

Aus der Kinder- und Jugendklinik der Universitätsmedizin  
Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. M. Radke

**Der Einfluss von Rapamycin auf  
Längenwachstum und Knochenentwicklung bei  
Ratten mit autosomal-rezessiver polyzystischer  
Nierenerkrankung**



**Inauguraldissertation**  
zur  
**Erlangung des akademischen Grades**  
**doctor medicinae (Dr. med.)**  
**der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock**

vorgelegt von

Christine Bittig, geb. am 23.09.1987 in Güstrow  
Rostock, im Juni 2016

Eingereicht am 7. Juni 2016  
Verteidigt am 7. Februar 2017

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dieter Haffner, Medizinische Hochschule Hannover
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Lorenz Hofbauer, Universitätsklinikum Dresden
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Oliver Hakenberg, Universitätsmedizin Rostock

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung . . . . .	1
1.1.1	Pathogenese, klinische Manifestation und genetische Ursache der ARPKD	1
1.2	Das mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) . . . . .	5
1.2.1	Die Wirkweise von Rapamycin . . . . .	7
1.3	Die PolyCysticKidney-Ratte (PCK-Ratte) als Tiermodell der autosomal rezessiv polyzystischen Nierenerkrankung . . . . .	7
1.4	Die Knochenentwicklung und Mineralhomöostase . . . . .	8
1.4.1	Die physiologischen Wachstumsprozesse . . . . .	8
1.4.2	Die hormonelle Regulation des Knochenstoffwechsels . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
3.1	Materialien . . . . .	14
3.1.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Antikörper . . . . .	14
3.1.2	Geräte und Software . . . . .	15
3.2	Beschreibung des Tierversuches . . . . .	15
3.3	Makroskopische und histologische Knochenbeurteilung . . . . .	17
3.3.1	Identifizierung proliferierender Zellen . . . . .	20
3.4	Bestimmung des flächenbezogenen Mineralgehalts in den Femura . . . .	22
3.5	Mikro-Computertomographie zur Analyse der Knochenmikrostruktur . .	23
3.5.1	Durchführung der Messungen . . . . .	23
3.5.2	Rekonstruktion und Bestimmung von Strukturparametern aus den $\mu$ -CT-Daten . . . . .	24
3.5.3	Übersicht der durch das $\mu$ -CT bestimmten morphometrischen Parameter .	28
3.6	Statistische Auswertung . . . . .	29

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
4.1	Vorbefunde und biometrische Merkmale der Versuchstiere und ihrer Tibiae	30
4.2	Auswirkungen von Rapamycin auf die Höhe der Wachstumsfugen und die Mineralisierungsrate . . . . .	33
4.3	Proliferation der Chondrozyten der Wachstumsfuge . . . . .	39
4.4	Flächenbezogene Mineraldichte im Femur . . . . .	39
4.5	Volumenbezogene Dichte von kortikalem und trabekulärem Knochen . . .	40
4.6	Morphologische Parameter des trabekulären Knochens . . . . .	40
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>43</b>
5.1	Methodenvergleich: Bestimmung von Wachstumsfugenhöhe und Knochenmineralgehalt . . . . .	47
5.2	Grenzen der vorliegenden Arbeit . . . . .	48
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>Thesen</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>54</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Lokalisation von Fibrozystin (FPC) in Niere und Leber . . . . .	2
Abb. 2: Klinische Manifestationen der ARPKD . . . . .	3
Abb. 3: Die Struktur von Polycystin 1 (PC 1), PC 2 und FPC . . . . .	4
Abb. 4: Modell des mTOR-Signalweges . . . . .	6
Abb. 5: Schematische Darstellung der enchondralen Ossifikation . . . . .	9
Abb. 6: Die einzelnen Zonen der Wachstumsfuge . . . . .	11
Abb. 7: Die Interaktionen zwischen Osteoklasten und Osteoblasten durch RANK-RANKL . . . . .	12
Abb. 8: In Technovit®9100 <sup>neu</sup> eingebettetes proximales Tibiafragment . . . . .	17
Abb. 9: Knochenpräparat nach Masson-Goldner-Trichrom-Färbung . . . . .	18
Abb. 10: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Tetrazyklin und Demeclozyklin	20
Abb. 11: Immunhistochemischer Nachweis BrdU-positiver Chondrozyten . . . . .	23
Abb. 12: Übersicht über Umfang und Lage der trabekulären sowie kortikalen ROI	25
Abb. 13: ROIs des trabekulären sowie kortikalen Knochens und 3D-Modell eines Knochenfragments . . . . .	26
Abb. 14: Grenzschichten für die Bestimmung der WFH anhand von $\mu$ -CT-Bildern	27
Abb. 15: Gewicht der Tiere nach einer 4-, 8-, und 12-wöchigen Behandlung mit Rapamycin . . . . .	31
Abb. 16: Körperlänge und Tibialänge nach einer 4-, 8-, und 12-wöchigen Behandlung mit Rapamycin . . . . .	32
Abb. 17: Tibiadurchmesser der Tiere nach einer 4-, 8-, und 12-wöchigen Behandlung mit Rapamycin . . . . .	33
Abb. 18: Zusammenhang zwischen gemittelter Tibialänge und lichtmikroskopisch bestimmter WF-Höhe . . . . .	35
Abb. 19: Zusammenhang zwischen den am $\mu$ CT und Lichtmikroskop bestimmten WF-Höhen . . . . .	36
Abb. 20: Zusammenhang zwischen MAR und WF-Höhe . . . . .	38
Abb. 21: Volumenbezogene Mineraldichte nach 4-wöchiger Behandlung mit Rapamycin . . . . .	40

Abb. 22: Das relative Volumen und das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen von Knochen männlicher und weiblicher Ratten nach 4-wöchiger Behandlung mit Rapamycin . . . . .	41
Abb. 23: Trabekelanzahl und Strukturindizes von Knochen männlicher und weiblicher Ratten nach 4-wöchiger Behandlung mit Rapamycin . . . . .	42

# Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe . . . . .	16
Tab. 2: Einstellungen während Aufnahme und Rekonstruktion der $\mu$ -CT-Bilder . .	24
Tab. 3: Kreatinininkonzentration und Aktivität der Aspartat-Aminotransferase (ASAT) zum Versuchsende . . . . .	30
Tab. 4: Die WFH und ihre einzelnen Zonen bei männlichen und weiblichen Versuchstieren . . . . .	34
Tab. 5: Die im $\mu$ -CT bestimmte Wachstumsfugenhöhe in den Knochen von PCK- und SD-Ratten nach 4-wöchiger Behandlung mit Rapamycin . . . . .	35
Tab. 6: MineralAppositionRate (MAR) in den unterschiedlichen Gruppen . . . . .	37
Tab. 7: Relative Anzahl BrdU-positiver Chondrozyten in den Wachstumsfugen . .	39
Tab. 8: Flächenbezogene Mineraldichte im Femur nach 4-wöchiger Behandlung mit bzw. ohne Rapamycin . . . . .	39
Tab. 9: Durchschnittliche Trabekeldicke der vier Wochen lang behandelten Tiere .	42

# Abkürzungsverzeichnis

aBMD	areal bone mineral density
AP	Alkalische Phophatase
ARPKD	autosomal-rezessive polycystic kidney disease, autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung
ADPKD	autosomal-dominant polycystic kidney disease, autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung
AS	Aminosäuren
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BrdU	Bromdesoxyuridin
BS	bone surface
BV	bone volume
ChPI	Chondrozyten-Proliferationsindex
Conn.Dn	connectivity density
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DXA	Dual-Röntgen-Absorptiometrie
FGF-23	fibroblast growth factor
FOV	field of view
FPC	Fibrozystin
HEAT-Repeats	Huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A (PP2A), TOR1 - Repeats, Proteineinsequenz
HGF	hepatocyte growth factor
HZ	Hypertrophe Zone, Teil der Wachstumsfuge
IGF	insulin-like growth factors
Ihh	indian hedgehog homolog, intrazellulärer Signalweg
ILD	inter label distance
IQR	interquartile range, Interquartilsabstand
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade, intrazellulärer Signalthtrasduktionsweg
µ-CT	mikro-Computer-Tomograph
MAR	mineral apposition rate, Mineralisierungsrate
MG-Färbung	Masson-Goldner-Färbung
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8, humanes Protein

MMPs	Matrix-Metalloproteinases
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
mTORC1 und 2	mTOR Complex 1 und 2
OMIM	online mendelian inheritance in man, Datenbank humaner Gene und Mutationen
OPG	Osteoprotegerin
ORPK-Maus	oak ridge polycystic kidney-Maus
PCK-Ratte	Polycystic Kidney-Ratte
PC 1 und 2	Polycystin 1 und 2
PIKK	Phosphatidylinositol-Kinase related Kinase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKHD1-Gen	Polycystic Kidney and Hepatic Disease1-Gen
PTH	Parathormon
PTHrP	parathormon-related protein
PZ	Proliferationszone, Teil der Wachstumsfuge
Q	Quartil
RANK	Receptor Activator of NF-kappaB
RANK-L	RANK-Ligand
ROI	region of interest
RZ	Reservezone, Teil der Wachstumsfuge
SD-Ratte	Sprague Dawley-Ratte
SMI	Structure Model Index
SK6	S6-Kinase
Tb.N	Trabecular number
Tb.Pf	Trabecular pattern factor
TBS	Tris buffered saline, Pufferlösung
Tb.Sp	Trabecular separation
Tb.Th	Trabecular thickness
TSC 1 und 2	Tuberous Sclerosis Complex 1 und 2 bzw. Hamartin und Tuberin
TV	tissue volume
vBMD	volumetric bone mineral density
VEGF	vascular endothelial growth factor
WF	Wachstumsfuge
WFH	Wachstumsfugenhöhe

# 1 Einleitung

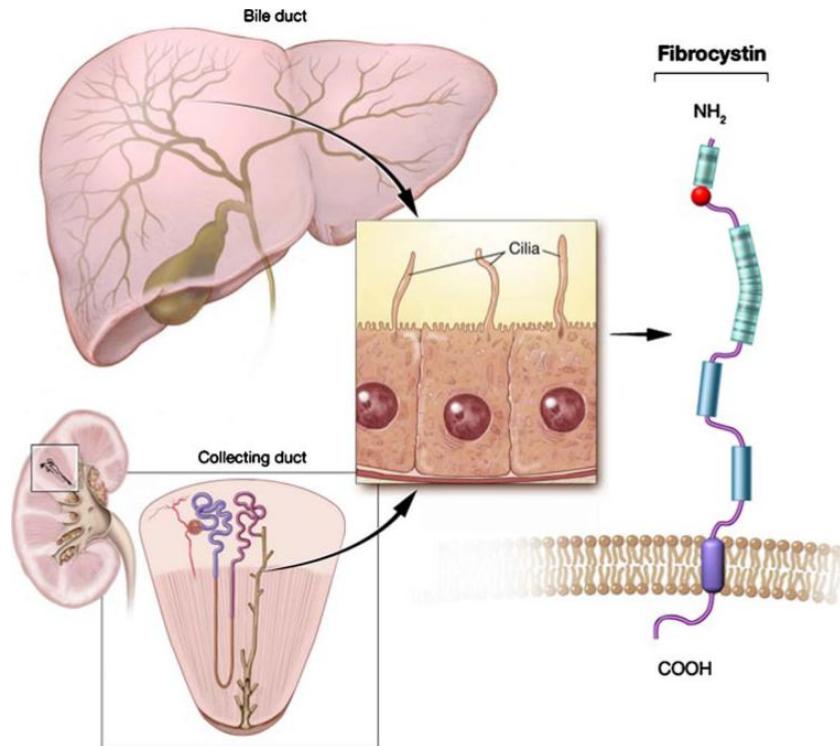
## 1.1 Die autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung

### 1.1.1 Pathogenese, klinische Manifestation und genetische Ursache der ARPKD

Die autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD, OMIM 263 200) gehört mit einer Inzidenz von 1 : 20 000 zu den seltenen Erkrankungen. Neben der beeinträchtigten Nieren- und/oder Leberfunktion sind, in geringerem Ausmaß, auch die Funktionen anderer Organe betroffen.

Ursache dieses schweren Krankheitsbildes sind sporadische Mutationen, die beide Allele des PKHD1(Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1)-Gens betreffen. Dieses Gen ist auf Chromosom 6 in der p21.1-p12-Region lokalisiert und kodiert ein sehr großes, multifunktionelles Protein, das Fibrozystin (auch: Polyductin, FPC) (Torres and Harris, 2006). FPC ist ein Rezeptor-ähnliches Zilienprotein und besteht aus einer großen extrazellulären Domäne (4 074 Aminosäuren, AS), die zahlreiche repetitive Domänen mit Homologien zu Transkriptions- und Wachstumsfaktoren enthält. Daran schließt sich eine transmembranöse (23 AS) und eine kurze intrazytoplasmatische Domäne (192 AS) an (Abb. 1). Durch diesen Aufbau ähnelt FPC strukturell dem HGF(Hepatocyte Growth Factor)-Rezeptor (Onuchic et al., 2002).

FPC wird hauptsächlich in den Epithelzellen der Nieren, aber auch der Leber und des Pancreas sowie in der Lunge exprimiert und spielt für die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Polarisierung von Epithelzellen eine wichtige Rolle (Ward et al., 2002; Harris and Rossetti, 2004; Harris and Torres, 2009; Zhang et al., 2004). Letzteres ist für die Tubulus-Genese bzw. die Aufrechterhaltung des Tubuluslumens wesentlich (Torres and Harris, 2006; Al-Bhalal and Akhtar, 2008).



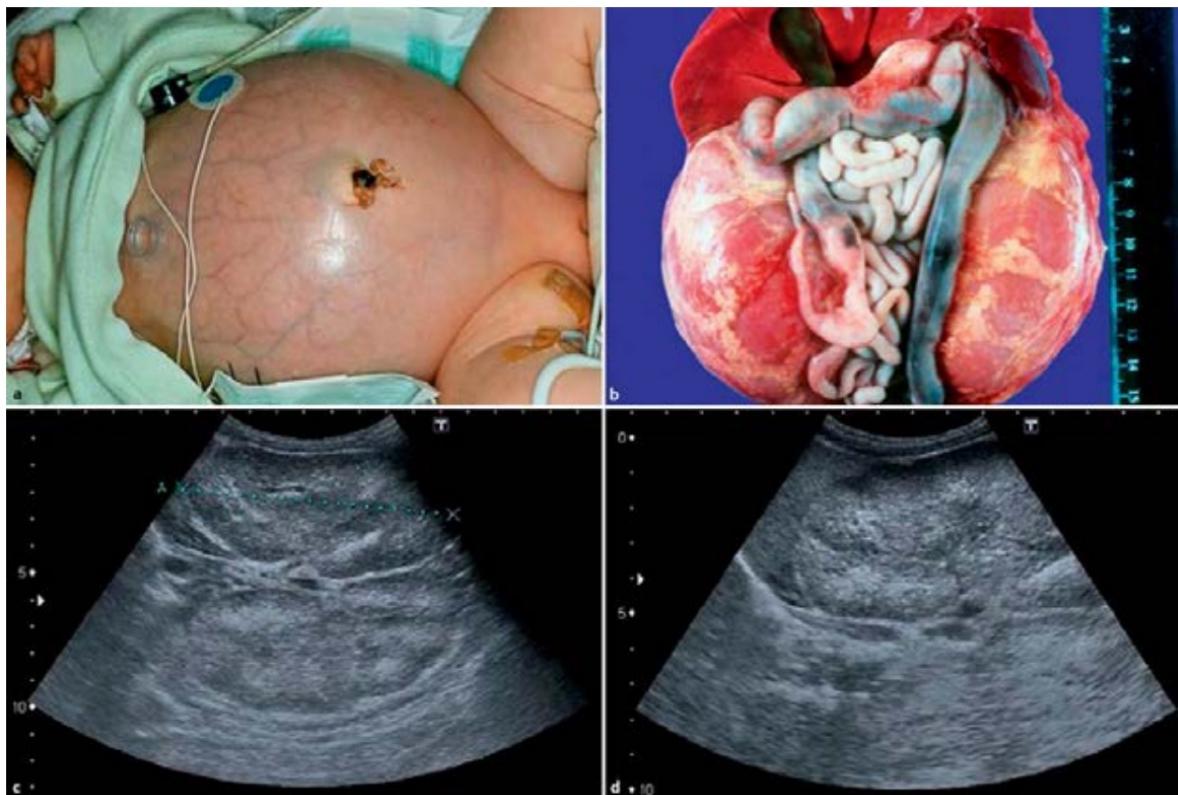
**Abb. 1:** Die Lokalisation von Fibrozystin (FPC) in den Sammelrohren der Niere und den Gallengängen der Leber.

Aus: Turkbey, 2009.

Aus der Lokalisation des FPC und den mutationsbedingten Fehlfunktionen dieses Zilioproteins erklärt sich die Morphologie der ARPKD: Nierenrinde und -mark der Patienten sind von zahllosen kleinen Zysten durchsetzt, welche erweiterten Sammelrohren und distalen Tubuli entsprechen. Im Ultraschall imponieren diese Zysten als ein typisches „Pfeffer-und-Salz“-Muster – eine Differenzierung von Mark und Rinde ist nahezu unmöglich (Abb. 2). Die überschießende Proliferation der zystischen Anteile und die simultane Atrophierung und Fibrosierung des intakten Gewebes (Glomeruli und proximale Tubuli) bedingen den progredienten Verlust der Nierenfunktion (Fischer et al., 2009; Bergmann, 2014).

Die Leber ist im Sinne einer kongenitalen Leberfibrose mit Malformation der Duktalplatte betroffen. Auch hier verdrängt proliferierendes Zystenepithel funktionierendes Leberparenchym (Bergmann, 2014).

Die Symptome der ARPKD manifestieren sich in den meisten Fällen schon prä- bzw. perinatal, bei milden Formen sehr selten auch erst in der Adoleszenz. Typische pränatale Symptome sind ein Oligohydramnion aufgrund der verminderten fetalen Diurese sowie



**Abb. 2:** Klinische Manifestationen der ARPKD.

- a) ausladendes Abdomen bei neonataler ARPKD.
- b) deutlich vergrößerte Nieren eines pränatal verstorbenen ARPKD-Patienten.
- c+d) Sonografischer Befund eines Säuglings mit ARPKD: Pfeffer-und-Salz-Muster und aufgehobene Mark-Rinden-Differenzierung.

Aus: Bergmann 2014 "Zystische Nierenerkrankungen und Ziliopathien"

deutlich vergrößerte Nieren mit erhöhter sonographischer Echogenität (Abb. 2). Aufgrund der großen Nieren und des Oligohydramnions besteht häufig eine Lungenhypoplasie mit sekundärer respiratorischer Insuffizienz sowie ein hohes Risiko für die Ausbildung eines Spontanpneumothorax. Auch Zeichen einer Herzinsuffizienz sind möglich.

Bei 70 - 80 % der betroffenen Kinder besteht bereits bei Geburt eine Niereninsuffizienz mit Oligo- oder Anhydrie, Hyponatriämie und ausgeprägtem arteriellem Hypertonus, welcher sich medikamentös häufig nur schwer kontrollieren lässt. Oft kommen zusätzlich faziale Stigmata wie fliehende Stirn, tiefe und flache Ohren, Epikanthus medialis und Hypertelorismus sowie Fehlbildungen der Extremitäten (z.B. Klumpfüße) im Sinne einer Pottersequenz hinzu. Etwa die Hälfte aller betroffenen Neugeborenen zeigt bereits Zeichen der hepatischen Manifestation mit Leberfibrose, portocavaler Hypertension und/oder Hepatosplenomegalie (Porter and Avner, 2011; Bergmann, 2014; Torres

and Harris, 2006; Turkbey et al., 2009).

Generell scheint es, dass Patienten mit zwei heterozygoten Missense-Mutationen im PKHD1-Gen einen etwas milderden Krankheitsverlauf aufweisen als solche mit Deletio-nen und/oder trunkierenden Mutationen. Träger von zwei trunkierenden Mutationen sterben mit großer Wahrscheinlichkeit bereits in der Peri- oder Neonatalperiode (Berg-mann et al., 2005). Entscheidend für das Ausmaß der Erkrankung sind neben Art und Lokalisation der Mutation exogene Faktoren. Da Patientinnen eine stärkere hepatische Beteiligung zeigen als männliche Erkrankte, ist auch ein hormoneller Einfluss anzuneh-men (Rossetti and Harris, 2007; Harris and Torres, 2009; O'Meara et al., 2012).

Da die ARPKD als genetische Erkrankung ein sehr komplexes Protein betrifft und jeder Patient eine individuelle Mutation trägt, ist keine kausale Therapie möglich.

FPC ist, ebenso wie zahlreiche andere für zystische Nierenerkrankungen bzw. hereditäre Nierenfehlbildungen (ADPKD, Nephronophthisen) verantwortliche Proteine, in den pri-mären Zilien lokalisiert (Ward et al., 2003; Harris and Rossetti, 2004; Zhang et al., 2004; Fliegauf et al., 2007).

