CIN85 protein balance regulates the slit diaphragm turnover.

Manuskript in Preparation.

Tossidou, I., Starker, G., Krüger, J., Leitges, M., Meier, M., Haller, H., Schiffer, M.

The role of Protein-kinase-C-alpha (PKC α) in glomerular podocytes.

Manuskript zur Einreichung für *Journal of American Society of Nephrology*.

7.3 Kurzvorträge und Poster

Kurzvorträge:

Tossidou, I., Kardinal, C., Peters, I., Tkatchouk, S., Kriz, W., Shaw, A.S., Dumler, I., Haller, H., Schiffer, M. (2007).

CD2AP/CIN85 balance determines RTK-signaling response in podocytes.

XLIV ERA EDTA Congress in Barcelona, Spanien, 21. bis 24. Juni.

Tossidou, I., Krüger, J., Leitges, M., Haller, M., Schiffer, M. (2007).

Die Rolle von PKC-alpha in der TGF-beta und Glucose induzierten Apoptose.

38. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, München, 22. bis 25. September.

Tossidou, I., Haller, M., Schiffer, M. (2007).

Hochregulation von CIN85 in CD2AP-/- Podozyten führt zur Ubiquitinierung von den Schlitzmembranproteinen Nephrin und Podocin.

38. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, München, 22. bis 25. September

Tossidou, I., Moeller, C., Wie, C., Haller, H., Reiser, J., Schiffer, M. (2007).

CD2AP/CIN85 protein balance regulates the slit diaphragm Turnover.

40th Annual Renal Week, ASN in San Francisco, USA, 2. bis 5. November.

Poster:

*Peters, I., ***Tossidou, I.**, Paschy, M., Mundel, P., Böttinger, E.P., Haller, H., Schiffer, M. (2005).

Modulation von TGF-beta induzierter Podozytenapoptose durch IGFBP-3.

36. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie in Saarbrücken, 17. bis 20. September.

* gleichberechtigte Erstautorenschaft

Tossidou, I., Kardinal, C., Peters, I., Tkatchouk, S., Kriz, W., Shaw, A.S., Dumler, I., Haller, H., Schiffer, M. (2006).

Upregulation of CIN85 disrupts RTK-signaling in CD2AP-knockout podocytes.

6th Podocyte Conference in Helsinki, Finnland, 8. bis 11. Juni.

Tossidou, I., Kardinal, C., Peters, I., Tkatchouk, S., Kriz, W., Shaw, A.S., Dumler, I., Haller, H., Schiffer, M. (2006).

Upregulation of CIN85 disrupts ERK-signal initiation and termination in CD2AP-knockout podocytes.

37. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie in Essen, 23. bis 26. September.

Tossidou, I., Kardinal, C., Peters, I., Tkatchouk, S., Kriz, W., Shaw, A.S., Dumler, I., Haller, H., Schiffer, M. (2006).

Upregulation of CIN85 disrupts RTK-signaling in CD2AP-knockout podocytes.

39th Annual Renal Week, ASN in San Diego, USA, 14. bis 19. November.

Tossidou, I., Krüger, J., Leitges, M., Meier, M., Haller, H., Schiffer, M. (2007).

The role of Protein kinase-C-alpha (PKC α) in TGF- β and Glucose induced apoptosis in podocytes (2007).

40th Annual Renal Week, ASN in San Francisco, USA, 2. bis 5. November.

Auszeichnungen:

Posterpreis:

*Peters, I., ***Tossidou, I.**, Paschy, M., Mundel, P., Böttinger, E.P., Haller, H., Schiffer, M. (2005).

Modulation von TGF-beta induzierter Podozytenapoptose durch IGFBP-3.

36. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie in Saarbrücken, 17. bis 20. September.

Travel Grant für den besten Abstract der Kategorie:

Tossidou, I., Kardinal, C., Peters, I., Tkatchouk, S., Kriz, W., Shaw, A.S., Dumler, I., Haller, H., Schiffer, M. (2007).

CD2AP/CIN85 balance determines RTK-signaling response in podocytes.

XLIV ERA EDTA Congress in Barcelona, Spanien, 21. bis 24. Juni.

8 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Irimi Tossidou
Geburtsdatum / -ort: 26.09.1978 in Hildesheim
Staaatsangehörigkeit: griechisch

SCHULAUSSBILDUNG

1985-1989 Grundschule Nord in Hildesheim
1989-1991 Orientierungsstufe Ost in Hildesheim
1991-1998 Scharnhorstgymnasium in Hildesheim

STUDIUM & Berufspraxis

10/1998-02/2003 Studium der Biologie an der Gottfried Wilhelm Leibniz
Universtät Hannover
09/2000 Vordiplom
03/2003-11/2003 Diplomarbeit mit dem Thema Studien an Leukozyten aus dem
Darm von Karpfen: Untersuchungen zu Verteilung, Struktur und
Funktion im Fachgebiet für Fischkrankheiten und Fischhaltung
an der Tierärztlichen Hochschule Hannover
Betreut durch Prof. Dr. D. Steinhagen
02/2004 Abschluss als Diplom-Biologin
09/2004-jetzt Wissenschaftliche Angestellte im Forschungslabor der
Abteilung Nephrologie (Zentrum Innere Medizin) der
Medizinischen Hochschule Hannover – Prof. Dr. med. H. Haller

PROMOTION

11/2004-10/2007 Experimentelle Arbeiten unter Betreuung von Dr. med. M.
Schiffer, Abteilung Nephrologie (Innere Medizin) an der
Medizischen Hochschule Hannover

9 Danksagung

Auf dieser Seite möchte ich mich bei allen bedanken, die mich unterstützt haben.

Frau Prof. Dr. Inna Dumler danke ich für die Möglichkeit, die praktischen Arbeiten zu der vorliegenden Doktorarbeit in der Abteilung für Nephrologie an der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Betreuung von Dr. med. Mario Schiffer durchzuführen.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Dr. med. Mario Schiffer für die exzellente Betreuung, seine Diskussionsbereitschaft und seinen stetigen Einsatz bedanken.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller danke ich für die Beantwortung meiner Fragen hinsichtlich der Promotion und für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. Stephan Steinlechner danke ich für die Teilnahme am Prüferkollegium.

Ein besonderer Dank gilt dem gesamten Labortrakt und speziell allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schiffer.

Vor allem aber möchte ich mich bei Gabi, Robert, Janna und Heike für die schöne Zeit bedanken.

Imke und Kirstin danke ich für die hilfreiche Korrektur des Manuskriptes.

Bei Christian möchte ich mich ebenfalls für die Korrektur meiner Manuskripte, für die exzellente fachliche Unterstützung und natürlich für die langen und interessanten Gespräche bedanken.

Aber der größte Dank gilt meinen Eltern, Bärbel, Hans-Helmut und besonders Björn, die mich immer uneingeschränkt unterstützt haben.