

Aus der Universitäts-Kinder- und Jugendklinik Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Marianne Wigger (k)

**Einsatz des mTOR-Inhibitors Sirolimus zur Progressionshemmung bei
autosomal rezessiver polyzystischer Nierenerkrankung: Die PCK-Ratte als
orthologes Tiermodell**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae
(Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Catharina Margarethe Voigt
geb. am 11.07.1982 in Bremen

Rostock, im April 2012

Eingereicht am 18.04.2012

Datum der Verteidigung: 18.12.2012

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dieter Haffner, Medizinische Hochschule Hannover
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Benito Yard, Universitätsmedizin Mannheim
3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz, Universität Rostock

Meinem Vater:
Filum rubrum non perdidit.

I	Inhaltsverzeichnis	
II	Verzeichnis der Abkürzungen	
III	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	
1	Einleitung	1
1.1	Polyzystische Nierenerkrankungen	1
1.1.1	Autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung	1
1.1.2	Mutationen des <i>PKHD1</i> -Gens als Ursache der ARPKD und Eigenschaften von Fibrozystin	4
1.1.3	Bedeutung der primären Zilien	7
1.1.4	Gemeinsamkeiten und funktionelle Zusammenhänge von ARPKD und ADPKD	9
1.2	Regulation von Zellwachstum und Proliferation - die mTOR-Signalkaskade	10
1.2.1	Eigenschaften von mTOR	10
1.2.2	Funktion des mTOR-Komplexes	11
1.2.3	Regulation des mTORC1-Komplexes	12
1.3	Eigenschaften und Verwendung von Sirolimus	13
1.3.1	Pharmakologie, Pharmakokinetik und Nebenwirkungsprofil von Sirolimus	14
1.3.2	Sirolimus in der Therapie der polyzystischen Nierenerkrankung	15
1.4	Tiermodelle der ARPKD	15
2	Ziel der vorliegenden Arbeit	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Beschreibung des Tierversuchs	17
3.1.1	Versuchsbedingungen	17
3.1.2	Einteilung der Versuchsgruppen und Versuchsablauf	17
3.1.3	Medikation der Versuchstiere	18
3.1.4	Methoden im Tierversuch	19
3.2	Materialien	20
3.2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	20
3.2.2	Antikörper	22
3.2.3	Geräte	22
3.3	Methoden	22
3.3.1	Histologische Untersuchungen	22
3.3.1.1	Masson-Goldner-Trichrom-Färbung	22
3.3.1.2	Pikrosirius Rot-Färbung	23
3.3.1.3	Bestimmung der Zystenfläche in Niere und Leber	24
3.3.1.4	Bestimmung der Fibrosefläche in Niere und Leber	24
3.3.2	Immunhistochemische Untersuchungen	25

3.3.3	Klinische Chemie	27
3.3.4	Statistik	27
4	Resultate	28
4.1	Allgemeine Beschreibung des Tierversuchs	28
4.2	Natürliche Entwicklung und Organfunktion und Auswirkungen von Sirolimus	29
4.2.1	Entwicklung von Körpergewicht und Längenwachstum	29
4.2.2	Makroskopische Beurteilung der inneren Organe	29
4.2.2.1	Veränderungen an Herz, Milz und Lunge	29
4.2.2.2	Veränderungen an Niere und Leber	31
4.2.3	Auswirkungen auf den Blutdruck	34
4.2.4	Surrogatmarker für Nieren- und Leberfunktion in Serum und Urin	35
4.3	Mikroskopische Untersuchungen an Nieren und Lebern	42
4.3.1	Histologische Beurteilung von Nieren und Leber	42
4.3.2	Nachweis von BrdU als Marker der Zellproliferation in der Leber	43
4.3.3	Immunhistochemische Nachweise von p-Akt, p-mTOR und p-S6Kinase	44
5	Diskussion	46
6	Zusammenfassung	55
7	Thesen	57
8	Literatur	59

II Verzeichnis der Abkürzungen

ADPKD	Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung
Akt	Proteinkinase B
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AMP; ADP; ATP	Adenosinmono-, -di- bzw. triphosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ARPKD	Autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung
AS	Aminosäure
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BrdU	Bromdeoxyuridin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CYP	Cytochrom P
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
4EBP1	Bindeprotein des eukaryotischen Initiationsfaktors 4E
EGFR	Epithelial growth factor-Rezeptor
FK 506	Tacrolimus
FKBP12	FK506-bindendes Protein 12
FPC	Fibrozytin
FRB-Region	FKBP-Rapamycin-Bindestelle am mTOR-Protein
GAP	GTPase-activating Protein
Han:SPRD-Ratte	Sprague-Dawley Ratte aus dem Zentralinstitut für Versuchstiere, Hannover, deren Mutationen (<i>Cy</i> , <i>Pkd</i>) als ADPKD-Modelle dienen
IGF	Insulin growth factor
KG	Körpergewicht
MCKD	medulläre zystische Nierenerkrankung
Mrp2	kanalikulärer Transporter zur biliären Exkretion von Glutathion
mTOR	Mammalian target of Rapamycin (Proteinkinase)
mTORC1; 2	mTOR-Komplex 1 und 2
NPHP	Nephronophthise
p-S6K	phosphorylierte S6-Kinase
PBS	Phosphat buffered saline
PC-1; PC-2	Polycystin 1 und 2
PCK-Ratte	Polycystic Kidney Ratte
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2; PIP3	Phosphatidylinositol-di-bzw. triphosphat
PKD	Polycystic kidney disease
(<i>PKD1</i>)-Gen	<i>Polycystic kidney disease 2</i> -Gen
(<i>PKD2</i>)-Gen	<i>Polycystic kidney disease 1</i> -Gen

<i>(PKHD1)</i> -Gen	<i>Polycystic kidney and hepatic disease</i> -Gen
Raptor	regularly associated protein of mTOR
Rheb	Ras homolog enriched in brain-GTPase
SD-Ratte	Sprague-Dawley- Ratte
S6K	S6-Kinase
TBS	Tris-buffered saline
TSC1; TSC2	Tuberöse-Sklerose-Komplex 1 und -2

III Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1	Schematische Darstellung der normalen im Vergleich zur pathologischen Tubululentwicklung in der Niere bei der ARPKD	3
Abb. 2	Schematische Darstellung der normalen im Vergleich zur pathologischen Gallengangsentwicklung bei der ARPKD	4
Abb. 3	Schematische Darstellung des Membranproteins Fibrozystin mit den bisher bekannten Domänen	5
Abb. 4	Schematische Darstellung eines primären Ziliums und die Lokalisation der mit zystischen Nierenerkrankungen assoziierten Proteine	7
Abb. 5	Schematische Darstellung der Proteinstruktur von mTOR	10
Abb. 6	Schematische Darstellung der mTOR-Signalkaskade	11
Abb. 7	Strukturformel von Sirolimus	14
Abb. 8	Schematische Darstellung des Versuchsablaufs	18
Abb. 9	Mosaik-Fluoreszenzaufnahme eines PCK-Rattenleberpräparates	25
Abb. 10	Immunhistochemische Markierung BrdU-positiver Zellkerne im Leberpräparat einer PCK-Ratte (200x)	27
Abb. 11	PCK-Ratte mit kongenitalem Augendefekt	28
Abb. 12	Mittlere Körperlängen und -Gewichte der Tiere bei Versuchsende	30
Abb. 13	Mittleres relatives Lungengewicht bei Versuchsende	31
Abb. 14	Makroskopische Aspekte der Nieren von PCK- und SD-Ratten	31
Abb. 15	Mittleres relatives Nierengewicht bei Versuchsende	32
Abb. 16	Mittlere relative Nierenlänge bei Versuchsende	32
Abb. 17	Makroskopischer Aspekt der Lebern von PCK- und SD-Ratten	33
Abb. 18	Mittleres relatives Lebergewicht bei Versuchsende	34
Abb. 19	Mittlerer Blutdruck nach Ablauf der halben Versuchszeit	34
Abb. 20	Mittlere Urinkonzentration des direkten Bilirubins	39
Abb. 21	Mittlere Serumkonzentration des direkten Bilirubins	40
Abb. 22	Gallensäuren im Serum	41
Abb. 23	Direktes Bilirubin in Abhängigkeit von der Sirolimuskonzentration im Serum	41
Abb. 24	Masson-Goldner gefärbte Nierenquerschnitte von SD- und PCK-Ratten	42

Abb. 25	Mittlere relative Zysten- und Fibrosefläche in Niere und Leber der PCK-Ratten	43
Abb. 26	Mittlere Anzahl BrdU-positiver Zellkerne pro Gesichtsfeld in der Leber	44
Abb. 27	Immunistochemisch dargestellte Expression von p-Akt, p-mTOR und p-S6K	45
Abb. 28	Schematische Darstellung pharmakologischer Angriffspunkte zur Therapie der ARPKD und ADPKD	46
Tab. 1	Genetische Ursachen einiger zystischer Nierenerkrankungen	2
Tab. 2	Einteilung der Versuchsgruppen	18
Tab. 3	Liste der verwendeten Antikörper	22
Tab. 4	Zahl der Wurfgeschwister und perinataler Todesfälle bei PCK-Ratten	28
Tab. 5	Serumkonzentrationen von Kreatinin, Harnstoff, Calcium, Phosphat und Gesamteiweiß	35
Tab. 6	Enzymatische Aktivitäten der Transaminasen (ALAT, ASAT) im Serum	37
Tab. 7	Konzentrationen des indirekten und Gesamtbilirubins im Serum und Urin	38
Tab. 8	Ergebnisse vergleichbarer Studien am PCK-Tiermodell	48
Tab. 9	Ergebnisse klinischer Studien zur Therapie der ADPKD mit Sirolimus	49

1 Einleitung

1.1 Polyzystische Nierenerkrankungen

Zystische Nierenerkrankungen sind durch unregelmäßige Proliferation epithelialer Zellen im Tubulus- und Sammelrohrsystem charakterisiert. In der Folge bilden sich sackartige Ausstülpungen, deren Lumina durch Sekretion von Flüssigkeit zu Zysten aufgeweitet werden. In 10 bis 15% aller Fälle sind zystische Nierenerkrankungen Ursache der terminalen Niereninsuffizienz, da eine kausale Therapie bislang nicht möglich ist.

Zysten können als *multizystische* Dysplasie z.B. infolge von Entwicklungsstörungen oder langjähriger Dialysebehandlung auftreten (Segeer *et al.* 1998). Häufiger sind jedoch die als *polyzystisch* bezeichneten hereditären Zystennieren, die überordnend auch als Ziliopathien bezeichnet werden. Hier unterscheidet man die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD), die autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD), die medulläre zystische Nierenerkrankung (MCKD) und die Nephronophthise (NPHP, Tabelle 1).

1.1.1 Autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung

Die ARPKD gehört zur Gruppe der kongenitalen hepatorenenal fibrozystischen Syndrome und ist mit einer Inzidenz von etwa 1: 20.000 eine vergleichsweise seltene, angeborene Erkrankung. Im Gegensatz zur ADPKD manifestiert sich die ARPKD zumeist im frühen Kindesalter, in der Mehrzahl der Fälle sogar pränatal (Wilson 2004). Die hohe perinatale Mortalität (bis zu 30%) der Erkrankung resultiert aus einer hochgradig eingeschränkten Nierenfunktion mit Entwicklung eines Oligohydramnions, konsekutiver Lungenhypoplasie und respiratorischer Insuffizienz (Zerres *et al.* 1998). Gelegentlich stellen die extrem vergrößerten, schwammartig aufgetriebenen Nieren ein Geburtshindernis dar. In besonders schweren Fällen kommt es zur Ausprägung des Potter-Phänotyps mit Lungenhypoplasie, charakteristischer Potter-Facies sowie Wirbelsäulen- und Gliedmaßendeformitäten (Bergmann *et al.* 2006). Zusätzlich ist bei der ARPKD auch eine Leberbeteiligung obligat, diese wird jedoch seltener schon in der Perinatalzeit relevant (s.u.).

Bei der Mehrzahl der Patienten, die die Perinatalperiode überleben, ist der Krankheitsverlauf von einem rasch progredienten Funktionsverlust der Niere und renaler Hypertension geprägt. Die Zeit bis zum Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz ist zwar variabel, aber rund 50% der Patienten werden bis zum zehnten Lebensjahr dialysepflichtig (Ward *et al.* 2002; Bergmann *et al.* 2005).

Tabelle 1: Genetische Ursachen einiger zystischer Nierenerkrankungen (modifiziert nach (Fischer *et al.* 2010))

Zystische Nierenerkrankung (OMIM Nr.)	Gen	Protein	Nierenerkrankung (medianes Alter bei terminaler NI)	Extrarenale Beteiligungen
Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD)				
ADPKD1 (601313)	<i>PKD1</i>	Polycystin-1	Zysten (~ 55 Jahre)	Leber- und Pankreaszysten; Hirnbasisaneurysmen
ADPKD2 (173910)	<i>PKD2</i>	Polycystin-2	Zysten (~ 70 Jahre)	Leber- und Pankreaszysten
Autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD)				
ARPKD (263200)	<i>PKHD1</i>	Fibrocystin/Polyductin	Zysten (42% im Alter von 20 Jahren)	Leberfibrose (obligat)
Medulläre zystische Nierenerkrankung (MCKD; Markschwammniere)				
MCKD2 (603860)	<i>MCKD2</i>	Uromodulin	Corticomedulläre Zysten	Gicht
Nephronophthise (NPHP)				
NPHP1 (juvenile) (256100)	<i>NPHP1</i>	Nephrocystin-1	NPHP (13 Jahre)	Retinitis Pigmentosa (10%); oculomotorische Apraxie (~ 2%)
NPHP2 (infantile) (243305, 602088)	<i>NPHP2 / INV</i>	Nephrocystin-2 Inversin	Zysten (< 1 Jahr)	Retinitis Pigmentosa (10%); Leberfibrose
NPHP3 (adoleszente) (608002, 604387)	<i>NHP3</i>	Nephrocystin-3	NPHP (19 Jahre)	Retinitis Pigmentosa (10%); Leberfibrose ?
NPHP4 (606966)	<i>NPHP4</i>	Nephrocystin-4	NPHP (21 Jahre)	Retinitis Pigmentosa (10%); Leberfibrose; oculomotorische Apraxie
NPHP5	<i>NPHP5</i>	Nephrocystin-5	NPHP (13 Jahre)	Retinitis Pigmentosa (100%)

Die Markschwammniere wird autosomal dominant, die Nephronophthisen werden autosomal rezessiv vererbt.

Bei der ARPKD sind in der Niere ausschließlich die Sammelrohre von zystischer Degeneration betroffen (Abb. 1). Die Zysten entstehen als längliche, spindelförmige Expansionen, die sich nicht von ihrem Ursprungsnephron ablösen und in radiärer Anordnung das gesamte Parenchym durchziehen (Wilson 2004).

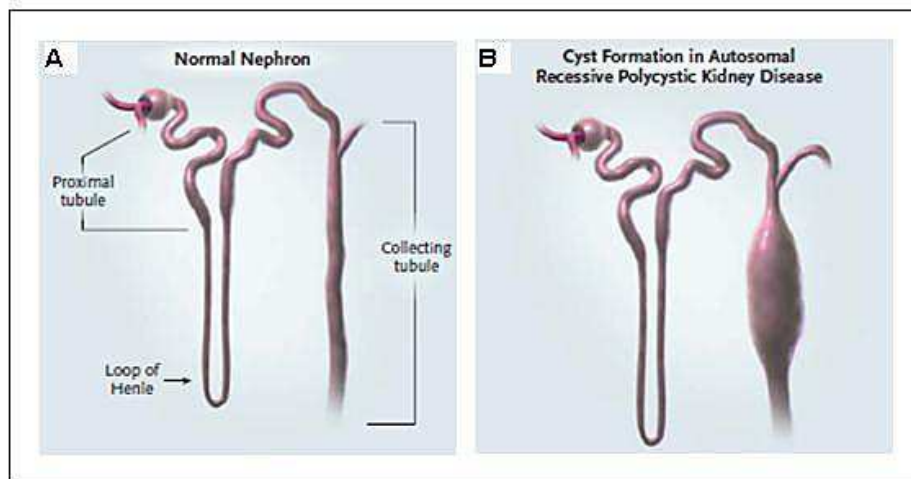


Abb. 1: Schematische Darstellung der normalen (links) im Vergleich zur pathologischen Tubululentwicklung in der Niere bei der ARPKD (aus: (Wilson 2004))

Zusätzlich ist bei der ARPKD eine Dysgenese der hepatischen Portalfelder obligat, die auf einer fehlerhaften Umgestaltung der Duktalplatte beruht (Shneider *et al.* 2005).

Die Duktalplatte entsteht während der Embryonalentwicklung als zirkulär um die Portalvene angelegte Doppelzellschicht und ist als Vorläuferstruktur des intrahepatischen Gallengangssystems zu betrachten. Einzelne Areale der Duktalplatte werden zu Tubuli umgestaltet, während die übrigen Anteile atrophieren. Die Tubuli migrieren in Richtung der Portalvene und bilden mit der Arterie ein Portalfeld (Glissonsche Trias). Die Störung dieses Prozesses bei der ARPKD führt zum Erhalt der primitiven embryonalen Architektur mit hyperplastischen, peripher liegenden Gallengängen und periportalere Fibrose (Desmet 1992, Gunay-Aygun, 2009) (Abb. 2). Beginnende hepatische Veränderungen ohne klinisch relevante Beeinträchtigung der Leberfunktion sind bereits perinatal nachweisbar. Sie sind zeitlebens progredient, aber in ihrem Ausmaß sehr variabel. Die klinischen Konsequenzen der kongenitalen hepatischen Fibrose dominieren oft erst im späten Kindes- bzw. Jugendalter den Phänotyp der ARPKD (Hermanns *et al.* 2003). Die Progression der generalisierten portalen und interlobulären Fibrose führt zu portaler Hypertension mit Ösophagusvarizen, Hypersplenismus und einem erhöhten Risiko für Cholangitiden. Die im Serum messbaren Aktivitäten der Leberenzyme sind in der Regel normal oder nur leicht erhöht und weisen nicht auf eine Funktionseinschränkung hin. Isoliert hepatische Verlaufsformen der ARPKD sind

beschrieben (Zerres *et al.* 2003; Gunay-Aygun 2009). Es gibt Patienten mit ausgeprägter Leber- bei nahezu fehlender Nierenschädigung, solche mit maximaler Nierenschädigung bei minimaler Leberbeteiligung, jedoch auch die gleichzeitige Erkrankung beider Organe, die eine Doppeltransplantation erfordern kann.

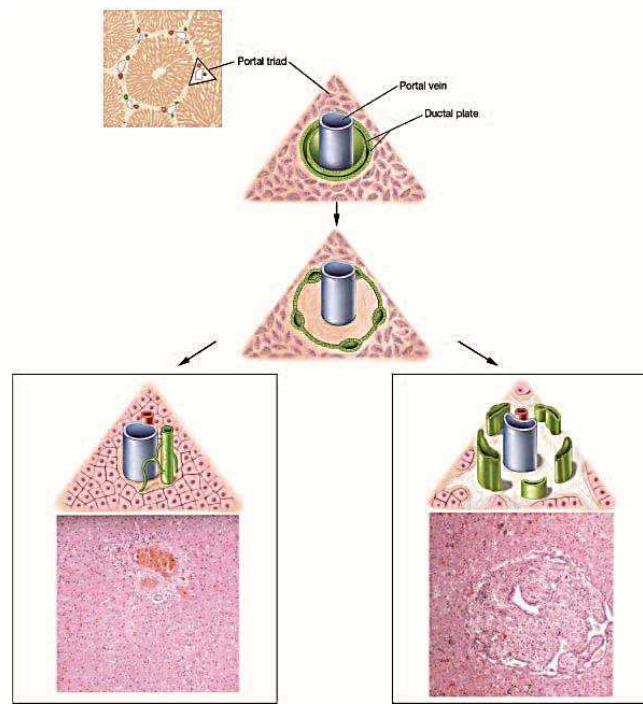


Abb. 2: Schematische Darstellung der normalen (links) im Vergleich zur pathologischen (rechts) Gallengangsentwicklung bei der ARPKD (aus: (Gunay-Aygun 2009))

In Ermangelung einer kausalen Therapie wird die ARPKD symptomatisch behandelt. Für die chronische Niereninsuffizienz bedeutet dies die Substitution mit Erythropoetin und aktivem Vitamin D, Behandlung der renalen Azidose, Einstellung des Blutdrucks bis hin zur Nierenersatztherapie und/oder Nierentransplantation. Die Folgen der progressiven Lebererkrankung können nur durch eine Transplantation kompensiert werden.

1.1.2 Mutationen des *PKHD1*-Gens und Eigenschaften von Fibrozystin

Bei der ARPKD liegt die Mutation ausschließlich im *Polycystic kidney and hepatic disease (PKHD1)*-Gen (6p21.1-p12), das 2002 durch zwei Arbeitsgemeinschaften unabhängig voneinander identifiziert wurde (Onuchic *et al.* 2002; Ward *et al.* 2002). Das ausgesprochen große Gen hat 66 kodierende Exone, die eine genomische Region von etwa 472 kb umfassen. Es kodiert eine RNA mit einem offenen Leserahmen von 12.222 Basenpaaren, die zu dem aus 4.074 Aminosäuren bestehenden Protein Fibrozystin/Polyductin (FPC) führt (Abb. 3). Es sind über 300 verschiedene *PKHD1*-Mutationen bekannt, die über das gesamte Gen verteilt

auftreten. Zumeist sind die Mutationen auf Familien beschränkt („Privatmutationen“) und erschweren so die Korrelation zwischen Geno- und Phänotyp. Es gilt aber als weitestgehend gesichert, dass der Phänotyp mit der Art der Mutation korreliert (Zerres *et al.* 2003; Bergmann *et al.* 2005). Trunkierende Mutationen sind auffallend häufig mit einer frühen Manifestation und einem schweren, häufig letalen Verlauf assoziiert, während der Austausch einer einzelnen Base (Missense-Mutation) einen vergleichsweise moderaten Phänotyp zur Folge hat. In der Regel haben ARPKD-Patienten, die die Neonatalperiode überleben, wenigstens eine Missense-Mutation. Weiterhin definiert bei Kombination von Missense- und trunkierenden Mutationen offenbar die „mildere“ Mutation den klinischen Phänotyp, da zwischen Patienten mit zwei Missensemutationen und Patienten mit einer trunkierenden und einer Missensemutation kein signifikanter klinischer Unterschied besteht (Bergmann *et al.* 2005).

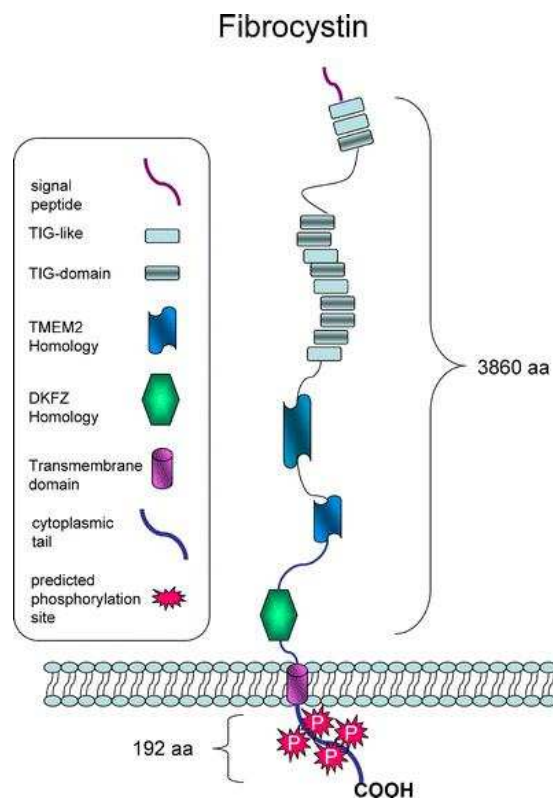


Abb. 3: Schematische Darstellung des Membranproteins Fibrocystin mit den bisher bekannten Domänen (aus: (Sweeney *et al.* 2006)) TIG/IPT, immunoglobulin-like fold shared by plexins and transcription factors; aa, Aminosäuren; TMEM2, Transmembranprotein 2

Fibrocystin/Polyductin (FPC, Abb. 3) weist strukturelle Ähnlichkeit mit integralen Membranrezeptoren und dem murinen Protein D86, einem von Lymphozyten sezernierten Protein mit bisher unbekannter Funktion, auf. Theoretische Überlegungen und Sequenz-

vergleiche zeigen, dass die N-terminale, extrazelluläre Domäne neben zahlreichen Glykosylierungsstellen neun (Parallel- β -Helix-1-Repeats)-Domänen enthält, denen aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit bakteriellen Polysaccharidasen katalytische Eigenschaften zugesprochen werden. Distal dieser Domänen finden sich sechs TIG/ITP-Domänen, die sowohl bei den zur Sema-Superfamilie gehörenden Membranrezeptoren als auch bei Transkriptionsfaktoren zu finden sind (Onuchic *et al.* 2002; Ward *et al.* 2002).

Die Extrazellulärdomäne verfügt außerdem über zwei Domänen mit Homologien zu TMEM2, einem Protein mit bisher unbekannter Funktion (Ward *et al.* 2002).

