

Lüdemann, Willie Magnus
Dr. med.

Analyse der molekularen Mechanismen der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 (TNFR1)-vermittelten Signalwege in humanen peritonealen Mesothelzellen (HPMCs)

Fach/ Einrichtung: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. Vedat Schwenger

Die terminale Niereninsuffizienz ist ein Krankheitsbild unterschiedlicher Ätiologie, die von Bluthochdruck über Diabetes mellitus bis hin zu Glomerulonephritiden reichen kann. Neben der Nierentransplantation sind zu ihrer Therapie verschiedene Konzepte der Hämodialyse und Peritonealdialyse (PD) etabliert. Bei der PD werden glucosehaltige, hyperosmolare Dialyselösungen in die Peritonealhöhle instilliert, um über das kräftig vaskularisierte Peritoneum eine osmotisch induzierte Ultrafiltration zu erzielen. Das Verfahren ermöglicht dem Patienten eine große Mobilität und Autonomie. Nach etwa vier bis fünf Jahren treten jedoch therapieassoziierte Umbauprozesse des Peritoneums im Sinne einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), peritonealen Sklerose und Ultrafiltrationsversagen auf. Zu diesem Zeitpunkt muss die PD beendet und ein alternatives Nierenersatzverfahren gewählt werden. Untersuchungen zur Pathophysiologie der peritonealen Schädigung sind daher von großer klinischer Bedeutung.

Die Schädigung der peritonealen Gewebsintegrität ist das Ergebnis einer therapieassoziierten, chronischen Inflammation in der Bauchhöhle. Diese entsteht auf dem Boden der ständigen Präsenz unphysiologischer Dialyselösungen sowie des Dialysekatheters und wird bedingt durch zytokinvermittelte Wechselwirkungen residenter Zellen wie Mesothelzellen, Fibroblasten und Myoepithelzellen sowie in die Peritonealhöhle extravadiierter Zellen des Immunsystems wie Makrophagen. Neben verschiedenen Interleukinen und dem ‚transforming-growth-factor- β 1‘ (engl., TGF- β) ist der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) eines der Schlüsselzytokine bei diesen Prozessen. Es wird durch Makrophagen sezerniert, bindet an Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 (TNFR1) und induziert so zellspezifische Signalantworten, welche einerseits zur Induktion von Apoptose oder andererseits zum Überleben der Zelle führen können.

In der vorliegenden Arbeit wurden die größtenteils noch unverstandenen molekularen Mechanismen der TNFR1-vermittelten Signalwege sowie die Regulation der TNFR1-Expression in humanen peritonealen Mesothelzellen (engl. human peritoneal mesothel cells, HPMCs) untersucht. Im Hinblick darauf wurden HPMCs gesunder Spender sowie HPMCs urämischer PD-Patienten isoliert, kultiviert, charakterisiert und im Anschluss mittels ‚enzyme linked immunosorbent assay‘ (engl., ELISA), Zytotoxizitäts-Assays, Western Blots und Durchflusszytometrie weiterführenden Analysen unterzogen.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zur TNFR1-Anzahl bei HPMCs ergaben, dass die Zellen urämischer PD-Patienten im Durchschnitt 1,6 mal so viele Rezeptoren exprimierten wie HPMCs gesunder Spender. Damit korrelierend führte die Stimulation von HPMCs nierengesunder Probanden mit TNF zu einer Steigerung der TNFR1-Expression um den Faktor 2,3 gegenüber unstimulierten Kontrollen. Ergänzend durchgeführte ELISAs des löslichen TNFR1 (engl. soluble TNFR1, sTNFR1) zeigten nach Behandlung der Zellen mit Dialyselösung keine Konzentrationsänderung des sTNFR1 im Zellkulturüberstand, sodass vermindertes TNFR1-Shedding als Ursache für die gesteigerte Rezeptorzahl ausgeschlossen werden konnte.

Zytotoxizitäts-Assays zeigten, dass die Stimulation mit TNF trotz einer sehr hohen TNFR1-Expression von HPMCs nicht zur Induktion von Apoptose führt. Zur Untersuchung der

TNFR1-initiierten Signalkaskade wurden Western Blots mit Antikörpern gegen intrazelluläre Proteine der TNFR1-Signaltransduktion, darunter ‚inhibitor of NF- κ B α ‘ (engl., I κ B α), ‚cellular FADD-like Interleukin-1 β -converting enzyme (engl., FLICE) inhibitory protein‘ (engl., cFLIP_L), Procaspase-3 und ‚cellular inhibitor of apoptosis protein‘ (engl., cIAP)-1 und -2 durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von HPMCs mit TNF zu einer signifikanten Steigerung der Proteinmenge von phosphoryliertem und zu einer verminderten Proteinmenge von nicht phosphoryliertem I κ B α führt. Die Stimulation mit Dialyselösung führte zu inversen Ergebnissen. I κ B α komplexiert ‚Nuclear transcription factor- κ B‘ (engl., NF- κ B) intrazellulär, seine Phosphorylierung führt zur Freigabe und Aktivierung von NF- κ B. Die intrazelluläre Proteinmenge von cFLIP_L, einem durch NF- κ B regulierten, antiapoptotisch wirkenden Protein, nimmt durch Stimulation der Zellen mit TNF stark zu. Aktivierte Caspase-3 ist ein Indikator für Apoptose und war nach Stimulation mit TNF nicht nachweisbar. Ein signifikanter Einfluss auf die Proteinmenge der überwiegend antiapoptotisch wirkenden Proteine cIAP-1 und -2 war nach Stimulation von HPMCs mit TNF oder Dialyselösung nicht nachzuweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen neue, relevante Einblicke in Mechanismen der TNFR1-vermittelten Signalweiterleitung in HPMCs, welche von großer Bedeutung für das Verständnis PD-assoziiierter peritonealer Umbauprozesse sind. Die nach Stimulation von HPMCs mit TNF beobachtete intrazelluläre Erhöhung von phosphoryliertem I κ B α und cFLIP_L legt eine NF- κ B-vermittelte, proinflammatorische Signaltransduktion nahe, wohingegen Dialyselösung die TNFR1-Signalweiterleitung durch Erhöhung von I κ B α und Reduktion von cFLIP_L zugunsten des proapoptotischen Signalwegs beeinflusst. Die durchflusszytometrisch nachgewiesene, gesteigerte Anzahl der Rezeptoren nach Stimulation von HPMCs mit Dialyselösung kann als Sensibilisierung der Zellen für TNF und die durch sie vermittelte NF- κ B-Aktivierung diskutiert werden. NF- κ B begünstigt das Zellüberleben, wirkt proinflammatorisch und spielt möglicherweise Snail-vermittelt eine wichtige Rolle bei der Induktion von EMT, welche wiederum von entscheidender Bedeutung bei der Entwicklung von peritonealer Fibrose und Ultrafiltrationsversagen ist. Die vorliegenden Ergebnisse können helfen, besser verträgliche Dialyselösungen zu entwickeln, welche die Hochregulation von TNFR1 minimieren. In Analogie zur erfolgreichen Therapie anderer chronisch entzündlicher Erkrankungen wie dem Morbus Crohn mit TNF-Inhibitoren ist auch der intraperitoneale Einsatz dieser Substanzen, wie beispielsweise dem Antikörper Certolizumab, zur Reduktion der effektiv auf die HPMCs wirkenden TNF-Konzentrationen denkbar.