

Jacek Zenon Bloch
Dr. med.

Über die Expression, Regulation und Funktion von Aquaporin-1 und Aquaporin-3 in peritonealen Mesothelzellen und deren Bedeutung für die peritoneale Funktion

Promotionsfach: Kinderheilkunde
Doktorvater: Prof. Dr. med. Claus Peter Schmitt

Die Peritonealdialyse (PD) ist in der Pädiatrie aus technischen, medizinischen und psychosozialen Gründen bei Patienten mit Niereninsuffizienz die Dialysemodalität der ersten Wahl, in der internistischen Nephrologie wird ein weit höherer Einsatz als bisher angestrebt. Unter chronischer PD kommt es auf Grund der unphysiologischen Komposition von PD-Lösungen und dem Gehalt an toxischen Glucoseabbauprodukten regelhaft zu progredientem Verlust der peritonealen Mesothelzellschicht, zur Hypervaskularisierung und zur Fibrosierung des Peritoneums. Dies führt zu einem Ultrafiltrationsverlust und letztendlich zum technischen Versagen der PD. Seit einigen Jahren sind Dialyselösungen erhältlich, die durch die Trennung der glucosehaltigen, sauren Lösung von der alkalischen Pufferlösung wesentlich weniger Toxine enthalten. Sie unterscheiden sich im Wesentlichen nur noch in der Puffersubstanz voneinander, Laktat bzw. Bikarbonat. Deren Bedeutung für die PD ist unklar. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluss der Puffersubstanz auf für die peritoneale Funktion essentiellen Proteine, AQP-1 und AQP-3, an primären humanen peritonealen Mesothelzellen (HPMC) untersucht. Hierzu wurden Zweikammer-PD-Lösungen benutzt, die sich lediglich im Puffer, nicht jedoch in anderen Komponenten oder Toxinen unterscheiden und mit einer Einkammerlösung und entsprechenden Mediumkontrollen mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen verglichen. Neben der Regulation der beiden Proteine wurde die intrazelluläre Signaltransduktion und die funktionelle Bedeutung in drei verschiedenen Modellen der Zellmigration validiert.

Die Transkription und Proteinsynthese von AQP-1 und AQP-3 wird durch alle drei PD-Lösungen dosis- und zeitabhängig differentiell reguliert. Bikarbonathaltige Doppelkammerlösung (B-PDF) führt zu einer starken Hochregulation von AQP-1 und AQP-3, laktathaltige Doppelkammerlösung (L-PDF) zu einer Suppression von AQP-1 und zu einer Hochregulation von AQP-3 und konventionelle Einkammerlösung (C-PDF) zu einer starken Suppression von AQP-1 und AQP-3 im Vergleich zu Mediumkontrolle. Die stufenweise Erhöhung des pH bei B-PDF führt zu einem starken Anstieg von AQP-1, bei L-PDF jedoch zu keinem Anstieg von AQP-1.

Die Zugabe von Bikarbonat zu L-PDF führt zu einem starken Anstieg von AQP-1, der geringere Anstieg von AQP-1 bei Laktatzugabe zu B-PDF wird via Anstieg der Osmolarität der PD-Lösung erklärt.

Folgende intrazelluläre Signalmoleküle sind für die konstitutive Synthese von AQP-1 in HPMC bedeutsam. PKA, welche die AQP-1 Synthese induziert, PKC, die zu einer Suppression von AQP-1 führt und die MAP-Kinasen MEK, p38 und JNK, deren Inhibition zu einer Suppression von AQP-1 führt. Die Hemmung der PKA, PKC, von MEK und JNK blockiert die Hochregulation von AQP-1 durch B-PDF. Eine Hemmung von PKA, MEK und JNK blockiert AQP-1 in L-PDF. p38 spielt allerdings bei B-PDF und L-PDF für AQP-1 keine wesentliche Rolle.

In allen drei Migrationsmodellen, Transwell-System, Woundhealing-Assay und Time laps microscopy konnte gezeigt werden, dass durch B-PDF die Migrationsfähigkeit der HPMC um $210 \pm 29\%$ gegenüber der Mediumkontrolle erhöht und durch L-PDF auf $64 \pm 22\%$ im Vergleich zu B-PDF reduziert wird. C-PDF führt zu einer starken Abnahme der Zellmigration

auf $47 \pm 2\%$ im Vergleich zur Mediumkontrolle. Time laps microscopy Studien zeigen darüber hinaus, dass die Anzahl der migrierenden Zellen mit B-PDF $150 \pm 15\%$ von L-PDF beträgt. Die anschließend durchgeführten Gene silencing Experimente belegen, dass die Migrationsfähigkeit der HPMC von der AQP-1 Expression und Funktion abhängt. Knock down von AQP-1 führt zum weitgehenden Verlust der Migrationsfähigkeit, während AQP-3 in diesem Zusammenhang unbedeutsam ist. Auch die durch B-PDF und L-PDF induzierbaren erheblichen Veränderungen der Migrationskapazität sind ausschließlich von AQP-1 abhängig und von AQP-3 unabhängig.

Zu untersuchen ist nun, inwieweit diese in vitro Befunde in vivo relevant sind. Erste tierexperimentelle Studien bestätigen die in vitro Daten; eine kürzlich publizierte klinische Studie zeigt einen besseren Erhalt der Ultrafiltrationskapazität mit B-PDF versus L-PDF über ein Jahr. Von Interesse ist nun auch, inwieweit eine pharmakologische Steuerung der AQP-1 Expression in vivo möglich ist. Durch diese könnte nicht nur die AQP-1 abhängige Ultrafiltrationsleistung des Peritoneums gesteigert werden, sondern möglicherweise auch die Integrität des Peritoneums erhalten werden, d. h. der pathologische Umbau der peritonealen Membran mit Mesothelzellverlust und Neoangiogenese hinausgezögert werden.