Die Funktion des FPC ist weitgehend unbekannt. Seine Struktur und Lokalisation (s.u.) lässt auf eine Rolle in der Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Adhäsion und/oder Signaltransduktion schließen. Die intrazelluläre Domäne von FPC verfügt über drei potentielle cAMP/cGMP-Phosphorylierungsstellen, über die die Interaktion mit dem Calcium-modulierenden Cyclophilin-Liganden (CAML) erfolgt. Da CAML in die Calcium-vermittelte Signalkaskade eingebunden ist, liegt es nahe, dass FPC als Rezeptor fungiert und Teil dieser Kaskade ist (Nagano *et al.* 2005). Mutationen im *PKHDI*-Gen können mit C-terminalen Veränderungen von FPC einhergehen und zum Verlust oder Inaktivierung dieser putativen Phosphorylierungsstellen und damit zum Verlust der Fähigkeiten zur Signaltransduktion führen.

In-vitro-Studien weisen darauf hin, dass FPC einer regulierten intramembranen Proteolyse (RIP) unterliegt, die ihrerseits durch Proteolyse innerhalb der extrazellulären Domäne getriggert wird (Hiesberger *et al.* 2006). Dieser Prozess, der die Abspaltung und nachfolgende Translokation intrazellulärer Peptide zur Folge haben kann, ist von anderen membranständigen Rezeptorproteinen bekannt, die Entwicklung, Differenzierung, Adhäsion und Zell-Zell-Interaktionen beeinflussen. Zu diesen gehören Notch, aber auch ErbB4, Neuregulin-1 (NRG-1), CD44, N-Cadherin, Lipoprotein-ähnliche (LPR)-Proteine und Polycystin-1 (PC-1). Auch bei FPC erfolgt die Freisetzung eines Peptids aus dem intrazellulären C-Terminus durch Proteinkinase C erst, nachdem der über Disulfidbrücken mit der Transmembrandomäne verbundene N-Terminus durch Metalloproteinasen abgespalten wurde (Hiesberger *et al.* 2006; Kaimori *et al.* 2007). Dieses Fragment könnte als Signalmolekül auf benachbarte Zellen wirken, während das intrazellulär abgespaltene FPC-Fragment in-vitro im Nukleolus lokalisiert werden konnte (Hiesberger *et al.* 2006). Dies lässt vermuten, dass FPC Transkription und Zellproliferation beeinflusst.

Im Gegensatz zu anderen PKD-assoziierten Proteinen ist die Expression von FPC auf Nierentubuli, Gallen- und Pankreasgangsystem und das Lungenepithel beschränkt.

Ein Großteil des FPC findet sich an primären Zilien und ihren Basalkörpern (Ward *et al.* 2003; Menezes *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2004).

1.1.3 Bedeutung der primären Zilien

Das primäre, nonmotile Zilium ist auf nahezu allen Zellen des Körpers lokalisiert. Sein mit Ziliarmembran umhülltes Axonem besteht aus einem 9+0-Mikrotubuli-Arrangement, an seiner Basis findet sich ein aus zwei Centriolen aufgebautes Basalkörperchen (Abb. 4). Bei Eintritt in den Zellzyklus wird das Zilium resorbiert, während das Basalkörperchen für die Organisation des Spindelapparates benötigt wird.

Primäre Zilien werden als sensorische Organellen angesehen, die an der Chemo-, Photo- und Mechanorezeption, aber auch an der Regulation der Zellproliferation und -Polarität sowie der Organisation der Mitosespindel beteiligt sind. Für eine adäquate Entwicklung und die Aufrechterhaltung der Gewebemhomöostase ist dies besonders in Leber, Niere, Pankreas, Sinnesorganen und dem zentralen Nervensystem von Bedeutung. Die Epithelfunktion und der adäquate Durchmesser tubulärer Strukturen, z.B. renaler und biliärer Gänge, aber auch grundsätzliche embryonale Entwicklungsvorgänge wie die Achsendeterminierung, Links-Rechts-Symmetrie und die Ausbildung von Gliedmaßen und orofazialen Strukturen sind an eine regelrechte Zilienfunktion gebunden (Masyuk *et al.* 2008; Gunay-Aygun 2009; Harris *et al.* 2009).

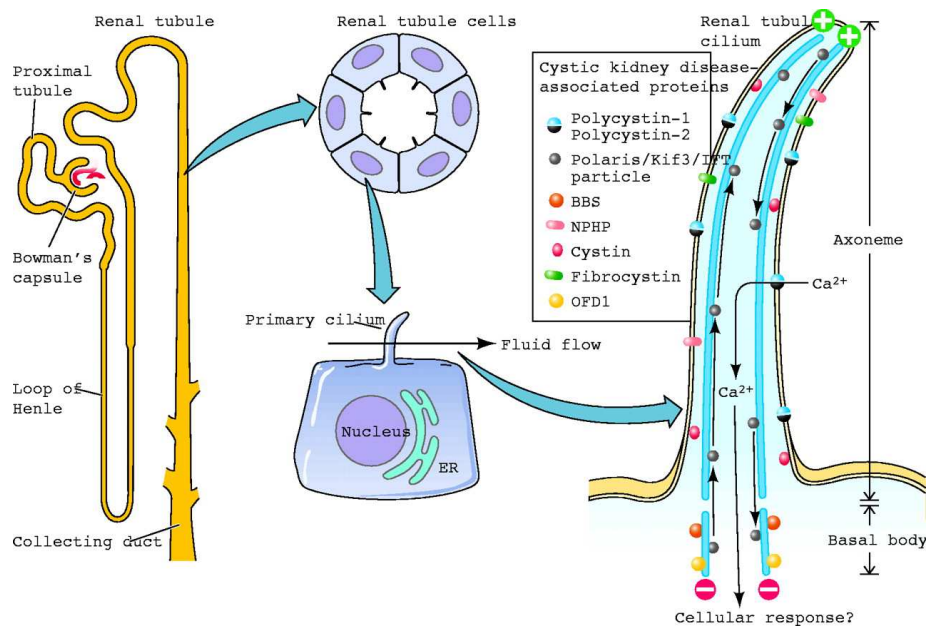


Abb. 4: Schematische Darstellung eines primären Ziliums und die Lokalisation der mit zystischen Nierenerkrankungen assoziierten Proteine (aus: (Zhang *et al.* 2004))

(ER, Endoplasmatisches Retikulum; BBS, Bardet-Biedl-Syndrom; NPHP, Nephronophthise; OFD1 = Oral-fazial-digitales Syndrom)

Das primäre Zilium mit Zentrosom und Basalkörper wurde als gemeinsame Lokalisation nahezu aller hereditären und syndromalen Nephropathien erkannt (Hildebrandt *et al.* 2005).

So sind beispielsweise die Produkte der bei der Nephronophthise mutierten Gene am primären Zilium zu finden, während die für das Bardet-Biedl-Syndrom und das Oro-fazial-digitale Syndrom Typ1 verantwortlichen Proteine am Basalkörper lokalisiert wurden (Zhang *et al.* 2004). Auch in Tiermodellen der ARPKD und anderen hereditären Zystenerkrankungen sind primäre Zilien an renalen Epithelzellen und Cholangiozyten häufig in ihrer Länge und Struktur verändert (Masyuk *et al.* 2003; Woollard *et al.* 2007).

Von besonderer Bedeutung ist die Co-Lokalisation von FPC mit den für die Pathogenese der ADPKD verantwortlichen Membranlykoproteinen Polycystin 1(PC-1) und 2(PC-2) in den Zilien.

Diese sind bei der ADPKD durch Mutation des Polycystic kidney disease (*PKD1*)-Gens (85% der Fälle) bzw. des (*PKD2*)-Gens (15% der Fälle) verändert (Mochizuki *et al.* 1996; Wilson 2004). PC-1 ist ein Membranrezeptor (4.302 AS) mit elf Transmembrandomänen, einer kurzen zytoplasmatischen und einer großen extrazellulären Domäne. Ähnlich wie beim Fibrozystin dient auch beim PC-1 die extrazelluläre Domäne mit großer Wahrscheinlichkeit der Signaltransduktion (Wilson 2004; Harris *et al.* 2009). PC-1 ist an fokalen Zell-Matrix-Adhäsionskomplexen und Zell-Zell-Kontakten beteiligt. Seine Interaktion mit Kollagen I, Fibronectin und Laminin weist darauf hin, dass PC-1 bei der Verschaltung von Extrazellulärmatrix, angrenzenden Zellen und Tubuluslumen mit dem intrazellulären Aktin-Tubulin-Zytoskelett als Sensor dient. Die Intrazellulärdomäne enthält Phosphorylierungsstellen für die Aktivierung zahlreicher intrazellulärer Signalwege (Cantiello 2004). Sie interagiert mit PC-2, einem Membranprotein (968 AS) mit sechs Transmembrandomänen, das zur Transient receptor potential (TRP)- Superfamilie der Calciumkanäle gehört und am endoplasmatischen Retikulum sowie der Plasmamembran lokalisiert ist (Nauli *et al.* 2003).

Am primären Zilium renaler epithelialer Zellen dient der PC-1/PC-2- Komplex vermutlich der Umwandlung mechanischer Stimuli in Calciumsignale. PC-1 fungiert dabei als Mechanosensor für flussbedingte Bewegungen des primären Ciliums und als Aktivator des assoziierten Calciumkanals PC-2. Der durch Interaktion von PC-1 und PC-2 generierte Calciumeinstrom triggert die Freisetzung von intrazellulärem Calcium und hat damit Einfluss auf Genexpression, Wachstum, Differenzierung und Apoptose (Zhang *et al.* 2004; Veland *et al.* 2009). Des Weiteren konnten in-vitro-Studien zeigen, dass die regulierte intramembranöse Proteolyse von FPC durch einen Anstieg des intrazellulären Calciums ermöglicht wird (Hiesberger *et al.* 2006).

Es hat sich gezeigt, dass Mutationen völlig verschiedener Proteine, deren gemeinsames Merkmal die subzelluläre Lokalisation am Zilium ist, zu Erkrankungen mit ähnlichem Phänotyp, nämlich der Bildung von Zysten führen. Dies legt nahe, dass für die Entstehung des Phänotyps weniger die gestörte Funktion des betroffenen Proteins, als vielmehr die konsekutiv gestörte Homöostase und/oder Interaktion des gesamten Protein-Ensembles verantwortlich ist.

Dies schließlich wirkt sich auf die mechanosensorische Zilienfunktion und intrazelluläre Calciumhomöostase aus.

Positive wie negative Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration induzieren je nach zellulärem Kontext und auslösendem Ereignis verschiedene, miteinander in Wechselwirkung stehende Signalkaskaden.

Eine gestörte Zilienfunktion mit unphysiologischen intrazellulären Calciumkonzentrationen hat einen negativen Einfluss auf die Organogenese und trägt zu einer unregelmäßigen Proliferation des Zystenepithels mit nachfolgendem Verlust der Organfunktion bei (Dressler 2006; Sweeney *et al.* 2006; Cowley 2008).

1.1.4 Gemeinsamkeiten und funktionelle Zusammenhänge von ARPKD und ADPKD

Bei ARPKD und ADPKD gibt es auffällige Analogien. Beiden Erkrankungen liegt ein auto-krin-parakriner Stimulationskreislauf zugrunde, der durch Überexpression der EGF-Rezeptoren an der luminalen Seite zystenauskleidender Epithelzellen und Sekretion abnorm hoher Mengen ihres Liganden in das Zystenlumen aufrecht erhalten wird. Gleichmaßen treten verdickte Basalmembranen, abnorme Integrinrezeptorzahlen und Veränderungen in der Matrixzusammensetzung auf. Darüber hinaus finden sich bei beiden Nephropathien Alterationen in der Polarität von Membranproteinen mit eher apikal als basolateral lokalisierten EGF-Rezeptoren, Cathepsin B, Matrix-Metalloproteinase 2, E-Cadherin und Na-K-ATPase und basal statt apikal lokalisiertem Na,K,2Cl-Symporter (Wilson 2004).

Die alterierte Polarisierung ist ein Zeichen für die Persistenz fetaler Konditionen und deutet auf eine Blockade des Reifeprogramms hin. Bei Gesunden findet dieser Prozess in utero statt und unterliegt der Kontrolle durch geregelte Genexpression.

Die wichtigsten Merkmale beider Erkrankungen sind jedoch eine inadäquate epitheliale Differenzierung und ein Ungleichgewicht von Proliferation und Apoptose. Die erhöhte Apoptose begünstigt die Zystenexpansion durch Zerstörung des gesunden Parenchyms, während die renale Proliferation, die bei Gesunden schon pränatal abgeschlossen ist, lebenslang persistiert.

Die Analogien zwischen ARPKD und ADPKD sowie die Kollokalisierung von PC-1, PC-2 und FPC auf primären Zilien führten zu der Hypothese, dass die Interaktion dieser Proteine funktionell relevant ist. Es konnte gezeigt werden, dass PC-2 und FPC über das Kinesinmotorprotein KIF3B miteinander in Verbindung stehen und diese Interaktion zur Regulation des intrazellulären Calciumhaushalts beiträgt (Wu *et al.* 2006; Wang *et al.* 2007).

In den intrazellulären C-Termini von PC-2 und FPC konnten darüber hinaus Domänen identifiziert werden, die auf eine Interaktion der Membranproteine hinweisen. Demnach wird die Expression von PC-2 durch FPC reguliert (Kim *et al.* 2008b).

Die sowohl bei ARPKD-Patienten als auch bei orthologen Tiermodellen dieser Erkrankung beschriebene Fehlbildung der Duktalplatte, die fehlende Differenzierung des Tubulusepithels

und die überschießende Proliferation deuten darauf hin, dass Fibrozystin für die räumliche und zeitliche Regulation von Proliferation und Differenzierung einerseits und die Interaktion von Mesenchym und Epithel andererseits eine entscheidende Rolle spielt.

1.2 Regulation von Zellwachstum und Proliferation - die mTOR-Signalkaskade

Exogene Faktoren, wie z.B. die Verfügbarkeit von Nährstoffen/Aminosäuren, Wachstumsfaktoren und Stress, regulieren durch Induktion verschiedener, miteinander in Wechselwirkung stehender Signaltransduktionskaskaden primär das Zellwachstum und die Proliferation. Die Aktivierung dieser Kaskaden erfolgt über Rezeptor-Tyrosinkinasen und/oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Dabei sind die Ras/Raf/MEK/ERK/MAPK- und die Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B/Akt (PIK3/PKB/Akt)-Kaskade von besonderer Bedeutung. Als zentrale Schaltstelle des letztgenannten Signalwegs ist die Serin/Threoninkinase mTOR (mammalian target of Rapamycin) einer der wichtigsten Regulatoren von Zellwachstum und Proliferation.

1.2.1 Eigenschaften von mTOR

mTOR besteht aus 2.549 Aminosäuren und enthält an seinem N-Terminus 20 HEAT (Huntingtin, Elongationsfaktor 3, Proteinphosphatase 2A, TOR1)-Sequenzen aus jeweils zwei α -Helices, deren 40 Aminosäuren ein individuelles Muster hydrophiler und hydrophober Reste aufweisen. Diese Sequenzen dienen u.a. der Interaktion mit Raptor (Regularly associated protein of mTOR) (Wullschleger *et al.* 2006).

Der C-Terminus enthält die Kinasedomäne, deren Sequenz zu der katalytischen Domäne der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) homolog ist. Daher wird mTOR zur Familie der PI3K-verwandten Kinasen (PIKK) gezählt. Proximal dieser Domäne findet sich die FRB-Region (FKBP-Rapamycin-Bindestelle, s.u.), an der die Bindung von Rapamycin erfolgt.

Weiterhin enthält das Protein die allen PIK-Kinasen gemeinsamen FAT-Regionen (benannt nach den Kinasen FRAP, ATM und TRAP) (Hay *et al.* 2004; Wang *et al.* 2006).



Abb. 5: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von mTOR (Wang *et al.* 2006)

HEAT: Huntingtin, Elongationsfaktor 3, Proteinphosphatase 2A, TOR1; FAT: FRAP, ATM und TRAP-Kinase; FRB: FKBP-Rapamycin-Bindestelle; FATC: FAT-Region am C-Terminus

1.2.2 Funktion des mTOR-Komplexes

Es existieren zwei funktionell unterschiedliche mTOR-Komplexe, mTORC1 und mTORC2, von denen nur mTORC1 mit Rapamycin gehemmt werden kann (Abb.6).

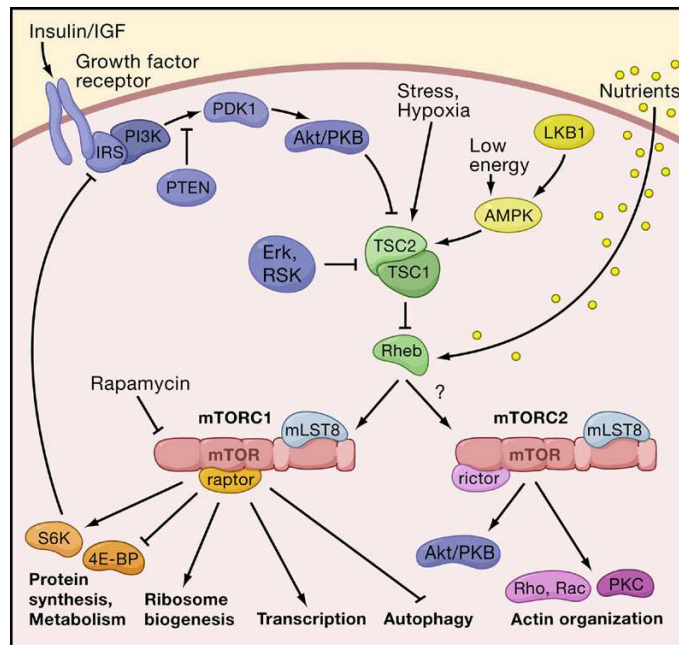


Abb. 6: Schematische Darstellung der mTOR-Signalkaskade

Die mTOR Signalkaskade besteht aus zwei Hauptwegen, die jeweils über einen spezifischen mTOR-Komplex (mTORC) gesteuert werden. Das Rapamycin-sensitive mTORC1 kontrolliert diverse Signalwege, die sämtlich für die Generierung der Zellmasse zuständig sind. Das Rapamycin-insensitive mTORC2 kontrolliert das Zytoskelett und legt somit die Form der Zelle fest. mTORC1, wahrscheinlich auch mTORC2 reagieren auf Wachstumsfaktoren (Insulin, IGF), den Energiestatus der Zelle, Nährstoffe (Aminosäuren) und Stress. mTORC1 und vermutlich auch mTORC2 sind Multimere, werden aber hier als Monomere dargestellt. Pfeile bedeuten Aktivierung, abbrechende Linien Inhibition (aus: (Wullschleger et al. 2006)).

Der mTORC1-Komplex setzt sich aus mTOR, GβL (G-Protein-β-Untereinheit-ähnliches Protein) und Raptor zusammen und reguliert die Proteinsynthese durch Phosphorylierung an den TOS (mTOR-Signalkaskade) -Aminosäuresequenzen seiner Zielproteine, deren Rekrutierung über Raptor erfolgt. Diese Zielproteine sind *i)* der mRNA-Translations-Repressor 4EBP1 (Bindeprotein des eukaryotischen Initiationsfaktors 4E), der durch Phosphorylierung inaktiviert und *ii)* die S6-Kinase, die durch Phosphorylierung aktiviert wird. Das Substrat der S6-Kinase, das S6-Protein, fördert selektiv die mRNA-Translation für ribosomale Proteine und andere Translationsregulatoren und damit die Translationskapazität der Zelle (Inoki *et al.* 2005).

Zu den Aufgaben des Rapamycin-insensitiven mTORC2-Komplexes, der anstelle von Raptor das Protein Rictor enthält, gehören die Regulation des Aktinzytoskeletts und die Aktivierung der Proteinkinase Akt.

Nahezu sämtliche Signale vorgeschalteter Regulatoren passieren einen aus zwei Tumorsuppressoren (Tuberöse-Sklerose-Komplex-1 und -2; TSC1, TSC2) aufgebauten funktionalen Komplex. TSC1 wird dabei als regulatorische, TSC2 als katalytische Komponente angesehen, welche als GAP (GTPase-activating Protein) die Aktivität der Ras-ähnlichen GTPase Rheb (Ras homolog enriched in brain) reguliert (Wullschleger *et al.* 2006).

Die Inhibition von TSC1/2 durch Phosphorylierung bedeutet eine Hemmung seiner GAP-Aktivität, so dass die Rheb-GTPase in ihrer aktiven, GTP-gebundenen Form akkumulieren und mTOR aktivieren kann.

In-vitro-Studien zeigen, dass die zytoplasmatische Domäne von PC-1 mit TSC2 interagiert und beide mit mTOR komplexieren und es damit inhibieren (Shillingford *et al.* 2006).

1.2.3 Regulation des mTORC1-Komplexes

Die Aktivität des mTOR/Raptor-Komplexes ist direkt mit dem Angebot an Nährstoffen, Energie und Wachstumsfaktoren assoziiert (Reiling *et al.* 2006).

Binden Wachstumsfaktoren wie Insulin oder Insulin-like growth factor (IGF) an ihre membranständigen Rezeptoren, werden das Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS) und anschließend die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) zur Zellmembran rekrutiert. Durch PI3K wird in der Membran Phosphatidylinositol-Diphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-Triphosphat (PIP₃) umgewandelt. PIP₃ rekrutiert daraufhin die Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1) und die Serin/Threoninkinase Akt zur Zellmembran, wo Akt phosphoryliert wird. Die Tumorsuppressor-Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homologue deleted on Chromosome 10) hebt diese Wirkung von PIP₃ durch Dephosphorylierung auf. In phosphoryliertem Zustand inhibiert Akt den TSC1/2-Komplex und führt so zur Aktivierung von mTOR (Wang *et al.* 2006; Wullschleger *et al.* 2006).

Bei niedrigem Energiestatus der Zelle, also einem relativen Mangel an ATP, wird die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) aktiviert. Aktivierte AMPK inhibiert energiezehrende Prozesse (z.B. Proteinsynthese, Zellproliferation) und stimuliert energieliefernde (ATP-generierende) Prozesse wie die Fettsäureoxidation. Diese Drosselung des Energieverbrauchs geht mit der TSC1/2-vermittelten Inhibition von mTOR einher.

Auch Raptor fungiert vermutlich als Sensor des Energiehaushalts und reguliert seine Bindung an mTOR in Abhängigkeit von der Energiebilanz. Eine lockere Bindung zwischen mTOR und Raptor steigert, eine feste Bindung inhibiert die Aktivität des mTORC1-Komplexes.

Man geht davon aus, dass Rapamycin durch Bindung an FKBP12 die Interaktion zwischen Raptor und mTOR und somit selektiv die Phosphorylierung der Zielproteine verhindert (Inoki *et al.* 2005).

Auch Stress und Hypoxie aktivieren den TSC1/2-Komplex und inhibieren damit mTOR. Es ist bekannt, dass eine selektive Hemmung der mTOR-Aktivität bei ADPKD-Patienten und im Tiermodell der ADPKD das Zystenwachstum inhibiert (Tao *et al.* 2005; Shillingford *et al.* 2006; Wahl *et al.* 2006; Zafar *et al.* 2009).

Aufgrund der Interaktion von PC-1, PC-2 und FPC und der Aktivierung von mTOR durch mutiertes PC-1 wird postuliert, dass auch mutiertes FPC zu einer Aktivierung von mTOR führt. Im Umkehrschluss ergibt sich daraus, dass die Inhibition von mTOR auch auf die Progression der ARPKD einen positiven Einfluss haben könnte.

Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Proteinkinase mTOR und die nachgeschaltete Signalkaskade in Analogie zur ADPKD auch in Nephrektomiepräparaten von Patienten mit klinisch und/oder genetisch gesicherter ARPKD aktiviert ist (Fischer *et al.* 2009). Die auffallend identische Lokalisation von Fibrozystin und mTOR, die von uns und anderen Arbeitsgruppen in den Tubulusepithelien gesunder und zystisch alterierter Nieren nachgewiesen werden konnte, könnte auf eine Interaktion beider Proteine hinweisen (Ward *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2004; Sweeney *et al.* 2006; Fischer *et al.* 2009).

1.3 Eigenschaften und Verwendung von Sirolimus

Sirolimus (Rapamycin, Rapamune®) ist ein von der Bakterie *Streptomyces hygroscopicus* sezerniertes Makrolidantibiotikum. Die Bakterie wurde 1975 im Rahmen einer explorativen Erhebung antimikrobieller Agenzien in einer Bodenprobe der Osterinseln entdeckt und kultiviert. In einem mechanismusbasierten Screeningprotokoll zeichneten sich antifungale Eigenschaften ab. Aus dem Myzel des Erregers konnte ein Wirkstoff isoliert werden, der sich als hochpotentes Fungizid erwies und nach dem indigenen Namen seines Fundortes, „Rapa Nui“, benannt wurde (Sehgal 2003). Der ursprünglich zgedachten Verwendung als Antimykotikum standen die immunsuppressiven Eigenschaften der Substanz entgegen, die allerdings zunächst nicht zu ihrer weiteren Erforschung führten. Erst in den 80er Jahren entdeckte man die strukturelle Ähnlichkeit mit dem Calcineurininhibitor Tacrolimus (Camardo 2003).

Sirolimus/Rapamycin hemmt die Zellproliferation und wird daher zur Immunsuppression nach Organtransplantation, in der Onkologie und in der Gefäßchirurgie (rapamycinbeschichtete Stents) eingesetzt.

Grundlage der immunsuppressiven Wirkung von Sirolimus ist die vorrangige Hemmung der Proteinsynthese in proliferierenden T-Lymphozyten; seit 1999 ist Sirolimus in den USA, seit 2001 in Europa für die Therapie nach Nieren- oder Lebertransplantation zugelassen.