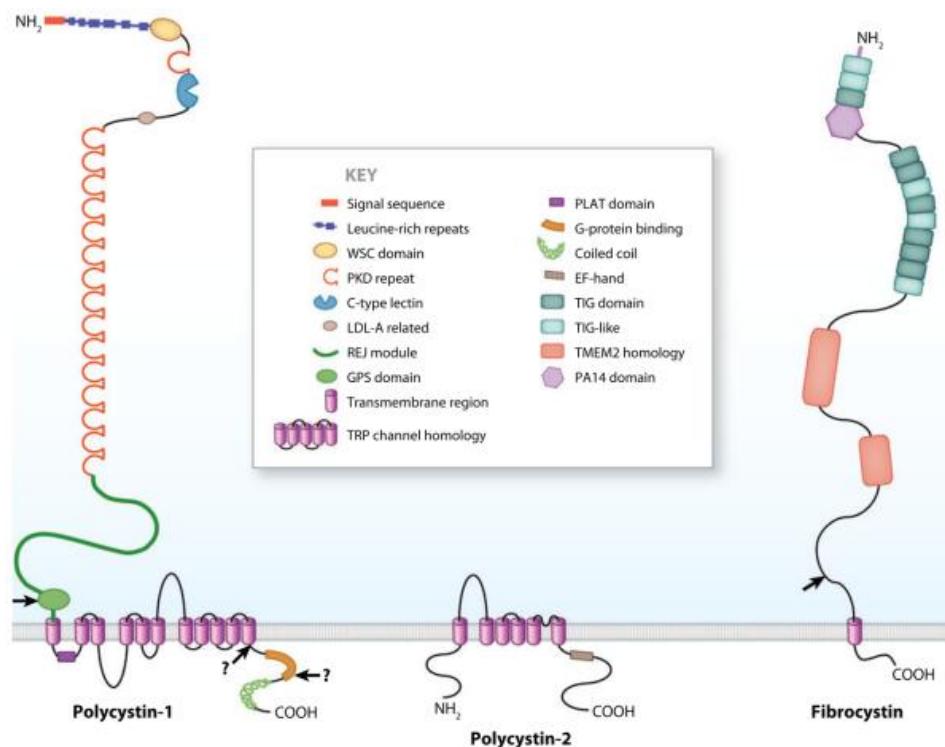
Diese Zellorganellen sind, mit Ausnahme von Hepatocyten, differenzierten myeloischen und lymphatischen Zellen sowie eventuell Endothelzellen, in allen Geweben zu finden und fungieren hauptsächlich als Mechano-, Chemo-, Photo- und Osmosensoren. Außerdem spielen primäre Zilien eine entscheidende Rolle bei der embryonalen Gewebedifferenzie- rung (Ong and Wheatley, 2003; Fliegauf et al., 2007; Veland et al., 2009).

Zilien – und damit auch FPC – sind in eine Reihe weiterer Signalwege (z.B. kanonischer und nicht-kanonischer Wnt-Signalweg, Hedgehog-Signalweg, Ras/MAPK-Signalweg, PI3K-Signalweg, mTOR-Signalweg) involviert, welche für Zellproliferation und -differenzierung sowie Apoptose verantwortlich sind (Fliegauf et al., 2007; Veland et al., 2009; Lee et al., 2011; Wang et al., 2014).

Jede tubuläre Epithelzelle verfügt über ein solches primäres, unbewegliches Zilium, das – im Gegensatz zu den sekundären, meist motilen Zilien – aus neun peripheren Mikrotubuli-Paaren *ohne* zentrales Mikrotubuli-Doublet ( $9 \times 2 + 0$ ) besteht und im Centrosom verankert ist (Ong and Wheatley, 2003). Während der Zellteilung werden die primären Zilien zeitweise reabsorbiert, um an der Formation des Spindelapparates mitzuwirken. Durch die Zellteilung teilt sich auch das Centrosom (bestehend aus Mutter- und Tochter-Centriole), sodass die neu entstandene Zelle ebenfalls in der Lage ist, ein primäres Zilium auszubilden (Torres and Harris, 2006).

In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass FPC gemeinsam mit den Proteinen Polycystin 1 und Polycystin 2 (PC1 und PC2, Abb. 3) einen Komplex bildet, der sich am Zilium und der Plasmamembran befindet (Zhang et al., 2004; Wang et al., 2007; Al-Bhalal and Akhtar, 2008).

Bei der ADPKD sind Mutationen des PC1 (85% der Fälle) oder PC2 ursächlich. PC1 als integrales Membranprotein hat Rezeptor-Funktion, die intrazelluläre C-terminale Domäne interagiert mit PC2. Als Reaktion auf veränderte Mechanostimulation der Zilie kann dieses C-terminale Ende enzymatisch abgespalten und zum Nucleus transportiert werden, und dort als Transkriptionsfaktor aktiv werden. (Lee et al., 2011). Bei PC2 handelt es sich um einen membranösen, rezeptorgesteuerten, nicht-selektiven Kationen-Kanal (Kim et al., 2008). PC2 ist indirekt mit dem intrazellulären C-Terminus des FPC assoziiert, sodass FPC die Aktivität des PC2-Kationen-Kanals stimulieren kann. (Rohatgi et al., 2008; Wu et al., 2006; Wang et al., 2007). Aufgrund dieser engen funktionellen Verbindung zwischen FPC und PC1 bzw. PC2 ist anzunehmen, dass die Pathomechanismen, welche bei der ADPKD und ARPKD zur Zystogenese führen, ebenfalls eng miteinander verbunden sind.



**Abb. 3:** Die Struktur von Polycystin 1 (PC 1), Polycystin 2 (PC 2) und Fibrozystin (FPC).

Aus: Harris and Torres, 2009.

Eine gestörte Interaktion zwischen FPC und dem PC1/PC2-Komplex führt wahrscheinlich über eine gestörte Funktion des Mechanosensors in den tubulären Epithelzellen zu fehlerhafter Gewebeentwicklung (Wang et al., 2007; Fliegauf et al., 2007). In gesunden Zellen führt die Krümmung der primären Zilien zu einem erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx durch den PC2-Kanal (Praetorius and Spring, 2005; Fliegauf et al., 2007). Dabei dient PC1 als Mechanosensor, der zu einer Öffnung des PC2-Kanals führt. Der erhöhte Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in den Intrazellulärtraum führt über Ryanodin-sensitive Rezeptoren sowie am endoplasmatischen Retikulum lokalisierte PC2-Kanäle zur weiteren Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den intrazellulären Speichern (Fliegauf et al., 2007; Rohatgi et al., 2008; Torres and Harris, 2006). Diese erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration induziert mehrere molekulare Vorgänge, die für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Gewebsstruktur verantwortlich sind und beispielsweise auch das Tubuluslumen regulieren (Fliegauf et al., 2007). In Osteoblasten bzw. Osteozyten spielt das Zilium-assoziierte PC1 eine entscheidende Rolle bei anabolen Prozessen (Xiao et al., 2006).

Antiproliferative und Calcium-Einstrom-regulierende Therapieansätze für die ADPKD wurden aufgrund der ähnlichen Pathogenese auch bei der ARPKD geprüft.

## 1.2 Das mammalian Target Of Rapamycin (mTOR)

Das Mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) ist eine Serin/Threonin-Kinase, die vor allem (aber nicht nur) Zellwachstum und -metabolismus in Abhängigkeit von Umweltsignalen steuert und in allen bislang untersuchten eukaryotischen Genomen kodiert ist. In Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen (ausreichend Nährstoffangebot, kein zellulärer Stress durch Hypoxie oder Energiedefizit), stimuliert mTOR anabole Prozesse bzw. inhibiert katabole Prozesse (z.B. Autophagie) (Reiling and Sabatini, 2006; Srinivas et al., 2009; Inoki, 2014). Vermutlich hat mTOR als Nährstoffsensor der Zelle durch Interaktion mit dem Hedgehog (Ihh)-Signalweg auch Einfluss auf die Chondrozytendifferenzierung (Phornphutkul et al., 2008; Ren et al., 2014).

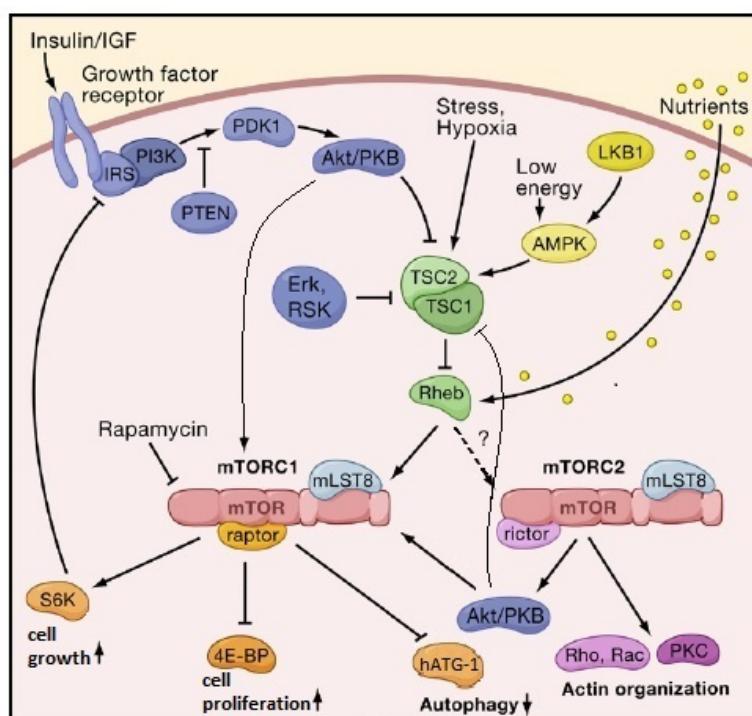
TORs sind große Proteine ( $\sim 280$  kDa), die zur Familie der PhosphatidylInositol Kinase-related Kinase (PIKK) gehören und an ihrem C-terminalen Ende eine Serin/Threonin-Kinase tragen. Daran schließt sich eine FKBP12-Rapamycin-bindende Domäne an, die Rapamycin (Sirolimus) im Komplex mit seinem Kofaktor FKBP12 bindet. N-terminal befinden sich HEAT-Repeats (Huntingtin, Elongation factor 3, protein phosphatase 2A, TOR1), die möglicherweise Schnittstellen für Protein-Protein-Interaktionen darstellen. mTOR ist Bestandteil der Komplexe mTORC1 und mTORC2 (mTOR Complex), die

neben mTOR und dem Protein mLST8 (mammalian Lethal with SEC13 proTein 8) entweder Raptor (mTORC1) oder Rictor (mTORC2) enthalten (Abb. 4).

mTORC1 reguliert Zellproliferation und -wachstum in Abhängigkeit von der Energieversorgung der Zelle. Rapamycin kann mTORC1 inhibieren, indem es die Verbindung zwischen mTOR und Raptor stört und so die katalytische Aktivität des Komplexes hemmt.

mTORC2 ist für die zellzyklusabhängige Polarisierung des Aktin-Zytoskeletts wichtig. Rapamycin hat keinen direkten Effekt auf die katalytische Aktivität von mTORC2, kann aber bei längerer Therapiedauer und in hoher Konzentration trotzdem in einigen Zellarten die mTORC2-Aktivität verringern (Wang et al., 2014; Lieberthal and Levine, 2012a).

Die exogene Stimulation des PI3K-Signalwegs, z.B. durch Interaktion von Wachstumsfaktoren mit ihrem Rezeptor, führt über die Aktivierung von Akt zu einer Aktivierung von mTOR. Parallel dazu wird der Gegenspieler von mTOR, das Heterodimer TSC1/TSC2 (Tuberous SClerosis Proteins Hamartin bzw. Tuberin), gehemmt. Umgekehrt führt die Aktivierung von TSC1/TSC2 durch Hypoxie, osmotischen Stress oder



**Abb. 4:** Modell des mTOR-Signalweges mit den Komplexen mTORC1 und mTORC2. Modifiziert nach: Wullschleger et al., 2006.

Energiemangel zur Hemmung von mTORC1 (Abb. 4).

Ob auch mTORC2 über die Signalkaskade von TSC1/2 bzw. Rheb aktiviert wird, ist noch unklar. Gesichert scheint hingegen, dass mTORC2 ebenfalls durch Wachstumsfaktoren aktiviert wird.

Zielmoleküle von mTORC1 sind die ribosomale S6-Kinase (S6K) und der eukaryotische Initiierungsfaktor 4E-BP. Aktiviertes S6K inhibiert im Sinne einer Feedback-Hemmung den Insulin/IGF-PI3K-Signalweg (Wullschleger et al., 2006; Pallet et al., 2006; Inoki and Guan, 2006; Lieberthal and Levine, 2012a).

Die Aktivität von mTORC1 ist für die Regeneration renaler Zellen notwendig, wohingegen eine langanhaltende Über-Stimulierung von mTORC1 – und eventuell auch mTORC2 – zur Bildung sowie Vergrößerung renaler Zysten führt (Lieberthal and Levine, 2012b). Im Sinne einer proliferativen Erkrankung wurde auch im Nierengewebe von ARPKD-Patienten eine gegenüber gesunden Nieren deutlich erhöhte Expression von aktiviertem mTOR sowie phosphoryliertem Akt und S6K beobachtet (Fischer et al., 2009).

Zusätzlich beschreiben viele Studien mögliche Interaktionen zwischen FPC/PC1 und mTOR (Shillingford et al., 2006; Boletta, 2009; Mekahli et al., 2013; Wang et al., 2014). Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse ist anzunehmen, dass die Aktivierung von mTOR eine wichtige Rolle in der Pathogenese und Progression von ARPKD und ADPKD spielt. Tierversuche zur ADPKD haben positive Effekte durch die Inhibierung von mTOR gezeigt. Dies und der Nachweis der mTOR-Aktivierung bei ARPKD-Patienten haben unsere Arbeitsgruppe veranlasst, die Wirkung von Rapamycin am Tiermodell der PCK-Ratte zu untersuchen (Renken et al., 2011).

### **1.2.1 Die Wirkweise von Rapamycin**

Der mTOR-Inhibitor Rapamycin ist ein fungaler Metabolit, der starke wachstums- und immunsupprimierende Eigenschaften besitzt und deshalb regelhaft zur Immunsuppression nach Organtransplantationen eingesetzt wird. Rapamycin und seine Derivate (Everolimus, Temsirolimus, Deforolimus) verfügen über die für die Wirksamkeit entscheidende FKBP12-Bindungsstelle, sind aber in unterschiedlichem Ausmaß hydro- und/oder lipophil und werden daher oral oder intravenös appliziert. In therapeutischen Dosen inhibiert Rapamycin hauptsächlich mTORC1. Die Rapamycin-Sensitivität hängt von der Art des Gewebes ab, die immunsupprimierende Wirkung beruht auf der hohen Rapamycin-Sensitivität von Lymphozyten (Lieberthal and Levine, 2012a).

## **1.3 Die PolyCysticKidney-Ratte (PCK-Ratte) als Tiermodell der autosomal rezessiv polyzystischen Nierenerkrankung**

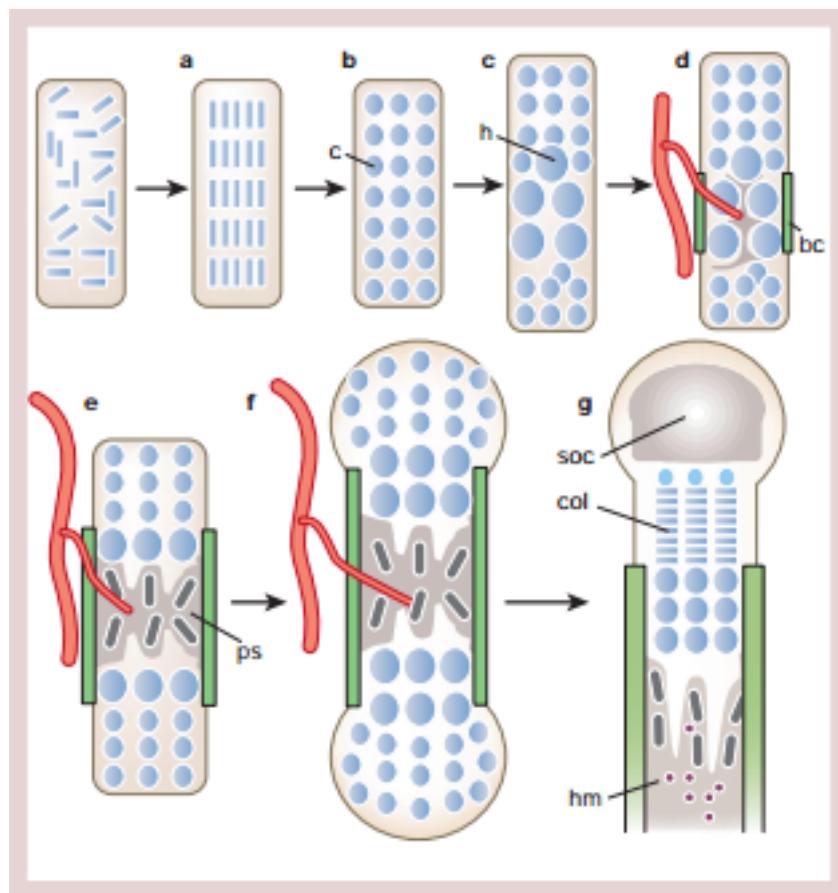
Bei den von der Charles River Japan Inc. gezüchteten Sprague-Dawley-Ratten (Crj:CD/SD) trat 1996 eine Spontanmutation im PKHD1-Gen auf, die zu zystisch vergrößerten Nieren und Lebern führte. Diese Tiere werden seitdem gezielt als orthologes Tiermodell der ARPKD gezüchtet, sind jedoch nur eingeschränkt kommerziell verfügbar (Katsuyama et al., 2000; Lager et al., 2001).

An einer in Mannheim verfügbaren Kolonie dieser Tiere wurde in unserer Arbeitsgruppe untersucht, ob Rapamycin geeignet ist, bei jungen Tieren den Progress der Erkrankung im Hinblick auf Nieren- und Leberfunktion aufzuhalten. Das physiologische Wachstum beruht auf kontrollierter Zellproliferation und Apoptose zum Erhalt von Form und Funktion der wachsenden Organe und des gesamten Organismus. Da Rapamycin antiproliferativ wirkt, muss von Auswirkungen auf das (Längen-)Wachstum ausgegangen werden, sodass in einem Nebenprojekt auch dieser Aspekt der Rapamycin-Behandlung untersucht wurde.

## **1.4 Die Knochenentwicklung und Mineralhomöostase**

### **1.4.1 Die physiologischen Wachstumsprozesse**

Knochen entstehen, mit Ausnahme einzelner Schädelknochen, durch enchondrale Ossifikation, wobei die Form des späteren Knochens bereits während der Embryogenese als Verdichtungen mesenchymaler Stammzellen angelegt wird. Diese Stammzellen differenzieren sich zu Chondrozyten, welche hypertrophieren und eine Kollagen-II-, Aggrecan- und Perlecan-haltige Matrix sezernieren. Gleichzeitig entwickeln sich perichondrale Stammzellen zu Osteoblasten und bilden eine Knochenmanschette. Die Matrix verknöchert in dynamischen Umbauprozessen (Remodeling) zur sekundären Spongiosa mit trajektoriell ausgerichteten Trabekeln (Abb. 5). Das Längenwachstum ist erst dann abgeschlossen, wenn die Epiphysenfuge (Wachstumsfuge, WF) verknöchert ist.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der enchondralen Ossifikation. c = Chondrozyt, h = hypertropher Chondrozyt, bc = Knochenmanschette (bone collar), ps = primäre Spongiosa, soc = sekundäres Ossifikationszentrum in der Epiphyse, col = Zellsäulen der Wachstumsfuge (collum), hm = hämatopoetisches Knochenmark.

a+b: kondensierende Mesenchymalzellen entwickeln sich zu Chondrozyten; c: zentrale Chondrozyten hypertrophieren; d: an hypertrophe Zellen angrenzende, perichondrale Zellen werden zu Osteoblasten und formen eine Knochenmanschette, die Matrix mineralisiert, das Gebiet wird vaskularisiert und die hypertrophen Chondrozyten apoptieren; e: primäre Spongiosa entsteht; f: der Knochen verlängert sich durch weitere Chondrozyten-Proliferation, Osteoblasten der primären Spongiosa werden zu Trabekeln, Osteoblasten der Knochenmanschette werden zum kortikalen Knochen; g: das sekundäre Ossifikationszentrum entwickelt sich in der Epiphyse, darunter liegt die Wachstumsfuge mit den Zellsäulen der proliferativen Chondrozyten, hämatopoetisches Knochenmark füllt den intertrabekulären Raum aus.

Aus: Kronenberg, 2003.

Die Epiphyse besteht aus mehreren, nicht scharf voneinander abgegrenzten Schichten (Abb. 6), in denen von der Epiphyse zur Diaphyse die einzelnen Schritte der Ossifikation ablaufen:

### **1. Reservezone, RZ**

In dieser Zone findet kein Wachstum statt, die ruhenden Knorpelzellen bilden das Reservoir für das weitere Knochenwachstum. Zwischen dem epiphysären Knochen und der Reservezone verlaufen viele Blutgefäße, die die gesamte Wachstumsfuge versorgen.

