

David Peter Obert

Dr. med.

Auswirkungen der Modulation des endoplasmatischen Retikulum-Stresses mittels Tunicamycin auf den posthämorrhagischen Leberschaden und die systemische Inflammationsreaktion

Fach/Einrichtung: Orthopädie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Gerhard Schmidmaier

Traumata, welche die häufigste Todesursache für Menschen unter 44 Jahren darstellen, gehen häufig mit einem hämorrhagischen Schock einher. Dieser führt zu einer Gewebshypoxie, auf welche der Körper mit zellulären, organischen und systemischen Anpassungs- bzw. Stressreaktionen antwortet. Eine dieser zellulären Stressreaktionen ist die Unfolded Protein Response (UPR). Diese wird durch endoplasmatischen Retikulum-Stress, eine Überladung des endoplasmatischen Retikulums (ERs) mit fehl- bzw. ungefalteten Proteinen, initiiert. Die UPR besteht aus drei Hauptsignalwegen, an deren Beginn Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase-like ER-Kinase (PERK), Activating Transcription Factor 6 (ATF6) und Inositol Requiring Enzyme 1 (IRE1) stehen. Sie werden durch die Dissoziation des Chaperons Binding Immunoglobulin Protein (BiP) aktiviert und dienen der Optimierung der Proteinfaltung, der Reduktion der Proteinsynthese sowie der Steigerung der Proteindegradation. Ist die Zelle jedoch über einen längeren Zeitraum ER-Stress ausgesetzt, kann die UPR u. a. durch die vermehrte Expression von CCAAT/Enhancer Binding Protein Homologous Protein (CHOP) den Zelltod auslösen. Diese Mechanismen tragen zur Entstehung einer Ischemia-Reperfusion Injury (IRI) bei, welche wesentlich für den Organschaden nach hämorrhagischen Schock und Reperfusion (HS/R) verantwortlich ist. Fernerhin ist die UPR in der Lage, entzündliche Prozesse zu initiieren und zu modulieren. Auf diesen Vorkenntnissen basierend diente diese Studie dem Ziel, den Zusammenhang zwischen ER-Stress, Organschaden und Inflammation im Rahmen einer systemischen Stresssituation zu untersuchen.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Mäuse narkotisiert, die Aa. femorales beiderseits kanüliert und Blut entnommen bis ein mittlerer arterieller Druck (MAP) von 30 ± 5 mmHg erreicht wurde. Nach 90 Minuten wurde das dreifache Entnahmevolumen in Form von Ringer-Lösung infundiert. Abhängig von der Gruppenzuteilung wurde den Mäusen entweder im Rahmen der Reperfusion oder 48 h vor Schockinduktion der ER-Stressinduktor Tunicamycin (TM) bzw. ein Drug Vehicle (DV) injiziert. Zur Organ- und Blutentnahme wurden die Mäuse

14 h nach Schockinduktion euthanasiert. Im Folgenden wurden die Plasmakonzentrationen von inflammatorischen Zytokinen und Lebertransaminasen gemessen, wobei der Leberschaden zudem durch die Auswertung von Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gewebeschnitten quantifiziert wurde. Zur Untersuchung der UPR und ihrer Zielproteine wurden sowohl immunhistochemische Färbungen als auch Western Blot-Analysen der Leber durchgeführt.

Während eine Präkonditionierung mittels TM die systemische Entzündungsreaktion nach HS/R nur in geringem Ausmaß beeinflusste, hemmte eine TM-Applikation im Rahmen der Reperfusion die inflammatorische Antwort. Auch die Höhe des Leberschadens wurde wesentlich durch die ER-Stressmodulation beeinflusst. Bewirkte eine posthämorrhagische TM-Applikation eine signifikante Zunahme des hepatozellulären Schadens, reduzierte eine prähämorrhagische TM-Injektion den histologisch nachweisbaren Leberschaden. Einen Erklärungsansatz für diese Ergebnisse bieten die nachgewiesenen Änderungen im Expressionsmuster und -level der UPR-Signalproteine; so wurde nach einer posthämorrhagischen TM-Applikation zum einen eine verminderte Expression von ATF6 und BiP in den Zellen um die perizentral gelegenen Zelltodareale beobachtet und zum anderen eine verstärkte CHOP-Expression nachgewiesen. Da sowohl ATF6 als auch BiP protektiv wirken und CHOP wesentlich an der Induktion des ER-Stress-vermittelten Zelltods beteiligt ist, könnten diese nachgewiesenen Veränderungen den ausgeprägten Leberschaden erklären. Eine prähämorrhagische TM-Injektion hatte insbesondere eine gesteigerte BiP-Expression und Veränderungen der PERK-Expression zur Folge. Während in den übrigen Gruppen eine verstärkte periportale PERK-Färbung zu beobachten war, zeigte sich nach einer Präkonditionierung mittels TM vor HS/R eine nahezu homogene Färbung des Leberparenchyms. Sowohl BiP als auch PERK induzieren Autophagie, welcher im Rahmen einer IRI ein protektiver Effekt zugeschrieben wird. Die gesteigerte perizentrale Expression des Autophagiemarkers Beclin-1 kann somit als Hinweis auf eine Verstärkung der Autophagie gesehen werden, wodurch die Abnahme des Leberschadens erklärt wird. Auch eine Reduktion des oxidativen Stresses durch den PERK-Signalweg sowie eine Verminderung des ER-Stresses durch BiP sind mögliche Erklärungen.

Diese Studie lässt somit den Rückschluss zu, dass ein Zusammenhang zwischen ER-Stress und IRI nach HS/R besteht. Während eine posthämorrhagische TM-Applikation den Leberschaden verstärkte, führte eine Präkonditionierung mittels TM zu einer Reduktion des hepatozellulären Schadens. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die ER-Stressmodulation einen potentiell therapeutischen Ansatz darstellt und möglicherweise zur Verbesserung des Outcomes schwerverletzter Patienten beitragen kann.