Die antiproliferative Wirkung von Sirolimus beruht auf der Bindung an das Immunophilin FKBP12 (FK506-bindendes Protein 12), das seinerseits an die multifunktionelle Serin-Threonin-Kinase mTOR bindet. Diese Blockade von mTOR bewirkt eine Hemmung des co-stimulatorischen Signals 2 während des Übergangs von der G0- in die G1-Phase sowie des

Cytokinsignals-3 in der späten G1-Phase der T-Zelle, sodass *i*) die Aktivierung einer ruhenden Zelle verhindert und *ii*) der Arrest aktivierter Zellen in der präsynthetischen Wachstumsphase erreicht wird (Kahan 2001).

1.3.1 Pharmakologie, Pharmakokinetik und Nebenwirkungsprofil von Sirolimus

Nach oraler Aufnahme wird Sirolimus schnell, aber unvollständig absorbiert (orale Bioverfügbarkeit 15%) und erreicht seine maximale Konzentration im Blut nach 0,5 bis 2,3 Stunden, die Halbwertszeit beträgt rund 60 Stunden. Seine Aufnahme wird durch fettreiche Mahlzeiten reduziert. Die lipophilen Eigenschaften der Substanz ermöglichen nach Absorption eine rasche, mehr als 95%ige Bindung an Erythrozyten.

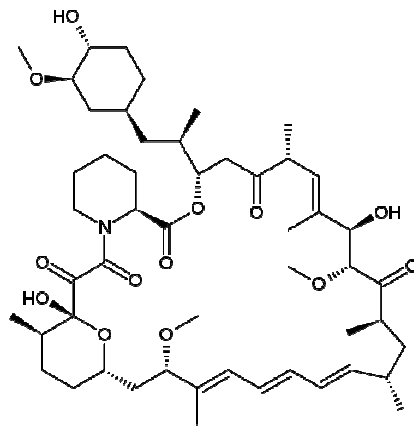


Abb. 7: Strukturformel von Sirolimus (aus (Panel 2010))

Sirolimus wird im CYP3A4-System der Leber metabolisiert und ist Substrat der darmwandständigen p-Glykoproteinpumpe; seine Clearance über diese Wege ist sehr variabel. Die Mehrzahl seiner sieben Metabolite, die für weniger als 10% seiner immunsuppressiven Wirkung verantwortlich sind, entsteht durch O-Demethylierung und Hydroxylierung. Die Exkretion erfolgt über Galle und Fäzes.

Die vergleichsweise schmale therapeutische Breite des Medikaments erfordert ein sorgfältiges Drug Monitoring, wobei in der Erhaltungstherapie nach Organtransplantation Serumkonzentrationen von 15 ng/ml angestrebt werden (Panel 2010).

Die therapeutischen und toxischen Effekte von Sirolimus basieren auf identischen zellulären Prozessen (Kahan 2001). Als Nebenwirkungen treten besonders häufig Hyperlipidämie mit Hypercholesterinämie und -Triglyzeridämie, aber auch Knochenmarkdepression und Thrombozytopenie sowie erhöhte Leberfunktionsparameter auf (Panel 2010).

Allerdings weist Sirolimus eine geringere Nephrotoxizität als Tacrolimus und Cyclosporin A auf und wird daher besonders für den Einsatz nach Nierentransplantation empfohlen (DiJoseph *et al.* 1992; Nielsen *et al.* 2003).

1.3.2 Sirolimus in der Therapie der polyzystischen Nierenerkrankung

In unterschiedlichen Tiermodellen der polyzystischen Nierenerkrankung konnte eine positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufes durch Therapie mit Sirolimus nachgewiesen werden:

- Im Orpk (Oak ridge PKD)-rescue Mausmodell (Tg737^{orpk/orpk};TgRsq) der ADPKD bewirkte Sirolimus eine Verbesserung des Phänotyps
- Bei der BPK (Balb/c-*bpk/bpk*, Defizienz in der **B-Zell-Progenitor**kinase)-Maus als Modell der frühen ARPKD-Manifestation zeigten sich nach Behandlung mit Sirolimus verminderte Harnstoffwerte, eine signifikante Reduktion des Nierengewichtes und der Zystengröße sowie ein verbesserter Zystenindex (Shillingford *et al.* 2006)
- Bei der Han:SPRD-(Cy/+)-Ratte (Sprague-Dawley-Ratte aus dem Zentralinstitut für Versuchstiere, Hannover als Tiermodell der ADPKD) konnten der Verlust der Nierenfunktion durch Therapie mit Sirolimus aufgehalten und das Nierengewicht sowie die Zystengröße verringert werden (Tao *et al.* 2005; Wahl *et al.* 2006; Zafar *et al.* 2009)

Auch bei ADPKD-Patienten, bei denen eine Nierentransplantation ohne Nephrektomie durchgeführt wurde, zeigte sich, dass die im Körper belassenen Zystennieren unter immunsuppressiver Behandlung mit Sirolimus nach durchschnittlich 24 Monaten eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Volumenreduktion von $24,8 \pm 9,7\%$ aufwiesen (Shillingford *et al.* 2006).

1.4 Tiermodelle der ARPKD

Die PCK (Polycystic kidney)-Ratte trägt eine in einer japanischen Kolonie von Sprague-Dawley-Ratten (Crj: CD/SD; Charles River, Japan) spontan aufgetretene und rezessiv vererbte Mutation des Fibrozystin-Gens (Frame-shift mit Skipping von Exon 36; IVS35-2A→T). Damit ist die PCK-Ratte im Gegensatz zu allen anderen bislang für die Untersuchung der polyzystischen Nierenerkrankung eingesetzten Tiermodellen ein orthologes Tiermodell der humanen ARPKD. Innerhalb der ersten drei Wochen nach Geburt entwickeln diese Tiere polyzystische Veränderungen von Niere und Leber mit Fibrosierung und Dilatation der intrahepatischen Gallengänge. Ihre Erkrankung entspricht somit dem humanen Phänotyp (Katsuyama *et al.* 2000; Lager *et al.* 2001; Masyuk *et al.* 2003; Muff *et al.* 2006). Andere orthologe Tiermodelle der ARPKD sind die durch genetische Manipulation generierte *ex40* Maus (in-frame-Deletion von Exon 40 des murinen *PKHD1*) und *PKHD1*^{del2/del2}-Maus (Fibrozystin-knock-out-Maus) (Kim *et al.* 2008b). Phänotypisch unterscheiden sich diese Tiermodelle jedoch stark von der humanen ARPKD.

2 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die bislang durchgeführten präklinischen Studien an der PCK-Ratte als orthologem Tiermodell der ARPKD basieren auf der Hemmung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren) auf der Ebene des Rezeptors oder des als second-messenger dienenden cAMP. Der Phänotyp konnte entweder in der Leber (EGFR-Inhibitoren) oder in der Niere (cAMP-Inhibition durch Vasopressin V2-Rezeptorantagonisten), in keinem Fall aber in beiden Organen zugleich verbessert werden.

Fibrosierung und Zystenwachstum in Leber und Niere von ARPKD-Patienten schreiten kontinuierlich voran. Angesichts der zentralen Bedeutung von mTOR für die Organisation von Zellwachstum und Proliferation, vor allem aber aufgrund der aktivierten mTOR-Signalkaskade in Nierenzysten von ARPKD-Patienten und PCK-Ratten erscheint die selektive Hemmung dieser Proteinkinase mit dem in der Transplantationsmedizin etablierten Sirolimus als ein viel versprechender Therapieansatz für die Behandlung der humanen ARPKD.

Daher wurde an der PCK-Ratte überprüft, ob die regelmäßige sirolimusvermittelte Hemmung von mTOR mit Rapamycin einen Einfluss auf die Organfunktion und die Entwicklung charakteristischer hepatobiliärer und renaler Veränderungen hat und somit einen möglichen Therapieansatz für die Behandlung der humanen ARPKD darstellt.

Die bei behandelten und nicht behandelten, kranken und gesunden Tieren erhobenen Parameter sollten zum einen der vergleichenden Beurteilung der Entwicklung, zum anderen der Erfassung therapiebedingter Haupt- und Nebenwirkungen dienen. Hierzu wurden makroskopische und mikroskopische Parameter (Zysten und Fibrose in Niere und Leber, immunhistochemische Darstellung proliferierender Zellen und charakteristischer Proteine der mTOR-Kaskade), Blutdruck sowie Nieren- und Leberfunktionsparameter im Serum der Versuchstiere nach vier-, acht- und zwölfwöchiger Behandlungsdauer ermittelt.

3 Material und Methoden

3.1 Beschreibung des Tierversuchs

3.1.1 Versuchsbedingungen

Die Haltung sowie sämtliche Behandlungen der Tiere fanden unter Standardbedingungen (Temperatur 23°C, 12/12-Tag-Nacht-Rhythmus) in den Räumen der Zentralen Versuchstierhaltung, Institut für Experimentelle Chirurgie (Direktorin Prof. Dr. B. Vollmar) der Universität Rostock, statt. Der Tierversuch war von der zuständigen Aufsichtsbehörde genehmigt worden.

Die PCK-Ratten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. N. Gretz und Frau Dr. med. vet. B. Kränzlin (Zentrum für Medizinische Forschung, Medizinische Fakultät Mannheim) zur Verfügung gestellt und zusammen mit den Muttertieren geliefert (zehn Muttertiere mit insgesamt 85 Jungtieren). Im Alter von vier bis fünf Wochen wurden die Tiere abgesetzt und randomisiert. Die SD (Sprague-Dawley)-Ratten wurden im Alter von drei Wochen von der Firma Charles River, Sulzfeld geliefert. Alle Tiere wurden paarweise nach Geschlechtern getrennt gehalten und erhielten eine Ohrmarkierung zur Identifizierung. Die Tiere hatten uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Futter (V1534, ssniff, Soest) und wurden zweimal wöchentlich gewogen. Die Käfige und Trinkflaschen wurden zweimal wöchentlich gewechselt bzw. gereinigt.

Sowohl PCK- als auch SD-Ratten wurde nach Randomisierung und Kennzeichnung eine einwöchige Akklimatisierungsphase zur Gewöhnung an die Haltungs- und Umgebungsbedingungen gewährt.

Die PCK-Ratten wurden in zwei Kohorten nacheinander (Mai – August 2008 und Oktober 2008 – Januar 2009), die SD-Ratten in einer Kohorte (September – Dezember 2008) behandelt.

Im ersten Durchgang fiel nach etwa sechs Wochen bei vier klinisch unauffälligen Tieren ein Befall mit Ascariden auf. Daher wurden bis zum Versuchsende für die Kohorten regelmäßig die Käfige und Laborflächen mit Neopredisan® 4% (Menno Chemie-Vertrieb GmbH, Norderstedt) desinfiziert.

3.1.2 Einteilung der Versuchsgruppen und Versuchsablauf

Die Tiere wurden gleichmäßig in die Behandlungs- und Kontrollgruppen randomisiert (Tab. 2). Es standen uns 34 männliche und 51 weibliche PCK-Ratten zur Verfügung. Bei den (kommerziell verfügbaren) SD-Ratten wurde mit einem Geschlechterverhältnis von 1:1 gearbeitet.

Tabelle 2: Einteilung der Versuchsgruppen

t [w]	PCK-Ratten				SD-Ratten			
	Sirolimus		Kontrolle		Sirolimus		Kontrolle	
	m	w	m	w	m	w	m	w
4	5	9	5	8	6	6	6	6
8	6	10	6	6	6	6	6	6
12	6	10	6	8	6	6	6	6

Der Versuchsablauf ist in Abb. 8 schematisch wiedergegeben.

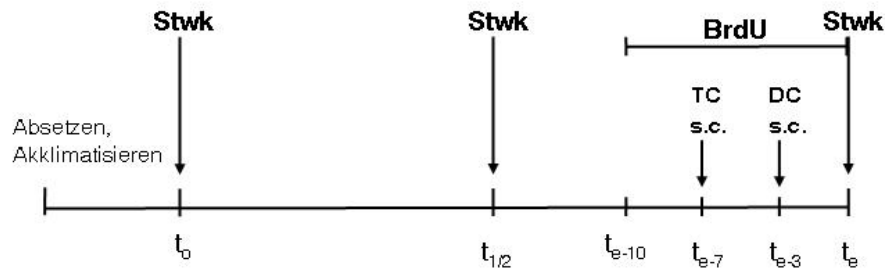


Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

(Stwk, Stoffwechsellage; t_0 , Versuchsbeginn; $t_{1/2}$, Hälfte der Versuchszeit; t_e , Ende der Versuchszeit; $t_{e-3}/t_{e-7}/t_{e-10}$, drei /sieben/zehn Tage vor Versuchsende; TC, Tetrazyklin; DC, Demeclozyklin; BrdU, Bromdeoxyuridin)

Eine Woche nach Randomisierung wurden die Tiere zur Gewinnung von Sammelurin und Bestimmung der individuellen Trinkmenge für 24 Stunden in einen Stoffwechsellage (Stwk, Techniplast S.p.A., Buguggiate, Italien) gesetzt. Anschließend erfolgten eine Blutentnahme und die Messung der Körperlänge. Dieser Vorgang wurde nach Ablauf der halben Beobachtungszeit und am Ende der Versuchszeit wiederholt.

Nach der Hälfte der Versuchszeit wurde bei allen Tieren der Blutdruck gemessen. Am Versuchsende wurden die Tiere in tiefer Allgemeinanästhesie (Ketamin 100 mg/kg KG und Xylazin 10 mg/kg KG) exsanguiniert.

3.1.3 Medikation der Versuchstiere

Sirolimus

Die Medikation der Therapiegruppe mit Sirolimus (Rapamune® Trinklösung; 1 mg/ml, Wyeth Pharma GmbH, Münster) erfolgte gewichtsadaptiert (2 mg/kg KG/d) mit dem Trink-

wasser. Da wegen der Lichtempfindlichkeit von Sirolimus mit schwarzen Trinkflaschen (Techniplast S.p.A., Buguggiate, Italien) gearbeitet wurde, wurden diese täglich gewogen, die Dosis richtete sich nach der Trinkmenge pro Tag und Zweierkäfig. Die Sirolimusspiegel im EDTA-Blut wurden nach der Hälfte und am Ende der Versuchszeit (HPLC-Massenspektroskopie) bestimmt.

Bromdeoxyuridin

Für die Markierung proliferierender Zellen wurden dem Trinkwasser bzw. der Rapamycinlösung sämtlicher Versuchstiere während der letzten zehn Tage der Therapie bzw. des Beobachtungszeitraums Bromdeoxyuridin (BrdU, 1 g/l) sowie zur geschmacklichen Überdeckung Glucose (50 g/l) zugesetzt.

Tetrazyklin/Demeclozyklin

Sieben und drei Tage vor Versuchsende erfolgte eine Markierung mit Tetrazyklin (30 mg/kg KG s.c.) bzw. Demeclozyklin (25mg/kg KG s.c.), um in weiteren Studien histomorphometrische Knochenanalysen zu ermöglichen.

3.1.4 Methoden im Tierversuch

Blutentnahme

Zur Blutentnahme wurden die Schwanzvenen der Ratten in Ätherkurznarkose mit einer heparinisierten Kanüle punktiert. Abhängig vom Alter des Tieres wurden 400-800 µl Blut entnommen und in EDTA-beschichtete Röhrchen überführt.

Blutdruckmessung und Messung der Herzfrequenz

Die Messungen erfolgten mit einem Blutdruckmessgerät (TSE Systems GmbH, Bad Homburg). Bei jedem Tier erfolgten 15 Messungen an drei aufeinander folgenden Tagen.

Die Ratten wurden in Restrainern fixiert und etwa 30 min in einem Wärmekabinett (37°C) auf die Messung vorbereitet, da für die zuverlässige Messung der Pulswelle eine temperaturinduzierte Dilatation der Schwanzarterie erforderlich ist. Eine aufblasbare Blutdruckmanschette sowie ein Pulssensor wurden am Schwanz der Tiere angelegt. Die Manschette ist über einen Schlauch mit dem Druckgenerator verbunden und wird für die Messung computergesteuert aufgepumpt. Während der anschließenden schrittweisen Reduktion des Manschetten-drucks werden das Pulssignal und die Verlaufskurve der maximalen Pulssignalamplitude registriert.

Organasservierung

Nach medianer Laparotomie/Thorakotomie des tief narkotisierten Tieres wurden der rechte Ventrikel punktiert und eine Exsanguination vorgenommen. Gallengang und Blase wurden zur Gewinnung von Galle und Urin punktiert. Anschließend wurden Herz, Leber, Nieren, Lunge und Milz entnommen, gewogen und die Länge der linken Niere mit einer Schieblehre ermittelt. Auch die Geschlechtsorgane, Aorta, Augen sowie Teile des Pankreas wurden asserviert. Um eine Vergleichbarkeit der Präparate zu gewährleisten, wurden die Organe einheit-

lich dissektioniert und für die Paraffineinbettung in 4% Formaldehyd, für die Kryokonservierung in Kryoröhrchen und flüssigen Stickstoff überführt. Für weiterführende Untersuchungen an den Wachstumsfugen wurden beide Tibiae und Femora präpariert und zur Entwässerung in 70% Ethanol gegeben. In gleicher Weise wurden die Ossa temporalia konserviert.

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

AppliChem GmbH, D-64291 Darmstadt

Triton X 100, 5-Brom-2-deoxyuridin

Dako Chemikalien, D-22769 Hamburg

Antikörper gegen 5-Brom-2-deoxyuridin, DAB-Tabletten für die Immunhistochemie

Dianova, D-20354 Hamburg

Sekundäre Peroxidase-konjugierte Antikörper mit minimaler Kreuzreaktion gegen Rattenproteine

Rolf Greiner/Diasys BioChemica GmbH, D-65558 Flacht

Kits für die Bestimmung von Phosphat, Kreatinin, Harnstoff, Calcium, ALAT, ASAT, Bilirubin (konjugiert und gesamt) und Gallensäuren in Serum bzw. Urin

TruLab N und TruLab P-Kontrollseren für die klinische Chemie

TruLab Kalibrator für die klinische Chemie

Greiner Bio One, D-45326 Essen

Mikrotiterplatten

Menzel GmbH Co.KG, D-38116 Braunschweig

Objektträger Superfrost Plus und Deckgläschen

Merck KGaA, D-64271 Darmstadt

Mayers Hämalan (gebrauchsfertig), Molybdätophosphorsäure-Hydrat, Orange G, Säurefuchsin, Weigerts Eisenhämatoxylin,

Eindeckmittel: Aquatex und Entellan

Carl Roth GmbH Co. KG, D-76185 Karlsruhe

Eosin G (0,5%)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89555 Steinheim

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

Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

Pferdeserum und Ziegenserum als Blockiermedium für die Immunhistochemie

Avidin-Biotin-Komplex-Reagenz

Avidin-Biotin-Blockierkit

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).

Puffer

Citratpuffer:

0,1 M Citronensäure-Monohydrat und 0,1 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat
gegeneinander bis pH 6,0 titriert

Tris Buffered Saline (TBS, 5x Stammlösung):

0,1 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) und 1,5 M NaCl; mit HCl auf pH 7,4
eingestellt

Entwicklungspuffer für die Färbung mit peroxidasekonjugierten Antikörpern:

20 ml TBS (1x); 10 mg DAB; 6,4 µl H₂O₂ (30%)

Phosphate buffered saline (PBS) nach Gibco (ohne Ca², ohne Mg²):

2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 138 mM NaCl; 8 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O.

Der Puffer wurde gebrauchsfertig von der Firma PAA (Pasching, Österreich) bezogen.

Waschlösungen für die Histologie bzw. Immunhistochemie:

PBS (1x)

PBS (1x) + Triton X 100 (0,02%), (v/v)

Essigsäure (1%)

Medikamente

Ketamin

Hoechst GmbH, D-65926 Frankfurt a.M.

Sirolimus

Wyeth Pharmaceuticals AG, CH-6301 Zug

Xylazin

Bayer Schering Pharma AG, D-13353 Berlin

3.2.2 Antikörper

Die für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Antikörper

Antigen	Ursprung	Firma und Katalog-Nr.	Spezifität	Verdünnung	Anwendung
p-Akt 1/2/3	Kaninchen (polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology sc-16646-R	Thr308P	1:800	Niere
p-mTOR	Kaninchen (polyklonal)	Abcam ab 51044	Ser2448P	1:250	Niere
p70S6 Kinase	Ziege (polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology sc-11759	Thr389P	1:40	Niere
BrdU	Maus (monoklonal)	Dako Cytomation M 0744	in DNA eingebautes BrdU	1:50	Leber

3.2.3 Geräte

Die Mikroskopie erfolgte an einem DMI 4000-Mikroskop mit digitalen Farb- und Schwarzweiß-Kameras (DFC 320 R2 und DFC 350 Fx) und korrespondierender Software für Bildaufnahmen und -analysen (Leica Application Suite, LAS-AF, QWin; alle Leica, Wetzlar). Für photometrische Bestimmungen diente der Tecan-Reader Infinite M200 und korrespondierender Software (Tecan, Crailsheim).

3.3 Methoden

3.3.1 Histologische Untersuchungen

Vor allen histologischen und immunhistologischen Färbungen wurden die Präparate in Xylol entparaffiniert (2 x 15 min), in einer absteigender Alkoholreihe (100%, 96% je 10 min; 80%, 70% je 5 min) rehydratisiert und anschließend für 5 min in A. dest gestellt.

3.3.1.1 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Diese trichromatische Färbung wird zur selektiven Darstellung von kollagenem Bindegewebe (grün), Muskulatur (blassrot), Zellkernen (schwarzbraun), Erythrozyten (orangerot) und Zytoplasma (rot) genutzt. Sie beruht auf der simultanen und sukzedanen Anwendung disperser Farbstoffe. Für die Färbung werden neben Weigerts Eisenhämatoxylin und der Massonlösung drei Färbebäder benötigt.

Massonlösung

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

Lösung B: 2 g Ponceau de Xylidine ad 200 ml A. dest., 2 ml konz. Essigsäure

1 Teil Lösung A + 2 Teile Lösung B

Färbebäder

- 1.) Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin-Lösung (250 ml Ansatz)
25 ml Masson-Lösung
5 ml Azophloxin-Lösung
(0,5 mg Azophloxin ad 100 ml A. dest. + 2 ml konz. Essigsäure)
220 ml 0,2%ige Essigsäure

- 2.) Phosphomolybdän / Orange G-Färbelösung
6 g Phosphomolybdänsäure ad 100 ml A. dest.
4 g Orange G ad 100 ml A. dest.

- 3.) Lichtgrün-Färbelösung
0,25 g Lichtgrün ad 250 ml 0,2%ige Essigsäure

Protokoll

1. Weigerts Eisenhämatoxylin (4 min)
2. Spülen in fließendem Wasser (5 min)
3. Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin (4 min)
4. Spülen in 1% Essigsäure (2 Färbeküvetten)
5. Phosphomolybdänsäure / Orange G (ca. 6 min)
6. Spülen in 1% Essigsäure (2 Färbeküvetten)
7. Lichtgrün (20 min)
8. Spülen in 1% Essigsäure (in der 2. Färbeküvette 5 min stehen lassen)
9. Rasch entwässern in aufsteigender Alkoholreihe
10. Trocknen der Präparate zwischen Filterpapier
11. Entwässern mit Xylol (5 min) und Eindecken mit Entellan (Abzug)

3.3.1.2 Pikrosirius Rot-Färbung

Kollagene (z.B. retikuläre Fasern oder Basallaminae) werden als rote Strukturen vor gelblichem Hintergrund in einer Genauigkeit dargestellt, die durch Masson Goldner, Azan-Mallory, Heidenhain oder Van Gieson nicht erreicht werden kann. Die gefärbten Präparate können sowohl in Durchlicht- als auch durch Polarisations- oder Fluoreszenzmikroskopie beurteilt werden.

Pikrosirius-Rot-Färbelösung

0,5 g Direkt Rot 80 und einige Pikrinsäurekristalle ad 500 ml gesättigte, wässrige Pikrinsäurelösung

Protokoll

1. Weigerts Hämatoxylin (8 min)
2. Spülen in fließendem Leitungswasser (10 min)
3. Pikrosirius Rot (60 min)
4. Spülen in 1% Essigsäure (2 Färbeküvetten)
5. Dehydrieren in 100% Ethanol (3 Färbeküvetten)
6. Trocknen der Präparate zwischen Filterpapier
7. Entwässern in Xylol (5 min) und Eindecken mit Entellan (Abzug)

3.3.1.3 Bestimmung der Zystenfläche in Niere und Leber

Zur Bestimmung der Zystenfläche wurden Dünnschnitte ($\sim 4 \mu\text{m}$) der formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Nieren und Lebern der PCK-Ratten nach der Masson-Goldner-Trichrom-Methode gefärbt. Das gesamte Präparat wurde bei 100facher Vergrößerung aufgenommen (LAS-AF, Mosaik-Aufnahmen) und analysiert (QWin Image Analysis). Mit diesem Programm kann der Anteil der Zysten („weiße“ Fläche) relativ zur Präparatefläche halbautomatisch ermittelt werden. Die Mindest- und Maximalgröße sowie die Farbe der zu detektierenden Flächen wurden für alle Präparate beibehalten. Bei transversalen Nierenschnitten wurde die gesamte Fläche abzüglich des umgebenden Binde- und Fettgewebes, bei Leberschnitten eine Fläche von durchschnittlich 60 mm^2 analysiert. Gefäßlumina, Nierenbecken und Artefakte, die im Präparat zwar denselben Farbwert, aber andere Flächencharakteristika als die Zysten hatten, wurden vor der Übernahme der Messergebnisse ausgeschlossen.