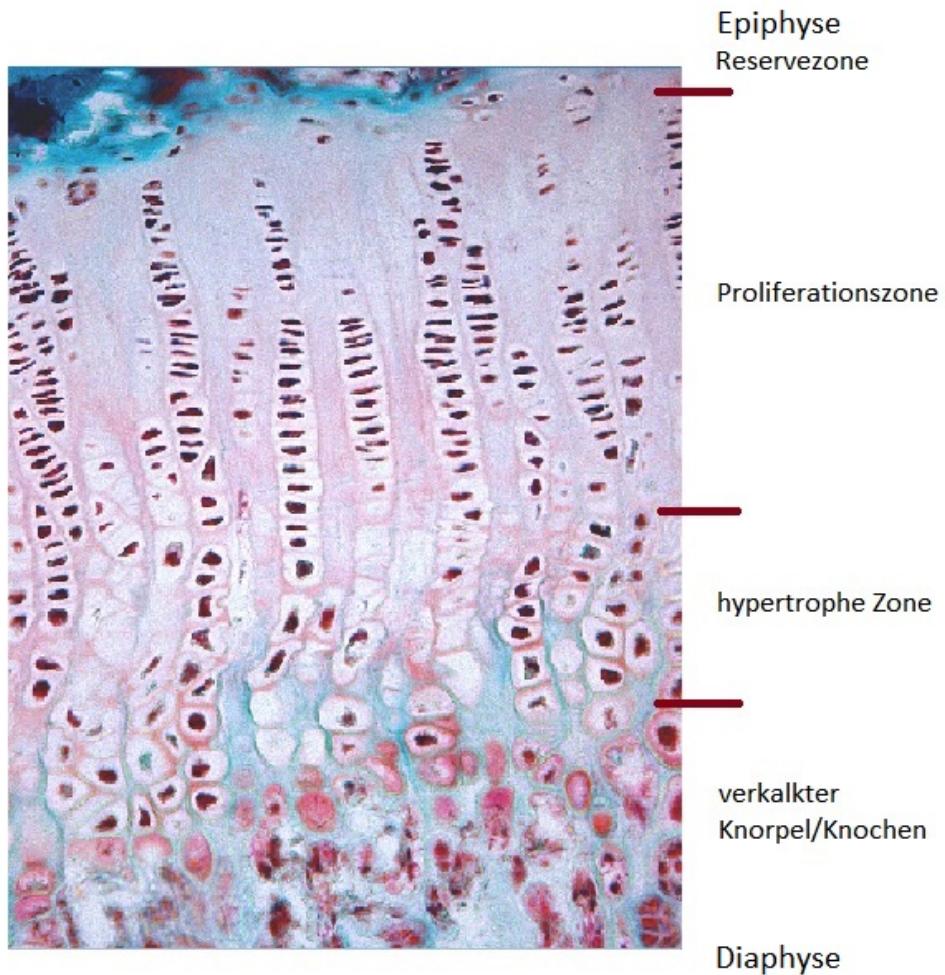
### **2. Proliferationszone, PZ**

Die mitotisch aktiven, proliferierenden Chondrozyten sind säulenartig angeordnet und ersetzen die Knorpelzellen, welche an der diaphysären Seite der Wachstumsfuge für die Knochenbildung verloren gehen. Dadurch entfernen sie sich sukzessive von der primären Spongiosa, was zu einem Längenwachstum des Knochens führt. Die Zellsäulen sind eigene funktionelle Einheiten, in denen die Chondrozyten simultan die verschiedenen Stadien ihrer Differenzierung durchwandern.

### **3. Hypertrophe Zone, HZ**

In dieser Zone ist die Säulenstruktur deutlich aufgelockert, die ausdifferenzierten Knorpelzellen sind groß ("Blasenknorpel") und besitzen einen hellen, runden Zellkern. Diese Chondrozyten sezernieren unter anderem die Alkalische Phosphatase (AP), ein matrix-verkalkendes Enzym, sowie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), was das Einsprossen von Kapillaren aus der nachfolgenden Eröffnungzone anregt. Weiterhin synthetisieren diese Chondrozyten das netzförmige Kollagen X, welches die Grundlage der späteren Knochenmatrix bildet.

Daneben befindet sich die Eröffnungszone, ein Gebiet mit verkalkender Knorpelsubstanz und longitudinalen Septen. Die Chondrozyten sezernieren hier als Voraussetzung für die Reorganisation der Extrazellulärmatrix u.a. Matrix-Metalloproteininasen (MMPs). Über die Blutgefäße wandern Chondroblasten ein, die die Trabekel und damit auch den Markraum formen. Des Weiteren gelangen Calcium- und Phosphat-Ionen in das interkapilläre Gebiet, wo sie sich an Calcium-bindene Proteine (v.a. Osteocalcin) und Kollagen X anlagern. Die Chondrozyten gehen durch Apoptose zugrunde. Gleichzeitig differenzieren mesenchymale Stammzellen zu Osteoblasten, die sich an die Knorpelsepten anlagern und dort eine nicht mineralisierte Knochenmatrix aus Proteoglykanen und Kollagen Typ I



**Abb. 6:** Die einzelnen Zonen der Wachstumsfuge

(Osteoid) bilden. Anschließend wird diese Matrix durch die Einlagerung von Hydroxylapatit mineralisiert (Hunziker, 1994; Kronenberg, 2003; Zelzer and Olsen, 2003; Welsch, 2006; Gustafsson et al., 2003).

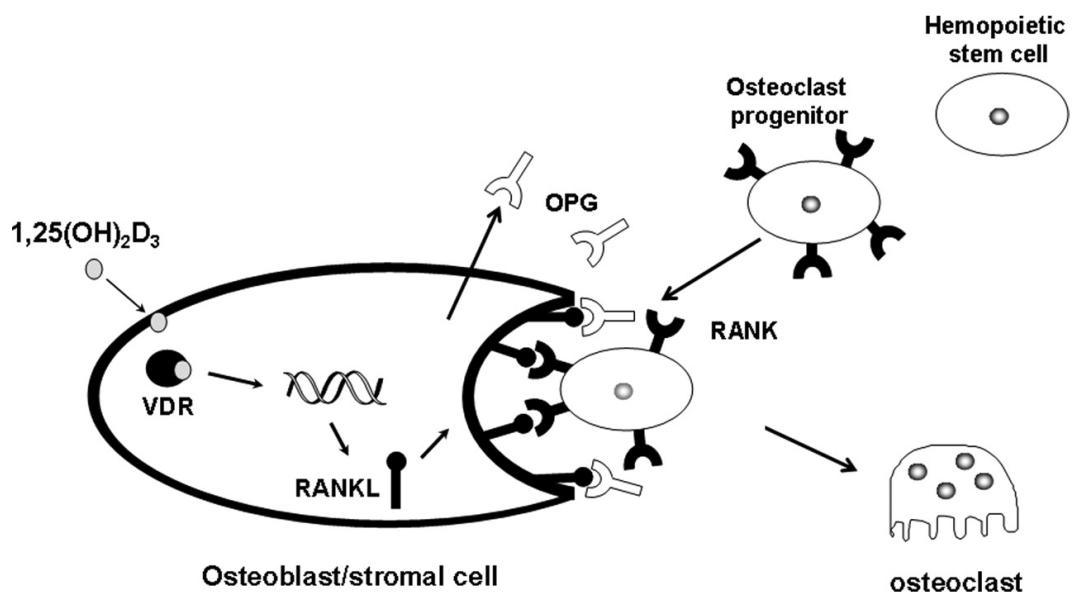
Die Chondrozytenaktivität in der Wachstumsfuge ist für das Längenwachstum entscheidend. Längenwachstum und das Volumen der hypertrophen Chondrozyten sind direkt proportional zueinander (Hunziker et al., 1987; Hunziker and Schenk, 1989; Breur et al., 1991).

Die Höhe der Wachstumsfuge (WFH) wird durch das Zusammenspiel von Knorpel- und Knochenbildung bestimmt (Santos et al., 2005).

## **1.4.2 Die hormonelle Regulation des Knochenstoffwechsels**

Die Calcium- und Phosphathomöostase wird durch Parathormon (PTH), 25(OH)Vitamin D<sub>3</sub> bzw. 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin D<sub>3</sub>, Fibroblast Growth Factor (FGF-23) und dessen Rezeptor Klotho reguliert. Diese Hormone stimulieren zum Einen die Freisetzung von Calcium und Phosphat aus dem Knochen bzw. die gastrointestinale Resorption und zum Anderen die renale Ausscheidung. PTH fördert durch Stimulation der renalen 1,α-Hydroxylase (CYP27B1) die 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin D<sub>3</sub>-Synthese, was die Sekretion von FGF-23 induziert. Umgekehrt hemmt FGF-23 die renale 1,α-Hydroxylase und die PTH-Sekretion. Außerdem ist die durch RANK-RANKL und OPG (Osteoprotegerin) medierte Interaktion zwischen Osteoblasten (RANK-L = RANK-Ligand) und präterminaler Osteoklasten (RANK) für den Knochenaufbau und - umbau entscheidend (Abb. 7). 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin D<sub>3</sub> aktiviert Osteoblasten und die Expression von RANK-Liganden. Diese binden an RANK auf Osteoklastenprogenitorzellen und stimulieren deren Reifung. Das ebenfalls von Osteoblasten freigesetzte OPG bindet freie RANK-Liganden und verhindert die Differenzierung der Osteoklasten (Holick, 2006; Dusso et al., 2005; Alshahrani and Aljohani, 2013).

Dieses Gleichgewicht ist bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz empfindlich gestört. Dysbalance in der Calcium- und Phosphat-Homöostase tragen erheblich zu den bei den Patienten beobachteten Gefäßverkalkungen und Mineralisierungsstörungen der Knochen bei (renale Osteodystrophie). Besonders schwer wiegen diese Knochenstoffwechseldefekte, wenn sie schon während der skelettalen Entwicklung – also im Kindesalter – auftreten (Moe, 2008; Hruska et al., 2010; Haffner and Fischer, 2010).



**Abb. 7:** Die Interaktionen zwischen Osteoklasten und Osteoblasten durch RANK-RANKL: Osteoblasten exprimieren RANKL (RANK-Ligand) auf ihrer Oberfläche. Bindet RANKL an RANK, so differenzieren prämature Osteoklasten zu reifen Osteoklasten. Durch die Bindung von RANKL an OPG wird RANKL für eine mögliche RANK/RANKL-Interaktion blockiert und somit die Osteoklastenausreifung gehemmt.  $1,25(\text{OH})_2\text{Vitamin D}_3$  und PTH stimulieren die RANKL-Expression, gleichzeitig hemmt  $1,25(\text{OH})_2\text{Vitamin D}_3$  die OPG-Produktion, sodass die Osteoklastendifferenzierung und -aktivität gehemmt ist.

Aus: Dusso, 2005.

## 2 Ziel der Arbeit

Bei der ARPKD handelt es sich um eine hereditäre Nieren- und Lebererkrankung mit den Folgen einer potentiell terminalen Niereninsuffizienz und schweren portalen Hypertension, die eine Nieren- und/oder Lebertransplantation erforderlich machen.

Die Therapie der ARPKD zielt auf den Funktionserhalt oder -ersatz der betroffenen Organe und die Reduktion der Begleitsymptome. Eine kausale Therapie steht – abgesehen von der Organtransplantation – nicht zur Verfügung.

Antiproliferative Medikamente werden bei der ADPKD schon lange eingesetzt, um die Progression zu hemmen. Durch die große (pathogenetische) Ähnlichkeit der ARPKD zur ADPKD wurden vielfach Therapieansätze der ADPKD auf die deutlich seltener ARPKD übertragen – bisher jedoch nur mit mäßigem Erfolg. Nun soll der therapeutische Einsatz des antiproliferativen Rapamycins evaluiert werden. Da es sich bei der ARPKD um eine proliferative Erkrankung mit aktivierter mTOR-Kaskade handelt, ist der Einsatz von Rapamycin begründet. Die Wirkung des Medikaments wurde im Tierversuch untersucht. Als primäres Studienziel dieses Tierexperimentes wurde geprüft, ob Rapamycin den Progress der Nieren- und/oder Leberzysten aufhalten kann (Voigt, geb. Renken, 2012).

Sekundäres Ziel dieser Studie war die Beschreibung der durch Rapamycin verursachten Veränderungen von Wachstum, Knochenstoffwechsel und Knochenhistomorphologie der behandelten Ratten. Da mTOR ein entscheidender Regulator für Wachstum und Zelldifferenzierung ist, führt die Hemmung durch Rapamycin wahrscheinlich zu Wachstumsstörungen. Dies würde bei den ARPKD-Patienten besonders schwer wiegen, da sie häufig schon in frühester Kindheit therapiebedürftig sind.

# **3 Material und Methoden**

## **3.1 Materialien**

### **3.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Antikörper**

**AppliChem GmbH, Darmstadt**

5-Brom-2-deoxyuridin, Triton X 100

**Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe**

Eosin G (0,5%)

**Dako Chemikalien, Hamburg**

monoklonaler Maus-anti-BrdU-Antikörper (Klon Bu20a, Isotyp IgG<sub>1</sub>/K)

**Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim**

Technovit ®9100<sup>neu</sup>

**Menzel GmbH Co.KG, Braunschweig**

Objektträger Superfrost Plus und Deckgläschchen

**Merck KGaA, Darmstadt**

Eindeckmittel: Aquatex und Entellan, Mayers Hämalaun (gebrauchsfertig), Molybdato-phosphorsäure-Hydrat, Orange G, Säurefuchsin, Weigerts Eisenhämatoxylin

**Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim**

Azophloxin, Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) in Tablettenform (10 mg/Tbl), Direkt Rot 80, Lichtgrün, Pikrinsäure, Ponceau de Xylidine

**Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA**

Avidin-Biotin-Komplex-Reagenz, Avidin-Biotin-Blockierkit, Biotin-konjugierte Pferde-anti-Maus/anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, Pferde- und Ziegenserum als Blockiermedi-

um für die Immunhistochemie

Die **Grundchemikalien** stammten im Allgemeinen von den Firmen Merck KGaA oder Carl Roth GmbH & Co. KG und hatten mindestens p.a.-Qualität. Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt (Wasseraufbereitung mit Ionenaustauscher Typ Destillo 20).

### **3.1.2 Geräte und Software**

Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten mit einem Leica DMI 4000-Mikroskop, welches mit einer digitalen Schwarz-Weiß- und einer Farbkamera ausgestattet war (DFC 320 R2 und DFC 350 Fx). Die Auswertung mikroskopischer Aufnahmen erfolgte mit Hilfe der zugehörigen Software (Leica Application Suite, Version 3.6 und Leica Application Suite Advanced Fluorescence, Version 2.3.0).

Die Osteodensitometrie mit Hilfe der Dual-Energie-Röntgen-Absorptiometrie (DXA) erfolgte in der Klinik für Orthopädie der Universitätsmedizin Rostock (Direktor: Prof. Dr. med. W. Mittelmeier) unter der Anleitung von Dr. Tobias Lindner am Lunar-Prodigy-Osteodensitometer (GE Healthcare, München). Die mikrocomputertomographischen Untersuchungen der Knochen wurden am Skyscan 1076- $\mu$ -CT (Bruker-MikroCT, Kontich, Belgien) durchgeführt. Die Rekonstruktion sowie die Analyse der Daten erfolgten mit den Programmpaketen NRecon (Version 1.6), CT-Analyser (Version 1.10) und CTVolume (Version 2.0; alle Bruker-MikroCT, Kontich, Belgien).

## **3.2 Beschreibung des Tierversuches**

In einem Tierversuch wurde an gesunden SD-Ratten und PCK-Ratten geprüft, ob Rapamycin geeignet ist, die Nieren- und Leberfunktion bei der ARPKD zu erhalten (Renken et al., 2011).

SD-Ratten wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld) gekauft und PCK-Ratten vom Zentrum für Medizinische Forschung in Mannheim (Prof. N. Gretz/Dr. B. Kränzlin) zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden ab einem Alter von 3 Wochen (SD-Tiere) bzw. 4 Wochen (PCK-Tiere) vom Muttertier abgesetzt, jeweils paarweise gehalten und käfigweise randomisiert. Nach Akklimatisierung an die neuen Haltungsbedingungen (1 Woche) erhielten die Tiere über einen Zeitraum von 4, 8 oder 12 Wochen entweder reines Trinkwasser oder Rapamycin-haltiges Trinkwasser. Die pro Käfig von den Tieren aufgenommene Wassermenge wurde täglich registriert. Die dem Trinkwasser zugesetzte

Menge Rapamycin wurde so berechnet, dass pro Tag und Tier eine Dosis von 2 mg/kg KG aufgenommen wurde. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten reines Wasser. Alle Tiere hatten ad libitum Zugang zu Futter (Tab. 1).

Die Gruppenbezeichnung enthält Angaben zum Stamm (PCK oder SD), zum Geschlecht (m oder w), zur Versuchsdauer (4, 8 oder 12 Wochen) und zur Behandlung mit Rapamycin (ohne c<sub>0</sub>/mit c<sub>1</sub>).

In den letzten 10 Tagen vor Versuchsende erhielten alle Tiere mit dem Trinkwasser Bromdesoxyuridin (BrdU) zur Markierung proliferierender Zellen. Zur Überdeckung des BrdU-Geschmackes wurde zusätzlich Glucose (50 g/l) zugesetzt. 7 und 3 Tage vor Versuchsende erhielten alle Tiere Tetrazyklin (30 mg/kg KG) bzw. Demeclozyklin (25 mg/kg KG) als s.c. Injektion, um später die Mineralisierungsrate zu bestimmen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die Auswirkungen der Rapamycin-Behandlung auf die Morphologie und Struktur der Epiphyse und das Längenwachstum untersucht.

**Tabelle 1:** Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe

Tiere in der Auswertung (vorzeitig ausgeschieden)		Tiere in der Auswertung (vorzeitig ausgeschieden)	
PCKmt <sub>4</sub> c <sub>0</sub>	5	SDmt <sub>4</sub> c <sub>0</sub>	6
PCKwt <sub>4</sub> c <sub>0</sub>	8	SDwt <sub>4</sub> c <sub>0</sub>	5 (1)
PCKmt <sub>4</sub> c <sub>1</sub>	5	SDmt <sub>4</sub> c <sub>1</sub>	6
PCKwt <sub>4</sub> c <sub>1</sub>	9	SDwt <sub>4</sub> c <sub>1</sub>	6
PCKmt <sub>8</sub> c <sub>0</sub>	6	SDmt <sub>8</sub> c <sub>0</sub>	6
PCKwt <sub>8</sub> c <sub>0</sub>	6	SDwt <sub>8</sub> c <sub>0</sub>	6
PCKmt <sub>8</sub> c <sub>1</sub>	5 (1)	SDmt <sub>8</sub> c <sub>1</sub>	6
PCKwt <sub>8</sub> c <sub>1</sub>	10	SDwt <sub>8</sub> c <sub>1</sub>	5 (1)
PCKmt <sub>12</sub> c <sub>0</sub>	6	SDmt <sub>12</sub> c <sub>0</sub>	6
PCKwt <sub>12</sub> c <sub>0</sub>	8	SDwt <sub>12</sub> c <sub>0</sub>	6
PCKmt <sub>12</sub> c <sub>1</sub>	4 (2)	SDmt <sub>12</sub> c <sub>1</sub>	6
PCKwt <sub>12</sub> c <sub>1</sub>	8 (2)	SDwt <sub>12</sub> c <sub>1</sub>	6

### **3.3 Makroskopische und histologische Knochenbeurteilung**

Die Tibiae und Femura beider Hinterläufe wurden am Versuchsende nach Exsanguination entnommen, von anhaftenden Sehnen, Muskeln und Bindegewebe befreit und in 70%igem Ethanol asserviert. Die makroskopischen Daten beider Tibiae (Länge, ventero-dorsaler Durchmesser (d1) und medio-lateraler Durchmesser (d2)) wurden mit einer Schieblehre bestimmt. Die linken Tibiae wurden mit einer schnelllaufenden Mini-Kreissäge sagittal gespalten und nach Herstellerangaben (modifiziert für den manuellen Einsatz) in Poly-Methyl-Methacrylat (Technovit®9100<sup>neu</sup>) eingebettet (Abb. 8).



**Abb. 8:** In Technovit®9100<sup>neu</sup> eingebettetes proximales Tibiafragment

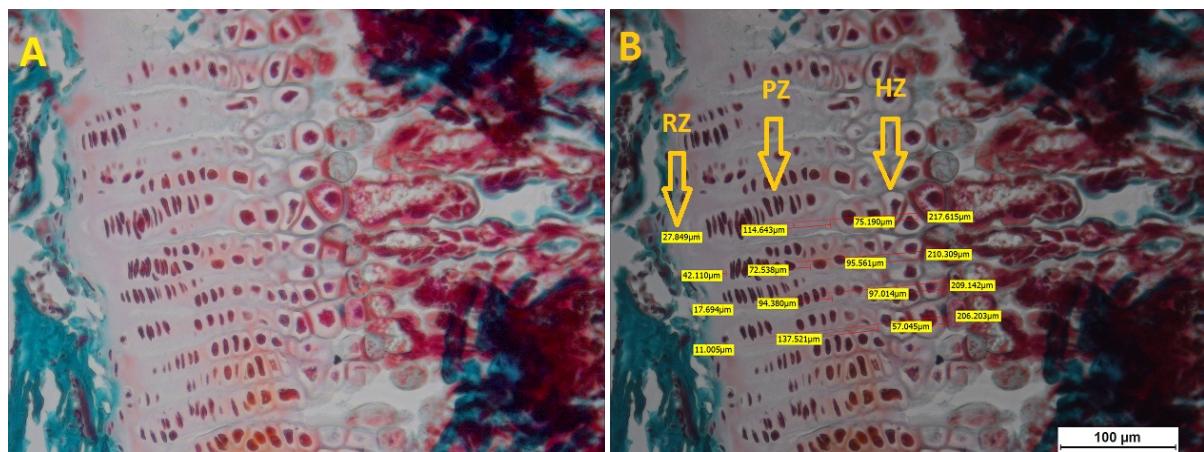
Von diesen Präparaten wurden am Rotationsmikrotom (Leica RM 2255, Leica, Wetzlar) Schnitte (5 µm für die histologischen und immunhistochemischen bzw. 7 µm für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen) erstellt und auf beschichtete Objektträger (Superfrost Plus) aufgebracht. Zur quantitativen und morphologischen Charakterisierung der WF wurden die Präparate nach verschiedenen Methoden gefärbt.

Für die dynamische Histomorphometrie (Bestimmung der Mineralisierungsrate/d) wurden im Forschungslabor der Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie (Direktor: Prof. Dr. Dr. B. Frerich) der Universitätsmedizin Rostock ungefärbte Knochenschliffe angefertigt. Dazu wurden 200 µm dicke Proben parallel zur Längsachse aus dem eingebetteten Knochen gesägt, auf unbeschichtete Objektträger aufgebracht und auf eine

Dicke von 20 µm heruntergeschliffen. Danach wurden sie mit Glycerin eingedeckt und am Fluoreszenzmikroskop bei 200-facher Vergrößerung beurteilt.

