

Iva Marinovic
Dr. sc. hum.

Understanding and modulating molecular mechanisms of peritoneal transport function to improve PD efficacy and outcome

Fach/Einrichtung: Kinderheilkunde

Doktorvater: Prof. Dr. med. Claus Peter Schmitt

Peritonealdialyse (PD) ist ein zu Hause durchführbares Nierenersatzverfahren für Patienten mit chronischem Nierenversagen im Endstadium (CKD5). Dabei wird das Bauchfell des Patienten als semipermeable Membran zur Entfernung von überschüssigen Salzen, Toxinen und Wasser genutzt. Das frühe Patientenüberleben und die Vereinbarkeit mit sozialem und beruflichem Leben sind im Vergleich zur Hämodialyse besser. Allerdings ist die Entgiftungsleistung des Peritoneums begrenzt und die Biokompatibilität der PD Lösungen und Peritonitiden führen zum Umbau des Peritoneums mit Abnahme der PD-Leistung und zunehmendem Proteinverlust. Erstaunlicherweise ist trotz Anwendung der PD seit über mehr als 50 Jahre wenig über die molekularen Mechanismen des transperitonealen Stofftransportes bekannt. Bislang wurde nur die Funktion des Wasserkanals Aquaporin1 im Detail untersucht. Mathematische Modelle des PD-Transportes konzentrierten sich auf die Barrierefunktion des Endothels und gehen davon aus, dass das Mesothel keine Barriere darstellt. Diese eklatanten Wissenslücken zu überwinden, ist für innovative therapeutische Ansätze zur Verbesserung der PD-Wirksamkeit von entscheidender Bedeutung. In dieser Arbeit habe ich mich daher auf das umfassende Verständnis der Transportmechanismen über das peritoneale Mesothel und das Endothel fokussiert, ihrer zugrunde liegenden molekularen Gegenspieler und ihrer Regulation durch CKD5 und PD.

Da experimentelle Studien auf die Verwendung von in-vitro-Modellen angewiesen sind, habe ich die am häufigsten verwendeten humanen Zellmodelle mittels RNAseq und bioinformatisch untersucht. Diese sind immortalisierte Pleuramesothelzellen (MeT-5A), primäre peritoneale Mesothelzellen (HPMC), Umbilicalvenen-Endothelzellen (HUVEC) und die seltener verwendeten aber besser die peritonealen Kapillaren reflektierenden kardialen mikrovaskulären Endothelzellen (HCMEC). Die vier Zelllinien zeigten ausgeprägte Unterschiede in der Expression, die in sechs funktionale Cluster zusammengefasst wurden, selbst innerhalb der Mesothel- und Endothelzelltypen. Diese waren nur teilweise auf den Gewebsursprung und den Immortalisierungsstatus zurückzuführen und umfassten wesentliche Unterschiede in der Zellmigrationskapazität, der Zelladhäsion, der Regulation der Angiogenese und der Reaktion auf Hypoxie. Diese Analyse liefert wesentliche Informationen zur spezifischen Eignung der jeweiligen Zelllinie zur Beantwortung von Forschungsfragen in Bezug auf PD und darüber hinaus. Es konnte die Expression vieler transportbezogener Gene in den Mesothelzellen gezeigt werden, was auf entsprechende Funktionen neben den Endothelzellen hinweist.

Im methodischen Teil der Arbeit wurde ein optimierter experimenteller Ablauf entwickelt, der in einem einzelnen, polarisierten Zell-Monolayer in vitro funktionelle Transport-Messungen mit der Visualisierung von zellulären (Junction-) Proteinen mittels Immunfluoreszenz bis hin zur Single Cell Localisation Mikroskopie und Cluster-Analyse kombiniert. Dieser Ansatz erhöht die experimentelle Konsistenz, reduziert den Arbeitsaufwand und minimiert die Kosten. Er wurde verwendet, um die Eigenschaften des peritonealen Transports weiter zu

charakterisieren. Insgesamt zeigte dieser umfassende Ansatz spezifische Expressionsmuster von Junction-Proteinen in Mesothel- und Endothelzellen. Funktionell bildeten Mesothelzellen im Vergleich zu kapillaren Endothelzellen *in vitro* eine stärkere Barriere gegen den Transport, von Ionen und 4, 10 und 70 kDa Dextran-Molekülen. Die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie gefolgt von Analysen der persistierenden Homologie zeigte, dass das Tight Junction-Ankerprotein Zonula occludens-1 kontinuierlich entlang der Mesothelzellmembran exprimiert wird, während es in der Endothelzellmembran weniger häufig vorkommt und weniger clustert, es gibt ZO1 freie Bereiche. Diese *In-vitro*-Befunde zeigen, dass das peritoneale Mesothel *in vitro* neben dem Endothel eine signifikante Barriere bildet.