3.3.1.4 Bestimmung der Fibrosefläche in Niere und Leber

Der Kollagenanteil fibrotischer Areale in Niere und Leber der PCK-Ratten wurde mithilfe der Pikrosirius Rot-Färbung erfasst (Abb. 9). Die Beurteilung der Präparate erfolgte nach Anregung der intrinsischen Hintergrundfluoreszenz mit UV-Licht (Anregungsfilter 355 - 425 nm, Sperrfilter 470 nm). Bei 100facher Vergrößerung wurden pro Präparat in der Leber je vier Mosaikaufnahmen aus sechs zusammenhängenden Gesichtsfeldern ($4 \times 4,8 \text{ mm}^2 = 19,2 \text{ mm}^2$), in der Niere vier nicht zusammenhängende Gesichtsfelder ($4 \times 0,8 \text{ mm}^2 = 3,2 \text{ mm}^2$) erstellt. Der prozentuale Anteil der Fibrosefläche an der Gesamtfläche wurde wie oben beschrieben bestimmt.

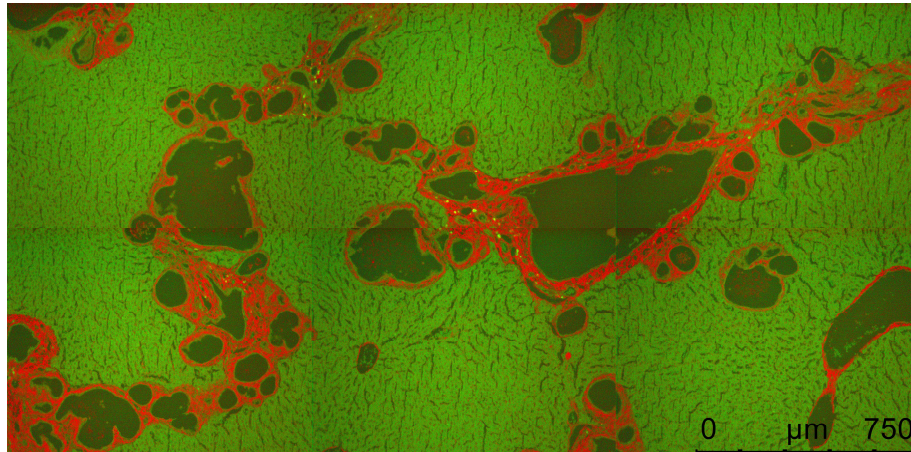


Abb. 9: Mosaik-Fluoreszenzaufnahme eines PCK-Rattenleberpräparates

Mit Pikrosirius Rot angefärbte fibrotische Areale demarkieren sich rot vor grünem Hintergrund (100x).

3.3.2 Immunhistochemische Untersuchungen

Die Formalinfixierung führt zur teilweise reversiblen Quervernetzung von Proteinen und entsprechenden Konformationsänderungen. In der Regel werden solche modifizierten Proteine nicht oder nur noch schwach von Antikörpern, die gegen das native Protein induziert wurden, erkannt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper erforderten eine Antigendemaskierung mit 0,1 M Citratpuffer (pH 6,0) und Wärmebehandlung in der Mikrowelle.

Endogenes Biotin wurde mithilfe eines Avidin/Biotin-Blockierkits blockiert.

Die Detektion der Primärantikörper erfolgte unter Verwendung geeigneter biotinkonjugierter Zweitantikörper, die zur Reduktion unspezifischer Färbungen minimale Kreuzreaktionen mit Rattenproteinen aufwiesen. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper und zur Signalverstärkung diente ein mit Meerrettich-Peroxidase (POD) konjugierter Avidin-Biotin-Komplex (Vector Laboratories, Inc.; Burlingame, USA), als Substrat für POD wurde DAB eingesetzt (bräunliche Färbung).

Zur Qualitätssicherung wurden sowohl Negativkontrollen (Erstantikörper durch Blockierserum ersetzt) als auch Positivkontrollen (gesicherte Expression der nachzuweisenden Antigene, in allen Fällen humane Niere von Patienten mit gesicherter ARPKD) mitgeführt.

Die Präparate wurden von zwei unabhängigen Betrachtern beurteilt. Die Beurteilung der Färbungen wurde dokumentiert und für eine statistische Auswertung kodiert. Bei unterschiedlicher Bewertung wurden die Präparate diskutiert und ein Konsens herbeigeführt.

Protokoll

1. Blockieren der endogenen Peroxidase in 1% H₂O₂ (20 min)
2. Aqua dest. (5 min)
3. Antigendemaskierung mit Citratpuffer (Mikrowelle, 3 x 6 min, dazwischen jeweils 5 min Pause)
4. Abkühlen (10 min)
5. Spülen in PBS (5 min)
6. Umranden der Präparate auf dem Objektträger mit Fettstift
7. Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit 5% Pferde- bzw. Ziegenserum pro 1 ml werden vier Tropfen Avidin zugesetzt (40 min)
8. Inkubation mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung bei 4°C über Nacht in feuchter Kammer (Ansatz in 5% Blockierserum, vier Tropfen Biotin pro ml)
9. Spülen in PBS + 0,02% Triton-X 100 (5 min), in PBS (5 min)
10. Inkubation mit geeignet verdünntem, biotinkonjugiertem Sekundärantikörper (Ansatz in Blockierserum, 45 min bei Raumtemperatur (RT))
11. Spülen in PBS + 0,02% Triton-X 100 (5 min), in PBS (5 min)
12. Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex (30 min RT)
13. Spülen in PBS + 0,02% Triton-X 100 (5 min), in PBS (5 min)
14. Inkubation mit dem Substrat (DAB 10 mg/20 ml TBS + 6,4 µl H₂O₂; 3 min)
15. Spülen in PBS (5 min)
16. Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun (1 min)
17. Spülen unter fließendem Leitungswasser (3 min), Bläuen (10 min)
18. Eindecken mit Aquatex

Auswertung der Präparate

Nachweis von p-Akt, p-mTOR und p70S6K

Bei der Beurteilung der Nierenpräparate von PCK-Ratten wurde zwischen erhaltenem Parenchym, Regionen mit beginnender Zystenentwicklung und Zystenepithel unterschieden. Die Intensität der spezifischen Färbereaktion in diesen Regionen wurde mit einem Score von null bis drei Punkten bewertet. In den Nierenpräparaten der SD-Ratten wurde ausschließlich das Parenchym bewertet.

Nachweis von BrdU

Für die Beurteilung der BrdU-spezifischen Färbung wurden je Leberpräparat bei 100facher Vergrößerung vier unabhängige Gesichtsfelder digital fotografiert und die mittlere Zahl der BrdU-positiven Zellkerne pro Gesichtsfeld ermittelt (QWin; Abb. 10). Die Gesamtzahl der Zellkerne pro Gesichtsfeld betrug durchschnittlich etwa 3.200.

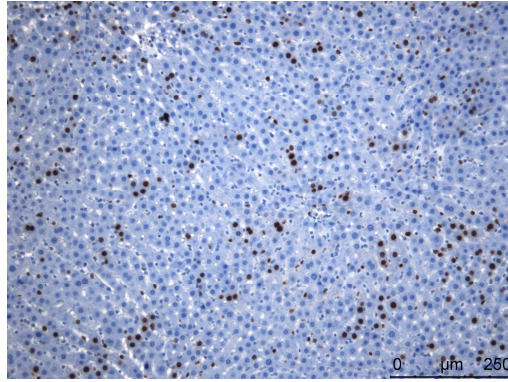


Abb. 10: Immunhistochemische Markierung BrdU-positiver Zellkerne im Leberpräparat einer PCK-Ratte (200x)

3.3.3 Klinische Chemie

Die quantitative Bestimmung von Gesamteiweiß, Phosphat, Calcium, Kreatinin, Harnstoff, ALAT, ASAT, Bilirubin (konjugiert/gesamt) und Gallensäuren erfolgte mit photometrischen und enzymatischen Tests, die üblicherweise in der klinischen Chemie verwendet werden. Diese Tests wurden manuell durchgeführt und waren zuvor an das Mikrotiterplattenformat angepasst worden. Bei jeder Probenreihe wurden geeignete Kontrollseren und ein Standard mitgeführt. Die Werte für unkonjugiertes Bilirubin wurden als Differenz von Gesamtbilirubin und konjugiertem Bilirubin bestimmt.

3.3.4 Statistik

Die statistischen Berechnungen (Gruppenvergleiche) wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. G. Kundt, Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung, Universitätsklinikum Rostock, mit dem Programm SPSS, Version 15.0, durchgeführt. Der Vergleich der Parameter erfolgte zwischen gleichgeschlechtlichen Gruppen mit jeweils gleicher Versuchszeit (vier, acht oder zwölf Wochen). Die Normalverteilung der Werte innerhalb der Gruppen wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest, die Varianzhomogenität mit dem Levene-Test geprüft. Gruppenvergleiche (Mittelwerte mit Standardabweichung) wurden mit dem Fisher-exact-Test bzw. mit dem t-Test durchgeführt, bei $p < 0,05$ wurden Unterschiede als signifikant angesehen.

4 Resultate

4.1 Allgemeine Beschreibung des Tierversuchs

Im Vergleich zu den SD-Ratten wirkten die PCK-Ratten kränklich und apathisch, waren häufig verlangsamt oder hatten Gleichgewichtsstörungen. Ihr Fell erschien im Vergleich zu den SD-Ratten schütterer, struppiger und fiel bei Reibung schnell aus. An Pfoten und Nasen der PCK-Ratten zeigten sich häufig kleine Wunden mit Blutaustritt. Die Größenunterschiede bei gleichgeschlechtlichen, vor allem männlichen Wurfgeschwistern waren bei den PCK-Ratten sehr ausgeprägt, häufig fanden sich in einem Wurf gut entwickelte neben dystrophen männlichen PCK-Ratten. Die perinatale Sterblichkeit war bei den PCK-Ratten relativ hoch, die Größe der Würfe variierte recht stark (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zahl der Wurfgeschwister und perinataler Todesfälle bei PCK-Ratten

Wurfnr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Weibchen	3	7	4	2	9	4	6	5	3	8
Männchen	2	3	4	2	4	4	6	4	3	2
Todesfälle	5	3	0	0	0	0	0	0	0	1
Gesamt	10	13	8	4	13	8	12	9	6	11

Bei den PCK-Ratten hatten vier von 85 Tieren nur ein Auge (Abb. 11).



Abb. 11: PCK-Ratte mit kongenitalem Augendefekt

Eine SD-Ratte musste vor Versuchsbeginn getötet werden, da sie sich im Käfig eine schwere Verletzung am Hinterbein zugezogen hatte, eine SD-Ratte verstarb während der Anästhesie zur ersten Blutentnahme.

Während alle SD- und PCK-Ratten aus den Kontrollgruppen überlebten, verstarben in der Therapiegruppe im Laufe des Versuchs drei männliche (nach zwei-, drei- und sechswöchiger

Versuchszeit) und zwei weibliche PCK-Ratten (nach sechswöchiger Versuchszeit). In allen fünf Fällen waren die Tiere zwei bis drei Tage vor ihrem Tod durch Stagnation des Gewichts oder Gewichtsverlust, fehlende Fellpflege („struppiges“ Aussehen) und zunehmende Apathie aufgefallen. Diese unspezifischen Veränderungen als Ausdruck des „Unwohlseins“ waren im Laufe der Versuchszeit auch bei anderen Individuen eine häufige und in der Regel transiente Erscheinung und rechtfertigten daher nicht, die betroffenen Tiere vorzeitig aus dem Versuch zu nehmen.

4.2 Natürliche Entwicklung und Organfunktion und Auswirkungen von Sirolimus

4.2.1 Entwicklung von Körpergewicht und Längenwachstum

Die PCK-Ratten waren zwar bei Versuchsbeginn zwei bis drei Wochen älter und damit größer und schwerer als die SD-Ratten, aber spätestens nach acht Wochen Beobachtungs- bzw. Behandlungszeit kehrten sich die Verhältnisse trotz vergleichbarer Futteraufnahme um (Abb. 12). Während eine SD-Ratte innerhalb von 28 Tagen etwa 180 g (männliche Ratten) bzw. 100 g (weibliche Ratten) zunimmt, ist die Gewichtszunahme bei den PCK-Ratten mit 150 g bzw. 60 g deutlich geringer. Bei den ausgewachsenen Tieren treten diese Unterschiede noch deutlicher zutage. Parallel zu dem geringen Gewicht sind PCK-Ratten auch kleiner.

Eine Tendenz zu einem verringerten Längenwachstum unter Sirolimus ist vor allem bei den PCK-Ratten zu verzeichnen.

4.2.2 Makroskopische Beurteilung der inneren Organe

4.2.2.1 Veränderungen an Herz, Milz und Lunge

Das relative Milz- wie auch das relative Herzgewicht nehmen mit der Zeit ab, sind bei den PCK-Ratten etwas höher als bei SD-Ratten und bleiben von der Sirolimustherapie unbeeinträchtigt. Das relative Lungengewicht ist bei nahezu allen mit Sirolimus behandelten Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen erhöht (Abb.13).

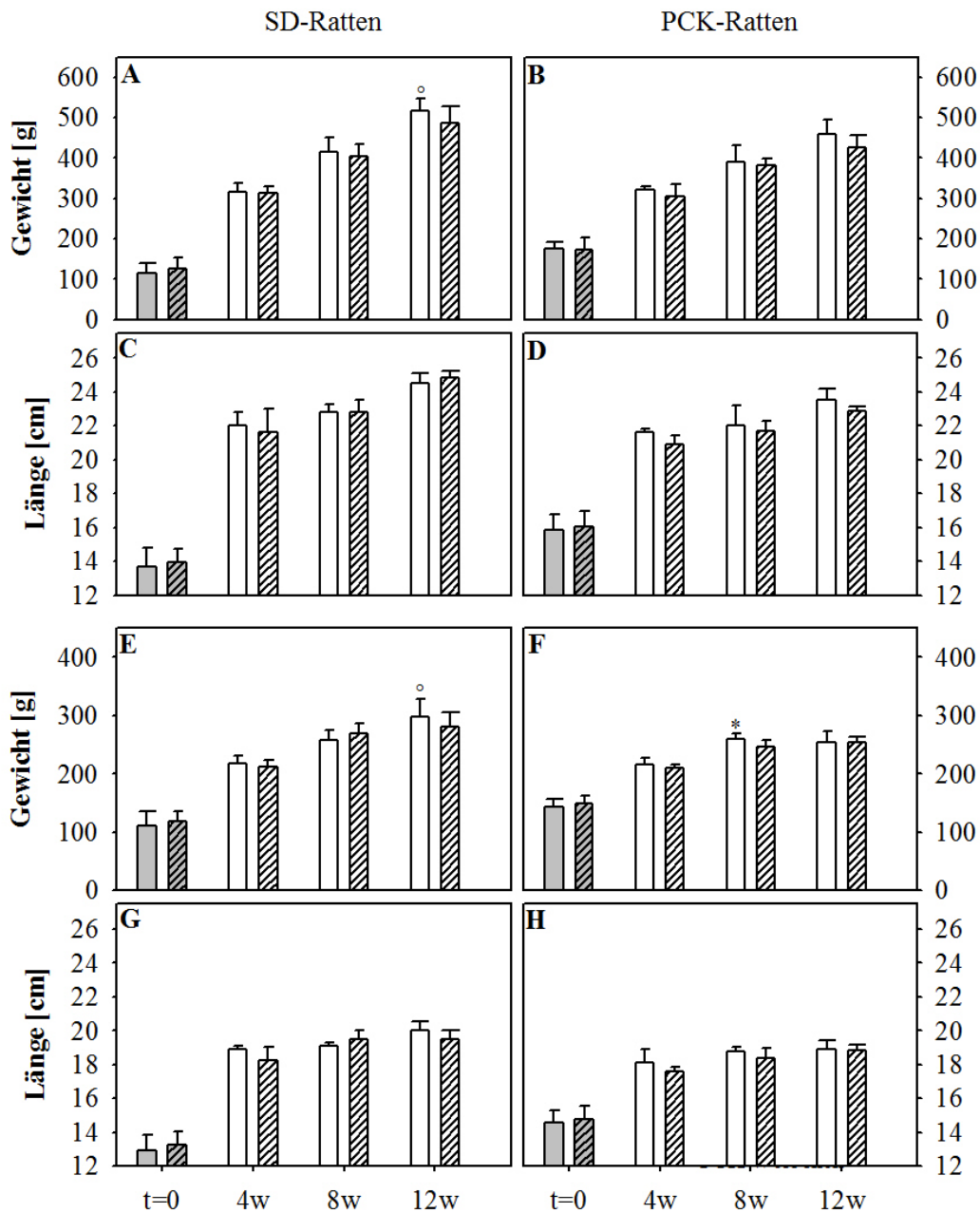





Abb. 12: Mittlere Körperlängen und -Gewichte der Tiere bei Versuchsende

Mittlere Körpergewichte und -Längen männlicher (A-D) und weiblicher (E-H) SD- und PCK-Ratten bei Versuchsbeginn  bzw. nach vier-, acht- und zwölfwöchiger Versuchszeit als Kontrolltier  oder unter Therapie mit Sirolimus  . * $p < 0,05$ Sirolimus vs. Kontrolle, ° $p < 0,05$ PCK vs. SD

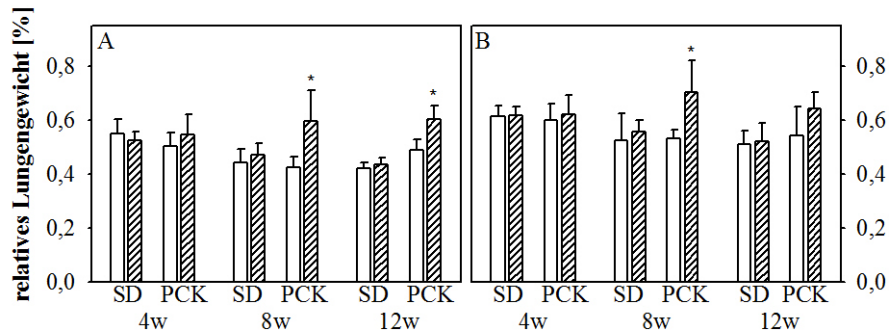




Abb. 13: Mittleres relatives Lungengewicht bei Versuchsende

Auf das Körpergewicht bezogenes mittleres Lungengewicht männlicher (A) und weiblicher (B) SD- und PCK-Ratten nach vier-, acht- und zwölfwöchiger Versuchszeit als Kontrolltier  oder unter Therapie mit Sirolimus  ; * $p < 0,05$ Sirolimus vs. Kontrolle.

4.2.2.2 Veränderungen an Niere und Leber

Gestalt und Größe der Nieren waren bei den SD-Ratten gleichförmig. Es zeigten sich glatt strukturierte, kompakte Organe mit homogen dunkelrotem Parenchym und weißlicher Papille. Bei den PCK-Ratten waren die phänotypischen Merkmale interindividuell sehr heterogen ausgeprägt. Die Nieren waren deutlich voluminöser und teilweise bräunlich-gelblich gefärbt. Auf ihrer Oberfläche fanden sich bis zu 1 mm große Zysten; im Schnittbild zeigten sich Hohlräume unterschiedlicher Größe, die sich vorrangig um die Papille gruppierten (Abb. 14).

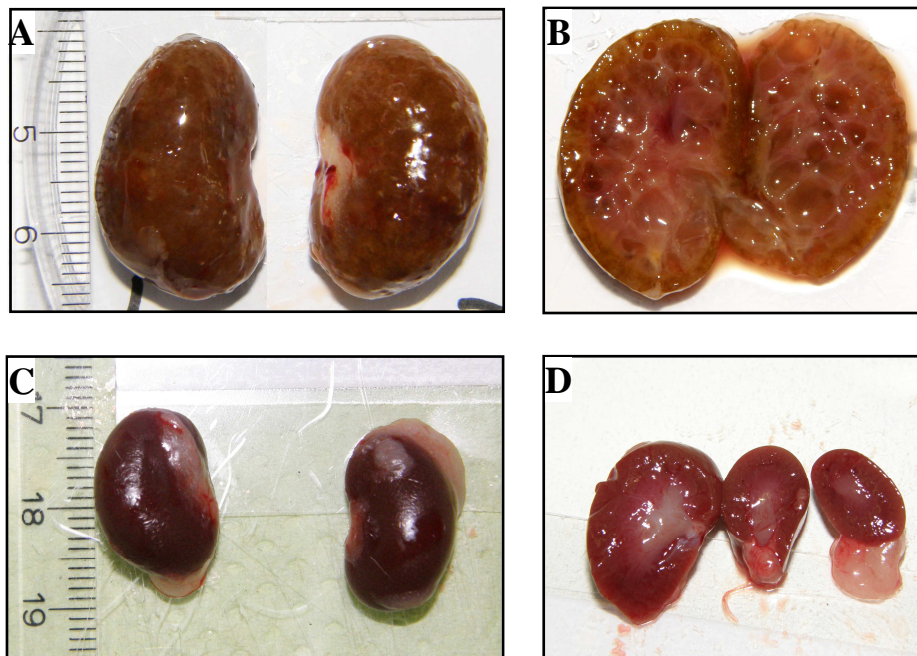


Abb. 14: Makroskopische Aspekte der Nieren von PCK- und SD-Ratten

Die Nieren einer ausgewachsenen weiblichen PCK-Ratte (A, B) und einer gesunden, ausgewachsenen SD-Ratte (C, D), die zwölf Wochen als Kontrolltiere im Versuch waren.

Diese Unterschiede spiegeln sich auch im relativen Nierengewicht wider (Abb. 15). Sirolimus hat bei PCK-Ratten nur einen geringen Einfluss auf diesen Parameter.

Spätestens nach achtwöchiger Versuchszeit ist die relative Nierenlänge bei den PCK-Ratten, unabhängig von einer Behandlung mit Sirolimus, signifikant größer als bei den SD-Ratten. Die Sirolimustherapie führt bei den männlichen PCK-Ratten nach zwölf Wochen zu einer signifikanten Regression der relativen Nierenlänge, während sich bei den weiblichen PCK-Ratten unter Therapie keine regelhaften Änderungen dieses Parameters ergeben. Auch bei den therapierten SD-Ratten zeigt sich eine leichte Tendenz zur Rückläufigkeit der relativen Nierenlänge (Abb. 16).

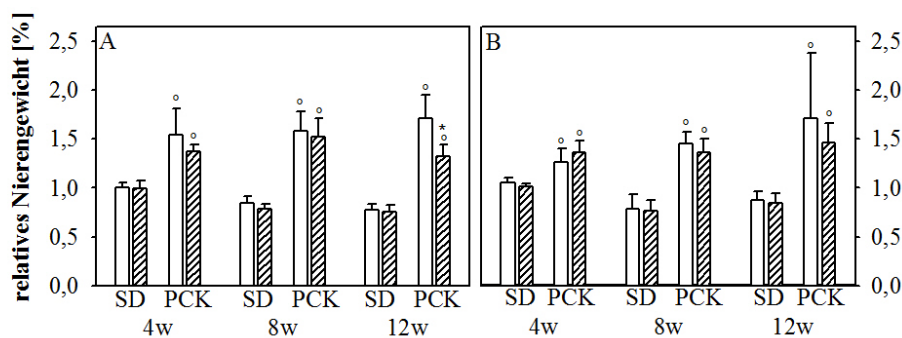


Abb. 15: Mittleres relatives Nierengewicht bei Versuchsende

Auf das Körpergewicht bezogenes mittleres Nierengewicht männlicher (A) und weiblicher (B) SD- und PCK-Ratten nach vier-, acht- und zwölfwöchiger Versuchszeit als Kontrolltier oder unter Therapie mit Sirolimus ; ° p < 0,05 PCK vs. SD.

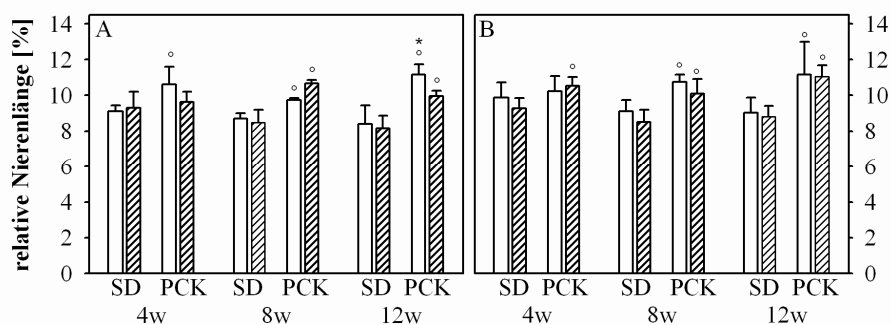


Abb. 16: Mittlere relative Nierenlänge bei Versuchsende

Auf die Körperlänge bezogene mittlere Nierenlänge männlicher (A) und weiblicher (B) SD- und PCK-Ratten nach vier-, acht- und zwölfwöchiger Versuchszeit als Kontrolltier oder unter Therapie mit Sirolimus ; * p < 0,05 Sirolimus vs. Kontrolle, ° p < 0,05 PCK vs. SD.

Die Lebern der SD-Ratten unterschieden sich mit ihrer glatten, fein strukturierten und homogen dunkelrot gefärbten Oberfläche nicht wesentlich untereinander. Bei den PCK-Ratten variierte die makroskopische Erscheinung stark, es zeigten sich vergrößerte, verhärtete Lebern mit scheckigen, granulierten Oberflächen, auf denen zum Teil kleinste Zysten zu sehen waren (Abb. 17).