An den intakten rechten Tibiae wurden die volumenbezogene Mineraldichte und Knochenmikrostruktur am µ-CT ermittelt. Die flächenbezogene Mineraldichte (aBMD) wurde mit der Dual-Energie-Röntgen-Absorptiometrie an den linken Femura bestimmt.

Weichteilgewebe und Osteoid wurde in der Trichromfärbung nach Masson-Goldner (MG-Färbung) sichtbar gemacht. Mit dieser Färbung stellen sich Zellkerne braun-schwarz, das Zytoplasma ziegelrot, Erythrozyten orange, Osteoid rötlich und mineralisiertes Knochen-gewebe türkis-blau dar (Abb. 9).



**Abb. 9:** Masson-Goldner-Trichrom-Färbung eines in Technovit®9100<sup>neu</sup> eingebetteten Ratten-Knochenpräparates, 200-fache Vergrößerung, mit eingefügten Messbalken (B) für die Reservezone (RZ), Proliferationszone PZ und hypertrophe Zone (HZ)

Herstellung der (Färbe-)Lösungen:

#### Ponceau-Säurefuchsin (Massonlösung)

Lösung A: 1 g Säurefuchsin ad 100 ml Aqua dest. + 1 ml konz. Essigsäure

Lösung B: 2 g Ponceau de Xylidine ad 200 ml Aqua dest. + 2 ml konz. Essigsäure

1 Teil Lösung A + 2 Teile Lösung B

#### Azophloxin-Lösung

0,5 g Azophloxin ad 100 ml Aqua dest. + 2 ml konz. Essigsäure

### Färbeträger:

1. Weigerts Hämatoxylin
2. Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin-Lösung  
5 T Masson-Lösung + 1 T Azophloxin-Lösung + 44 T 0,2%ige Essigsäure
3. Phosphomolybdänsäure-Orange G-Lösung  
6 g Phosphomolybdänsäure in 100 ml Aqua dest. lösen, 4 g Orange G in 100 ml  
A. dest. lösen und beide Lösungen mischen
4. Lichtgrün-Lösung  
0,25 g Lichtgrün in 250 ml 0,2%ige Essigsäure

### Waschlösung

1% Essigsäure

### Durchführung:

1. 5 min Aqua dest.
2. 10 min Weigerts Hämatoxylin
3. 6 min Bläuen unter fließendem Leitungswasser
4. 10 sec Aqua dest.
5. 60 min Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin
6. 1 min 1%ige Essigsäure
7. 7 min Phosphomolybdänsäure-Orange G-Lösung
8. 1 min 1%ige Essigsäure
9. 40 min Lichtgrün
10. 1 min 1%ige Essigsäure
11. 10 sec. Aqua dest.
12. aufsteigende Alkoholreihe: je 2 min 70% und 80% Ethanol
13. 2 h 100% Xylol
14. Eindecken mit Entellan

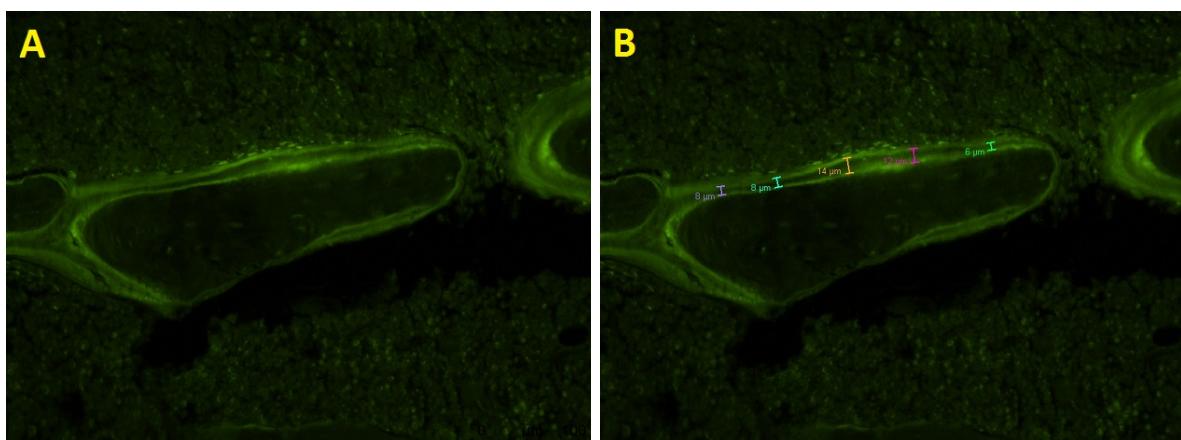
Um die Höhe von hypertropher Zone, Proliferations- und Reservezone in den Wachstumsfugen zu messen, wurden die randständigen Sichtfelder (field of view, FOV) nicht berücksichtigt. Aus den zentralen Bereichen wurden gut sichtbare, möglichst gerade verlaufende Chondrozytensäulen ausgewählt und die Gesamthöhe der Wachstumsfuge (WFH) sowie die der verschiedenen Zonen ermittelt. Pro Tier wurden diese Werte an 10 bis 30 Zellsäulen bestimmt. Präparate, die weniger als 10 auswertbare Chondrozy-

tensäulen enthielten, wurden nicht berücksichtigt.

Zur Bestimmung der Mineralisierungsrate/d wurden die mit Glycerin eingedeckten Knochenschliffe am Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Anregungsfilter: 355 – 425 nm; Sperrfilter: 470 nm). Während Tetrazyklin eher grün fluoresziert, ist für sein Derivat Demeclozyklin die gelbliche Farbe typisch (Abb. 10).

Der Abstand zwischen Tetrazyklin- und Demeclozyklin-Markierung wurde bestimmt und aus dem Abstand dieser Markierungen wurde die Mineralisierungsrate pro Tag (MAR [ $\mu\text{m}/\text{d}$ ]) berechnet. Dabei wurden pro Tier 10 – 30 Messwerte aus sechs bis zwölf unterschiedlichen trabekulären Gesichtsfeldern erfasst (Abb. 10). Tiere mit weniger als 10 Messwerten wurden für die Auswertung nicht berücksichtigt.

Ausreißer ( $<1.\text{Q}-1.5\text{IQR}$  oder  $>3.\text{Q}+1.5\text{IQR}$ ) wurden eliminiert.



**Abb. 10:** Nachweis von Tetrazyklin und Demeclozyklin als fluoreszierende Linien in einem Dünnschliffpräparat (A), Abstände zwischen den Fluoreszenz-Markierungen (B); Fluoreszenzmikroskopie, 200-fache Vergrößerung

### 3.3.1 Identifizierung proliferierender Zellen

Die cDNA proliferierender Zellen wurde in-vivo durch Einbau von BrdU markiert und post mortem immunhistochemisch durch Nachweis des BrdU im Zellkern sichtbar gemacht. Diese Analyse wurde nur an Knochen von Tieren, welche sich für 4 Wochen im Versuch befanden, durchgeführt.

## Herstellung der Puffer und Waschlösungen

### **Tris Buffered Saline (TBS)**

0,1 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan + 1,5 M NaCl; mit HCl auf pH 7,5 eingestellt

### **Tris-HCl-Lösung**

0,1 M Tris-hydrochlorid; mit HCl auf pH 3,7 eingestellt

### **Blockierlösung**

10 ml 0,1 M Tris-HCl-Lösung + 50µl Pferdeserum

### **Biotin-konjugierter Sekundärantikörper**

100µl Pferdeserum + 100 µl Biotin-konjugierter Pferde-anti-Maus/anti-Kaninchen-IgG-Antikörper in 10 ml 0,1 M Tris-HCl-Lösung

### **Avidin-Biotin-Komplex-Reagenz**

4 Tr. Lösung A (Avidin) + 4 Tr. Lösung B (biotinylierte Peroxidase) aus dem Vecastain

® Elite ABC Kit + 10 ml 0,1 M Tris-HCl-Lösung

### **Entwicklungsbuffer**

4 ml TBS + 16 ml Aqua dest. + 1 Tbl. DAB + 6,4 µl 30%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung

## Entplastung:

1. Xylol (2 x 20 min)
2. 2-Methoxyethylacetat (20 min)
3. Aceton (2 x 5 min)

## DNA-Denaturierung:

1. Aqua dest. (5 min)
2. 2 M HCl-Lösung (60 min)
3. Aqua dest. (5 min)
4. 0,1 M Tris-HCl-Lösung (pH 3,7) (5 min)
5. 0,1 M *CaCl*<sub>2</sub> und Trypsin (0,5mg/ml) (30 min)
6. 0,1 M Tris-HCl-Lösung (pH 3,7) (5 min)

#### Immunhistochemischer Nachweis von BrdU:

1. Umranden der Präparate auf dem Objektträger mit Fettstift
2. Hemmung der endogenen Peroxidase (30 min; 10%  $H_2O_2$  in  $H_2O$ )
3. Spülen mit Aqua dest. (5 min)
4. Blockierung unspezifischer Bindungsstellen (75 min, RT, feuchte Kammer)
5. Primärantikörper (120 min, RT, feuchte Kammer; geeignete Verdünnung in Blockierlösung)
6. Waschen (2 x 5 min; 0,1 M Tris-HCl-Lösung (pH 3,7))
7. Biotin-konjugierter Sekundärantikörper (30 min, RT, feuchte Kammer)
8. Waschen (2 x 5 min; 0,1 M Tris-HCl-Lösung (pH 3,7))
9. 30 min Inkubation mit Avidin-Biotin-Komplex-Reagenz (30 min, RT, feuchte Kammer)
10. Waschen (2 x 5 min; 0,1 M TBS)
11. 3 min Entwicklungspuffer
12. Waschen (5 min; 0,1 M TBS)
13. 30 s Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun
14. 10 min Bläuen unter fließendem Leitungswasser
15. Eindecken mit Aquatex®

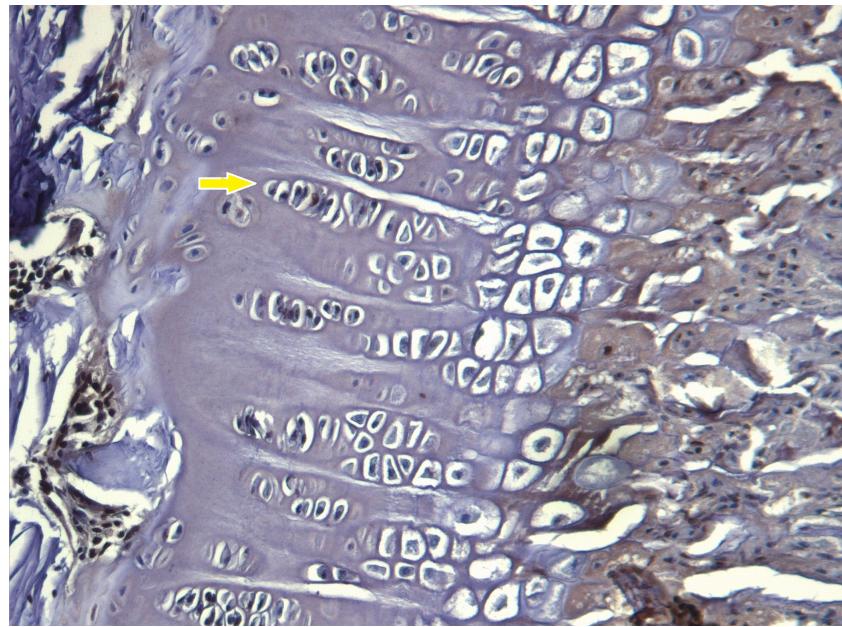
Bei der Auswertung wurden randständige (schiefe) Zellsäulen nicht berücksichtigt. Die Zellzahl in der hypertrophen Zone (HZ) und der Proliferationszone (PZ) sowie die jeweilige Zahl BrdU-positiver Zellen wurden manuell ermittelt.

Pro Präparat wurden 10 – 15 Zellsäulen in die Auswertung einbezogen und nur Präparate mit mindestens 10 auswertbaren Zellsäulen berücksichtigt.

Der Chondrozytenproliferationsindex (ChPI) ist der mittlere relative Anteil BrdU-positiver Zellen in HZ und PZ.

### **3.4 Bestimmung des flächenbezogenen Mineralgehalts in den Femura**

Zur Bestimmung des flächenbezogenen Mineralgehalts der Knochen (areal Bone Mineral Density, aBMD) wurde die Dual-Energie-Röntgen-Absorptiometrie (DXA) eingesetzt. Die Femura wurden für die Messung auf einer Styroporplatte angeordnet. Die Messbereiche (1 cm lang mit der maximal möglichen Breite) befanden sich im proximalen



**Abb. 11:** Immunhistochemischer Nachweis von BrdU-positiven Chondrozyten in der Proliferationszone; BrdU-Immunhistochemie, 200-fache Vergrößerung: ausgezählte Zellsäule (Pfeil)

Teil des Knochens ca. 0,5 cm unterhalb der Femurkopfoberkante, um eine Verfälschung der Messergebnisse durch die Wachstumsfuge zu vermeiden. Pro Knochen wurden zwei aBMD-Werte bestimmt und die Ergebnisse gemittelt.

## 3.5 Mikro-Computertomographie zur Analyse der Knochenmikrostruktur

### 3.5.1 Durchführung der Messungen

Die Mikroarchitektur der rechten Tibiae wurde im Mikro-Computertomographen ( $\mu$ -CT) bestimmt. Die Proben wurden aus der Ethanol-Lösung entnommen und in Frischhaltefolie gewickelt, um ein Austrocknen während der Messung zu verhindern. Die gerätespezifischen Einstellungen für Aufnahmen und Rekonstruktion der Schnittbilder sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Es wurde jeweils ein ca. 2 cm langer Abschnitt der proximalen Tibia untersucht.

**Tabelle 2:** Einstellungen während Aufnahme und Rekonstruktion der  $\mu$ -CT-Bilder

**Scan-Parameter**

Filter	0,5 mm Aluminium
Röntgenröhren-Spannung	50 kV
Röntgenröhren-Stromstärke	200 $\mu$ A
Pixelgröße	8,9 $\mu$ m
Kamera-Auflösung	4000 pixel field width
Tomografische Rotation	180°
Rotationswinkelinkrement	0,8°
Frame averaging	2

**Einstellungen bei der Bildverarbeitung**

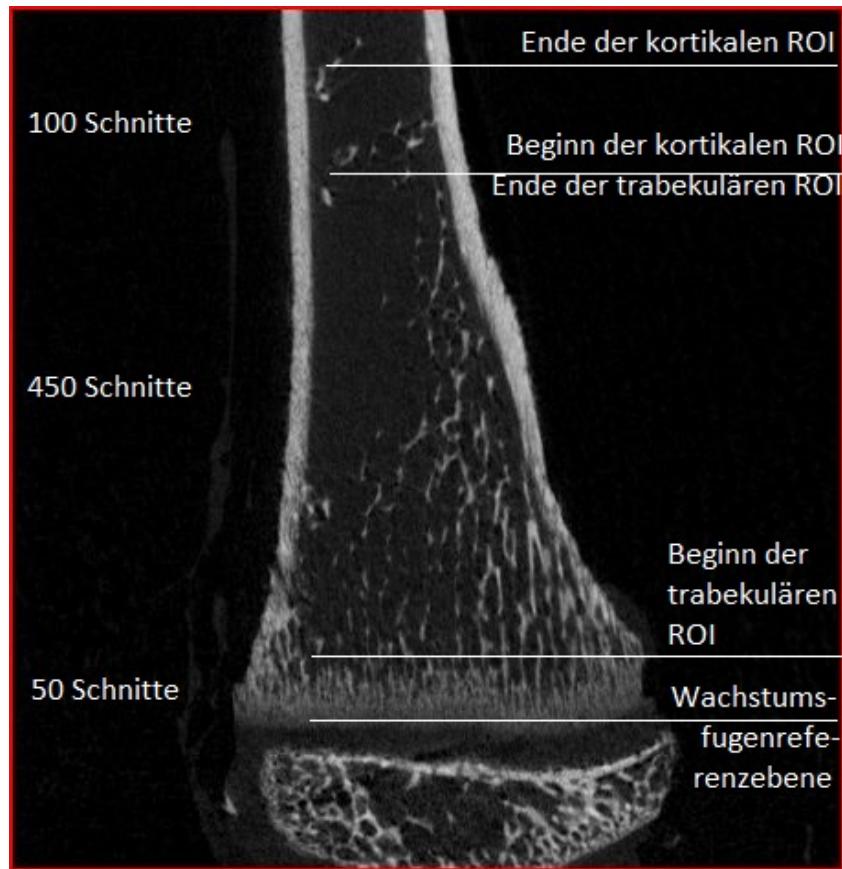
Beam hardening correction	30%
Defect pixel masking	20%
Ringartefakt-Reduktion	6
Smoothing	2
Alignment correction	automatisch
Segmentation threshold	64

### 3.5.2 Rekonstruktion und Bestimmung von Strukturparametern aus den $\mu$ -CT-Daten

In jedem Knochen war in metaphysärer Richtung die erste Schicht, in welcher der zentrale Knorpelbereich durch feine Spongiosa unterbrochen wird, die Referenzschicht. Ausgehend von dieser Ebene wurde die 51. Schicht als Beginn der trabekulären ROI, die ihrerseits 450 Schnitte umfasste, definiert. Im Anschluss befand sich die 100 Schnitte umfassende kortikale ROI (Abb. 12, (Salmon, 2011)).

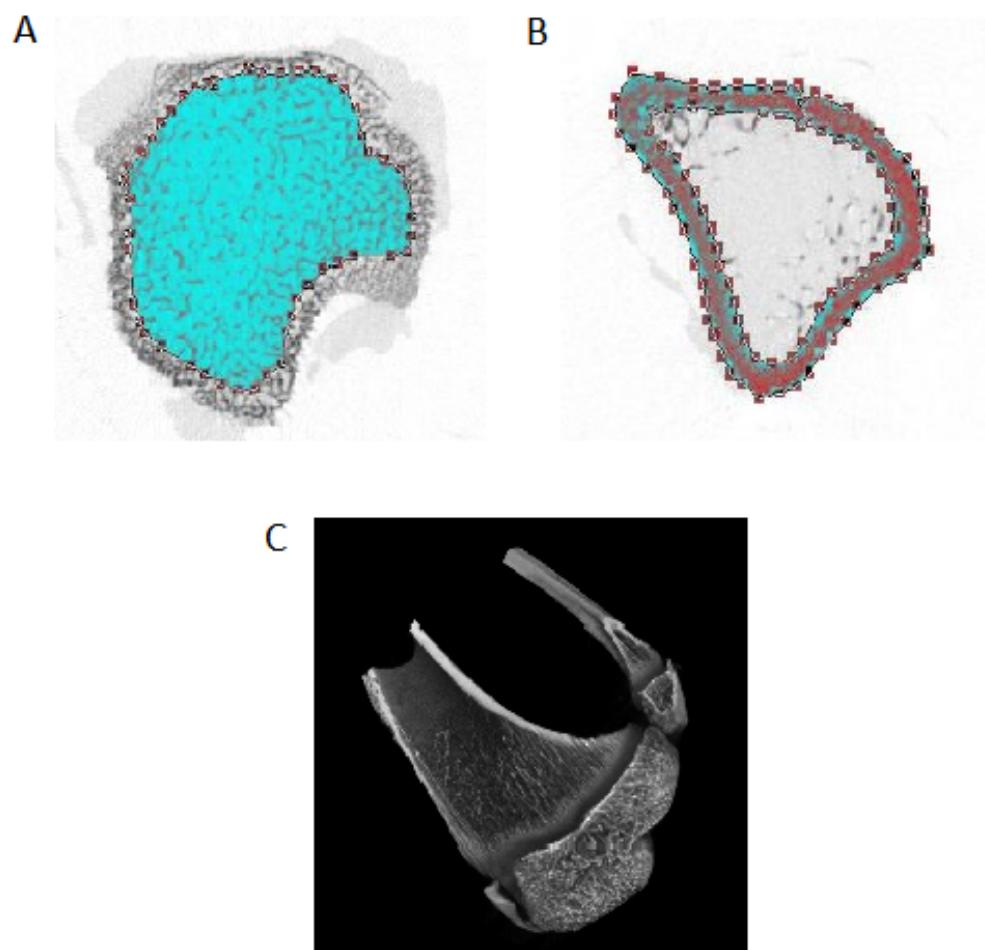
In beiden ROIs wurden die trabekulären und kortikalen Knochenanteile mit Hilfe eines Freihand-Zeichen-Werkzeuges separiert. Zwischen den Schichten, in denen diese Grenzbereiche manuell eingezeichnet worden waren, interpolierte die Software diese Grenzen automatisch. Je nach individueller Knochenform waren mehr oder weniger von Hand zu bearbeitende Schnitte notwendig, um ein realistisches Volume Of Interest (VOI) des trabekulären sowie des kortikalen Knochens zu erhalten (Abb. 13)

Die WFH wurde anhand der  $\mu$ -CT-Datensätze manuell im Sinne einer Punkt-zu-Punkt-



**Abb. 12:** Übersicht über Umfang und Lage der trabekulären sowie kortikalen ROI

Messung bestimmt. Der Beginn der Wachstumsfuge wurde als die Schicht definiert, in der eine zentrale, kontinuierliche (nicht mehr durch epiphysäre Trabekel durchbrochene) Knorpelbrücke vorlag. Das Ende der Wachstumsfuge definiert die Schicht, in der die knorpelige Wachstumsfugenbrücke durch die diaphysären Trabekel unterbrochen wurde (Abb. 14).



