

Julia Tsobaneli

Dr. med.

## **Untersuchung des schädigenden Potentials, Schwerpunkt Inflammation und Zelltod, der mTOR-Inhibitoren Everolimus und Sirolimus auf Podozyten *in vitro***

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Vedat Schwenger

Die mTOR-Inhibitoren Everolimus und Sirolimus sind Medikamente, die in der Nephrologie unter anderem zur Immunsuppression nach Organtransplantation Einsatz finden. Die Hoffnung, die langfristig nephrotoxischen Calcineurininhibitoren zu verdrängen, konnten sie nicht erfüllen. In der klinischen Anwendung ging ihr Einsatz zwar mit einer höheren GFR, aber auch mit einer – führend glomerulären – Proteinurie einher. Um eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen zu finden, wurde in dieser Arbeit die schädigende Wirkung der mTOR-Inhibitoren Everolimus und Sirolimus auf humane Podozyten *in vitro* mit Schwerpunkt auf Inflammation und Zelltod untersucht. Es erfolgten Konzentrationskinetiken, die zur Analyse dosisabhängiger Effekte von Everolimus und Sirolimus dienten. Außerdem wurden Sirolimus und Everolimus direkt miteinander verglichen und einander gegenübergestellt.

Untersucht wurden Veränderungen an der Schlitzmembran anhand der Expression der Membranproteine Nephrin und Podocin und Veränderungen des Aktinzytoskeletts anhand der Expression des Aktin-assoziierten Proteins Synaptopodin und der ihm nachgeschalteten kleinen GTPase RhoA. Diese Proteinexpressionsanalysen erfolgten mittels Western Blot und FACS-Analyse. Auswirkungen auf inflammatorische Signalwege wurden mittels Interleukin-6-ELISA und NFκB-Immunfluoreszenzanalyse sowie die Zellviabilität und zytotoxische Schäden mittels LDH-Zytotoxizitätsassay und TUNEL-Assay untersucht.

Es wurden unterschiedliche Pathomechanismen identifiziert, die zu der unter mTOR-Inhibitoren beobachteten Proteinurie führen können: Einerseits wurden Veränderungen hinsichtlich der Expression der Schlitzmembranproteine beobachtet mit dosisabhängiger abnehmender Expression von Nephrin als auch von Podocin. Andererseits wurden Expressionsveränderungen in Proteinen zur Regulation des Aktinzytoskeletts nachgewiesen mit einer reduzierten Expression von Synaptopodin und RhoA. Pro-inflammatorische Signalwege wurden inhibiert, wie anhand eines verminderten Aktivierungsgrad von NFκB sowie einer reduzierten Exkretion von IL-6 unter den mTOR-Inhibitoren gezeigt werden konnte. Wiederum konnte anhand eines TUNEL- sowie eines LDH-Zytotoxizitätsassays eine unter mTOR-Inhibitoren abnehmende, Apoptose-vermittelte Zellviabilität nachgewiesen werden. *In vitro* fielen unter Everolimus sowohl die Auswirkungen auf die

Schlitzmembranproteine und das Aktinzytoskelett als auch anti-inflammatorische und proapoptotische Effekte milder aus als unter Sirolimus.

Die Ergebnisse zu den Effekten der mTOR-Inhibitoren auf Podozyten sind mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vereinbar, direkte Vergleichsliteratur von Everolimus und Sirolimus zueinander sowohl in einem experimentellen als auch im klinischen Setting sind jedoch rar. Die Klärung der pathomechanistischen Ursache für die beobachteten Unterschiede von Everolimus und Sirolimus auf Proteinexpression, Inflammation und Apoptose erfordert weitere Untersuchungen. In Betracht kommen unterschiedliche Effekte von Everolimus und Sirolimus auf die beiden mTORC-Komplexe in Frage, aber auch substratspezifische Effekte der mTORC1-Inhibition, hier sind insbesondere 4EPB1 und Autophagie zu nennen sowie gegebenenfalls mTORC-unabhängige zelluläre Effekte wie der MAPK-Signalweg und mitochondriale Effekte zu nennen. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf.

Insgesamt bestätigt diese Arbeit das dedifferenzierende Potential von mTOR-Inhibitoren auf Podozyten mit Verlust der Integrität der Basalmembran und des typischen Zytoskeletts. Dies geht mit einer verminderten Aktivität der intrazellulären Inflammationssignalwege sowie einer erhöhten Apoptoserate einher. Verglichen zu Sirolimus scheint Everolimus *in vitro* auf Podozyten protektiv zu sein, sodass dieses unter diesem Aspekt von klinischer Seite zu bevorzugen wäre.

Interessant sind die hiesigen Beobachtungen insbesondere aufgrund der aktuellen Entwicklung neuer mTOR-Inhibitoren und der zunehmend bekannten Rolle des mTOR-Signalweges für eine Fülle von Erkrankungen jenseits der Transplantation bzw. Immunsuppression. Da hier bereits unterschiedliche zelluläre Effekte zwischen Everolimus und Sirolimus nachgewiesen werden konnten, müssen diese unter den neuen Substanzen genau untersucht werden, damit Patienten identifiziert werden können, die von dem Einsatz dieser Substanzen profitieren können.