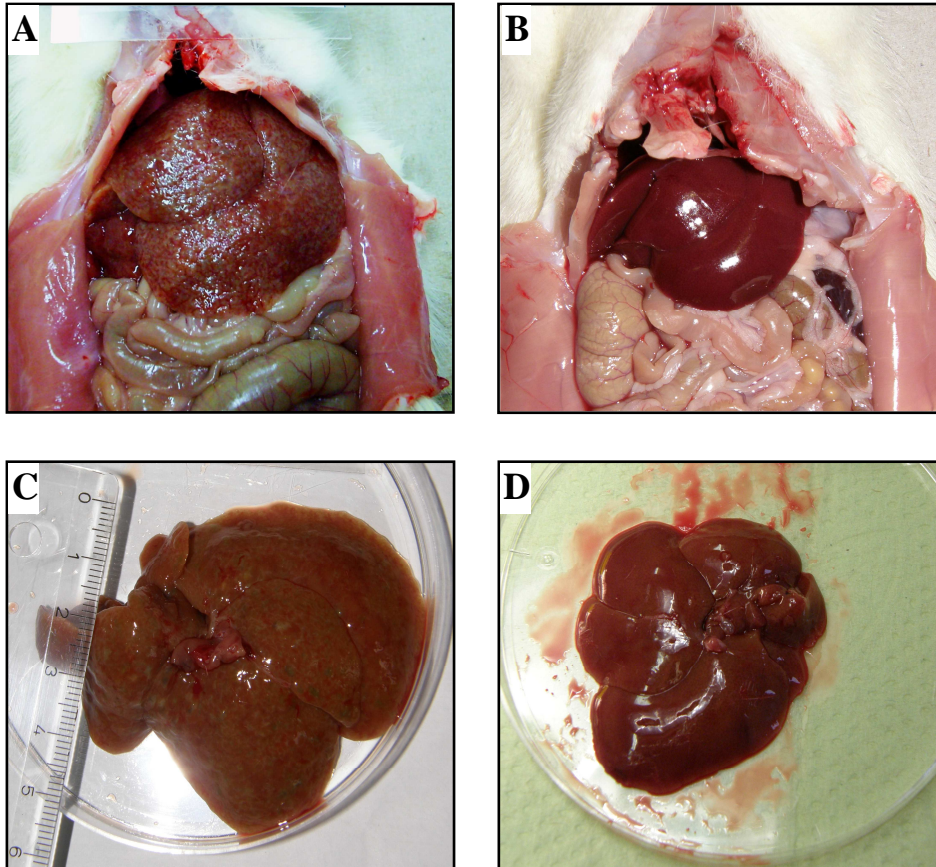


Abb. 17: Makroskopischer Aspekt der Lebern von PCK- und SD-Ratten

Größenverhältnisse der Leber einer PCK-Ratte (A, C) bzw. einer gesunden SD-Ratten (B, D) in situ (A, B) und nach Organasservation (C, D). Im Vergleich zur SD-Ratte ragt die Leber bei der PCK-Ratte deutlich weiter nach kaudal und weist eine granuliert, zystische Oberfläche auf.

Das relative Lebergewicht der PCK-Ratten ist signifikant höher als das der SD-Ratten, die Sirolimusbehandlung führte bei beiden Spezies nicht zu einer Regression (Abb. 18).

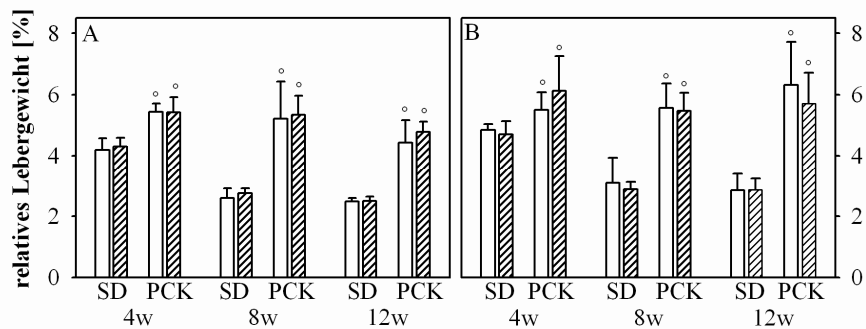


Abb. 18: Mittleres relatives Lebergewicht bei Versuchsende

Auf das Körpergewicht bezogenes Lebergewicht männlicher (A) und weiblicher (B) SD- und PCK-Ratten nach vier-, acht- und zwölfwöchiger Versuchszeit als Kontrolltier □ oder unter Therapie mit Sirolimus ▨; ° $p < 0,05$ PCK vs. SD.

4.2.3 Auswirkungen auf den Blutdruck

Der mittlere (gemittelte diastolische zu systolische) Blutdruck ist bei den PCK-Ratten höher als bei den SD-Ratten und ändert sich mit zunehmendem Alter der Tiere kaum. Bei den SD-Ratten nimmt der Blutdruck mit der Zeit leicht zu. Sowohl bei PCK- als auch bei SD-Ratten finden sich nur geringfügige Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Eindeutige Auswirkungen von Sirolimus auf den Blutdruck lassen sich nicht erkennen (Abb. 19).

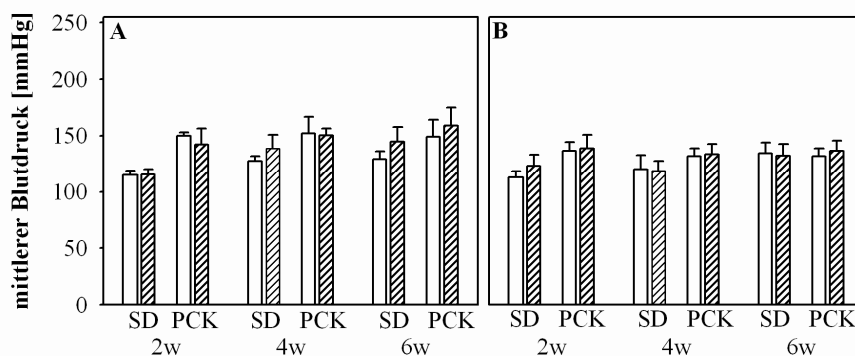


Abb. 19: Mittlerer Blutdruck nach Ablauf der halben Versuchszeit

Mittlerer Blutdruck bei männlichen (A) und weiblichen (B) SD- und PCK-Ratten nach zwei-, vier- und sechswöchiger Versuchszeit als Kontrolltier □ oder unter Behandlung mit Sirolimus ▨.

4.2.4 Surrogatmarker für Nieren- und Leberfunktion in Serum und Urin

Einen Überblick der Serumwerte für Kreatinin, Harnstoff, Calcium, Phosphat und Gesamteiweiß geben die Tabellen 5a und b. Gemessen an Serumkreatinin und -Harnstoff ist die Nierenfunktion der PCK-Ratten mit der der SD-Ratten vergleichbar. Die Behandlung mit Sirolimus führte bei beiden Spezies zu keiner signifikanten Änderung dieser Parameter.

Tabelle 5a: Serumwerte männlicher Ratten

t [w]	T	n	Kreatinin [mg/dl]	Harnstoff [mg/dl]	Calcium [mmol/l]	Phosphat [mmol/l]	Ges.-Eiweiß [mg/dl]
0	PCK	31	0,24 ± 0,11	24,7 ± 9,7	2,50 ± 0,34	2,25 ± 0,39	42,3 ± 7,1
	SD	36	0,15 ± 0,05	23,6 ± 8,3	2,47 ± 0,22	2,77 ± 0,68	45,3 ± 6,6
2	PCK	- 5	0,26 ± 0,02	23,2 ± 3,4	2,52 ± 0,11	2,64 ± 0,43	41,5 ± 9,1
		+ 5	0,16 ± 0,10	29,5 ± 10,8	2,67 ± 0,41	2,47 ± 0,58	44,2 ± 5,6
	SD	- 6	0,19 ± 0,10	30,6 ± 10,8	2,84 ± 0,13	2,39 ± 0,15	44,6 ± 6,7
		+ 6	0,31 ± 0,17	25,0 ± 3,7	3,01 ± 0,30	2,41 ± 0,66	38,9 ± 3,7
4	PCK	- 11	0,20 ± 0,04	32,2 ± 8,1	2,58 ± 0,22	2,00 ± 0,42	44,8 ± 7,4
		+ 10	0,23 ± 0,07	28,3 ± 8,3	2,49 ± 0,18	2,18 ± 0,84	45,4 ± 10,4
	SD	- 12	0,21 ± 0,07	37,6 ± 9,6	2,58 ± 0,27	2,66 ± 0,61	41,5 ± 5,2
		+ 12	0,20 ± 0,04	34,5 ± 8,3	2,58 ± 0,30	2,58 ± 0,65	40,2 ± 3,0
6	PCK	- 5	0,16 ± 0,12	42,2 ± 12,4	2,87 ± 0,46	1,80 ± 0,40	52,7 ± 11,2
		+ 4	0,22 ± 0,10	44,8 ± 27,5	2,84 ± 0,47	1,76 ± 0,11	56,3 ± 10,2
	SD	- 6	0,24 ± 0,03	26,7 ± 6,4	2,59 ± 0,17	2,14 ± 0,16	54,3 ± 4,6
		+ 6	0,23 ± 0,07	30,4 ± 12,3	2,75 ± 0,29	2,05 ± 0,17	42,4 ± 4,6
8	PCK	- 6	0,20 ± 0,08	42,4 ± 7,7	2,71 ± 0,46	2,59 ± 0,37	52,0 ± 9,5
		+ 5	0,27 ± 0,07	39,6 ± 10,5	2,65 ± 0,36	2,49 ± 0,33	52,3 ± 1,7
	SD	- 6	0,21 ± 0,06	30,4 ± 5,2	2,43 ± 0,12	3,16 ± 0,40	45,3 ± 7,0
		+ 6	0,23 ± 0,05	34,2 ± 5,2	2,80 ± 0,35	3,38 ± 1,67	48,6 ± 3,2
12	PCK	- 5	0,26 ± 0,08	37,6 ± 6,3 ^o	2,58 ± 0,23	2,71 ± 0,41	39,8 ± 3,8
		+ 4	0,37 ± 0,06	44,0 ± 12,7	2,42 ± 0,17	2,96 ± 0,33	46,6 ± 5,3
	SD	- 6	0,31 ± 0,05	26,1 ± 5,9	2,66 ± 0,15	2,97 ± 0,28	50,6 ± 5,5
		+ 6	0,30 ± 0,08	30,2 ± 11,4	2,45 ± 0,23	2,66 ± 0,30	49,1 ± 4,1

Serumwerte nach zwei, vier, sechs, acht und zwölf Wochen mit (+) und ohne (-) Sirolimusbehandlung. Die Zahl der zu den verschiedenen Zeitpunkten untersuchten Seren pro Gruppe ist mit [n] bezeichnet. ^o p < 0,05 PCK vs. SD; T, Therapie

Tabelle 5b: Serumwerte weiblicher Ratten

t [w]	T	n	Kreatinin [mg/dl]	Harnstoff [mg/dl]	Calcium [mmol/l]	Phosphat [mmol/l]	Ges.-Eiweiß [mg/dl]
0	PCK	49	0,23 ± 0,10	27,4 ± 9,4	2,51 ± 0,25	2,05 ± 0,55	47,3 ± 6,9
	SD	33	0,17 ± 0,04	24,7 ± 7,8	2,52 ± 0,12	2,47 ± 0,54	46,7 ± 6,3
2	PCK	- 8	0,12 ± 0,09	26,1 ± 9,5	2,38 ± 0,39	1,62 ± 0,57	41,4 ± 10,0
		+ 9	0,17 ± 0,07	24,1 ± 4,7	2,43 ± 0,40	1,87 ± 0,65	44,0 ± 9,3
	SD	- 5	0,17 ± 0,08	28,4 ± 11,6	2,99 ± 0,25	2,07 ± 0,22	41,6 ± 4,8
		+ 6	0,23 ± 0,11	25,7 ± 6,1	2,84 ± 0,15	1,80 ± 0,24	42,1 ± 5,4
4	PCK	- 14	0,25 ± 0,08	37,7 ± 13,2	2,62 ± 0,22	2,14 ± 0,68	47,8 ± 8,2
		+ 19	0,23 ± 0,08	30,1 ± 11,0	2,57 ± 0,19	1,95 ± 0,73	47,2 ± 8,2
	SD	- 11	0,19 ± 0,04	43,2 ± 7,1	2,55 ± 0,26	2,27 ± 0,87	43,8 ± 3,4
		+ 11	0,20 ± 0,04	33,9 ± 7,3	2,54 ± 0,33	2,46 ± 0,83	41,7 ± 3,0
6	PCK	- 8	0,19 ± 0,08	39,2 ± 13,6	2,75 ± 0,38	1,53 ± 0,24	65,8 ± 8,7
		+ 8	0,27 ± 0,18	42,3 ± 18,7	2,85 ± 0,33	1,45 ± 0,30	56,6 ± 8,7
	SD	- 6	0,27 ± 0,10	33,7 ± 8,7	2,86 ± 0,14	1,69 ± 0,16	59,4 ± 9,0
		+ 6	0,22 ± 0,10	32,7 ± 8,3	2,49 ± 0,50	1,76 ± 0,21	48,8 ± 7,3
8	PCK	- 6	0,24 ± 0,05	38,5 ± 7,2	2,80 ± 0,32	2,60 ± 0,34	58,1 ± 7,2
		+ 10	0,23 ± 0,07	39,0 ± 6,1	2,96 ± 0,28	2,40 ± 0,34	56,9 ± 6,4
	SD	- 6	0,28 ± 0,10	44,7 ± 7,3	2,66 ± 0,32	3,03 ± 0,63	50,5 ± 11,0
		+ 5	0,28 ± 0,04	49,6 ± 11,1	2,62 ± 0,22	2,45 ± 0,25	54,6 ± 9,9
12	PCK	- 8	0,25 ± 0,08	42,9 ± 7,9°	2,50 ± 0,18	2,12 ± 0,23	51,2 ± 8,1
		+ 8	0,28 ± 0,10	33,1 ± 5,9*	2,70 ± 0,12	2,23 ± 0,13	54,4 ± 7,3
	SD	- 6	0,34 ± 0,10	27,3 ± 9,1	2,77 ± 0,30	2,37 ± 0,32	57,8 ± 6,4
		+ 6	0,33 ± 0,05	30,0 ± 7,1	2,84 ± 0,28	2,57 ± 0,54	51,3 ± 4,3

Serumwerte nach zwei, vier, sechs, acht und zwölf Wochen mit (+) und ohne (-) Sirolimusbehandlung. Die Zahl der zu den verschiedenen Zeitpunkten untersuchten Seren pro Gruppe ist mit [n] bezeichnet. * $p < 0,05$ Sirolimus vs. Kontrolle, ° $p < 0,05$ PCK vs. SD; T, Therapie

Die enzymatischen Aktivitäten der Transaminasen (ALAT, ASAT) bei Versuchsende sind in Tabelle 6 aufgeführt.

PCK-Ratten haben deutlich höhere Bilirubinspiegel als SD-Ratten, wobei die Unterschiede bei den männlichen Tieren größer sind als bei den weiblichen Tieren. Dieses gilt auch für die Konzentrationen im Urin (Tabelle 7, Abb. 20). Bei den männlichen PCK-Ratten kommt es unter Sirolimus bereits nach vier Wochen zu einer signifikanten Erhöhung des Bilirubins, speziell des konjugierten (direkten) Bilirubins im Serum (Abb. 21). Dieser therapieabhängige Anstieg ist, wenngleich nicht signifikant, auch bei den weiblichen Tieren zu beobachten.

Die mittleren Gallensäurespiegel therapeutierter männlicher PCK-Ratten sind nach zwölfwöchiger Versuchsdauer signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Abb. 22). Die nach der Hälfte und am Ende der Versuchzeit bei behandelten SD- und PCK-Ratten bestimmten Sirolimusspiegel liegen zwischen 0,1 und 3,6 ng/dl und damit in einem Bereich, der sehr gut mit anderen Tierversuchen vergleichbar ist. Bei den PCK-Ratten kommt es unter Therapie mit Sirolimus, unabhängig von dessen Konzentration im Serum, zu einer Cholestase mit Anstieg der Gallensäuren und signifikanter Erhöhung des Bilirubins im Serum (Abb. 23).

Tabelle 6: Enzymatische Aktivitäten der Transaminasen (ALAT, ASAT) im Serum

t [w]	T	Männchen			Weibchen		
		n	ASAT [U/l]	ALAT [U/l]	n	ASAT [U/l]	ALAT [U/l]
0	PCK	16	148 ± 38	108 ± 5	37	116 ± 24	82 ± 17
	SD	28	108 ± 19	78 ± 27	27	105 ± 16	73 ± 20
4	PCK	-	5 266 ± 50	60 ± 9	8 296 ± 87°	65 ± 11	
		+	5 286 ± 53	65 ± 25	9 372 ± 180	69 ± 21	
	SD	-	6 260 ± 112	44 ± 17	5 417 ± 93	71 ± 32	
		+	6 321 ± 131	63 ± 13	6 221 ± 65*	55 ± 17	
8	PCK	-	6 382 ± 106	92 ± 96	6 508 ± 219	73 ± 8	
		+	5 390 ± 125	68 ± 46	10 521 ± 212	89 ± 28	
	SD	-	6 291 ± 67	42 ± 12	6 305 ± 74	61 ± 31	
		+	6 360 ± 127	58 ± 17	5 224 ± 19	33 ± 2	
12	PCK	-	6 291 ± 82	66 ± 20°	8 437 ± 79°	67 ± 25	
		+	4 477 ± 73*	63 ± 17	8 579 ± 211	80 ± 14	
	SD	-	6 187 ± 73	43 ± 11	6 330 ± 75	72 ± 49	
		+	6 307 ± 32	58 ± 17	6 247 ± 43	61 ± 45	

Aktivitäten von ASAT und ALAT nach vier, acht und zwölf Wochen mit (+) und ohne (-) Sirolimusbehandlung. Die Zahl der zu den verschiedenen Zeitpunkten untersuchten Seren pro Gruppe ist mit [n] bezeichnet. * p < 0,05 Kontrolle vs. Sirolimus; ° p < 0,05 PCK vs. SD; T, Therapie

Tabelle 7: Konzentration des indirekten und Gesamtbilirubins in Serum und Urin

t [w]	T	Männchen				Weibchen				Männchen				Weibchen				
		Bilirubin [mg/dl] im Serum								Bilirubin [mg/dl] im Urin								
		n	gesamt	n	indirekt	n	gesamt	n	indirekt	n	gesamt	n	indirekt	n	gesamt	n	indirekt	
0	PCK	12	0,78 ± 0,4	8	0,59 ± 0,4	29	0,84 ± 0,3	16	0,58 ± 0,3	30	2,94 ± 0,8	30	2,37 ± 0,7	47	3,16 ± 1,0	47	2,53 ± 1,0	
	SD	24	1,05 ± 0,3	23	0,65 ± 0,4	27	0,97 ± 0,3	26	0,64 ± 0,4	31	1,50 ± 0,6°	28	0,89 ± 0,5°	28	1,25 ± 0,7°	28	0,82 ± 0,6°	
4	PCK	-	5	0,55 ± 0,1	8	0,47 ± 0,1	8	0,65 ± 0,3	8	0,55 ± 0,4	5	1,86 ± 0,3	5	1,56 ± 0,3	8	2,88 ± 1,2	8	2,42 ± 1,3
		+	5	2,61 ± 1,4*	9	1,23 ± 0,6*	9	0,62 ± 0,3	9	0,46 ± 0,2	5	2,97 ± 0,7*	5	2,57 ± 0,5*	9	3,04 ± 0,8	9	2,60 ± 0,8
	SD	-	6	0,58 ± 0,4	5	0,66 ± 0,5	5	0,57 ± 0,5	5	0,32 ± 0,2	5	2,10 ± 0,7	5	1,69 ± 0,6	5	1,69 ± 0,3	5	1,27 ± 0,2
		+	6	0,44 ± 0,2°	6	0,48 ± 0,2°	6	0,73 ± 0,4	6	0,69 ± 0,4	6	2,17 ± 0,4°	6	1,65 ± 0,4°	6	1,85 ± 0,2°	6	1,36 ± 0,2°
8	PCK	-	6	0,70 ± 0,3	6	0,46 ± 0,2	6	0,81 ± 0,3	6	0,65 ± 0,3	5	3,29 ± 4,3	5	2,99 ± 4,3	6	2,05 ± 1,0	5	1,71 ± 1,1
		+	5	3,48 ± 1,4*	10	1,62 ± 0,5*	10	1,06 ± 0,4	10	0,66 ± 0,3	5	3,27 ± 2,1	5	1,97 ± 2,2	10	3,01 ± 2,0	10	2,40 ± 1,7
	SD	-	6	0,55 ± 0,1	6	0,52 ± 0,1	6	0,63 ± 0,1	6	0,59 ± 0,1	6	2,30 ± 0,5	6	1,88 ± 0,4	6	2,97 ± 2,0	5	1,93 ± 0,7
		+	6	0,58 ± 0,3°	5	0,51 ± 0,3°	5	0,60 ± 0,1	5	0,52 ± 0,1	6	2,00 ± 0,6	6	1,73 ± 0,5	5	1,56 ± 0,5	5	1,35 ± 0,4
12	PCK	-	6	0,71 ± 0,1	8	0,61 ± 0,2	8	1,22 ± 0,6	8	0,80 ± 0,3	5	2,21 ± 0,8	5	1,93 ± 0,8	7	2,35 ± 1,2	7	1,65 ± 1,3
		+	4	5,03 ± 3,0*	8	1,76 ± 0,7*	8	1,37 ± 0,5	8	0,77 ± 0,4	4	9,20 ± 6,9	4	5,33 ± 4,1	8	3,84 ± 1,6	8	2,91 ± 1,6
	SD	-	6	0,86 ± 0,2	6	0,80 ± 0,2	6	0,84 ± 0,3	6	0,79 ± 0,3	6	1,80 ± 0,3	6	1,45 ± 0,3	6	1,32 ± 0,3	6	1,09 ± 0,3
		+	6	1,22 ± 0,6°	6	1,16 ± 0,6	6	1,07 ± 0,4	6	1,01 ± 0,5	6	1,53 ± 0,6°	6	1,26 ± 0,5°	6	1,49 ± 0,3°	6	1,31 ± 0,3°

Konzentrationen von Bilirubin (gesamt und indirekt) in Serum und Urin nach vier, acht und zwölf Wochen mit (+) und ohne (-) Sirolimusbehandlung. Die Zahl der zu den verschiedenen Zeitpunkten untersuchten Proben pro Gruppe ist mit [n] bezeichnet. * p < 0,05 Kontrolle vs. Sirolimus; ° p < 0,05 PCK vs. SD; T, Therapie

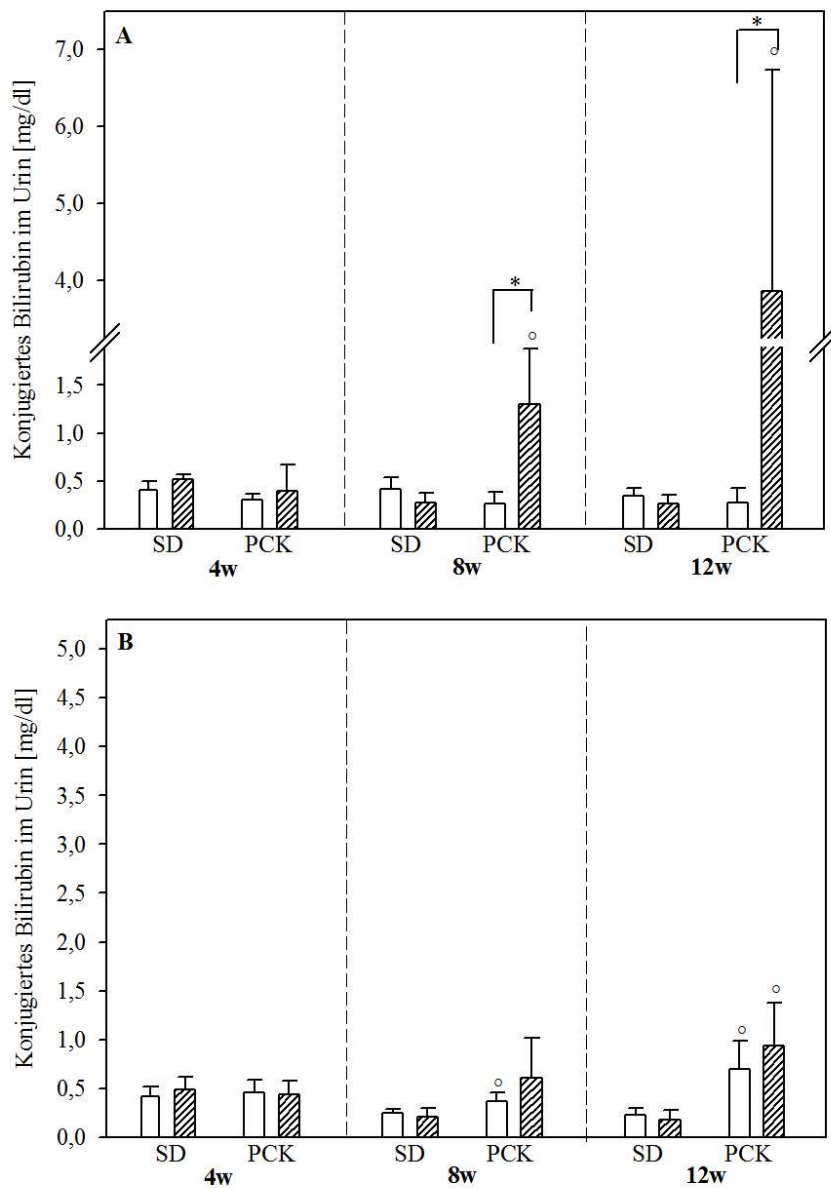


Abb. 20: Mittlere Urinkonzentration des direkten Bilirubins

Mittlere Urinkonzentrationen des direkten Bilirubins im Urin männlicher (A) und weiblicher (B) SD- und PCK- Ratten nach vier-, acht- und zwölfwöchiger Versuchszeit als Kontrolltier \square oder unter Behandlung mit Sirolimus ▨ . * $p < 0,05$ Sirolimus vs. Kontrolle; ° $p < 0,05$ PCK vs. SD