**Abb. 13:** Manuell eingezeichnete ROI des trabekulären (A) sowie kortikalen (B) Knochenanteils und 3D-Modell eines proximalen Tibia-und Fibulafragments (C)



**Abb. 14:** Identifikation der Grenzschichten für die Bestimmung der WFH anhand von  $\mu$ -CT-Bildern: Manuelle Messung der WFH als vertikaler Abstand zwischen der ersten (links) und letzten (rechts) Schicht

### **3.5.3 Übersicht der durch das $\mu$ -CT bestimmten morphometrischen Parameter**

Die Nomenklatur der durch Röntgentomographie bestimmten dreidimensionalen Parameter orientiert sich an den für die Histomorphometrie etablierten Parametern (Parfitt et al., 1987). Die Berechnung der dreidimensionalen Strukturparameter basiert auf dem von Feldkamp et al. (1984, 1989) vorgeschlagenen Algorithmus.

#### **Bone Volume (BV) [mm<sup>3</sup>]**

Volumen des trabekulären bzw. kortikalen Knochens

#### **Tissue Volume (TV) [mm<sup>3</sup>]**

Volumen der untersuchten Probe

#### **Bone Surface (BS) [mm<sup>2</sup>]**

Oberfläche des trabekulären bzw. kortikalen Knochens

#### **Trabecular Thickness (Tb.Th) [mm]**

durchschnittliche Dicke der Trabekel

#### **Trabecular Separation (Tb.Sp) [mm]**

durchschnittlicher Trabekelabstand; Analog zur Tb.Th kann die Tb.Sp als Dicke der Markräume angesehen werden (Scherzer, 2007).

#### **Trabecular Number (Tb.N) [mm<sup>-1</sup>]**

durchschnittliche Zahl der Trabekel pro Volumeneinheit

#### **Trabecular Pattern factor (Tb.Pf) [mm<sup>-1</sup>]**

Dieser 1992 von Hahn et al. (1992) ursprünglich für histologische Schnitte eingeführte Parameter beschreibt den Grad der Vernetzung der Trabekel. Je niedriger der Tb.Pf, desto besser sind die Trabekel verknüpft. Der Tb.Pf kann auch negative Werte annehmen und eignet sich vor allem für den Vergleich zweier Knochenproben, der Absolutwert hat kaum Bedeutung.

#### **Connectivity Density (Conn.Dn) [mm<sup>-1</sup>]**

Der Grad der Trabekelverknüpfung entspricht der maximalen Anzahl der Trabekel, die unterbrochen werden können, ohne dass das Knochengeflecht in zwei Teile zerbricht. Dieser Parameter sagt nichts über die Qualität (Stärke) der Verknüpfungen zwischen den Trabekeln aus (Engelke et al., 1999).

#### **Structure Model Index (SMI)**

Der dimensionslose SMI beschreibt die Struktur des Knochens von 0 (ideale Plattenstruktur) bis 3 (ideale Stabstruktur) bzw. 4 (ideale Kugel). Bei den trabekulären Strukturen eines realen Knochens liegt dieser Parameter zwischen 0 und 3 – abhängig von

der Anzahl platten- und stabähnlicher Strukturen im Trabekelwerk (Hildebrand and Rüegsegger, 1997).

**volumetric Bone Mineral Density (vBMD) [g/cm<sup>3</sup>]**

volumenbezogene Mineraldichte der Knochen

## 3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS Version 20.0 (IBM, New York, USA). Da bei der Fluoreszenzuntersuchung sowie bei der Masson-Goldner-Färbung sehr heterogene Werte bestimmt wurden, wurden alle Werte, die mehr als das 1,5-fache des Interquartilsabstands unterhalb des 1. Quartils oder oberhalb des 3. Quartils lagen, als Ausreißer eliminiert. Der exakte Mann-Whitney-U-Test wurde für Gruppenvergleiche eingesetzt. Zusammenhänge zwischen Variablen wurden durch die Korrelationsanalyse nach Spearman erfasst und die Signifikanztests sind zweiseitig. Als Signifikanzkriterium wurde ein  $p < 0,05$  festgelegt. Zur grafischen Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm SigmaPlot Version 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA) verwendet.

# 4 Ergebnisse

## 4.1 Vorbefunde und biometrische Merkmale der Versuchstiere und ihrer Tibiae

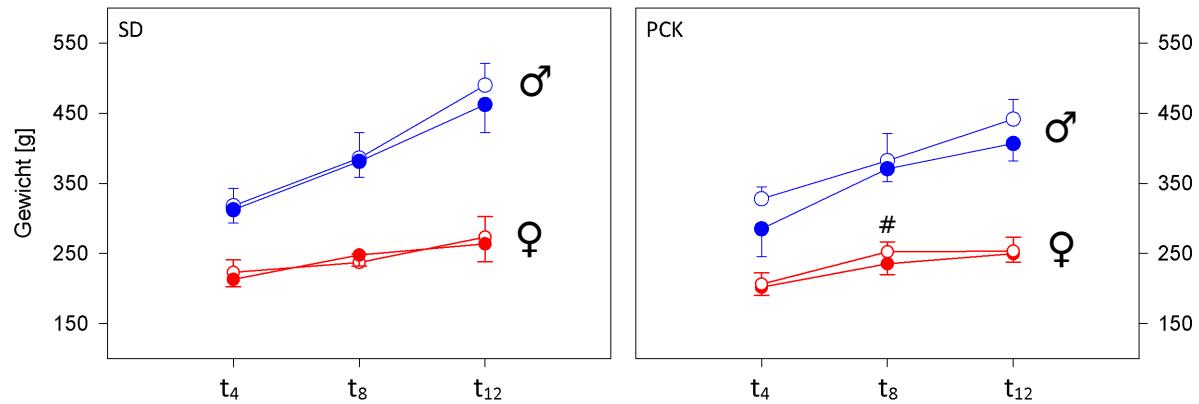
Die Daten zu den biometrischen Maßen (Körperlänge, Gewicht) und klinisch-chemische Befunde zum Versuchsende wurden im Rahmen des Tierversuches von Voigt (2012) erhoben und sind hier zitiert, um einen allgemeinen Eindruck vom Gesundheitszustand der Tiere vermitteln, da im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Knochen genau dieser Tiere untersucht wurden.

**Tabelle 3:** Kreatininkonzentration und Aktivität der Aspartat-Aminotransferase (ASAT) zum Versuchsende.

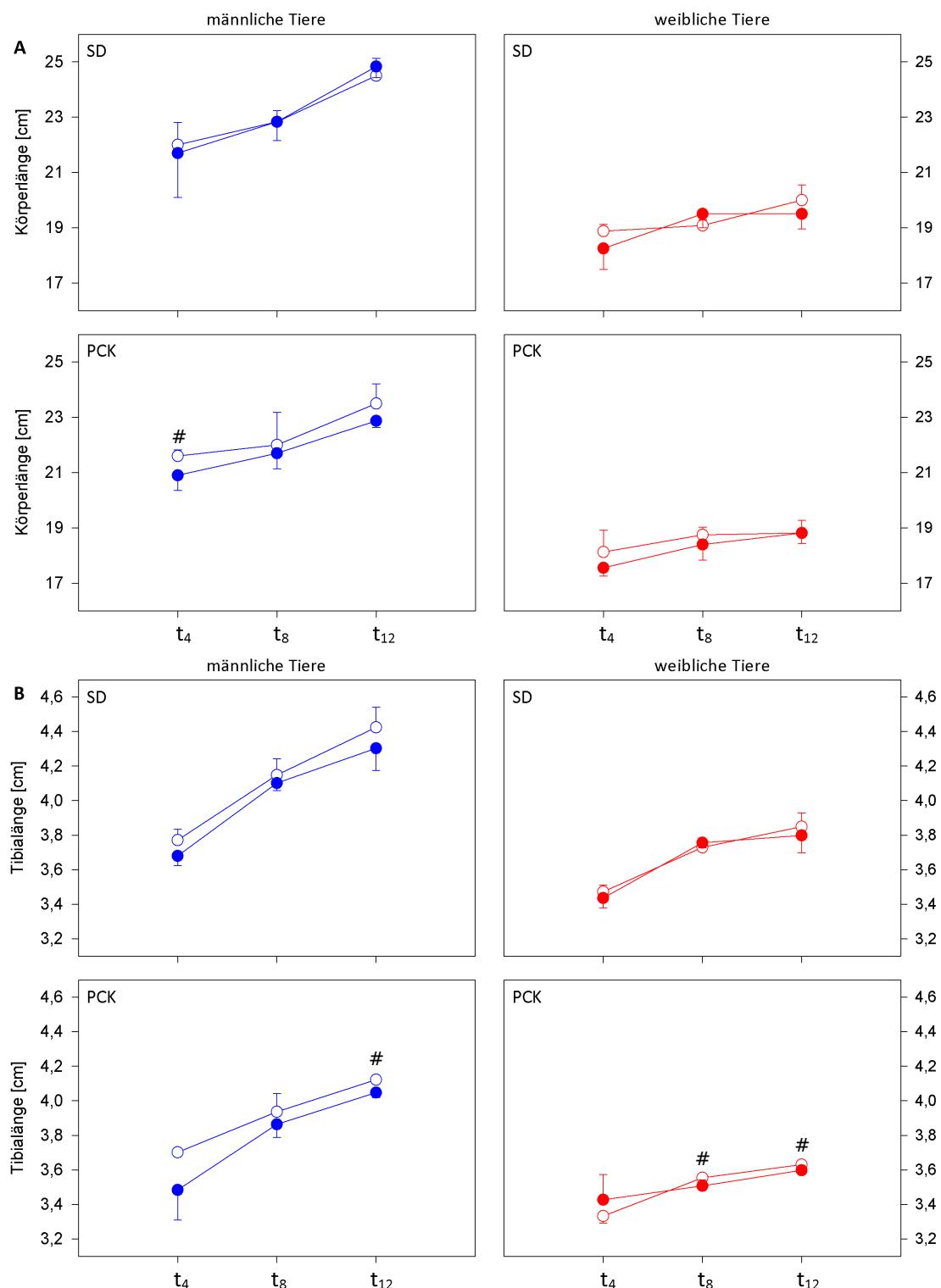
+/- = mit/ohne Rapamycin-Behandlung; \*= p < 0,05 für PCK vs. SD; # = p < 0,05 für + vs. - .

Gruppe	Männchen			Weibchen				
	n	Kreatinin [mg/dl]	n	ASAT [U/l]	n	Kreatinin [mg/dl]	n	ASAT [U/l]
PCKt <sub>4</sub> <sup>-</sup>	11	0,20 ± 0,04	5	266 ± 50	14	0,25 ± 0,08	8	296 ± 87 *
PCKt <sub>4</sub> <sup>+</sup>	10	0,23 ± 0,07	5	286 ± 53	19	0,23 ± 0,08	9	372 ± 180
SDt <sub>4</sub> <sup>-</sup>	12	0,21 ± 0,07	6	260 ± 112	11	0,19 ± 0,04	5	417 ± 93 # *
SDt <sub>4</sub> <sup>+</sup>	12	0,20 ± 0,04	6	321 ± 131	11	0,20 ± 0,04	6	221 ± 65 #
PCKt <sub>8</sub> <sup>-</sup>	6	0,20 ± 0,08	6	382 ± 106	6	0,24 ± 0,05	6	508 ± 219
PCKt <sub>8</sub> <sup>+</sup>	5	0,27 ± 0,07	5	390 ± 125	10	0,23 ± 0,07	10	521 ± 212
SDt <sub>8</sub> <sup>-</sup>	6	0,21 ± 0,06	6	291 ± 67	6	0,28 ± 0,10	6	305 ± 74
SDt <sub>8</sub> <sup>+</sup>	6	0,23 ± 0,05	6	360 ± 127	5	0,28 ± 0,04	5	224 ± 19
PCKt <sub>12</sub> <sup>-</sup>	5	0,26 ± 0,08	6	291 ± 82 #	8	0,25 ± 0,08	8	437 ± 79 *
PCKt <sub>12</sub> <sup>+</sup>	4	0,37 ± 0,06	4	477 ± 73 #	8	0,28 ± 0,10	8	579 ± 211
SDt <sub>12</sub> <sup>-</sup>	6	0,31 ± 0,05	6	187 ± 73	6	0,34 ± 0,10	6	330 ± 75 *
SDt <sub>12</sub> <sup>+</sup>	6	0,30 ± 0,08	6	307 ± 32	6	0,33 ± 0,05	6	247 ± 43

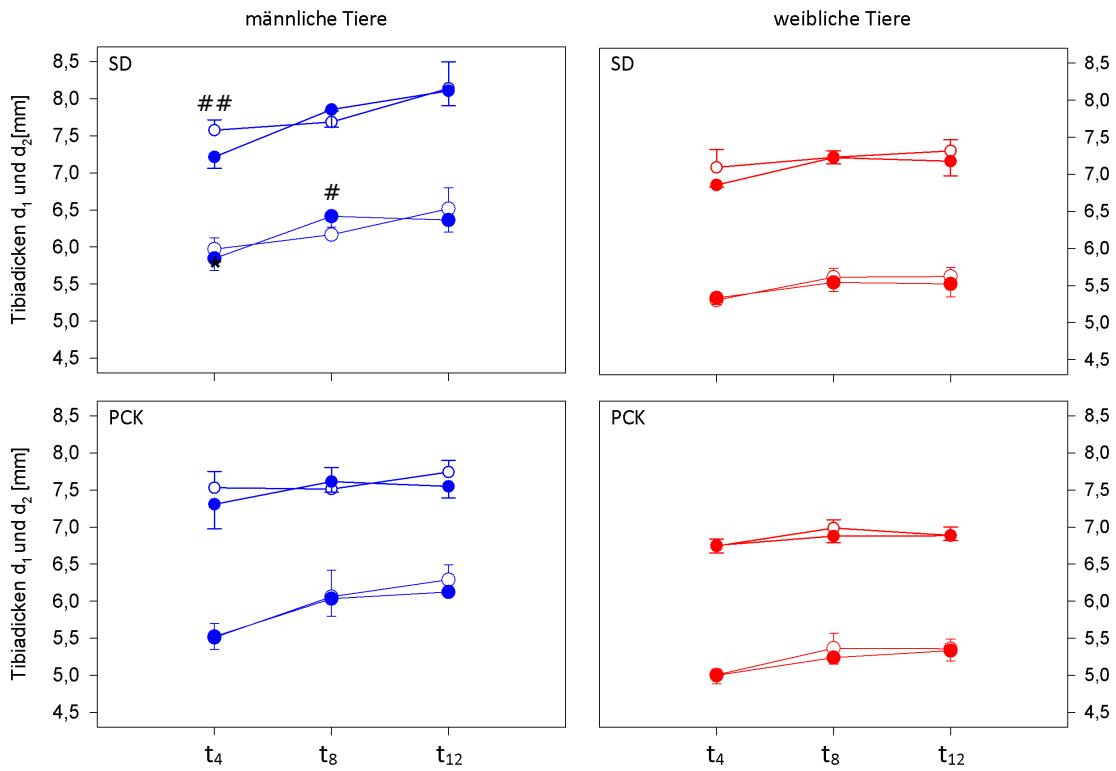
PCK-Ratten waren kleiner und leichter als alters- und geschlechtsgleiche SD-Ratten. Diese Unterschiede waren bei den weiblichen Tieren zu allen 3 Zeitpunkten, bei den männlichen Tieren ab  $t_8$  signifikant ( $p < 0,01$ ). Durch die Behandlung mit Rapamycin wurden diese Unterschiede verstärkt, wobei auch SD-Ratten mit reduziertem Wachstum und geringerer Körperlänge auf dieses Medikament reagierten (Abb. 15 – 17).



**Abb. 15:** Gewicht der Tiere nach einer 4, 8, und 12-wöchigen Behandlung.  
blau: männliche Tiere; rot: weibliche Tiere. Geschlossene Symbole mit und offene Symbole ohne Rapamycin-Behandlung.  $\# = p < 0,05$  für  $c_0$  vs.  $c_1$ .



**Abb. 16:** Körperlänge (A) und Tibialänge (B) nach einer 4, 8, und 12-wöchigen Behandlung. Pro Gruppe sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Geschlossene Symbole mit und offene Symbole ohne Rapamycin-Behandlung. # = p < 0,05 für c<sub>0</sub> vs. c<sub>1</sub>.



**Abb. 17:** Tibiadurchmesser d<sub>1</sub> (ant.-post., niedrigere Werte) und d<sub>2</sub> (med.-lat., höhere Werte) der Tiere nach einer 4, 8, und 12-wöchigen Behandlung.  
Geschlossene Symbole mit und offene Symbole ohne Rapamycin-Behandlung.  
Bei den weiblichen Ratten waren alle Unterschiede zwischen PCK- und SD-Ratten signifikant, diese sind aber aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet.  
# = p < 0,05 für c<sub>0</sub> vs. c<sub>1</sub>, ## = p < 0,01 für c<sub>0</sub> vs. c<sub>1</sub>.

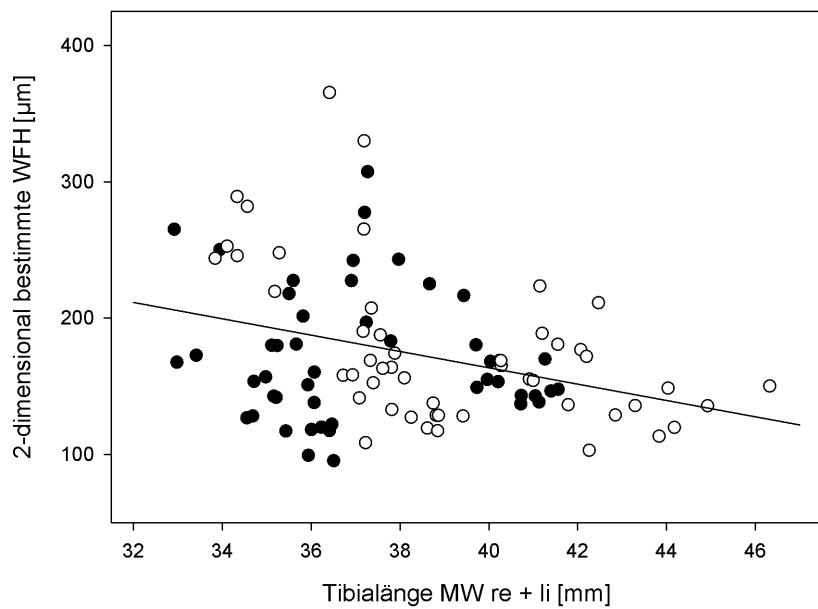
## 4.2 Auswirkungen von Rapamycin auf die Höhe der Wachstumsfugen und die Mineralisierungsrate

Die Höhe der WF wurde lichtmikroskopisch bestimmt, pro Tier konnten im Mittel 22,1 Werte verwendet werden (Spannweite: 9 – 30 Werte/Tier). Es zeigte sich, dass die Höhe der WF mit zunehmendem Alter und nachlassendem Wachstum abnimmt und dass Rapamycin insbesondere bei jungen Ratten zu einer Verbreiterung der WF führt (Tab. 4). Dieser Effekt ist im Wesentlichen auf die Änderungen in der HZ zurückzuführen.

**Tabelle 4:** Die WFH und ihre einzelnen Zonen bei männlichen und weiblichen Versuchstieren.

HZ = hypertrophe Zone, PZ = proliferative Zone, RZ = Reservezone;  $+/-$  = mit/ohne Rapamycin-Behandlung; \* =  $p < 0,05$  für PCK vs. SD; # =  $p < 0,05$  für + vs. - .