In den weiteren Arbeiten habe ich den Beitrag des Mesothels zum Stofftransport bei Mäusen, sowie *ex vivo* in Schaf- und humanem Peritoneum analysiert. Basierend auf 106 Biopsien konnte ich die Oberfläche des humanen peritonealen Mesothels relativ zur Oberfläche des submesothelialen Endothels berechnen. Sie ist außer bei Kindern im Alter von 2-17 Jahren, die weniger Kapillaren besitzen, kleiner. Bei PD-Patienten, die PD-Lösungen mit niedrigem Gehalt an Glukoseabbau-Produkten (GDP) verwendeten, war die peritoneale Auskleidung durch Mesothelzellen, anders als in Vorarbeiten für GDP reiche Lösungen gezeigt, nicht verändert. Ich konnte nun zeigen, dass GDP reiche Lösungen die Expression von Junction-, Transzytose- und Transporter-Proteinen in omenten Arteriolen, die vor direktem Einfluss der PD-Flüssigkeit durch umgebendes Fettgewebe geschützt waren, reduziert ist. *In-vitro* erhöhte das GDP 3,4DGE die endotheliale Permeabilität für Ionen, und 4 kDa. Bei Mäusen führte die kurzzeitige auf das Mesothel limitierte Exposition des Peritoneums gegenüber bakteriellen Lipopolysacchariden zu den selektiven Veränderungen der Mesothel-Morphologie und erhöhter peritonealer Aufnahme von 4- und 70 kDa-Dextran. Mechanische Entfernung des Mesothels von in Ussing-Kammern fixierten Schafperitoneum, beseitigte weitgehend den elektrischen Widerstand, d.h. die ionische Barrierefunktion des Gewebes, das submesotheliale Interstitium besitzt keine entsprechende Barrierefunktion.

Im humanen Peritoneum konnte im Rahmen dieser Promotionsarbeit das Vorhandensein und die Abundanz von peritonealen Transporter- und Tight Junction (TJ)-Proteinen in Mesothel- und Endothelzellen gezeigt werden sowie die Veränderungen bei CKD5 und PD. Tight Junction Claudine (CLDN), Transmembran-Transporter und Kanäle wurden konsistent exprimiert, mit geringen altersabhängigen Variationen. Bei Kindern mit CKD5 war mesothelial CLDN2 und arteriolar CLDN3 erhöht, bei PD mesothelial CLDN1 und CLDN2 sowie arteriolar CLDN1 erhöht. Funktionell korrelierten bei den Patienten die peritonealen Transportraten für Kreatinin und Glucose mit der Abundanz der Poren bildenden CLDN2, -4, -15 und mit PIT1. In multivariablen Modellen war die Abundanz von arteriolärem CLDN2 ein unabhängiger Prädiktor des Kreatinin- und Glucose-Transportes. Diese Befunde legen die funktionelle Relevanz der TJ-Proteine im peritonealen Stofftransport beim Menschen nahe.

Schließlich habe ich erstmals die pharmakologische Modulation der peritonealen TJ *in vitro* und *in vivo* beschrieben. Die Zugabe von Alaninyl-Glutamin zu PD-Flüssigkeiten verhinderte den endothelialen Verlust von ZO-1, von Sealing-TJ CLDN5 und von der Barrierefunktion gegenüber Ionen, und 10 und 70 kDa Dextran *in vitro* und bewahrte in entsprechend behandelten Mäusen die peritoneale CLDN5-Abundanz.

Zusammenfassend gelangen im Rahmen dieser Promotionsarbeit wesentliche methodische Fortschritte durch die Kombination von funktionellen Zellbarriere-Messungen mit

Immunfärbung und Single Cell Localisation und Cluster-Analyse in einem einzelnen, polarisierten Zell-Monolayer. Es gelang umfassende Erkenntnisse zum peritonealen Stofftransport in vitro, ex vivo und in vivo zu erhalten. Die Arbeit zeigt die funktionelle Bedeutung des Mesothels, die Expression von transportbezogenen Proteinen und deren Regulation durch CKD und PD und identifiziert Moleküle, die mit dem Stofftransport beim Menschen assoziiert sind, wobei das Poren bildende CLDN2 vermutlich von besonderer Relevanz ist. Diese Ergebnisse eröffnen neue Möglichkeiten für gezielte therapeutische Interventionen zur Verbesserung der Effizienz der PD.