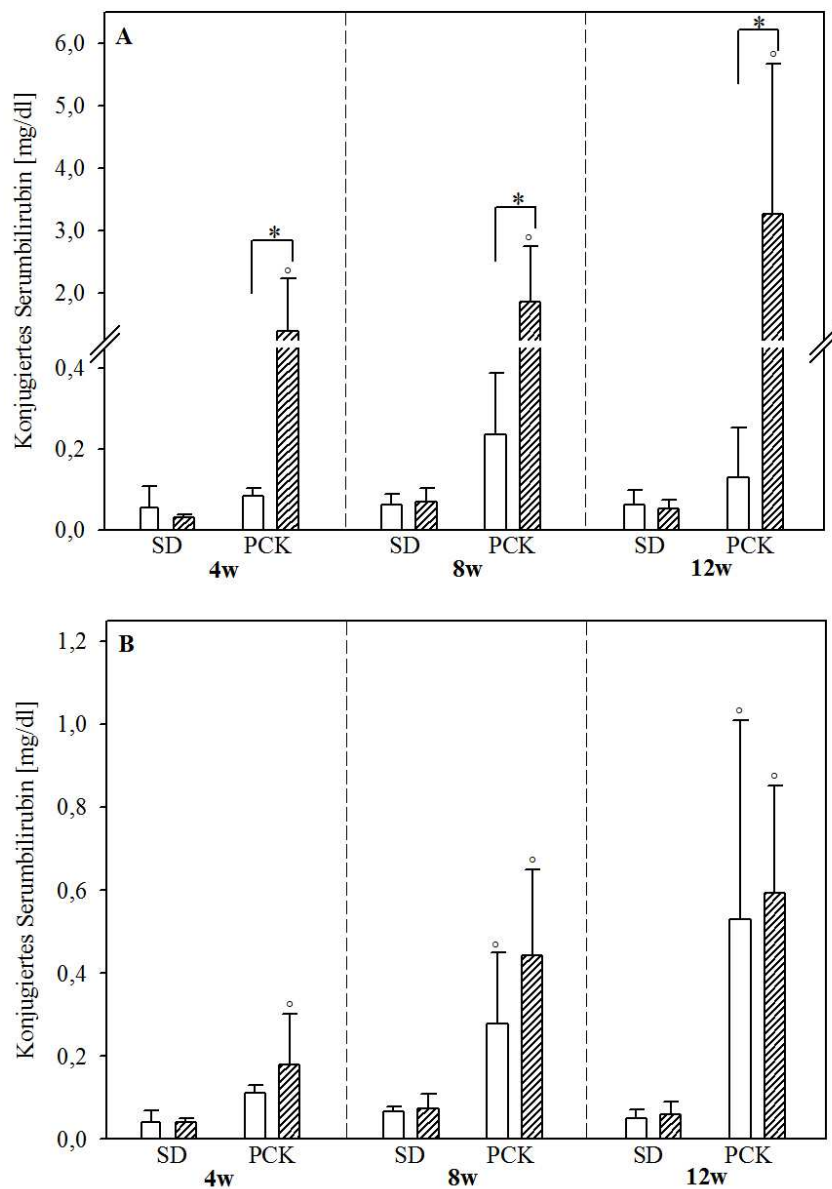


Abb. 21: Mittlere Serumkonzentration des direkten Bilirubins

Mittlere Konzentrationen des direkten Bilirubins im Serum männlicher (A) und weiblicher (B) SD- und PCK- Ratten nach vier-, acht- und zwölfwöchiger Versuchszeit als Kontrolltier oder unter Therapie mit Sirolimus . * $p < 0,05$ Sirolimus vs. Kontrolle; ° $p < 0,05$ PCK vs. SD

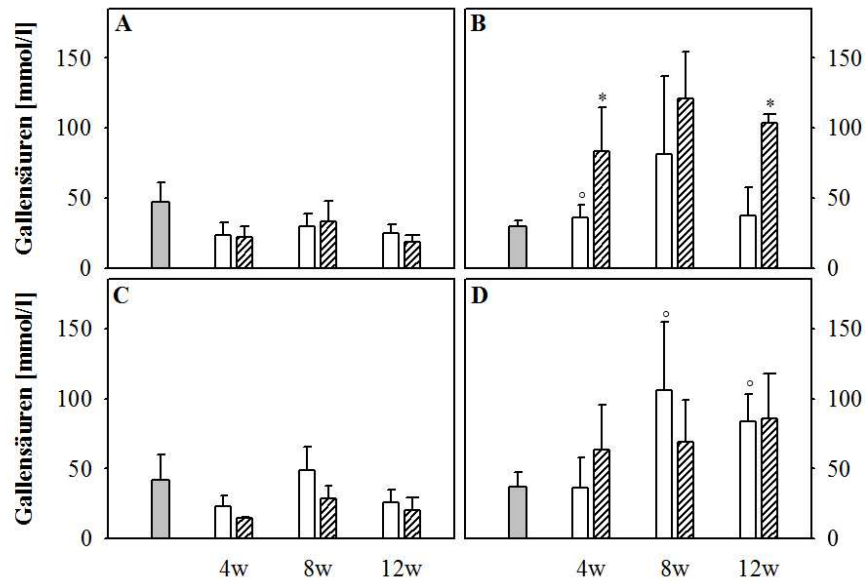


Abb. 22: Gallensäuren im Serum

Mittlere Konzentrationen der Gallensäuren im Serum männlicher (oben) und weiblicher (unten) SD- (A, C) und PCK-Ratten (B, D) bei Versuchsbeginn bzw. nach vier-, acht- und zwölfwöchiger Versuchszeit als Kontrolltier oder unter Therapie mit Sirolimus . * p < 0,05 Sirolimus vs. Kontrolle; ° p < 0,05 PCK vs. SD

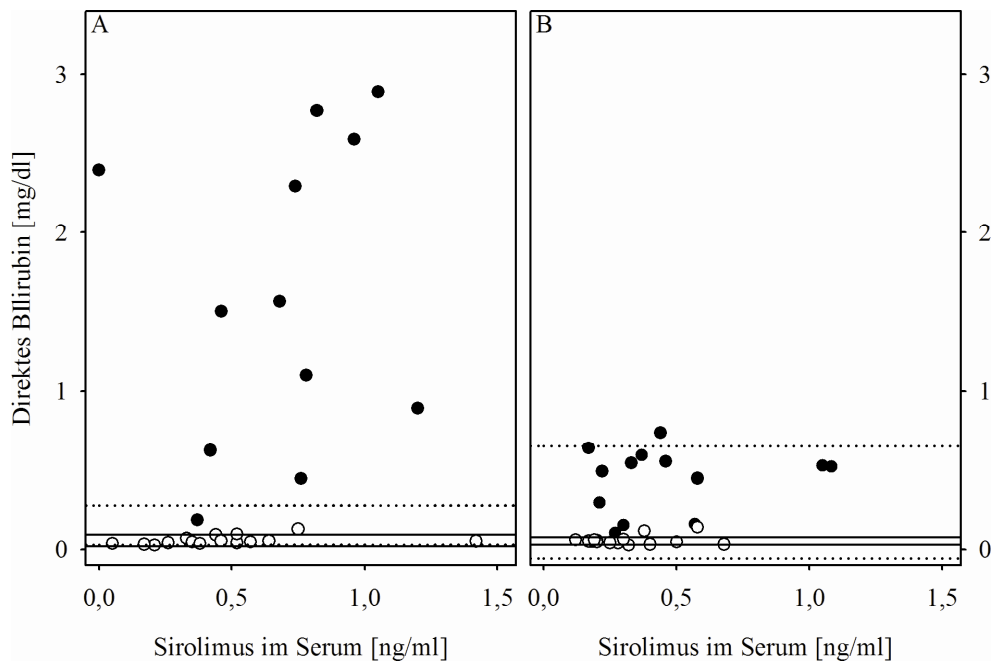


Abb. 23: Direktes Bilirubin in Abhängigkeit von der Sirolimuskonzentration im Serum

Einzelwerte männlicher (A) und weiblicher (B) SD- (weiß) und PCK-Ratten (schwarz) bei Versuchsende. Die Dauer der Behandlung wurde bei dieser Darstellung nicht berücksichtigt. Die Normalbereiche der direkten Bilirubinwerte (MW \pm SD) der jeweiligen Kontrollgruppen sind angegeben (PCK:; SD: __).

4.3 Mikroskopische Untersuchungen an Nieren und Lebern

4.3.1 Histologische Beurteilung von Nieren und Leber

Die mikroskopischen Bilder der Nieren bestätigen die makroskopischen Befunde (Abb. 24). Die renalen und hepatischen Veränderungen waren bei den PCK-Ratten relativ mild und bei männlichen und weiblichen Tieren vergleichbar ausgeprägt. Die Größe der Nierenzysten war in Papillennähe maximal und nahm in Richtung Kortex ab. Häufig waren schmale, straßenartige Regionen beginnender Zystenbildung zu finden, die sich radiär vom Kortex bis in die Medulla zogen. Die fibrotischen Areale waren um die größeren Zysten herum am stärksten ausgeprägt.

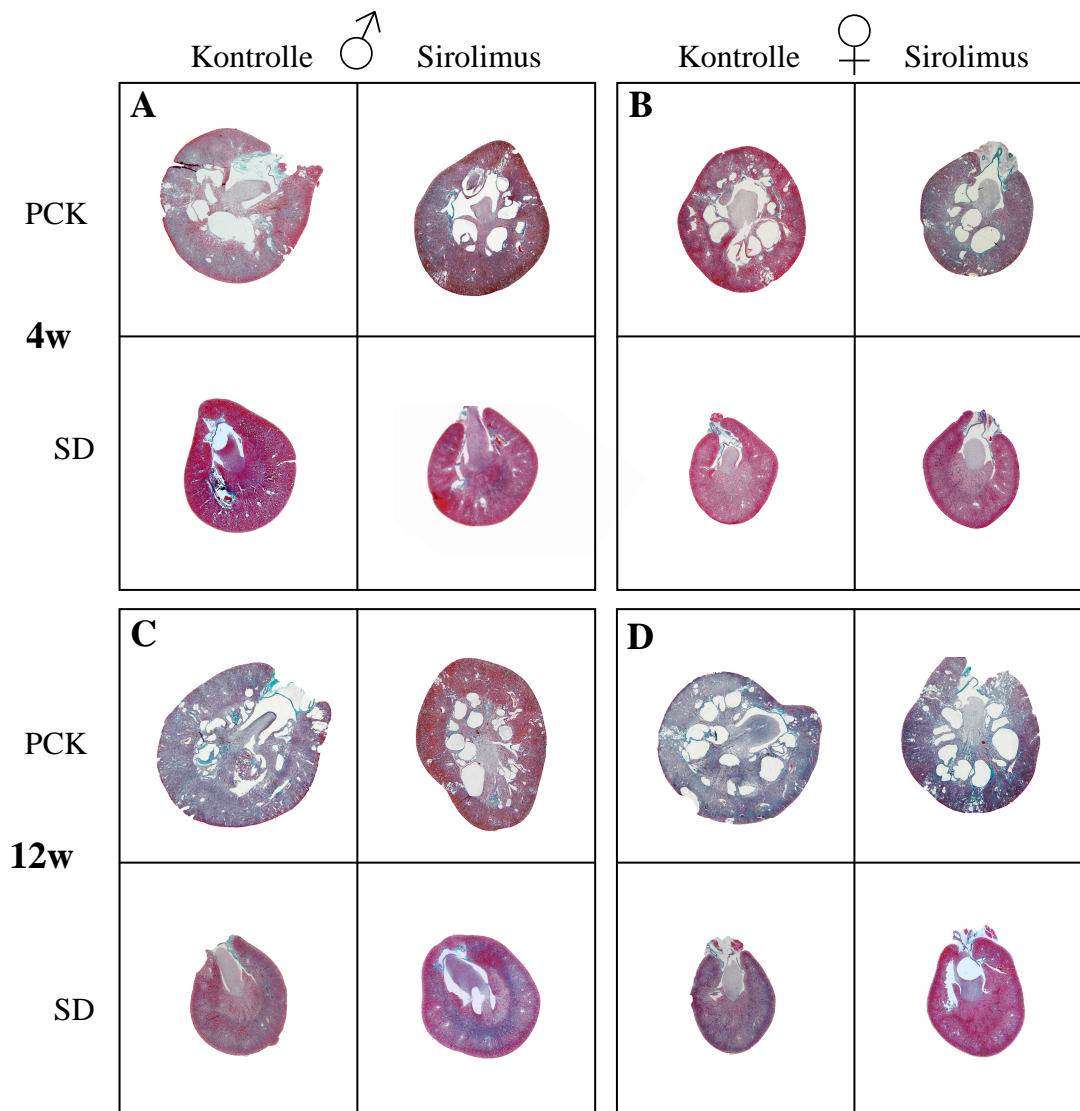


Abb. 24: Masson-Goldner gefärbte Nierenquerschnitte von SD- und PCK-Ratten

Makroaufnahmen repräsentativer transverser Nierenpräparate männlicher (links) und weiblicher (rechts) SD- und PCK-Ratten nach vier- (A,B) und zwölfwöchiger (C,D) Versuchszeit als Kontrolltier bzw. unter Therapie mit Sirolimus.

In der Leber erfolgte die Ausbreitung der Fibrose lamellär um die zystisch erweiterten Gallengänge herum. Es fand sich keine für eine Leberzirrhose typische portoportale Septierung. Die Ausprägung von Zysten und Fibrose in Niere und Leber behandelter und unbehandelter PCK-Ratten ist in Abb. 25 zusammengefasst.

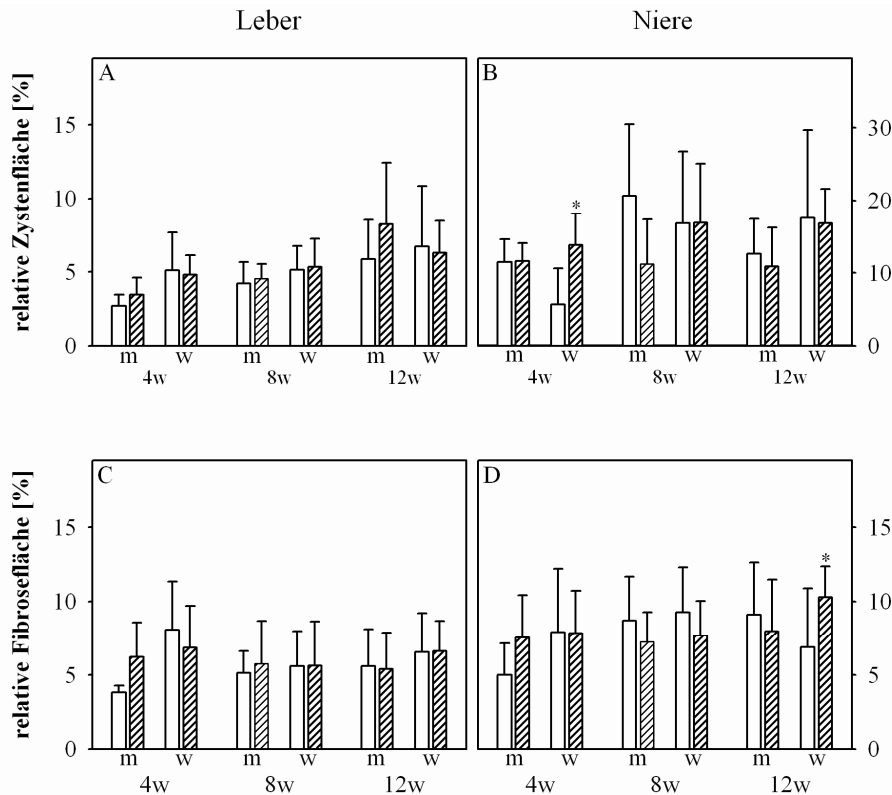


Abb. 25: Mittlere relative Zysten- und Fibrosefläche in Niere und Leber der PCK-Ratten

Prozentuale Flächenanteile von Zysten und Fibrose an der gesamten Organfläche in Leber und Niere männlicher (m) und weiblicher (w) PCK-Ratten nach vier-, acht- und zwölfwöchiger Versuchszeit als Kontrolltier oder unter Therapie mit Sirolimus .
* $p < 0,05$ Sirolimus vs. Kontrolle

4.3.2 Nachweis von BrdU als Marker der Zellproliferation in der Leber

Sowohl bei den SD- als auch bei den PCK-Ratten nimmt in der Leber die Anzahl BrdU-positiver Zellkerne mit dem Alter ab, sie ist aber bei PCK-Ratten stets höher als bei den SD-Ratten. Bei SD-Ratten beeinflusst Sirolimus die Zellproliferation in der Leber nicht. Im Gegensatz dazu zeigen sich bei den behandelten männlichen PCK-Ratten über die gesamte Versuchszeit mehr BrdU-positive Zellkerne in der Leber als bei den unbehandelten. Bei den weiblichen PCK-Ratten ist dieser Effekt nur schwach ausgeprägt (Abb. 26).

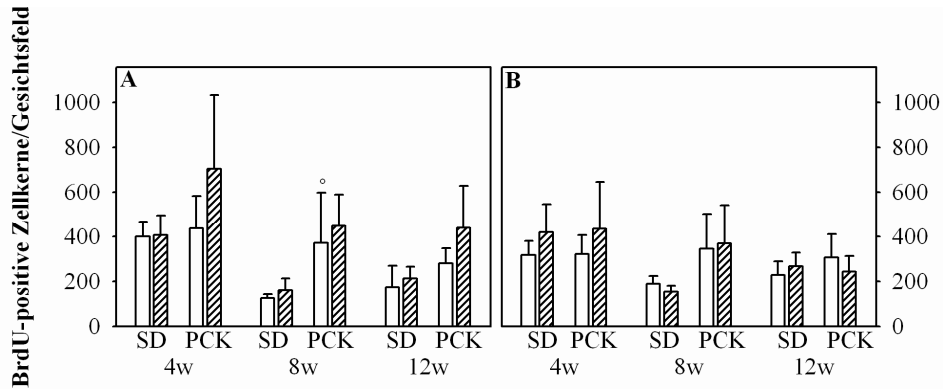




Abb. 26: Mittlere Anzahl BrdU-positiver Zellkerne pro Gesichtsfeld in der Leber

Mittlere Anzahl BrdU-positiver Zellkerne pro Gesichtsfeld in der Leber männlicher (A) und weiblicher (B) SD- und PCK-Ratten nach vier-, acht- und zwölfwöchiger Versuchszeit als Kontrolltier  oder unter Therapie mit Sirolimus . ° $p < 0,05$ PCK vs. SD

4.3.3 Immunhistochemische Nachweise von p-Akt, p-mTOR und p-S6Kinase

In den Nieren der PCK-Ratten ist die immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Akt deutlich stärker als in den Nieren der SD-Ratten. Das Antigen findet sich in allen für die Auswertung beurteilten Bereichen der Niere (Parenchym, Bereiche beginnender Zystenbildung und Zystenepithelien), seine Ausprägung nimmt mit fortschreitendem Alter der Tiere ab. Wie anzunehmen, findet sich p-Akt entsprechend seiner vielfältigen Funktionen nicht ausschließlich in den Bereichen, in denen auch phosphoryliertes mTOR exprimiert wird. Vor allem im Papillenbereich sind häufig bei PCK-Ratten, aber auch bei SD-Ratten intensiv gefärbte Sammelrohre zu sehen (Abb. 27).

Im Vergleich zu gesunden SD-Ratten lässt sich phosphoryliertes mTOR in den Nieren der PCK-Ratten in allen untersuchten Arealen deutlicher intrazellulär nachweisen. Insbesondere in gesunden bzw. in geringfügig erweiterten Tubuli findet sich bei den PCK-Ratten eine kräftige Expression des Antigens.

Bei PCK-Ratten ist in der Niere die phosphorylierte S6-Kinase immunhistochemisch nachweisbar. Nach achtwöchiger Versuchszeit sind im Parenchym der Nieren behandelter PCK-Ratten vergleichsweise stärkere Signale als bei unbehandelten Tieren zu sehen.

Die Expression des Antigens in den Zystenepithelien und Regionen beginnender Zystenbildung ist nach achtwöchiger Versuchszeit am höchsten und nimmt dann wieder ab. Im Gegensatz zum Parenchym ist sie hier bei den männlichen Tieren stärker ausgeprägt als bei den weiblichen Tieren. Bei den SD-Ratten hingegen zeigen sich in der Immunhistochemie der Niere überwiegend sehr schwache Signale für die p-S6-Kinase, die sich unter Behandlung mit Sirolimus nicht regelhaft ändern.

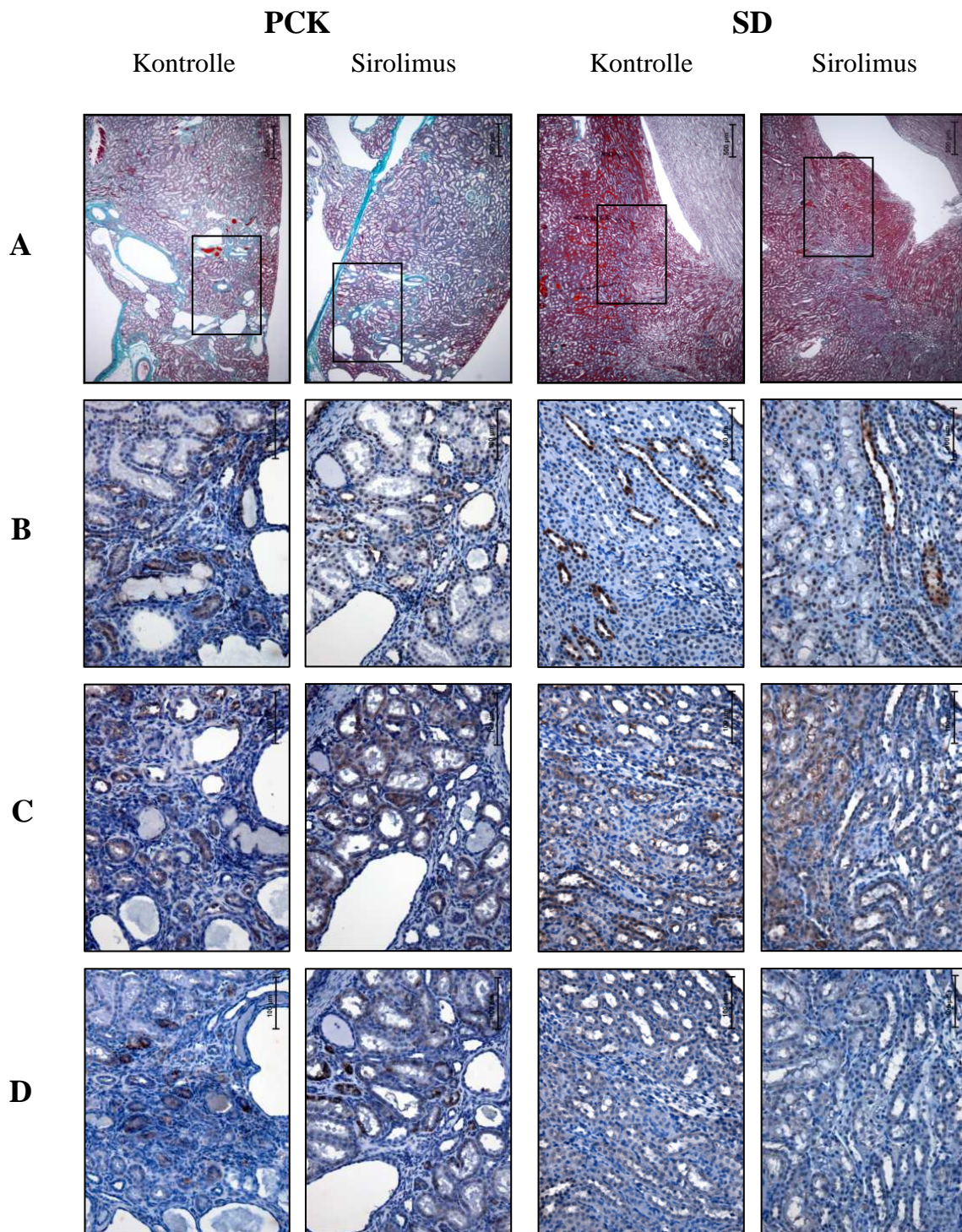


Abb. 27: Immunhistochemisch dargestellte Expression von p-Akt, p-mTOR und p-S6K
 Masson-Goldner-gefärbte Übersichtsaufnahmen (A; 25x) und Detailaufnahmen (200x) der immunhistochemisch dargestellten Expression von phosphoryliertem Akt (B), Phospho-mTOR (C) und Phospho-S6K (D) in Nierenpräparaten männlicher PCK- und SD-Ratten nach zwölfwöchiger Versuchszeit als Kontrolltier bzw. unter Behandlung mit Sirolimus.

5 Diskussion

Polyzystische Nierenerkrankungen sind genetisch heterogene Erkrankungen, die sämtlich auf Mutationen zilienspezifischer Membranproteine zurückzuführen sind. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung, die sich insbesondere im Kindesalter manifestiert und sowohl Nieren als auch Leber betrifft. Ein wesentliches Charakteristikum der ARPKD, aber auch anderer Ziliopathien, ist der progrediente Verlust der Organfunktion durch ungehemmte Proliferation der Zysten mit fibrotischem Umbau des Parenchyms. Daraus wurden in der Vergangenheit verschiedene Konzepte zur Hemmung dieser Vorgänge entwickelt, die sich in vielerlei Punkten an onkologischen Behandlungsprotokollen orientierten. In diesem Zusammenhang sind die Hemmung von EGF-Rezeptor und/oder Tyrosinrezeptor-Kinasen zu nennen (Torres *et al.* 2004; Wilson 2004; Sweeney *et al.* 2008) (Abb. 28).