	Gruppe	n	Gesamthöhe [ $\mu\text{m}$ ]	HZ [ $\mu\text{m}$ ]	PZ [ $\mu\text{m}$ ]	RZ [ $\mu\text{m}$ ]	
Männchen	4 Wochen	PCK <sup>-</sup>	5	265,99 $\pm$ 34,3	78,60 $\pm$ 13,3 #	147,08 $\pm$ 20,1	31,99 $\pm$ 10,8
		PCK <sup>+</sup>	4	416,75 $\pm$ 136,8	149,70 $\pm$ 54,0 #	217,54 $\pm$ 83,9	33,41 $\pm$ 9,4 *
		SD <sup>-</sup>	2	305,16 $\pm$ 56,4	91,90 $\pm$ 20,9	177,24 $\pm$ 44,6	27,44 $\pm$ 8,3
		SD <sup>+</sup>	5	337,29 $\pm$ 37,7	146,05 $\pm$ 24,2	161,64 $\pm$ 15,0	18,66 $\pm$ 3,5 *
	8 Wochen	PCK <sup>-</sup>	5	170,05 $\pm$ 19,4 #	43,38 $\pm$ 5,1 # *	97,23 $\pm$ 8,9	25,15 $\pm$ 5,7
		PCK <sup>+</sup>	4	217,12 $\pm$ 25,1 #	58,99 $\pm$ 6,0 #	119,31 $\pm$ 18,2	29,97 $\pm$ 8,0
		SD <sup>-</sup>	4	181,38 $\pm$ 20,6	58,14 $\pm$ 6,5 *	92,49 $\pm$ 10,0	25,35 $\pm$ 6,5
		SD <sup>+</sup>	6	178,66 $\pm$ 26,0	51,75 $\pm$ 10,0	98,00 $\pm$ 18,4	21,75 $\pm$ 4,1
Weibchen	12 Wochen	PCK <sup>-</sup>	5	149,20 $\pm$ 12,2	41,81 $\pm$ 6,6	79,94 $\pm$ 7,8	19,94 $\pm$ 4,5
		PCK <sup>+</sup>	4	150,71 $\pm$ 14,0	45,69 $\pm$ 4,0	78,59 $\pm$ 10,2	21,13 $\pm$ 5,9
		SD <sup>-</sup>	4	128,17 $\pm$ 16,1	38,42 $\pm$ 6,1	66,89 $\pm$ 8,1	18,35 $\pm$ 7,5
		SD <sup>+</sup>	5	132,00 $\pm$ 17,1	37,19 $\pm$ 7,8	67,27 $\pm$ 7,1	22,53 $\pm$ 5,6
	4 Wochen	PCK <sup>-</sup>	7	214,42 $\pm$ 36,9	60,79 $\pm$ 4,8 # *	122,94 $\pm$ 27,1	23,87 $\pm$ 4,7
		PCK <sup>+</sup>	3	239,97 $\pm$ 47,5	77,90 $\pm$ 6,5 #	126,02 $\pm$ 30,9	26,18 $\pm$ 7,1
		SD <sup>-</sup>	3	258,63 $\pm$ 20,3	98,80 $\pm$ 33,7 *	131,84 $\pm$ 22,2	19,01 $\pm$ 4,8
		SD <sup>+</sup>	5	254,96 $\pm$ 26,2	86,16 $\pm$ 13,3	140,24 $\pm$ 22,9	20,12 $\pm$ 4,0
Weibchen	8 Wochen	PCK <sup>-</sup>	3	177,88 $\pm$ 25,4	47,53 $\pm$ 6,8	98,23 $\pm$ 8,3	23,09 $\pm$ 15,8
		PCK <sup>+</sup>	10	165,62 $\pm$ 35,3	47,00 $\pm$ 14,1	91,01 $\pm$ 17,3	23,53 $\pm$ 5,6
		SD <sup>-</sup>	6	164,99 $\pm$ 12,5	48,96 $\pm$ 7,0	84,85 $\pm$ 8,2	26,59 $\pm$ 6,7
		SD <sup>+</sup>	5	173,69 $\pm$ 28,2	54,54 $\pm$ 6,6	92,01 $\pm$ 17,4	21,03 $\pm$ 3,4
	12 Wochen	PCK <sup>-</sup>	3	111,75 $\pm$ 14,3 *	32,45 $\pm$ 5,2	59,49 $\pm$ 4,2	15,25 $\pm$ 3,3
		PCK <sup>+</sup>	6	125,58 $\pm$ 21,0	39,03 $\pm$ 12,2	65,79 $\pm$ 6,0	16,32 $\pm$ 3,9
		SD <sup>-</sup>	6	130,49 $\pm$ 7,9 *	41,68 $\pm$ 3,8	66,33 $\pm$ 7,7	20,16 $\pm$ 3,0
		SD <sup>+</sup>	4	127,76 $\pm$ 20,7	39,66 $\pm$ 6,4	66,64 $\pm$ 8,8	19,56 $\pm$ 3,6

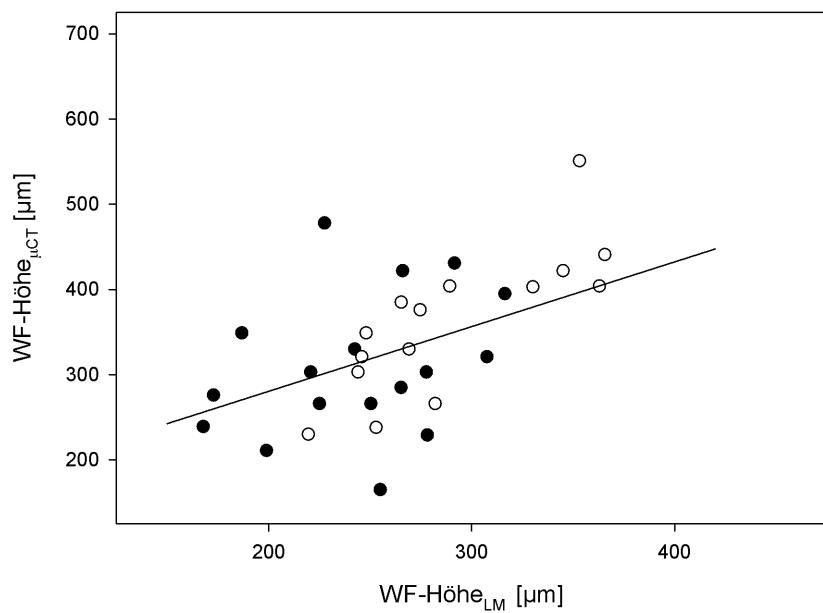


**Abb. 18:** Zusammenhang zwischen gemittelter Tibialänge und WF-Höhe unabhängig von Geschlecht, Behandlung und genetischem Hintergrund der Tiere  
 $r = -0,33$ ;  $p < 0,001$ , Gleichung der Regressionsgeraden:  $f(x) = -5,99x + 403,28$ .  
● = PCK-Ratten, ○ = SD-Ratten.

Weiterhin hängen Tibialänge und WFH voneinander ab: Je länger die Tibia, desto schmäler die WF (Abb. 18). Auch aus dem am  $\mu$ -CT gewonnenen Datensatz wurde die Höhe der WF ermittelt (Tab. 5). Die Ergebnisse der beiden Methoden stimmen sehr gut miteinander überein (Abb. 19), allerdings sind die mit dem Mikroskop bestimmten absoluten Werte grundsätzlich niedriger.

**Tabelle 5:** Die im  $\mu$ -CT bestimmte Wachstumsfugenhöhe in den Knochen von PCK- und SD-Ratten nach 4-wöchiger Behandlung mit Rapamycin.  
+/- = mit/ohne Rapamycin-Behandlung.

Gruppe	Männchen			Weibchen		
	n	WF-Höhe [μm]		n	WF-Höhe [μm]	
PCK <sup>-</sup>	3	385,6	± 70	8	244,5	± 61
PCK <sup>+</sup>	5	502,0	± 154	7	266,1	± 91
SD <sup>-</sup>	6	521,5	± 101	5	300,5	± 41
SD <sup>+</sup>	6	429,8	± 63	6	298,2	± 64



**Abb. 19:** Zusammenhang zwischen den am  $\mu$ CT und Lichtmikroskop (LM) bestimmten WF-Höhen unabhängig von Geschlecht, Behandlung und genetischem Hintergrund der Tiere

$r = 0,493$ ;  $p < 0,005$  Gleichung der Regressionsgeraden:  $f(x) = 0,67x + 128,4$ .

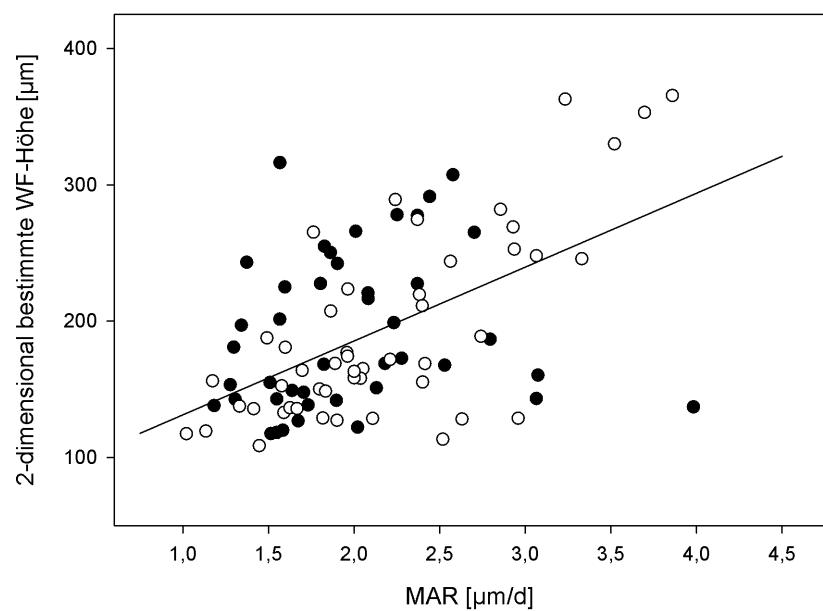
● = PCK-Ratten, ○ = SD-Ratten.

Aus dem Abstand der Tetrazyklin- und Demeclozyklin-Markierungen wurde die MAR berechnet. Im Mittel gingen 26,0 Abstands-Werte pro Tier in die Auswertung ein (Spannweite: 9 – 30 Werte/Tier). Hier zeigte sich bei gesunden weiblichen SD-Tieren eine durchweg höhere MAR als bei weiblichen PCK-Ratten. Bei den Männchen waren die Auswirkungen uneinheitlich. Teilweise zeigten Rapamycin-behandelte Tiere eine höhere MAR als unbehandelte Tiere. Signifikante Unterschiede waren nicht zu verzeichnen (Tab. 6).

Die lichtmikroskopisch erfasste WF-Gesamthöhe sowie die Höhe von HZ und PZ korrelierten stark mit der MAR (Abb. 20).

**Tabelle 6:** MineralAppositionRate (MAR) in den unterschiedlichen Gruppen.  
 $+/-$  = mit/ohne Rapamycin-Behandlung;  $*$  =  $p < 0,05$  für PCK vs. SD.

Gruppe	Männchen		Weibchen	
	n	MAR [ $\mu\text{m}/\text{d}$ ]	n	MAR [ $\mu\text{m}/\text{d}$ ]
PCKt <sub>4</sub> <sup>-</sup>	5	2,04 $\pm$ 0,3	7	1,91 $\pm$ 0,9
PCKt <sub>4</sub> <sup>+</sup>	4	2,20 $\pm$ 1,2	5	1,31 $\pm$ 1,3
SDt <sub>4</sub> <sup>-</sup>	4	1,98 $\pm$ 1,7	4	2,42 $\pm$ 1,4
SDt <sub>4</sub> <sup>+</sup>	5	2,78 $\pm$ 1,5	5	2,18 $\pm$ 1,1
PCKt <sub>8</sub> <sup>-</sup>	4	1,05 $\pm$ 0,8 *	4	1,09 $\pm$ 0,9
PCKt <sub>8</sub> <sup>+</sup>	2	0,69 $\pm$ 1,0	4	0,67 $\pm$ 0,9
SDt <sub>8</sub> <sup>-</sup>	5	1,82 $\pm$ 0,9 *	6	1,78 $\pm$ 0,2
SDt <sub>8</sub> <sup>+</sup>	5	1,85 $\pm$ 1,0	4	1,48 $\pm$ 0,8
PCKt <sub>12</sub> <sup>-</sup>	4	0,83 $\pm$ 0,9	2	0,44 $\pm$ 0,8
PCKt <sub>12</sub> <sup>+</sup>	4	2,63 $\pm$ 1,2	5	0,92 $\pm$ 1,1
SDt <sub>12</sub> <sup>-</sup>	3	1,02 $\pm$ 1,2	5	1,66 $\pm$ 1,1
SDt <sub>12</sub> <sup>+</sup>	4	1,09 $\pm$ 0,9	6	1,58 $\pm$ 0,5



**Abb. 20:** Zusammenhang zwischen MAR und WF-Höhe unabhängig von Geschlecht, Behandlung und genetischem Hintergrund der Tiere.

$r = 0,532$ ;  $p < 0,001$ , Gleichung der Regressionsgeraden:  $f(x) = 54,18x + 77,2$ .

● = PCK-Ratten, ○ = SD-Ratten.

## 4.3 Proliferation der Chondrozyten der Wachstumsfuge

Nennenswerte Unterschiede der Chondrozyten-Proliferationsindices waren lediglich in der hypertrophen Zone zu finden:

Bei unbehandelten männlichen PCK- und SD-Ratten war der Chondrozyten-Proliferationsindex (ChPI) annähernd identisch. Durch die Rapamycin-Behandlung sinkt der ChPI bei PCK-Ratten geringfügig, bei SD-Ratten nimmt er dadurch jedoch deutlich zu. Bei den Weibchen waren ähnliche Effekte zu beobachten, allerdings gab es dort auch tendenzielle Unterschiede zwischen den unbehandelten SD- und PCK-Tieren (Tab. 7).

**Tabelle 7:** Relative Anzahl BrdU-positiver Chondrozyten in den Wachstumsfugen nach 4-wöchiger Behandlung mit bzw. ohne Rapamycin.

+/- = mit/ohne Rapamycin-Behandlung; \*= p < 0,05 für PCK vs. SD.

Gruppe	Männchen			Weibchen		
	n	Prolif.I HZ	Prolif.I PZ	n	Prolif.I HZ	Prolif.I PZ
PCKt <sub>4</sub> <sup>-</sup>	5	0,21 ± 0,09	0,78 ± 0,09	7	0,25 ± 0,13	0,77 ± 0,08
PCKt <sub>4</sub> <sup>+</sup>	4	0,17 ± 0,04 *	0,78 ± 0,08	2	0,12 ± 0,08	0,78 ± 0,01
SDt <sub>4</sub> <sup>-</sup>	4	0,23 ± 0,1	0,79 ± 0,06	5	0,17 ± 0,06	0,76 ± 0,04
SDt <sub>4</sub> <sup>+</sup>	5	0,41 ± 0,12 *	0,78 ± 0,07	6	0,36 ± 0,25	0,83 ± 0,07

## 4.4 Flächenbezogene Mineraldichte im Femur

Bei unbehandelten männlichen PCK-Ratten wurde die höchste, bei behandelten männlichen SD-Ratten die niedrigste Knochendichte gemessen. Allerdings waren diese Unterschiede nicht signifikant. Bei den weiblichen Tieren zeigte sich ein ähnliches Bild (Tab. 8).

**Tabelle 8:** Flächenbezogene Mineraldichte (aBMD) im Femur nach 4-wöchiger Behandlung mit bzw. ohne Rapamycin.

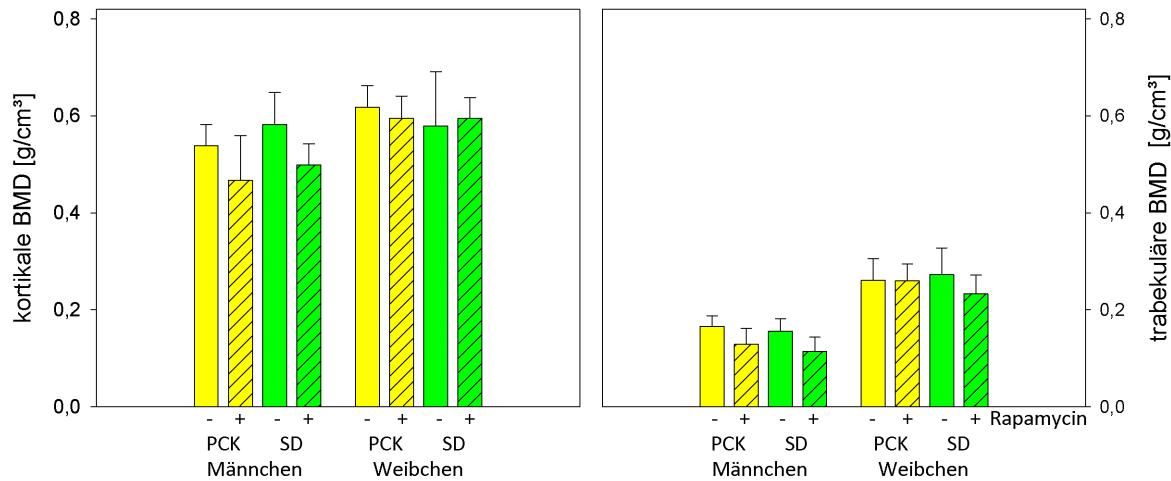
+/- = mit/ohne Rapamycin-Behandlung.

Gruppe	Männchen		Weibchen	
	n	aBMD [g/cm <sup>2</sup> ]	n	aBMD [g/cm <sup>2</sup> ]
PCK <sup>-</sup>	3	0,18 ± 0,01	8	0,16 ± 0,03
PCK <sup>+</sup>	5	0,15 ± 0,05	7	0,15 ± 0,03
SD <sup>-</sup>	6	0,15 ± 0,04	5	0,16 ± 0,01
SD <sup>+</sup>	6	0,12 ± 0,04	6	0,14 ± 0,06

## 4.5 Volumenbezogene Dichte von kortikalem und trabekulärem Knochen

Die volumenbezogene kortikale und trabekuläre BMD (vBMD) war bei den weiblichen Tieren mehrheitlich signifikant höher als bei männlichen (Abb. 21).

Während bei den weiblichen Ratten kaum spezifische vBMD-Veränderungen zu finden waren, zeigten männliche behandelte Ratten eine deutlich niedrigere Knochendichte als unbehandelte Ratten. Diese, wenngleich nicht signifikanten, Unterschiede waren im kortikalen und trabekulären Knochen nachzuweisen und sowohl bei PCK- als auch bei SD-Tieren zu finden.



**Abb. 21:** Volumenbezogene Mineraldichte nach 4-wöchiger Behandlung mit Rapamycin.

PCK-Ratten ■, SD-Ratten ■. Die signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren sind zugunsten der Übersichtlichkeit nicht abgebildet.

## 4.6 Morphologische Parameter des trabekulären Knochens

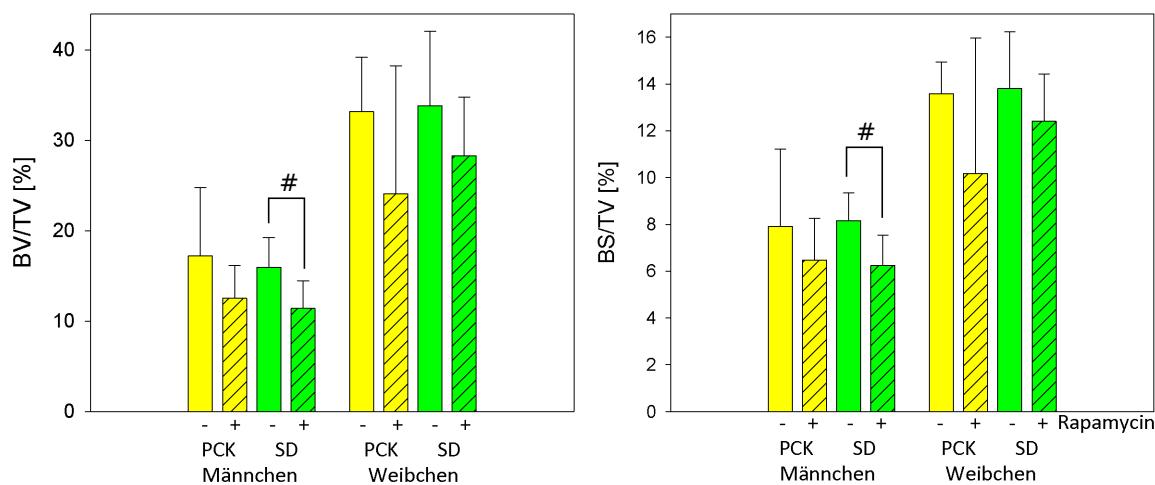
Sowohl bei PCK-, als auch bei SD-Ratten beeinflusst Rapamycin die Knochenmorphologie. Darüber hinaus sind auch Unterschiede zwischen unbehandelten PCK und SD-Ratten zu beobachten.

Die Knochen der PCK-Ratten zeigten im Vergleich zu denen der SD-Ratten ein signifi-

kant niedrigeres Gewebevolumen, weibliche PCK-Ratten hatten zudem ein etwas geringeres Knochenvolumen und eine geringere Knochenoberfläche als weibliche SD-Ratten (Abb. 22).

Knochenvolumen, Knochenoberfläche, das relative Knochenvolumen (BV/TV) und die Bone Surface Density (BS/TV) zeigten bei den mit Rapamycin behandelten Tieren durchweg niedrigere Werte.

Die Bone Surface to Volume Ratio (BS/BV) wies bei allen Tieren ähnliche Werte auf (Daten nicht gezeigt).

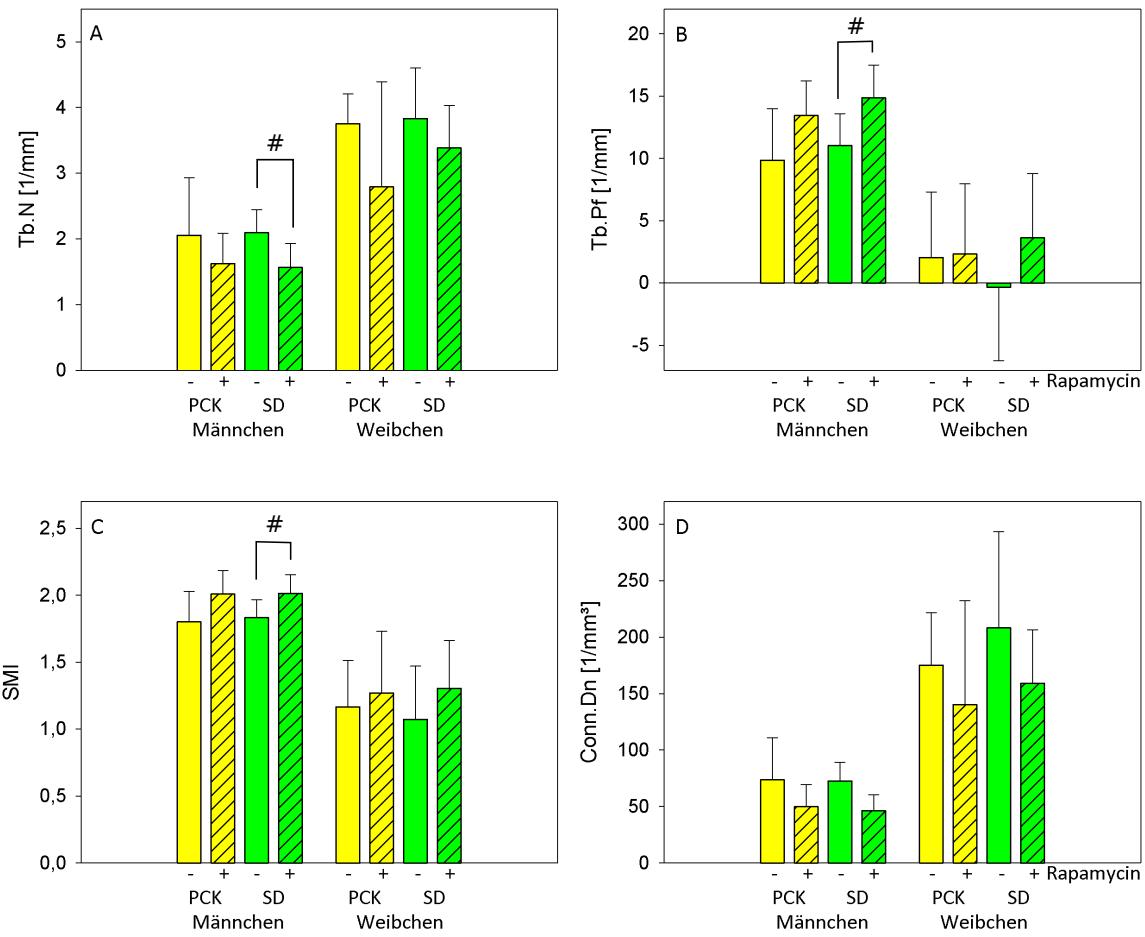


**Abb. 22:** Das relative Knochenvolumen (BV/TV) und das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen (BS/TV) von männlichen und weiblichen Ratten nach 4-wöchiger Behandlung. : PCK-Ratten, : SD-Ratten. # = p < 0,05 für + vs. -.