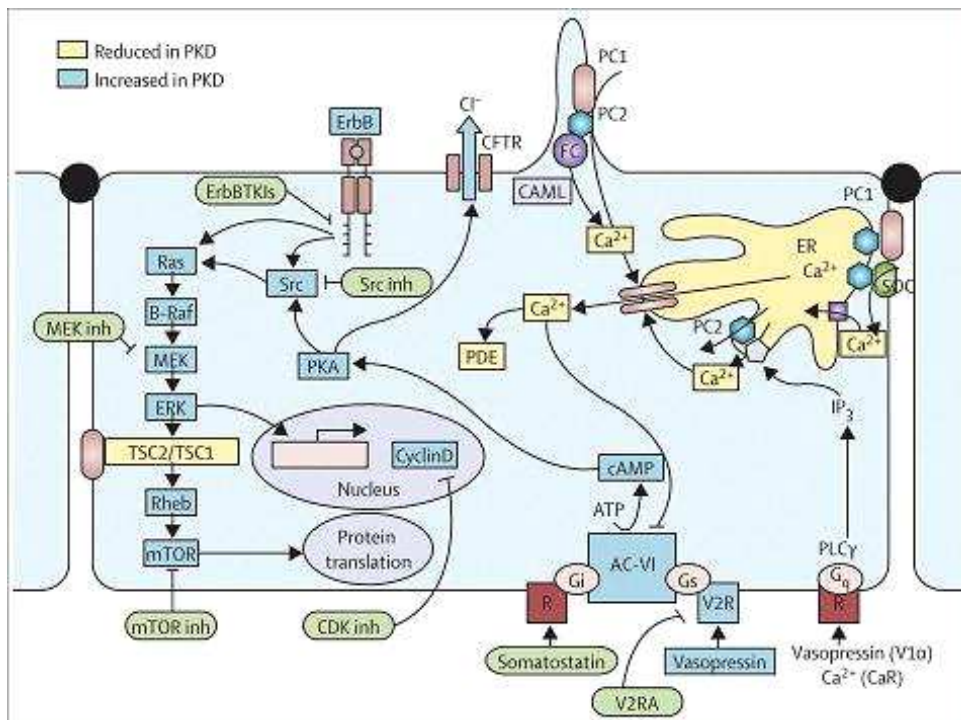


Abb. 28: Schematische Darstellung pharmakologischer Angriffspunkte zur Therapie der ARPKD und ADPKD (Torres *et al.* 2004)

Leider erwiesen sich diese Ansätze als wenig erfolgreich. Auch heute ist die Organtransplantation die einzig kausale Therapie für die ARPKD. Da weder Gen- noch Stammzelltherapie praktikabel erscheinen, weil die Erkrankung bereits pränatal beginnt und mehrere Organe betrifft, richten sich die Bemühungen nun im Wesentlichen darauf, die Progredienz zu verlangsamen. Ein zentraler Regulator für Wachstum und Proliferation ist die

Proteinkinase mTOR, die zudem selektiv durch Rapamycin (Sirolimus) gehemmt werden kann. Tatsächlich haben sich Sirolimus und seine Derivate bereits in zahlreichen Nagetiermodellen der ADPKD als effektiv erwiesen (Shillingford *et al.* 2006; Wahl *et al.* 2006; Wahl *et al.* 2007; Harris *et al.* 2009). Auch in ersten klinischen Studien der ADPKD schien sich dieser Effekt zunächst zu bestätigen (Walz 2006; Ponticelli *et al.* 2010; Walz *et al.* 2010).

Sirolimus inhibiert auf molekularer Ebene direkt die Wirkung von mTOR, welches erheblichen Einfluss auf Zellwachstum und Proliferation hat (Inoki *et al.* 2005). Diese Proteinkinase ist mit zahlreichen in das Zellwachstum involvierten Signalwegen verschaltet; ihre aberrante Aktivierung konnte im Zusammenhang mit etlichen malignen und benignen Prozessen nachgewiesen werden (Reiling *et al.* 2006; Wang *et al.* 2006; Wullschleger *et al.* 2006). Die Stimulation der Proteinsynthese erfolgt dabei über die S6-Kinase, einem direkten Substrat von mTOR. Im phosphorylierten Zustand nimmt die S6-Kinase Einfluss auf die Translationskapazität der Zelle (Hay *et al.* 2004).

Wenngleich ARPKD und ADPKD sich geno- und phänotypisch stark unterscheiden, sind sie doch beide Ziliopathien. Es konnte sogar nachgewiesen werden, dass die bei der ARPKD (FPC) und bei der ADPKD (PC-1 und PC-2) mutierten Membranproteine interagieren (Kim *et al.* 2008a; Kim *et al.* 2008b; Hildebrandt *et al.* 2011). Darüber hinaus konnte eine von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchung an archiviertem Nierengewebe von Patienten mit klinisch und genetisch gesicherter ARPKD Anhaltspunkte dafür liefern, dass die mTOR-Signalkaskade in diesem Gewebe stark aktiviert ist (Fischer *et al.* 2009).

Diese Erkenntnisse führten zu der Hypothese, dass die Inhibition von mTOR mit Sirolimus auch bei der ARPKD eine therapeutische Option darstellt. Daher wurde in der vorliegenden Studie der zeitabhängige Einfluss einer Sirolimusbehandlung auf den Krankheitsverlauf bei der PCK-Ratte untersucht. Diese Ratte ist ein orthologes Tiermodell der humanen ARPKD: Sowohl der hepatische als auch der renale Phänotyp ist mit dem humanen vergleichbar. Damit ist die PCK-Ratte deutlich besser als andere Tiermodelle für Therapiestudien zur ARPKD geeignet (Katsuyama *et al.* 2000; Masyuk *et al.* 2003; Masyuk *et al.* 2004).

In der Literatur sind an diesem Tiermodell verschiedene therapeutische Ansätze beschrieben, die entweder auf der Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen (EGFRs) oder des cAMP zur Normalisierung der intrazellulären Calciumhomöostase beruhen (Tabelle 8). Damit konnte der Krankheitsprogress nur in der Leber (Inhibition des EGFR) oder nur in der Niere (Inhibition von cAMP), nicht aber in beiden Organen zugleich aufgehalten werden (Gattone *et al.* 2003; Masyuk *et al.* 2003; Torres *et al.* 2004; Sato *et al.* 2006).

In unserer Studie wurde an 81 PCK- und 70 SD-Ratten der Einfluss einer vier-, acht- und zwölfwöchigen Behandlung mit Sirolimus auf die Entwicklung von Körpergewicht und Körperlänge, Serumparametern, Nieren- und Lebergewicht sowie auf die Entwicklung von Zysten und Fibrose in Leber und Niere der PCK-Ratten untersucht.

Tabelle 8: Ergebnisse vergleichbarer Studien am PCK-Tiermodell

Studie	Medikation [mg/kg KG/d]	Dauer (LW - LW)	KG [g]	rel. Organgewicht [%]		rel. Zystenfläche [%]		rel. Fibrosefläche [%]		
				Niere	Leber	Niere	Leber	Niere	Leber	
Torres 2003	EKI-785 i.p.	3-10								
	0		365 ± 36	1,5 ± 0,3	5,5 ± 0,4	20,8 ± 5,8	6,0 ± 0,9	2,4 ± 0,3	5,6 ± 0,8	
	90		318 ± 18	2,8 ± 0,1	6,2 ± 0,5	35,7 ± 5,8	4,9 ± 1,1	4,5 ± 1,5	5,1 ± 1,7	
	EKB-569 i.p.	3-10								
			0	299 ± 34	1,5 ± 0,2	4,5 ± 0,3	22,6 ± 8,1	6,5 ± 1,4	1,1 ± 0,5	7,3 ± 1,5
			20	290 ± 67	1,6 ± 0,1	5,0 ± 0,3	24,3 ± 5,2	4,9 ± 0,7	1,7 ± 0,8	7,6 ± 2,0
	EKB-569 p.o.	3-10								
			0	351 ± 16	1,6 ± 0,4	5,1 ± 0,3	29,0 ± 12,7	5,6 ± 2,0	1,0 ± 1,3	5,2 ± 1,5
			5	357 ± 26	1,6 ± 0,3	5,2 ± 0,4	33,2 ± 3,2	5,8 ± 1,9	1,0 ± 0,8	4,2 ± 2,0
			10	338 ± 40	1,6 ± 0,3	5,4 ± 0,7	34,8 ± 10,1	4,4 ± 1,6	1,5 ± 0,7	4,5 ± 1,3
	20	342 ± 25	1,7 ± 0,2	5,5 ± 0,3	34,9 ± 2,6	4,2 ± 1,0	1,2 ± 0,4	4,0 ± 0,8		
Gattone 2003	OPC 31260 p.o.*									
	0	328 ± 35	1,5 ± 0,3	n.d.	24,9 ± 9,0	n.d.	0,8 ± 0,7	n.d.		
	0.05	328 ± 26	1,1 ± 0,2		14,8 ± 7,2		0,7 ± 0,3			
	0.1	272 ± 40	1,0 ± 0,1		14,1 ± 7,9		0,4 ± 0,1			
Sato 2006	Gefitinib i.p.	3-10								
	0		321 ± 7	1,0 ± 0,1	4,1 ± 0,1	23,0 ± 2,0	7,9 ± 2,7		n.d.	
	2		308 ± 11	1,0 ± 0,2	4,5 ± 0,7	23,0 ± 7,0	6,7 ± 1,6			
	10		310 ± 5	1,0 ± 0,1	4,3 ± 0,1	27,0 ± 7,0	4,1 ± 1,3*			
Wang 2008	R-568 p.o.*	3-10								
	0		340 ± 19	2,0 ± 0,3	n.d.	22,7 ± 5,4	n.d.	4,5 ± 1,7	n.d.	
	0.05		330 ± 20	2,0 ± 0,2		20,2 ± 5,5		2,2 ± 0,9		
	0.1	299 ± 27	1,9 ± 0,21		20,9 ± 2,3		1,6 ± 0,4			
Sweeney 2008	SKI 606 i.p.	1-13								
	0		388 ± 40	1,5 ± 0,1	4,8 ± 0,7	30,9 ± 11,0	n.d.		n.d.	
	30		375 ± 18	1,1 ± 0,3	4,0 ± 0,6	14,8 ± 7,0				
Park 2009	HET-0016 i.p.	4-8								
	0		384 ± 12	1,3 ± 0,0	5,8 ± 0,2		n.d.		n.d.	
	10		362 ± 7	1,0 ± 0,0	5,0 ± 0,3					
Renken 2010	Sirolimus p.o.	5-13								
	0		391 ± 39	1,6 ± 0,2	5,2 ± 1,2	20,6 ± 9,8	4,2 ± 1,5	8,7 ± 3,0	5,1 ± 1,5	
	2		381 ± 16	1,5 ± 0,2	5,3 ± 0,6	11,2 ± 6,2	4,6 ± 1,0	7,3 ± 2,0	5,8 ± 2,9	

* Prozent im Futter; LW, Lebenswoche; EKI-785 und EKB 569 (=Pelitinib) und Gefitinib sind Inhibitoren der EGFR-Tyrosinkinase; OPC 31260 ist ein Vasopressin V2-Antagonist, R-568 ist ein Calcimimetikum, das die Sensitivität des Calcium-Sensing-Rezeptors in der Nebenschilddrüse stimuliert; SKI 606 (=Bosutinib) ist ein Src-Kinase-Inhibitor; HET-0016 ist ein Inhibitor der 20-Hydroxyeicosatetraensäure (HETE)-Synthase. Dargestellt sind ausschließlich Ergebnisse männlicher Individuen.

Der auffälligste Unterschied zwischen den Ausgangsbefunden unserer und aller in der Tabelle aufgelisteten Daten betrifft die renale Fibrose. Diese ist bei unseren Tieren mit ca. 9% relativer Fibrosefläche mindestens doppelt so hoch bzw. im Extremfall sogar zehnmal höher als in anderen Studien, während die Nierenfunktion, gemessen an Kreatinin und Harnstoff im Serum, vergleichsweise gut erhalten ist. Die deutlich ausgeprägtere Fibrose unserer unbehandelten Tiere weist auf einen frühen und schwereren Krankheitsverlauf hin. Sie könnte darauf zurückzuführen sein, dass die hier eingesetzte PCK-Ratte und die in den amerikanischen Studien verwendeten PCK-Ratten sich bereits auseinander entwickelt haben. Die Mannheimer Kolonie, aus der wir unsere Versuchstiere bezogen haben, wurde vor einigen Jahren mit einigen wenigen Zuchtpaaren aus Amerika aufgebaut und ist damit eine isolierte Population. Bei Ratten mit diabetischer Nephropathie konnte gezeigt werden, dass die Blockade der mTOR-Kaskade mit Sirolimus initiale Parenchymschäden verbessert (Lloberas *et al.* 2006). Es ist sehr plausibel, dass die bei den hier untersuchten Tieren sehr ausgeprägte Fibrose durch Sirolimus nicht mehr beeinflussbar ist. Auch die initial erwähnten klinischen Studien über die Therapie mit Sirolimus und seinen Derivaten bei ADPKD-Patienten legen nahe, dass bei Patienten mit einer bereits zu weit vorgeschrittenen zystischen Nierenerkrankung durch Blockade der mTOR-Kaskade zwar eine Reduktion der Nierengröße, jedoch keine Verbesserung der Funktion erreicht werden kann (Walz *et al.* 2010; Watnick *et al.* 2010) (Tabelle 9).

Tabelle 9: Ergebnisse klinischer Studien zur Therapie der ADPKD mit Sirolimus

Studie	n	t [Mon]	Ergebnis
Perico 2010	21	6	Nierenvolumen: keine Vorteile gegenüber Placebo, Zystenvolumen: Stabilisierung im Vergleich zu Placebo
Ponticelli 2010	25	6	keine Verbesserung der GFR
Serra 2010	100	18	gleiche Volumenzunahme der Nieren in Therapie- und Kontrollgruppe
Walz 2010	433	24	Im ersten Jahr: verlangsamte Zunahme des Nierenvolumens, danach kein Unterschied zu Kontrollgruppe, keine Verbesserung der GFR

Es wird angenommen, dass der initial beobachtete positive Effekt auf die Nierenfunktion durch das Schrumpfen der Zysten mit konsekutiver Druckentlastung des übrigen Parenchyms entsteht. Langfristig könnten mTOR-Antagonisten jedoch die im verbliebenen Nierengewebe einsetzende kompensatorische Hypertrophie der Glomeruli und die forcierte glomeruläre Filtration inhibieren, so dass die Nierenfunktion weiter abnimmt oder zumindest nicht verbessert werden kann (Perico *et al.* 2010; Ponticelli *et al.* 2010; Serra *et al.* 2010; Walz *et al.* 2010).

Auch wenn die bekannte Aktivierung pathogenetisch relevanter Proteine der mTOR-Kaskade in den Nieren aller in dieser Arbeit untersuchten PCK-Ratten und in einer repräsentativen Auswahl von SD-Rattennieren nachgewiesen werden konnte, hat sich die Sirolimustherapie in der hier vorliegenden Studie hinsichtlich einer Verbesserung des renalen oder hepatischen Phänotyps als ineffizient erwiesen. Vielmehr musste festgestellt werden, dass Sirolimus vor allem bei männlichen PCK-Ratten zu schweren hepatischen Nebenwirkungen führte.

Während die SD-Ratten diesbezüglich unauffällig blieben, kam es bei den PCK-Ratten unter Therapie mit Sirolimus zu einer Cholestase mit Anstieg der Gallensäuren und signifikanter Erhöhung des Bilirubins im Serum, und zwar unabhängig von der Serumkonzentration des Sirolimus. Dies lässt vermuten, dass die fibrozystische Lebererkrankung der Tiere zu einer verminderten Toleranz putativer Nebenwirkungen des Immunsuppressivums führt. Männliche PCK-Ratten sind dabei offensichtlich noch weniger als weibliche Tiere in der Lage, medikamentös bedingte Irritationen des Gallestoffwechsels zu kompensieren, ohne dass bei ihnen, gemessen an den untersuchten Parametern Zystenfläche und Fibrosefläche, eine schwerere Ausprägung des hepatischen Phänotyps vorlag.

Die Leberenzyme ALAT und ASAT waren bei den PCK-Ratten weder in der Therapie- noch in der Kontrollgruppe wesentlich höher als bei den SD-Ratten. Dieses Ergebnis deckt sich mit den bekannten Charakteristika der humanen ARPKD, bei der es üblicherweise nicht zu einer Erhöhung der Leberenzyme im Serum kommt (Zerres *et al.* 2003; Gunay-Aygun 2009). Es lag somit offensichtlich eine isolierte Störung des Galleflusses vor.

Der Gallefluss wird in eine gallensalzabhängige und -unabhängige Fraktion unterteilt. Der gallensalzunabhängige Gallefluss wird hauptsächlich durch ATP-abhängige Sekretion von Glutathion angetrieben. Von einer Behandlung mit Sirolimus bleibt die Synthese von Glutathion zwar unbeeinflusst, die mRNA für Mrp2, dem kanalikulären Transporter, über den Glutathion in die Galle ausgeschieden wird, nimmt jedoch geringfügig ab (Bramow *et al.* 2001). Da Mrp2 darüber hinaus auch als Transporter diverser Metaboliten der Phase-II-Reaktion, darunter Glutathion-Konjugate und direktes Bilirubin, fungiert, könnte die Herunterregulierung der Mrp2-Funktion zu einer Akkumulation potentiell toxischer Metabolite und zur Cholestase führen.

Sowohl bei Menschen als auch bei Ratten wird Sirolimus über die CYP3A-Familie metabolisiert (Sattler *et al.* 1992). Im Tierexperiment reduzieren sich die mRNA-Konzentrationen von CYP3A9, 1A2 und 2E1 nach Gabe von Sirolimus.

Dies kann zur Folge haben, dass die Synthese der Phase-I-Metaboliten und konsekutiv die Beladung kanalikulärer Transporter mit Metaboliten abnehmen, so dass es trotz regelrechter Glutathionsynthese zu einem verminderten Gallefluss kommen kann (Bramow *et al.* 2001). In einer Studie mit männlichen Wistar-Ratten konnte gezeigt werden, dass eine zweiwöchige Behandlung mit Sirolimus (1 mg/kg KG/d p.o.) den Gallefluss um zehn Prozent verringert, während sich die Serumkonzentrationen der Gallensalze oder des Bilirubins nicht oder nur

wenig ändern (Deters *et al.* 2002). Eine einmalige i.p.- Injektion mit 6 mg/kg KG Sirolimus hingegen verringerte den Gallefluss um 50% (Deters *et al.* 2001).

Die mittlerweile abgeschlossenen klinischen Studien über den Einsatz von mTOR-Inhibitoren bei ADPKD-Patienten liefern keinen Hinweis auf eine therapieassoziierte Cholestase. In einem (leber-)gesunden Organismus mag Sirolimus also nicht zu einer Cholestase führen - es ist aber durchaus vorstellbar, dass sie bei ARPKD-Patienten auftreten könnte, da hier der hepatobiliäre Phänotyp üblicherweise deutlich stärker ausgeprägt ist als bei der ADPKD.

Auffällig ist auch, dass sämtliche Todesfälle in der Therapiegruppe der PCK-Ratten auftraten. Diese signifikant höhere Mortalität erkrankter Tiere unter Sirolimustherapie wird in einigen vergleichbaren Studien mit Han:SPRD-Ratten bestätigt (Tao *et al.* 2005; Wahl *et al.* 2006; Zafar *et al.* 2009). Die in diesen Studien mit Sirolimus therapierten Tiere zeigten vor ihrem Tod keine Auffälligkeiten bezüglich ihres Aussehens oder Körpergewichts. Allen PCK-Ratten in der vorliegenden Studie hingegen war gemein, dass sie vor ihrem Tod ein struppiges Aussehen hatten und kontinuierlich an Gewicht verloren. Allerdings waren diese Anzeichen nicht so stark ausgeprägt, dass sie eine vorzeitige Tötung der Tiere (und damit die Gewinnung von Untersuchungsmaterial) gerechtfertigt hätten. Es bleibt daher offen, woran die PCK-Ratten in unserer Studie genau verstarben. Eine mögliche Ursache ist eine exazerbierte Cholestase (s.o.).

Sowohl bei PCK- als auch bei SD-Ratten kam es unter Therapie mit Sirolimus zu einer nicht signifikanten Reduktion des Körpergewichts, bei den PCK-Ratten auch zu einer Reduktion der mittleren Körperlänge. Dieses Ergebnis wird in hinsichtlich der Behandlungsdauer und -dosis vergleichbaren Studien mit Han:SD-Ratten bestätigt (Tao *et al.* 2005) bzw. widerlegt (Wahl *et al.* 2006). Bei Han:SPRD-Ratten kam es unter Langzeitbehandlung mit Sirolimus (0,2 mg/kg KG/d i.p., Behandlungsdauer 48 Wochen) zu einer signifikanten Gewichtsreduktion (Zafar *et al.* 2009). In Langzeitstudien mit nierentransplantierten Erwachsenen und Kindern ist diese unerwünschte Wirkung des Sirolimus nicht aufgetreten (Ettenger *et al.* 2001; Tejani *et al.* 2004).

Die unter Therapie mit Sirolimus signifikant höheren relativen Lungengewichte bei den PCK-Ratten, die sich tendenziell auch bei den SD-Ratten zeigten, könnten ein Hinweis auf entzündliche Prozesse oder Hämorrhagien sein. Die interstitielle Pneumonitis ist eine bekannte und häufige Komplikation der Sirolimustherapie bei transplantierten Patienten (Morcos *et al.* 2011; Lee *et al.* 2012).

Die Therapie mit Sirolimus hatte weder bei PCK- noch bei SD-Ratten einen signifikanten Einfluss auf den Blutdruck. In einer Langzeitstudie (48 Wochen) mit Han:SD-Ratten als Tiermodell der ADPKD hingegen konnte unter Therapie mit Sirolimus (0,2 mg/kg KG/d i.p.) eine signifikante Reduktion des mittleren Blutdrucks erreicht werden (Zafar *et al.* 2009). Die im vorliegenden Versuch gemessenen Blutdruckwerte der SD-Ratten stimmen gut mit den

Daten anderer Arbeitsgruppen zur Auswirkung einer Sirolimustherapie bei gesunden Ratten überein (Nielsen *et al.* 2003).

Bei den mit Sirolimus therapierten SD-Ratten zeigte sich keine Änderung des relativen Nierengewichts, während bei den PCK-Ratten eine deutliche, nach zwölf Wochen bei männlichen Tieren auch signifikante Reduktion dieses Parameters erreicht werden konnte (22,7% im Vergleich zur Kontrollgruppe). Die an Serumkreatinin und -harnstoff gemessene Nierenfunktion verschlechterte sich jedoch bei den männlichen PCK-Ratten durch die Gabe von Sirolimus leicht, während die der weiblichen PCK-Ratten konstant blieb.

Das Wachstum der Zysten und/oder die Progression der Fibrose blieben von der Behandlung unberührt. In einer vorangegangenen Studie mit Han:SPRD-Ratten rief eine vergleichbare Verabreichungsform und -dosis eine signifikante Reduktion des Nierengewichts und des Nierenzystenvolumens hervor. In derselben Studie wurde anhand eines Western Blots gezeigt, dass durch Sirolimus der relative Anteil der phosphorylierten (aktivierten) an der gesamten S6-Kinase in den Nieren reduziert werden konnte (Wahl *et al.* 2006). Auch in unserer Studie fanden sich in der immunhistochemischen Darstellung der mTOR-Signalkaskade in den Nieren der PCK-Ratten stärkere Signale für p-Akt, p-mTOR und p-S6-Kinase als in den Nieren der SD-Ratten. Bei den SD-Ratten führte die Behandlung mit Sirolimus nicht zu einer Veränderung des schwachen bis negativen Signals.

Entgegen der Erwartungen führte die Inhibition der mTOR-Aktivität mit Sirolimus jedoch auch bei den PCK-Ratten nicht zu einer verminderten mTOR-spezifischen Phosphorylierung der S6-Kinase in der Niere. Paradoxerweise fanden sich nach achtwöchiger Behandlungsdauer im gesunden Nierenparenchym sogar stärkere Signale als in der Kontrollgruppe, während sich in den Zystenepithelien und den Regionen beginnender Zystenentstehung keine regelhafte Änderung des p-S6-Kinasesignals abzeichnete. Parallel dazu kam es unter Therapie mit Sirolimus, gemessen an der Zahl BrdU-positiver Zellkerne, auch zu einer gesteigerten Proliferation in der Leber. Es wäre somit denkbar, dass die Aktivierung der S6-Kinase bei den PCK-Ratten auch über andere Signalmoleküle als die mTOR-Proteinkinase erfolgen kann. Diese könnten nach mTOR-Inhibition im Sinne eines Rebound-Phänomens „einspringen“, die nachgeschalteten Effektoren aktivieren und so das Wachstum der Zysten aufrecht erhalten bzw. die Proliferation sogar steigern (Renken *et al.* 2010).

Sowohl die eukaryotischen Initiationsfaktor 4E-bindenden Proteine als auch die S6-Kinase sind der Proteinkinase mTOR nachgelagerte Schlüsselregulatoren der Translation. Eine Aktivierung dieser Signalwege erfordert die Bildung des mTOR-raptor-Komplexes (mTORC1), dessen Aktivität durch Sirolimus inhibiert wird. Im Gegensatz dazu ist der aus mTOR und rictor bestehende mTORC2-Komplex für die Aktivierung von Akt zuständig. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Sirolimuskonzentration, die für eine Blockade der den jeweil-

igen Komplexen nachgeschalteten Signalkaskaden notwendig ist, sich um mehrere Größenordnungen unterscheidet (Foster *et al.* 2009).