Die Knochen weiblicher Tiere enthielten deutlich mehr und tendenziell dickere Trabekel als die der männlichen Tiere. Die Behandlung mit Rapamycin führte zu einer Abnahme von Zahl und Dicke der Trabekel (Abb. 23 und Tab. 9).

Die Knochen weiblicher Ratten zeigten einen niedrigeren Tb.Pf, eine höhere Conn.Dn und ihre Trabekel waren eher plattenförmig ( $SMI < 1,5$ ), wohingegen die Knochentrabekel der männlichen Ratten sich eher der Stabform annäherten ( $SMI > 1,5$ ).

Ein Vergleich der Strukturindices von naiven und Rapamycin-behandelten Tieren weist darüber hinaus auf eine reduzierte mechanische Stabilität durch Rapamycin-Behandlung hin (Conn.D niedrig, Tb.Pf hoch,  $SMI > 1,5$ ; Abb. 23).



**Tabelle 9:** Durchschnittliche Trabekeldicke (Tb.Th) der vier Wochen lang behandelten Tiere.

+/- = mit/ohne Rapamycin-Behandlung; \*\* = p < 0,01 für PCK vs. SD.

Gruppe	n	Männchen		Weibchen	
		Tb.Th [mm]		Tb.Th [mm]	
PCK-	5	0,082	± 0,007	8	0,088 ± 0,006
PCK+	5	0,077	± 0,002 **	8	0,087 ± 0,006
SD-	6	0,076	± 0,004	5	0,088 ± 0,006
SD+	6	0,073	± 0,003 **	6	0,083 ± 0,004

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich Rapamycin bei SD- und PCK-Ratten auf das Längenwachstum und die Histomorphologie der Röhrenknochen auswirkt. Damit widmet sie sich einem Nebenaspekt des Tierversuches, in dem primär untersucht wurde, ob Rapamycin möglicherweise geeignet ist, die Progression der ARPKD aufzuhalten (Renken et al., 2011).

Während die Auswirkungen auf Nieren- und Leberfunktion Gegenstand der Dissertation von C. Voigt geb. Renken (2012) war, sind die Folgen für das Längenwachstum und die Knochenmorphologie als sekundäre Studienziele Gegenstand dieser Arbeit.

Längenwachstum, Gewichtsentwicklung und die Morphologie der Wachstumsfugen waren insbesondere bei jungen Tieren durch Rapamycin beeinträchtigt. Da sich bei älteren PCK- und SD-Ratten nur noch geringe Unterschiede zwischen Rapamycin-behandelten und unbehandelten Tieren fanden und sich trotz längerer Behandlung teilweise – jedoch nicht durchgehend – die Körperlänge normalisierte, ist davon auszugehen, dass die betroffenen Strukturen bei älteren Tieren nicht mehr im selben Maße Rapamycin-sensibel sind wie bei jungen Tieren.

Die bereits von Renken et al. (2011) vermutete Resistenz gegenüber Rapamycin bei längerer Behandlungsdauer würde zu diesen Daten passen. Auch bei pädiatrischen nierentransplantierten Patienten, die über einen Zeitraum von 2 Jahren mit niedrig dosiertem Everolismus behandelt wurden, fanden sich keine Hinweise auf ein reduziertes Längenwachstum (Billing et al., 2013).

Aufgrund der ausgeprägten Rapamycin-Sensitivität der jungen Tiere (4 Wochen Versuchsdauer), wurden ihre Knochen zusätzlich immunhistochemisch und mit dem  $\mu$ -CT untersucht.

Erwartungsgemäß deutlich fielen die Differenzen zwischen PCK- und SD-Ratten aus: Fast ausnahmslos waren die gesunden SD-Tiere (mit und ohne Rapamycin-Behandlung) schwerer und länger bzw. verfügten über längere und dickere Tibiae als die korrespondierenden PCK-Tiere. Viele dieser Unterschiede waren signifikant. Generell zeigte sich, dass die männlichen Tiere besonders sensibel auf die Behandlung mit Rapamycin reagierten.

Rapamycin beeinflusst offenbar auch die Konfiguration der WF. Die männlichen PCK- und SD-Tiere sowie die weiblichen PCK-Ratten, die den mTOR-Inhibitor erhalten hatten, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verbreiterte Wachstumsfugen. Nach 8 Wochen Behandlung waren bei den SD-Ratten mit Blick auf die WF keine Auswirkungen von Rapamycin mehr zu erkennen, bei den PCK-Tieren war diese Normalisierung der WF-Histomorphometrie erst nach 12 Wochen Behandlung zu beobachten. Die beschriebenen Tendenzen waren nicht nur in der Wachstumsfugen-Gesamthöhe, sondern auch in der Höhe von HZ und PZ zu finden, wobei vorrangig die HZ entscheidend für die Verbreiterung der Wachstumsfuge war.

In den Wachstumsfugen weiblicher SD-Ratten fanden sich kaum Rapamycin-induzierte Alterationen. Die Höhe der WF sowie der einzelnen Zonen waren bei SD-Tieren bzw. Männchen tendenziell höher als bei PCK-Tieren bzw. Weibchen. Dass die Variabilität der WF-Höhe bei PCK-Ratten stärker ausgeprägt ist als bei SD-Ratten, konnte bestätigt werden (Santos et al., 2005).

Die hier beschriebenen Daten entsprechen den Beobachtungen von Sanchez and He (2009), denen zufolge Rapamycin-Exposition zu verbreiterten hypertrophen Zonen, reduzierter Expression von PTH/PTHrP-Expression und erhöhter Ihh-Expression führt. Die Tiere, die 4 (statt 2) Wochen lang Rapamycin erhielten, zeigten zwar immer noch ein vermindertes Längenwachstum, die histologischen Auffälligkeiten hatten sich jedoch schon deutlich gebessert. Die von Phornphutkul et al. (2009) beschriebene Verschmälerung der WF und ihrer Zonen nach 8-wöchiger Rapamycin-Gabe hat sich nicht bestätigt. Möglicherweise sind diese Unterschiede in den verschiedenen Applikationsarten (oral vs. intraossär) bzw. Dosierungen (2 mg/kg/d vs. 0,45-0,9 µg/kg/d) oder in den Besonderheiten der untersuchten Spezies (Ratten vs. Kaninchen) begründet.

Die MAR weiblicher Tieren unter Rapamycin-Behandlung war niedriger als in der Placebo-Gruppe. Während sich auch dieser Unterschied bei der SD-Gruppe mit zunehmender Studiendauer verringerte, war er bei den PCK-Tieren auch noch nach 12 Wochen nachweisbar. Generell verfügten bei den Weibchen SD-Tiere über eine höhere MAR als PCK-Tiere, sodass hier die verminderte MAR als Hinweis auf eine renale Osteodystrophie angesehen werden könnte.

Die Männchen zeigten in Bezug auf die MAR ein uneinheitliches Bild: Die meisten PCK-Tiere hatten niedrigere MARs als die gesunden SD-Tiere. Unter den 4 und 12 Wochen lang im Versuch verbliebenen Ratten verfügten die Rapamycin-behandelten Tiere über teilweise signifikant höhere MARs als die Placebo-Gruppe. Die über 8 Wochen mit Rapamycin behandelten Männchen zeigten – ähnlich wie die weiblichen Tiere – eine eher

niedrigere MAR. Diese Datenkonfiguration erscheint wenig plausibel und wirft die Frage nach methodischen und/oder systematischen Fehlern auf. Diese könnten durch Injektionsschwierigkeiten oder manuelle Messfehler beim Ausmessen der ILD sowie durch die Auswahl unrepräsentativer FOVs begründet sein.

Der Chondrozyten-Proliferationsindex der hypertrophen Zone zeigte – im Gegensatz zu dem der Proliferationszone – Veränderungen bei Rapamycin-Exposition. Unklar ist, weshalb sich PCK- und SD-Ratten, die ohne Rapamycin-Behandlung ähnliche Proliferationslevel erreichen, unter Rapamycin-Behandlung in divergierende Richtungen entwickeln: SD-Tiere unter mTOR-Inhibition zeigten – verglichen mit der Kontrollgruppe – einen erhöhten Chondrozyten-Proliferationsindex, PCK-Tiere hingegen einen verminderten. Diese Daten stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Alvarez-García et al. (2007, 2010) und Sanchez and He (2009), welche bei gesunden Ratten nach einer 2-wöchigen Rapamycin-Behandlung (2 bzw. 2,5 mg/kg/d) eine reduzierte Chondrozytenproliferation nachweisen konnten. Sanchez and He (2009) untersuchten jedoch auch Tiere, welche 4 Wochen lang Rapamycin erhalten hatten; bei diesen Tieren hatte sich die Chondrozytenproliferation normalisiert.

Paradox scheint auch, dass die SD-Tiere unter Rapamycin-Behandlung einen erhöhten ChPI zeigen – obwohl durch Rapamycin die Proliferation gehemmt sein sollte.

Möglicherweise versuchen gesunde SD-Tiere, die durch Rapamycin beeinträchtigte enchondrale Ossifikation durch eine gesteigerte Chondrozytenproliferation zu kompensieren. Die Aktivierung eines solchen Mechanismus könnte jedoch mit zeitlicher Verzögerung auftreten, sodass initial eine gedämpfte Chondrozytenproliferation auftritt, welche sich im Verlauf zu einer überschießenden Chondrozyten-Proliferation entwickelt. Eventuell dekompenziert dieser Mechanismus bei den ohnehin schon beeinträchtigten PCK-Ratten durch den zusätzlichen Störfaktor Rapamycin, sodass die enchondrale Ossifikation und mit ihr die Chondrozytenproliferation gänzlich „zusammenbrechen“.

Hinzu kommt, dass die bei den PCK-Ratten vordergründige Leberinsuffizienz durch das – per se schon hepatotoxische – Rapamycin aufgrund der verminderten hepatischen Metabolisierung zu überhöhten Rapamycin-Serumkonzentrationen geführt haben könnte. Möglicherweise resultierte dies bei den kranken Tieren in einer Verstärkung von Rapamycin-Wirkung und - Nebenwirkungen, und somit eventuell auch zu in einer übermäßigen Hemmung der Chondrozytenproliferation.

Da die untersuchten PCK-Ratten anders als erwartet nicht stark niereninsuffizient waren, sondern vornehmlich ein Leberschaden zu beobachten war, ist von einem weitgehend normalen Mineralhaushalt der Tiere auszugehen. Dies spiegelt sich in den unauffälligen Werten von Trabecular Pattern factor, Structure Model Index und Connectivity Density sowie den flächen- und volumenbezogenen Mineraldichten von Kortikalis und Spongiosa wieder. Das niedrige TV bzw. BV sowie BS und die vergleichweise dicken Trabekel der kranken Tiere sind jedoch als Folge der Grunderkrankung zu sehen. Dementsprechend unterschieden sich BV/TV und BS/TV der PCK-Gruppe nicht von den Werten der Kontrollgruppe.

Andere Studien erbrachten bei niereninsuffizienten Mäusen ein erhöhtes BV/TV. Allerdings handelte es sich dabei um Tiere, die mit 8 bzw. 12 Wochen deutlich länger in die Versuche eingeschlossen waren als die hier untersuchten  $t_4$ -Tiere (Nikolov et al., 2010; Lee et al., 2010).

Das Geschlecht und die Gabe von Rapamycin erwiesen sich als Einflussfaktoren auf die im  $\mu$ -CT ermittelten morphometrischen Parameter: Weibliche Tiere verfügten über ein höheres Knochenvolumen bei geringerem Gewebevolumen, sowie zahlreichere, dickere und höhergradig verknüpfte plattenähnlichere Trabekel als Männchen. Dies lässt auf eine insgesamt “kompaktere”, dichtere Knochenarchitektur und biomechanisch belastbarere Knochen schließen.

Die Behandlung mit Rapamycin verschlechterte diese Parameter bzw. führte zu einer Annäherung an die ungünstigere Stabstruktur. Dies steht im Einklang mit den Erkenntnissen von Gu et al. (2013).

Da ein hoher Anteil stabähnlicher Strukturen im Knochen ein prädiktiver Faktor für Knochenfrakturen ist, muss von einer verminderten mechanischen Belastbarkeit der Knochen unter Rapamycin-Therapie ausgegangen werden (Melton et al., 2010). Bezogen auf einen möglichen klinischen Einsatz käme hier die frakturheilungsverzögernde Wirkung des Rapamycins erschwerend hinzu (Holstein et al., 2008).

Des Weiteren zeigten sowohl gesunde als auch erkrankte Ratten unter Rapamycin-Behandlung eine erniedrigte (relative) Knochenoberfläche sowie ein verminderter (relatives) Knochenvolumen bei gleichzeitig rarefizierten, dünnern Trabekeln. Auch die aBMD sowie die vBMD von Kortikalis und Spongiosa war in der Rapamycin-Behandlungsgruppe deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe.

Im Blick auf die Diskrepanz zwischen erwarteter und tatsächlicher Nieren- und Leberfunktion scheinen die in diesem Versuch untersuchten PCK-Ratten der Mannheimer Kolonie kein angemessenes Tiermodell der ARPKD und damit auch für präklinische

Studien ungeeignet zu sein (Fischer et al., 2009). Da die PCK-Ratte von der Charles River Japan Inc. nicht kommerziell vertrieben wird, gibt es lokale Kolonien (z.B. Toronto, Mannheim). Es ist durchaus möglich, dass sich die verschiedenen Kolonien langsam genetisch von ihrer japanischen “Ursprungskolonie” unterscheiden und sich somit auch der Phänotyp verändert.

Als alternative Tiermodelle für die ARPKD steht u.a. die ORPK-Maus (Oak Ridge Polycystic Kidney) zur Verfügung. Ihr Phänotyp verfügt über die für die ARPKD typischen Zystennieren und -leber. Jedoch zeigen die Tiere eine Reihe weiterer Abnormalitäten (Pankreaszysten, retinale Degeneration, Hydrocephalus und Kleinhirn-Hypoplasie) die bei ARPKD-Patienten nicht regelmäßig zu finden sind (Lehman et al., 2008).

## **5.1 Methodenvergleich: Bestimmung von Wachstumsfugenhöhe und Knochenmineralgehalt**

Im Großen und Ganzen stimmte die mit Mikroskop und  $\mu$ -CT gemessene WF-Höhe überein. Allerdings wurden mit dem  $\mu$ -CT konstant höhere Absolutwerte als die mit dem Lichtmikroskop ermittelt. Dies könnte darin begründet sein, dass die gewählten Referenzebenen den gesamten nicht-verknöcherten Teil der Epiphysenfuge und vermutlich auch die Eröffnungszone umfassten. Dadurch wurden in den mikrocomputertomographischen Datensätzen größere Bereiche als Wachstumsfugen-Höhe definiert als in den lichtmikroskopischen Untersuchungen. Daher könnten in den mikrocomputertomographischen Wachstumsfugen-Messungen auch Rapamycin-induzierte Veränderungen wie die gestörte Knorpelresorption in der Eröffnungszone zum Tragen gekommen sein (Alvarez-García et al., 2007), wodurch sich die teilweise divergenten Ergebnisse erklären ließen.

Dennoch sind beide Verfahren gut geeignet, die Höhe der WF zu ermitteln. Solange keine differenzierte Betrachtung von HZ, RZ und PZ erforderlich ist, ist die Bestimmung am  $\mu$ CT ausreichend.

Auch bei der Messung des Mineralgehalts der Knochen (aBMD bzw. vBMD) erbrachten beide Messmethoden (DXA und  $\mu$ -CT) ähnliche Ergebnisse. Lediglich die in den mikrocomputertomographischen Messungen signifikant höhere vBMD weiblicher Tiere im Vergleich zu männlichen Tieren konnte in der DXA-Messung nicht nachvollzogen werden. Dennoch erscheint die mikrocomputertomographische vBMD-Bestimmung deutlich geeigneter für den Einsatz im Rahmen von Kleintierstudien. Zum einen ergibt ein drei-

dimensionaler Messwert einer dreidimensionalen Materialeigenschaft immer ein realistischeres Abbild als ein zweidimensionaler (Näherungs-)Messwert, zum anderen ist die hohe Auflösung des µ-CTs geradezu prädestiniert für die Untersuchung der kleinen, isolierten Rattenknochen dieser Studie. Selbst im “Kleintier”-Programm des DXA-Gerätes fiel die exakte Auswahl des zu messenden Knochenbereichs nicht leicht. Deshalb können Messfehler hier nicht ausgeschlossen werden.

## 5.2 Grenzen der vorliegenden Arbeit

Die Aussagekraft der dargestellten Befunde wird vor allem durch die sehr geringe Gruppenstärke geschränkt. Abgesehen von der im Studiendesign festgelegten Gruppenstärke wirkten folgende Faktoren eine zusätzliche Verringerung der Fallzahlen:

Bei den kranken, nicht kommerziell verfügbaren PCK-Ratten waren pro Wurf weniger männliche Tiere verfügbar als weibliche. Dies ist umso bedauerlicher, als das gerade diese Tiere während des Versuches eine recht hohe Sterberate zeigten (ein 8 Wochen lang mit Rapamycin behandeltes Männchen sowie jeweils zwei 12 Wochen lang mit Rapamycin behandelte Männchen und Weibchen) (Renken et al., 2011). Gleichzeitig reflektiert dies die Tatsache, dass männliche Ratten deutlich schwerer von der Erkrankung betroffen waren als weibliche Tiere.

Ein weiteres Problem war die Tatsache, dass die Knochen der PCK-Ratten wesentlich spröder als die von SD-Ratten waren und sich daher auch deutlich schlechter verarbeiten ließen. Teilweise war dies so stark ausgeprägt, dass eine histologische Aufarbeitung nicht möglich war. Dies betraf unabhängig von der Behandlung 18 von 80 PCK-Ratten, aber nur 4 von 70 SD-Ratten.

Insbesondere bei der Fluoreszenzuntersuchung ergab sich bei einem Teil der Tiere das Problem, dass entweder gar keine oder nur eine Fluoreszenzbande sichtbar war oder dass durch die rarefizierten Trabekel nicht genügend FOVs mit Doppelbanden vorlagen, um pro Tier 10 Werte der ILD bestimmen zu können. Dies betraf insgesamt 10 Tiere – sowohl PCK- als auch SD-Ratten. Hier ist vermutlich nie ausreichend Tetra- bzw. Demeclozyklin in die Blutbahn der Tiere gelangt. Für diese Annahme spricht die Tatsache, dass zum Versuchsende bei einigen Tieren derbe, mit gelb-leuchtender Flüssigkeit gefüllte Abszesse im Bereich der Injektionsstellen an den Hinterläufen zu finden waren.

Diese drei Faktoren führten zu sehr kleinen Fallzahlen (abhängig von der jeweiligen Untersuchungsmethode), sodass nur eine eingeschränkte Interpretation der Befunde möglich ist. Statistisch belastbare Aussagen hätten größerer Versuchsgruppen bedurft. Da aber die Untersuchung der Knochen nur einen Nebenaspekt des Versuches war und der Ver-

such zu Beginn meiner Arbeit schon beinahe abgeschlossen war, entfiel diese Option. Obwohl einige Faktoren die Aussagekraft der hier vorgestellten Daten beeinträchtigen, wird zumindest ein Eindruck von den Rapamycin-Auswirkungen auf Wachstum und Knochenhistomorphologie gegeben.

# 6 Zusammenfassung

Die autosomal rezessiv polyzystische Nierenerkrankung manifestiert sich bevorzugt zum Zeitpunkt der Geburt bzw. in frühester Kindheit. Die Erkrankung ist in der Regel mit einer schweren Niereninsuffizienz und Leberfibrose assoziiert und es gibt, abgesehen von der Organtransplantation, keine kasuale Therapie. In den Nieren und Lebern betroffener Patienten ist die mammilian Target of Rapamycin-Signalkaskade aktiviert.

Daher wurde in einem Tierversuch die Wirkung von Rapamycin geprüft. Es wurden gesunde und PCK-Ratten über 4, 8 oder 12 Wochen mit Rapamycin oder einem Placebo behandelt. Primär sollte untersucht werden, ob Rapamycin den Progress der Nieren- und Leberinsuffizienz aufhalten kann und damit eine Therapieoption für die ARPKD darstellt. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Langzeiteffekt von Rapamycin auf die Knochenentwicklung, dem sekundären Studienziel. Hierfür wurden die Tibiae der Ratten untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die PCK-Tiere an einer frühen renalen Osteodystrophie litten, welche von einer schmalen Wachstumsfuge, einer niedrigen MineralAppositionRate und Knochenoberfläche sowie einem niedrigen Gewebe- und Knochenvolumen gekennzeichnet war. Im Vergleich zu gesunden Tieren war die Trabekelanzahl jedoch unverändert, die Trabekeldicke sogar erhöht.

Die Rapamycin-Behandlung führte – verglichen mit der Kontrollgruppe – zu einer gestörten Gewichtsentwicklung der Tiere und zu vermindertem Längenwachstum der Knochen. Dieser Effekt verringerte sich mit zunehmender Behandlungsdauer, die Gewichts- und Längenwerte normalisierten sich bei längerer Behandlung. Die Wachstumsfugen und hypertrophen Zonen waren bei den Rapamycin-exponierten Ratten deutlich verbreitert, was aber ebenfalls vor allem bei den 4 Wochen lang behandelten Tieren zum Tragen kam. Diese Normalisierung von Wachstum und Wachstumsfugen-Konfiguration könnte ein Hinweis auf eine (schon früher von unserer Arbeitsgruppe postulierte) Rapamycin-Resistenz der Tiere sein.

In der Gruppe der 4 Wochen lang behandelten Ratten führte der Einsatz von Rapamycin zu einer Reduzierung der MineralAppositionRate. Während diese Wirkung bei den 8 und 12 Wochen lang behandelten gesunden Ratten nicht mehr nachweisbar war, bestand sie bei den kranken Ratten bis zum Ende der maximalen Behandlungsdauer von 12 Wochen fort.

Rapamycin-behandelte Tiere verfügten über eine niedrigere Knochendichte, reduziertes Knochen- und Gewebevolumen, dünnerne, rarefizierte und schlechter verknüpfte Trabekel und eine stabähnliche Knochenarchitektur, sodass von einer verminderten biomechanischen Belastbarkeit der Knochen und damit von einem erhöhten Frakturrisiko unter Rapamycin-Behandlung ausgegangen werden muss. Der Chondrozytenproliferationsindex stieg bei den gesunden Tieren unter Rapamycin-Behandlung an, wohingegen er bei den nierenkranken Ratten sank. Ursache hierfür könnte ein – bei den kranken Ratten nicht verfügbarer – Kompensationsmechanismus sein.

## 7 Thesen

Für die ARPKD als hereditäre Nieren- und Lebererkrankung steht bisher keine kausale Therapie zur Verfügung. Nun wurde der schon lange bei der pathogenetisch ähnlichen ADPKD eingesetzte, antiproliferative Wirkstoff Rapamycin versuchsweise auch bei der ARPKD angewandt. Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen eines Tierversuches mit gesunden (SD) und erkrankten (PCK) Ratten und befasst sich mit den Auswirkungen von Rapamycin auf Wachstum, Knochenstoffwechsel und Knochenhistomorphologie in diesem Tiermodell.

1. Weibliche Ratten sind kleiner und leichter, verfügen jedoch über vergleichsweise kompakte, trabekulär besser vernetzte Knochen als ihre männlichen Artgenossen.
2. Die über 4 Wochen mit Rapamycin behandelten Tiere waren kürzer und leichter, hatten kleinere Tibiae und breitere WF als die Kontrollgruppe. Im weiteren Verlauf (8 bzw. 12 Wochen Beobachtungsdauer) verringerten sich diese Unterschiede bis zur Normalisierung bei Langzeitexposition. Dies könnte ein Anzeichen für eine schon in anderen Arbeiten vermutete Rapamycin-Resistenz sein.
3. Die MAR war unter 4-wöchiger Rapamycin-Behandlung herabgesetzt, bei längerer Behandlung normalisierte sie sich bei SD-Tieren.
4. Rapamycin-Behandlung über 4 Wochen führte bei allen Rattengruppen zu reduzierter Knochendichte, erniedrigtem absoluten und relativen Knochenvolumen und Knochenoberfläche, einer schlechteren Verknüpfung der dünnen, rarefizierten Trabekel sowie zur Annäherung an eine stabähnliche Knochenarchitektur.

5. Möglicherweise ist der Anstieg des Chondrozyten-Proliferationsindex bei Rapamycin-behandelten SD-Tieren kompensatorisch bedingt, bei PCK-Tieren scheint dieser Mechanismus zu fehlen.
6. Die in Mannheim lebende Kolonie der PCK-Ratte scheint als Modell der ARPKD für Therapiestudien zum Erhalt der Nierenfunktion nur wenig geeignet zu sein, da der hepatische Phänotyp im Vordergrund steht.

## 8 Literaturverzeichnis

- Al-Bhalal, L. and Akhtar, M. (2008). Molecular basis of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Adv Anat Pathol*, 15(1):54–58.
- Alshahrani, F. and Aljohani, N. (2013). Vitamin D: deficiency, sufficiency and toxicity. *Nutrients*, 5(9):3605–3616.
- Alvarez-García, O., Carbajo-Pérez, E., Garcia, E., Gil, H., Molinos, I., Rodriguez, J., Ordoñez, F. A., and Santos, F. (2007). Rapamycin retards growth and causes marked alterations in the growth plate of young rats. *Ped Nephrol*, 22(7):954–961.
- Alvarez-García, O., García-López, E., Loredo, V., Gil-Peña, H., Rodríguez-Suárez, J., Ordóñez, F. A., Carbajo-Pérez, E., and Santos, F. (2010). Rapamycin induces growth retardation by disrupting angiogenesis in the growth plate. *Kidney Int*, 78(6):561–568.
- Bergmann, C. (2014). Zystische Nierenerkrankungen und Ziliopathien. *Pädiatrie up2date*, 9:151–179.
- Bergmann, C., Senderek, J., Windelen, E., Küpper, F., Middeldorf, I., Schneider, F., Dornia, C., Rudnik-Schöneborn, S., Konrad, M., Schmitt, C. P., Seeman, T., Neuhaus, T. J., Vester, U., Kirfel, J., Büttner, R., Zerres, K., and APN (Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie) (2005). Clinical consequences of PKHD1 mutations in 164 patients with autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Kidney Int*, 67(3):829–848.
- Billing, H., Burmeister, G., Plotnicki, L., Ahlenstiel, T., Fichtner, A., Sander, A., Höcker, B., Tönshoff, B., and Pape, L. (2013). Longitudinal growth on an everolimus- versus an MMF-based steroid-free immunosuppressive regimen in paediatric renal transplant recipients. *Transpl Int*, 26(9):903–909.
- Boletta, A. (2009). Emerging evidence of a link between the polycystins and the mTOR pathways. *Patho Genetics*, 2(1).
- Breur, G. J., VanEnkevort, B. A., Farnum, C. E., and Wilsman, N. J. (1991). Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates. *J Orthop Res*, 9(3):348–359.

- Dusso, A. S., Brown, A. J., and Slatopolsky, E. (2005). Vitamin D. *Am J Physiol - Renal*, 289(1):F8–F28.
- Engelke, K., Karolczak, M., Lutz, A., Seibert, U., Schaller, S., and Kalender, W. (1999). [Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure]. *Radiologe*, 39(3):203–212.
- Feldkamp, L. A., Davis, L. C., and Kress, J. W. (1984). Practical cone-beam algorithm. *J Opt Soc Am A*, 1(6):612–619.
- Feldkamp, L. A., Goldstein, S. A., Parfitt, A. M., Jesion, G., and Kleerekoper, M. (1989). The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res*, 4(1):3–11.
- Fischer, D.-C., Jacoby, U., Pape, L., Ward, C. J., Kuwertz-Broeking, E., Renken, C., Nizze, H., Querfeld, U., Rudolph, B., Mueller-Wiefel, D. E., Bergmann, C., and Haffner, D. (2009). Activation of the AKT/mTOR pathway in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Nephrol Dial Transplant*, 24(6):1819–1827.
- Fliegauf, M., Benzing, T., and Omran, H. (2007). When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(11):880–893.
- Gu, S.-S., Zhang, Y., Chen, X., Diao, T.-Y., Gebru, Y., and Wong, M.-S. (2013). Trabecular bone deterioration at the greater trochanter of mice with unilateral obstructive nephropathy. *Asian J Androl*, 15(4):564–566.
- Gustafsson, E., Aszodi, A., Ortega, N., Hunziker, E. B., Denker, H.-W., Werb, Z., and Fassler, R. (2003). Role of collagen type II and perlecan in skeletal development. *Ann N Y Acad Sci*, 995:140–150.
- Haffner, D. and Fischer, D.-C. (2010). Bone cell biology and pediatric renal osteodys trophy. *Minerva Pediatr*, 62(3):273–284.
- Hahn, M., Vogel, M., Pompeius-Kempa, M., and Delling, G. (1992). Trabecular bone pattern factor—a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone*, 13(4):327–330.
- Harris, P. C. and Rossetti, S. (2004). Molecular genetics of autosomal recessive polycystic kidney disease. *Mol Genet Metab*, 81(2):75–85.
- Harris, P. C. and Torres, V. E. (2009). Polycystic kidney disease. *Annu Rev Med*, 60(1):321–337.

- Hildebrand, T. and Rüegsegger, P. (1997). Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Comput Methods Biomech Biomed Engin*, 1(1):15–23.
- Holick, M. F. (2006). Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest*, 116(8):2062–2072.
- Holstein, J. H., Klein, M., Garcia, P., Histing, T., Culemann, U., Pizanis, A., Laschke, M. W., Scheuer, C., Meier, C., Schorr, H., Pohlemann, T., and Menger, M. D. (2008). Rapamycin affects early fracture healing in mice. *Br J Pharmacol*, 154(5):1055–1062.
- Hruska, K. A., Choi, E. T., Memon, I., Davis, T. K., and Mathew, S. (2010). Cardiovascular risk in chronic kidney disease (CKD): the CKD-mineral bone disorder (CKD-MBD). *Ped Nephrol*, 25(4):769–778.
- Hunziker, E. B. (1994). Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Tech*, 28(6):505–519.
- Hunziker, E. B. and Schenk, R. K. (1989). Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats. *Journal Physiol*, 414:55–71.
- Hunziker, E. B., Schenk, R. K., and Cruz-Orive, L. M. (1987). Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. *J Bone Joint Surg Am*, 69(2):162–173.
- Inoki, K. (2014). mTOR signaling in autophagy regulation in the kidney. *Semin Nephrol*, 34(1):2–8.
- Inoki, K. and Guan, K.-L. (2006). Complexity of the TOR signaling network. *Trends Cell Biol*, 16(4):206–212.
- Katsuyama, M., Masuyama, T., Komura, I., Hibino, T., and Takahashi, H. (2000). Characterization of a novel polycystic kidney rat model with accompanying polycystic liver. *Exp Anim*, 49(1):51–55.
- Kim, I., Li, C., Liang, D., Chen, X.-Z., Coffy, R. J., Ma, J., Zhao, P., and Wu, G. (2008). Polycystin-2 expression is regulated by a PC2-binding domain in the intracellular portion of fibrocystin. *J Biol Chem*, 283(46):31559–31566.
- Kronenberg, H. M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 423(6937):332–336.

- Lager, D. J., Qian, Q., Bengal, R. J., Ishibashi, M., and Torres, V. E. (2001). The pck rat: a new model that resembles human autosomal dominant polycystic kidney and liver disease. *Kidney Int*, 59(1):126–136.
- Lee, K., Battini, L., and Gusella, G. L. (2011). Cilium, centrosome and cell cycle regulation in polycystic kidney disease. *Biochim Biophys Acta*, 1812(10):1263–1271.
- Lee, M. M., Chu, E. Y., El-Abbad, M. M., Foster, B. L., Tompkins, K. A., Giachelli, C. M., and Somerman, M. J. (2010). Characterization of mandibular bone in a mouse model of chronic kidney disease. *J Periodontol*, 81(2):300–309.
- Lehman, J. M., Michaud, E. J., Schoeb, T. R., Aydin-Son, Y., Miller, M., and Yoder, B. K. (2008). The Oak Ridge Polycystic Kidney mouse: modeling ciliopathies of mice and men. *Dev Dyn*, 237(8):1960–1971.
- Lieberthal, W. and Levine, J. S. (2012a). Mammalian target of rapamycin and the kidney. I. The signaling pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*, 303(1):F1–F10.
- Lieberthal, W. and Levine, J. S. (2012b). Mammalian target of rapamycin and the kidney. II. Pathophysiology and therapeutic implications. *Am J Physiol Renal Physiol*, 303(2):F180–F191.
- Mekahli, D., Decuyper, J.-P., Sammels, E., Welkenhuyzen, K., Schoeber, J., Audrezet, M.-P., Corvelyn, A., Dechênes, G., Ong, A. C., Wilmer, M. J., van den Heuvel, L., Bultynck, G., Parys, J. B., Missiaen, L., Levchenko, E., and De Smedt, H. (2013). Polycystin-1 but not polycystin-2 deficiency causes upregulation of the mTOR pathway and can be synergistically targeted with rapamycin and metformin. *Pflug Arch Eur J Phy*.
- Melton, L. J., Christen, D., Riggs, B. L., Achenbach, S. J., Müller, R., van Lenthe, G. H., Amin, S., Atkinson, E. J., and Khosla, S. (2010). Assessing forearm fracture risk in postmenopausal women. *Osteoporosis Int*, 21(7):1161–1169.
- Moe, S. M. (2008). Chronic kidney disease mineral bone disorder. *Perit Dial Int*, 28(Supplement 2):S5–S10.
- Nikolov, I. G., Joki, N., Nguyen-Khoa, T., Ivanovski, O., Phan, O., Lacour, B., Drüeke, T. B., Massy, Z. A., Dos Reis, L. M. M., Jorgetti, V., and Lafage-Proust, M.-H. H. (2010). Chronic kidney disease bone and mineral disorder (CKD-MBD) in apolipoprotein E-deficient mice with chronic renal failure. *Bone*, 47(1):156–163.

- O'Meara, C. C., Hoffman, M., Sweeney, W. E., Tsaih, S.-W., Xiao, B., Jacob, H. J., Avner, E. D., and Moreno, C. (2012). Role of genetic modifiers in an orthologous rat model of ARPKD. *Physiol Genomics*, 44(15):741–753.
- Ong, A. C. and Wheatley, D. N. (2003). Polycystic kidney disease—the ciliary connection. *Lancet*, 361(9359):774–776.
- Onuchic, L. F., Furu, L., Nagasawa, Y., Hou, X., Eggermann, T., Ren, Z., Bergmann, C., Senderek, J., Esquivel, E., Zeltner, R., Rudnik-Schöneborn, S., Mrug, M., Sweeney, W., Avner, E. D., Zerres, K., Guay-Woodford, L. M., Somlo, S., and Germino, G. G. (2002). PKHD1, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats. *Am J Hum Genet*, 70(5):1305–1317.
- Pallet, N., Beaune, P., Thervet, E., Legendre, C., and Anglicheau, D. (2006). [mTOR inhibitors: pleiotropic antiproliferative drugs]. *Med Sci (Paris)*, 22(11):947–952.
- Parfitt, A. M., Drezner, M. K., Glorieux, F. H., Kanis, J. A., Malluche, H., Meunier, P. J., Ott, S. M., and Recker, R. R. (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*, 2(6):595–610.
- Phornphutkul, C., Lee, M., Voigt, C., Wu, K.-Y., Ehrlich, M. G., Gruppuso, P. A., and Chen, Q. (2009). The effect of rapamycin on bone growth in rabbits. *J Orthop Res*, 27(9):1157–1161.
- Phornphutkul, C., Wu, K.-Y., Auyeung, V., Chen, Q., and Gruppuso, P. A. (2008). mTOR signaling contributes to chondrocyte differentiation. *Dev Dyn*, 237(3):702–712.
- Porter, C. C. and Avner, E. D. (2011). *Nelson Textbook of Pediatrics*, chapter 515.2 Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease. 19th edition.
- Praetorius, H. A. and Spring, K. R. (2005). A physiological view of the primary cilium. *Annu Rev Physiol*, 67:515–529.
- Reiling, J. H. and Sabatini, D. M. (2006). Stress and mTORture signaling. *Oncogene*, 25(48):6373–6383.
- Ren, X. S. S., Sato, Y., Harada, K., Sasaki, M., Furubo, S., Song, J. Y. Y., and Nakamura, Y. (2014). Activation of the PI3K/mTOR pathway is involved in cystic proliferation of cholangiocytes of the PCK rat. *PLoS one*, 9(1).

- Renken, C., Fischer, D.-C., Kundt, G., Gretz, N., and Haffner, D. (2011). Inhibition of mTOR with sirolimus does not attenuate progression of liver and kidney disease in PCK rats. *Nephrol Dial Transplant*, 26(1):92–100.
- Rohatgi, R., Battini, L., Kim, P., Israeli, S., Wilson, P. D., Gusella, G. L., and Satlin, L. M. (2008). Mechanoregulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> in human autosomal recessive polycystic kidney disease cyst-lining renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294(4).
- Rossetti, S. and Harris, P. C. (2007). Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant and autosomal recessive polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 18(5):1374–1380.
- Salmon, P. (2011). Method for ex-vivomicro-CTanalysis of mouse bone (proximal tibia, distal femur).
- Sanchez, C. P. and He, Y.-Z. (2009). Bone growth during rapamycin therapy in young rats. *BMC Pediatr*, 9:3+.
- Santos, F., Carbajo-Pérez, E., Rodríguez, J., Fernández-Fuente, M., Molinos, I., Amil, B., and García, E. (2005). Alterations of the growth plate in chronic renal failure. *Ped Nephrol*, 20(3):330–334.
- Scherzer, C. (2007). Mikrocomputertomographische Untersuchung der trabekulären Architektur des caninen Femurkopfes am Beispiel des Morbus Legg-Calvé-Perthes. *Diss TiHo Hannover*.
- Shillingford, J. M., Murcia, N. S., Larson, C. H., Low, S. H. H., Hedgepeth, R., Brown, N., Flask, C. A., Novick, A. C., Goldfarb, D. A., Kramer-Zucker, A., Walz, G., Piontek, K. B., Germino, G. G., and Weimbs, T. (2006). The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(14):5466–5471.
- Srinivas, V., Bohensky, J., and Shapiro, I. M. (2009). Autophagy: a new phase in the maturation of growth plate chondrocytes is regulated by HIF, mTOR and AMP kinase. *Cells Tissues Organs*, 189(1-4):88–92.
- Torres, V. E. and Harris, P. C. (2006). Mechanisms of Disease: autosomal dominant and recessive polycystic kidney diseases. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2(1).

- Turkbey, B., Ocak, I., Daryanani, K., Font-Montgomery, E., Lukose, L., Bryant, J., Tuchman, M., Mohan, P., Heller, T., Gahl, W. A., Choyke, P. L., and Gunay-Aygun, M. (2009). Autosomal recessive polycystic kidney disease and congenital hepatic fibrosis (ARPKD/CHF). *Pediatric radiology*, 39(2):100–111.
- Veland, I. R., Awan, A., Pedersen, L. B., Yoder, B. K., and Christensen, S. T. (2009). Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease. *Nephron Physiol*, 111(3).
- Voigt, C. M. (2012). Einsatz des mTOR-Inhibitors Sirolimus zur Progressionshemmung bei autosomal rezessiver polyzystischer Nierenerkrankung: Die PCK-Ratte als orthologes Tiermodell. *Diss MedFak Rostock*.
- Wang, S., Wu, M., Yao, G., Zhang, J., and Zhou, J. (2014). The cytoplasmic tail of FPC antagonizes the full-length protein in the regulation of mTOR pathway. *PLoS one*, 9(5).
- Wang, S., Zhang, J., Nauli, S. M., Li, X., Starremans, P. G., Luo, Y., Roberts, K. A., and Zhou, J. (2007). Fibrocystin/polyductin, found in the same protein complex with polycystin-2, regulates calcium responses in kidney epithelia. *Mol Cell Biol*, 27(8):3241–3252.
- Ward, C. J., Hogan, M. C., Rossetti, S., Walker, D., Sneddon, T., Wang, X., Kubly, V., Cunningham, J. M., Bacallao, R., Ishibashi, M., Milliner, D. S., Torres, V. E., and Harris, P. C. (2002). The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet*, 30(3):259–269.
- Ward, C. J., Yuan, D., Masyuk, T. V., Wang, X., Punyashthiti, R., Whelan, S., Bacallao, R., Torra, R., LaRusso, N. F., Torres, V. E., and Harris, P. C. (2003). Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Hum Mol Genet*, 12(20):2703–2710.
- Welsch, U. (2006). *Lehrbuch Histologie*, chapter 3.2.12 Knochengewebe. Second edition.
- Wu, Y., Dai, X.-Q., Li, Q., Chen, C. X., Mai, W., Hussain, Z., Long, W., Montalbetti, N., Li, G., Glynne, R., Wang, S., Cantiello, H. F., Wu, G., and Chen, X.-Z. (2006). Kinesin-2 mediates physical and functional interactions between polycystin-2 and fibrocystin. *Hum Mol Genet*, 15(22):3280–3292.
- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3):471–484.

- Xiao, Z., Zhang, S., Mahlios, J., Zhou, G., Magenheimer, B. S., Guo, D., Dallas, S. L., Maser, R., Calvet, J. P., Bonewald, L., and Quarles, L. D. D. (2006). Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *J Biol Chem*, 281(41):30884–30895.
- Zelzer, E. and Olsen, B. R. (2003). The genetic basis for skeletal diseases. *Nature*, 423(6937):343–348.
- Zhang, M.-Z., Mai, W., Li, C., Cho, S.-Y., Hao, C., Moeckel, G., Zhao, R., Kim, I., Wang, J., Xiong, H., Wang, H., Sato, Y., Wu, Y., Nakanuma, Y., Lilova, M., Pei, Y., Harris, R. C., Li, S., Coffey, R. J., Sun, L., Wu, D., Chen, X.-Z., Breyer, M. D., Zhao, Z. J. J., McKenna, J. A., and Wu, G. (2004). PKHD1 protein encoded by the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease associates with basal bodies and primary cilia in renal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(8):2311–2316.

# **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, die vorliegende Arbeit selbstständig ohne fremde Hilfe, nur unter Nutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und weder diese noch eine andere Arbeit zuvor an einer Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben.

Rostock, den 2. März 2017

Christine Bittig