Auch wenn noch nicht abschließend geklärt werden konnte, ob die Aktivität von mTOR für die Phosphorylierung der S6-Kinase erforderlich ist, wird die mTOR-spezifische Aktivierung der S6-Kinase für die Einschätzung der Effizienz einer Sirolimustherapie herangezogen (Wahl *et al.* 2006; Choo *et al.* 2009; Zafar *et al.* 2009). Unabhängig davon wäre es möglich, dass eine Blockade von mTOR durch Sirolimus mit konsekutiver Unterdrückung der S6K-Aktivität zu einer verminderten Inhibition der Insulin-like Growth-Factor Kaskade führt und sekundär die Aktivierung von Akt stimuliert. Weitere Interaktionen zwischen den mTORC1- und mTORC2-Signalkaskaden sind denkbar. Demnach könnten die in dieser Studie beobachteten eher marginalen Auswirkungen auf die Phosphorylierung der S6-Kinase im Zusammenspiel mit den starken Signalen für phosphoryliertes Akt ein Hinweis für alternative Aktivierungswege sein.

Abgesehen von einer bereits vor Beginn der Therapie sehr ausgeprägten Nephrofibrose können weitere Gründe für den ausgebliebenen therapeutischen Effekt von Sirolimus in Betracht gezogen werden: Die Art der Therapie könnte inadäquat und/oder die Dosierung unangebracht niedrig gewesen sein. Wie zuvor beschrieben, wurde Sirolimus über das Trinkwasser verabreicht um *i*) den Behandlungsstress der Tiere zu minimieren, da tägliche intraperitoneale Injektionen über vier Wochen oder länger nicht praktikabel sind und *ii*) konstante und nicht fluktuierende Serumspiegel zu erreichen (Wahl *et al.* 2006). Die im Rahmen dieser Studie erreichten Serumkonzentrationen von Sirolimus waren jedoch nicht nur unter PCK- und SD-Ratten, sondern auch mit denen vorangegangener Studien vergleichbar (Wahl *et al.* 2006).

Der enorme Anstieg der Serumkonzentration von Bilirubin bei mit Sirolimus behandelten Ratten und der unerwartete Tod bei fünf von 46 behandelten Tieren sprechen gegen eine Dosissteigerung in diesem Modell. Andererseits können diese Nebenwirkungen als Indikatoren für eine erfolgreiche Aufnahme des Medikaments aufgefasst werden. Folglich ist davon auszugehen, dass das Ausbleiben positiver Effekte nicht im Zusammenhang mit einem inadäquaten Therapieansatz zu sehen ist, sondern auf eine erworbene oder intrinsische Resistenz gegen Sirolimus hinweist.

Obwohl die Resistenz gegen Sirolimus eigentlich als typisches Merkmal maligner Erkrankungen und -Zelllinien gilt, wird sie auch im Zusammenhang mit nichtmalignen Erkrankungen erwähnt (Dilling *et al.* 2002; Kurmasheva *et al.* 2006; Lieberthal *et al.* 2006; Chaturvedi *et al.* 2009; Foster *et al.* 2009). Eine Langzeitexposition bei gesunden murinen proximalen Tubuluszellen hatte eine Resistenz gegen Sirolimus zur Folge, wohingegen nach Kurzzeitexposition (1 Tag vs. 7 Tage) eine merkliche Reduktion von Zellproliferation und Phosphorylierung der S6-Kinase zu verzeichnen war (Lieberthal *et al.* 2006; Lieberthal *et al.*

2009). Eine intraperitoneale Verabreichung von Sirolimus (etwa 0,2 mg/kg KG/d) bei SD-Ratten mit akutem Nierenversagen führte zwar zu einer verzögerten Erholung der Nieren, verhinderte sie aber nicht. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass gesunde Tubuluszellen in der Lage sind, sich einem durch Sirolimus induzierten Wachstumsarrest zu entziehen. Eben diese Fähigkeit könnte auch in den Tubuluszellen der PCK-Ratten erhalten sein.

Letztendlich könnte auch eine sirolimusabhängige Transaktivierung des EGF-Rezeptor-vermittelten Signalwegs involviert sein. Dieses Phänomen wurde erst kürzlich in Versuchen mit EFGR-exprimierenden Zellen (aortale glatte Gefäßmuskulzellen von Ratten bzw. Lungenfibroblasten von Mäusen) beschrieben (Chaturvedi *et al.* 2009). Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass die nicht mit Rezeptoren assoziierte Tyrosinkinase c-Src durch Sirolimus stimuliert wird und eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors induziert. Die Überexpression des EGF-Rezeptors wurde bereits früher in Tiermodellen der ARPKD nachgewiesen (Torres *et al.* 2004). Insofern ist es möglich, dass Sirolimus in der hier vorliegenden Studie zu einer Stimulation der EGFR-Signalkaskade und nicht, wie eigentlich beabsichtigt, zu einer Induktion des Zellzyklusarrests mit konsekutiver Verlangsamung des Krankheitsprogresses geführt hat.

Auch wenn es primär naheliegend erscheint, die Inhibition von mTOR mit Sirolimus für die Behandlung der ARPKD in Erwägung zu ziehen, zeigen unsere Ergebnisse, dass dieser Ansatz die Progression der Erkrankung bei PCK-Ratten nicht verhindert, sondern sogar zu erheblichen Nebenwirkungen führt. Ob dem ausbleibenden protektiven Effekt eine intrinsische oder eine erworbene Resistenz gegen Sirolimus zugrunde liegt, bleibt Gegenstand künftiger Forschung.

6 Zusammenfassung

Die ARPKD (autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung) ist eine seltene (1: 20.000) hereditäre Ziliopathie, die sich im frühen Kindesalter, häufig auch bereits perinatal manifestiert und mit einer hohen Mortalität einhergeht. Durch die fibrozystische Nierenerkrankung und obligate hepatobiliäre Dysgenese kommt es zu einem chronisch progredienten Verlust der Nieren- und Leberfunktion. Bis zu 50% der Betroffenen entwickeln bis zum zehnten Lebensjahr eine terminale Niereninsuffizienz. Bislang kann die ARPKD, abgesehen von einer Organtransplantation, nur symptomatisch behandelt werden.

Die Erkrankung beruht auf Mutationen des *PKHD1*-Gens, welches das zilienständige integrale Membranprotein Fibrozystin kodiert. Die Funktion des Fibrozystins ist unbekannt, es gibt jedoch strukturelle Hinweise auf eine Rolle in der Signaltransduktion. Außerdem ist es mit den Membranproteinen Polycystin 1 und 2, die bei der ADPKD (autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung) durch Mutation in den zuständigen Genen verändert sind, kolokalisiert. Eine funktionelle Interaktion dieser Membranproteine konnte nachgewiesen werden.

Unsere Voruntersuchungen konnten eine Aktivierung von mTOR in ARPKD-Nierenpräparaten und im Nierengewebe von PCK-Ratten, einem orthologen Tiermodell, zeigen. Diese Serin/Threoninkinase ist eine zentrale Schaltstelle für die Integration unterschiedlicher Signale (Verfügbarkeit von Energie und Nährstoffen, Sauerstoff, Stress- und Wachstumsfaktoren) und generiert eine adäquate zelluläre Reaktion, indem sie die Translation von Proteinen reguliert und so Zellwachstum und Zellzyklus steuert. Unter Therapie mit dem selektiven mTOR-Inhibitor Sirolimus, einem in der Transplantationsmedizin gut etablierten Wirkstoff, konnte in verschiedenen Nagetiermodellen der ADPKD der Progress der Erkrankung inhibiert werden. Ebenso wurde bei transplantierten ADPKD-Patienten unter Sirolimustherapie ein Schrumpfen der im Körper verbliebenen Zystennieren registriert.

In der vorliegenden Interventionsstudie wurden daher der therapeutische Effekt sowie das Nebenwirkungsprofil einer vier-, acht- und zwölfwöchigen Therapie mit Sirolimus bei der jungen, wachsenden PCK-Ratte und bei gesunden Kontrolltieren (SD-Ratten) untersucht. Zur Beurteilung der Nieren- und Lebererkrankung wurden Serum- und Urinparameter, Blutdruck sowie makro- (Aussehen, Gewichte und Längen der Tiere und ihrer Organe) und mikroskopische (Histologie, Immunhistochemie) Parameter herangezogen.

Im Laufe der Beobachtungszeit verstarben ausschließlich in der Therapiegruppe der PCK-Ratten fünf von 46 Tieren. Zysten und Fibrose der im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich vergrößerten Nieren und Lebern der PCK-Ratten waren bereits makroskopisch gut erkennbar. Mit Sirolimus therapierte Tiere waren etwas leichter als die Kontrolltiere.

Die Therapie mit Sirolimus hatte weder auf die Nierenfunktion, noch auf das Ausmaß der fibrozystischen Erkrankung in Niere und Leber einen nennenswerten Einfluss, wenngleich es

bei den männlichen PCK-Ratten nach zwölfwöchiger Therapie zu einer signifikanten Abnahme des Nierengewichtes kam. In der Immunhistochemie der Niere zeigte sich bei therapierten im Vergleich zu Kontrolltieren keine signifikante Abschwächung des Signals des mTOR-Zielproteins pS6K. Ursache dieser Ergebnisse könnte eine erworbene oder intrinsische Resistenz der PCK-Ratte gegenüber Sirolimus sein. Darüber hinaus wiesen die PCK-Ratten in dem vorliegenden Versuch eine vergleichsweise stärker ausgeprägte Nephrofibrose auf als PCK-Ratten in vergleichbaren Studien mit anderen Therapieansätzen. Eine Beeinflussung dieses Parameters in unserer Studie durch Sirolimus war also per se erschwert, da eine bereits bestehende Fibrose durch einen Proliferationshemmer nicht mehr therapiert werden kann.

Überraschenderweise kam es unter Therapie mit Sirolimus bei männlichen PCK-Ratten zu einer schweren Cholestase mit im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikanten Erhöhungen des direkten Bilirubins ($3,3 \pm 2,4$ mg/dl vs. $0,13 \pm 0,12$ mg/dl) und der Gallensäuren (104 ± 6 μ mol/l vs. 38 ± 20 μ mol/l) im Serum. Dieser Effekt trat, wenngleich nicht signifikant, auch bei weiblichen PCK-Ratten auf. Daraus folgt, dass die Substanz bei allen therapierten Tieren intestinal aufgenommen wurde.

Aufgrund der ausbleibenden therapeutischen Wirkung, insbesondere auch aufgrund der oben beschriebenen unerwünschten Nebenwirkung ist zu vermuten, dass Sirolimus für die Therapie hepatisch erkrankter Individuen und damit auch für den Einsatz bei der ARPKD ungeeignet ist.

7 Thesen

1. Die ARPKD ist durch progredienten Verlust der Nieren- und Leberfunktion im frühen Kindesalter gekennzeichnet und kann bislang nur symptomatisch oder durch Organtransplantation therapiert werden. Sie wird durch Mutation des *PKHD1*-Gens verursacht, welches das Membranprotein Fibrozystin kodiert. In den betroffenen Organen kommt es zu einer Aktivierung der Proteinkinase mTOR, die durch Sirolimus selektiv inhibiert werden kann.
2. Mit der PCK-Ratte steht ein orthologes Tiermodell der ARPKD zur Verfügung, an dem in dieser Studie der Versuch einer Intervention mit Sirolimus unternommen wurde.
3. Die Aktivierung von mTOR und der nachgeschalteten Signalkaskade (Akt, S6-Kinase) im Nierengewebe der PCK-Ratten konnte immunhistochemisch nachgewiesen werden.
4. Die PCK-Ratten in unserem Versuch stammen aus Mannheim und wiesen im Vergleich zu den in Amerika weiterentwickelten PCK-Ratten eine schwerer ausgeprägte Nephrofibrose auf, die jedoch, gemessen an Kreatinin und Harnstoff im Serum, nicht mit einer schlechteren Nierenfunktion assoziiert war.
5. Die Therapie mit Sirolimus führte bei den PCK-Ratten in unserer Studie nicht zu einer Regression der fibrozystischen Leber- und Nierenerkrankung. Lediglich das relative Nierengewicht nahm nach zwölfwöchiger Therapie bei männlichen PCK-Ratten signifikant ab.
6. Fünf von 46 mit Sirolimus behandelten PCK-Ratten verstarben aus ungeklärten Gründen. Vor ihrem Tod fielen diese Tiere lediglich durch geminderte Vitalität und Gewichtsverlust auf. Keine der unbehandelten PCK-Ratten bzw. der Kontrolltiere (SD-Ratten mit und ohne Sirolimus-Behandlung) verstarb vor dem Versuchsende.
7. Unter Therapie mit Sirolimus kam es bei den PCK-Ratten, vor allem bei männlichen Individuen, zu einer teils schweren Cholestase mit Erhöhung insbesondere des direkten Bilirubins und der Gallensäuren im Serum. Bei den gesunden Kontrolltieren trat dieser Effekt nicht auf.
8. Da Sirolimus den Krankheitsprogress nicht aufhalten konnte und es im Nierengewebe zu keiner signifikanten Abschwächung des Signals der durch mTOR aktivierten S6-Kinase kam, ist von einer intrinsischen oder erworbenen Resistenz der PCK-Ratte gegenüber der Substanz auszugehen.

9. Die von uns gewählte Dosierung von Sirolimus führte bei ausbleibendem therapeutischen Effekt bereits zu erheblichen Nebenwirkungen. Eine Steigerung der Dosis wäre somit selbstlimitierend.
10. Die mit Sirolimus assoziierte Cholestase, die bei hepatisch vorgeschädigten Versuchstieren beobachtet wurde, könnte auch bei ARPKD-Patienten auftreten.

8 Literatur

- Bergmann, C, Frank, V, Kupper, F, Kamitz, D, Hanten, J, Berges, P, Mager, S, Moser, M, Kirfel, J, Buttner, R, Senderek, J and Zerres, K (2006). Diagnosis, pathogenesis, and treatment prospects in cystic kidney disease. *Mol Diagn Ther* 10(3): 163-74.
- Bergmann, C, Senderek, J, Windelen, E, Kupper, F, Middeldorf, I, Schneider, F, Dornia, C, Rudnik-Schoneborn, S, Konrad, M, Schmitt, CP, Seeman, T, Neuhaus, TJ, Vester, U, Kirfel, J, Buttner, R and Zerres, K (2005). Clinical consequences of PKHD1 mutations in 164 patients with autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Kidney Int* 67(3): 829-48.
- Bramow, S, Ott, P, Thomsen Nielsen, F, Bangert, K, Tygstrup, N and Dalhoff, K (2001). Cholestasis and regulation of genes related to drug metabolism and biliary transport in rat liver following treatment with cyclosporine A and sirolimus (Rapamycin). *Pharmacol Toxicol* 89(3): 133-9.
- Camardo, J (2003). The Rapamune era of immunosuppression 2003: the journey from the laboratory to clinical transplantation. *Transplant Proc* 35(3 Suppl): 18S-24S.
- Cantiello, HF (2004). Regulation of calcium signaling by polycystin-2. *Am J Physiol Renal Physiol* 286(6): F1012-29.
- Chaturvedi, D, Gao, X, Cohen, MS, Taunton, J and Patel, TB (2009). Rapamycin induces transactivation of the EGFR and increases cell survival. *Oncogene* 28(9): 1187-96.
- Choo, AY and Blenis, J (2009). Not all substrates are treated equally: implications for mTOR, rapamycin-resistance and cancer therapy. *Cell Cycle* 8(4): 567-72.
- Cowley, BD, Jr. (2008). Calcium, cyclic AMP, and MAP kinases: dysregulation in polycystic kidney disease. *Kidney Int* 73(3): 251-3.
- Desmet, VJ (1992). Congenital diseases of intrahepatic bile ducts: variations on the theme "ductal plate malformation". *Hepatology* 16(4): 1069-83.
- Deters, M, Klabunde, T, Kirchner, G, Resch, K and Kaefer, V (2002). Sirolimus/cyclosporine/tacrolimus interactions on bile flow and biliary excretion of immunosuppressants in a subchronic bile fistula rat model. *Br J Pharmacol* 136(4): 604-12.
- Deters, M, Nolte, K, Kirchner, G, Resch, K and Kaefer, V (2001). Comparative study analyzing effects of sirolimus-cyclosporin and sirolimus-tacrolimus combinations on bile flow in the rat. *Dig Dis Sci* 46(10): 2120-6.
- DiJoseph, JF, Sharma, RN and Chang, JY (1992). The effect of rapamycin on kidney function in the Sprague-Dawley rat. *Transplantation* 53(3): 507-13.
- Dilling, MB, Germain, GS, Dudkin, L, Jayaraman, AL, Zhang, X, Harwood, FC and Houghton, PJ (2002). 4E-binding proteins, the suppressors of eukaryotic initiation factor 4E, are down-regulated in cells with acquired or intrinsic resistance to rapamycin. *J Biol Chem* 277(16): 13907-17.
- Dressler, GR (2006). The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 509-29.
- Ettenger, RB and Grimm, EM (2001). Safety and efficacy of TOR inhibitors in pediatric renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 38(4 Suppl 2): S22-8.
- Fischer, D and Haffner (2010). Zystische Nierenerkrankungen im Kindesalter. *Nephrologe* 5: 384-395.
- Fischer, DC, Jacoby, U, Pape, L, Ward, CJ, Kuwertz-Broeking, E, Renken, C, Nizze, H, Querfeld, U, Rudolph, B, Mueller-Wiefel, DE, Bergmann, C and Haffner, D (2009). Activation of the AKT/mTOR pathway in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Nephrol Dial Transplant* 24(6): 1819-27.

- Foster, DA and Toschi, A (2009). Targeting mTOR with rapamycin: one dose does not fit all. *Cell Cycle* 8(7): 1026-9.
- Gattone, VH, 2nd, Wang, X, Harris, PC and Torres, VE (2003). Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Nat Med* 9(10): 1323-6.
- Gunay-Aygun, M (2009). Liver and kidney disease in ciliopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 151C(4): 296-306.
- Harris, PC and Torres, VE (2009). Polycystic kidney disease. *Annu Rev Med* 60: 321-37.
- Hartford, CM and Ratain, MJ (2007). Rapamycin: something old, something new, sometimes borrowed and now renewed. *Clin Pharmacol Ther* 82(4): 381-8.
- Hay, N and Sonenberg, N (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18(16): 1926-45.
- Hermanns, B, Alfer, J, Fishedick, K, Stojanovic-Dedic, A, Rudnik-Schoneborn, S, Buttner, R and Zerres, K (2003). [Pathology and genetic hereditary kidney cysts]. *Pathologe* 24(6): 410-20.
- Hiesberger, T, Gourley, E, Erickson, A, Koulen, P, Ward, CJ, Masyuk, TV, Larusso, NF, Harris, PC and Igarashi, P (2006). Proteolytic cleavage and nuclear translocation of fibrocystin is regulated by intracellular Ca²⁺ and activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 281(45): 34357-64.
- Hildebrandt, F, Benzing, T and Katsanis, N (2011). Ciliopathies. *N Engl J Med* 364(16): 1533-43.
- Hildebrandt, F and Otto, E (2005). Cilia and centrosomes: a unifying pathogenic concept for cystic kidney disease? *Nat Rev Genet* 6(12): 928-40.
- Inoki, K, Corradetti, MN and Guan, KL (2005). Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet* 37(1): 19-24.
- Kahan, BD (2001). Sirolimus: a comprehensive review. *Expert Opin Pharmacother* 2(11): 1903-17.
- Kaimori, JY, Nagasawa, Y, Menezes, LF, Garcia-Gonzalez, MA, Deng, J, Imai, E, Onuchic, LF, Guay-Woodford, LM and Germino, GG (2007). Polyductin undergoes notch-like processing and regulated release from primary cilia. *Hum Mol Genet* 16(8): 942-56.
- 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): 51-5.
- Kim, I, Fu, Y, Hui, K, Moeckel, G, Mai, W, Li, C, Liang, D, Zhao, P, Ma, J, Chen, XZ, George, AL, Jr., Coffey, RJ, Feng, ZP and Wu, G (2008a). Fibrocystin/polyductin modulates renal tubular formation by regulating polycystin-2 expression and function. *J Am Soc Nephrol* 19(3): 455-68.
- Kim, I, Li, C, Liang, D, Chen, XZ, Coffey, RJ, Ma, J, Zhao, P and Wu, G (2008b). Polycystin-2 expression is regulated by a PC2-binding domain in the intracellular portion of fibrocystin. *J Biol Chem* 283(46): 31559-66.
- Kurmasheva, RT, Huang, S and Houghton, PJ (2006). Predicted mechanisms of resistance to mTOR inhibitors. *Br J Cancer* 95(8): 955-60.
- Lager, DJ, Qian, Q, Bengal, RJ, Ishibashi, M and Torres, VE (2001). The pck rat: a new model that resembles human autosomal dominant polycystic kidney and liver disease. *Kidney Int* 59(1): 126-36.
- Lee, HS, Huh, KH, Kim, YS, Kim, MS, Kim, HJ, Kim, SI and Joo, DJ (2012). Sirolimus-induced pneumonitis after renal transplantation: a single-center experience. *Transplant Proc* 44(1): 161-3.

- Lieberthal, W, Fuhro, R, Andry, C, Patel, V and Levine, JS (2006). Rapamycin delays but does not prevent recovery from acute renal failure: role of acquired tubular resistance. *Transplantation* 82(1): 17-22.
- Lieberthal, W and Levine, JS (2009). The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 20(12): 2493-502.
- Lloberas, N, Cruzado, JM, Franquesa, M, Herrero-Fresneda, I, Torras, J, Alperovich, G, Rama, I, Vidal, A and Grinyo, JM (2006). Mammalian target of rapamycin pathway blockade slows progression of diabetic kidney disease in rats. *J Am Soc Nephrol* 17(5): 1395-404.
- Masyuk, AI, Masyuk, TV and LaRusso, NF (2008). Cholangiocyte primary cilia in liver health and disease. *Dev Dyn* 237(8): 2007-12.
- Masyuk, TV, Huang, BQ, Masyuk, AI, Ritman, EL, Torres, VE, Wang, X, Harris, PC and Larusso, NF (2004). Biliary dysgenesis in the PCK rat, an orthologous model of autosomal recessive polycystic kidney disease. *Am J Pathol* 165(5): 1719-30.
- Masyuk, TV, Huang, BQ, Ward, CJ, Masyuk, AI, Yuan, D, Splinter, PL, Punyashthiti, R, Ritman, EL, Torres, VE, Harris, PC and LaRusso, NF (2003). Defects in cholangiocyte fibrocystin expression and ciliary structure in the PCK rat. *Gastroenterology* 125(5): 1303-10.
- Menezes, LF, Cai, Y, Nagasawa, Y, Silva, AM, Watkins, ML, Da Silva, AM, Somlo, S, Guay-Woodford, LM, Germino, GG and Onuchic, LF (2004). Polyductin, the PKHD1 gene product, comprises isoforms expressed in plasma membrane, primary cilium, and cytoplasm. *Kidney Int* 66(4): 1345-55.
- Mochizuki, T, Wu, G, Hayashi, T, Xenophontos, SL, Veldhuisen, B, Saris, JJ, Reynolds, DM, Cai, Y, Gabow, PA, Pierides, A, Kimberling, WJ, Breuning, MH, Deltas, CC, Peters, DJ and Somlo, S (1996). PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272(5266): 1339-42.
- Morcos, A, Nair, S, Keane, MP, McElvaney, NG and McCormick, PA (2011). Interstitial pneumonitis is a frequent complication in liver transplant recipients treated with sirolimus. *Ir J Med Sci*.
- Muff, MA, Masyuk, TV, Stroope, AJ, Huang, BQ, Splinter, PL, Lee, SO and Larusso, NF (2006). Development and characterization of a cholangiocyte cell line from the PCK rat, an animal model of Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease. *Lab Invest* 86(9): 940-50.
- Nagano, J, Kitamura, K, Hujer, KM, Ward, CJ, Bram, RJ, Hopfer, U, Tomita, K, Huang, C and Miller, RT (2005). Fibrocystin interacts with CAML, a protein involved in Ca²⁺ signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 338(2): 880-9.
- Nauli, SM, Alenghat, FJ, Luo, Y, Williams, E, Vassilev, P, Li, X, Elia, AE, Lu, W, Brown, EM, Quinn, SJ, Ingber, DE and Zhou, J (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 33(2): 129-37.
- Nielsen, FT, Ottosen, P, Starklint, H and Dieperink, H (2003). Kidney function and morphology after short-term combination therapy with cyclosporine A, tacrolimus and sirolimus in the rat. *Nephrol Dial Transplant* 18(3): 491-6.
- Onuchic, LF, Furu, L, Nagasawa, Y, Hou, X, Eggermann, T, Ren, Z, Bergmann, C, Senderek, J, Esquivel, E, Zeltner, R, Rudnik-Schoneborn, S, Mrug, M, Sweeney, W, Avner, ED, Zerres, K, Guay-Woodford, LM, Somlo, S and Germino, GG (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): 1305-17.
- Panel, VPBMShGAMA. (2010). "National PBM Drug Monograph ", from <http://www.pbm.va.gov/DrugMonograph.aspx>.

- Perico, N, Antiga, L, Caroli, A, Ruggenti, P, Fasolini, G, Cafaro, M, Ondei, P, Rubis, N, Diadei, O, Gherardi, G, Prandini, S, Panozo, A, Bravo, RF, Carminati, S, De Leon, FR, Gaspari, F, Cortinovis, M, Motterlini, N, Ene-Iordache, B, Remuzzi, A and Remuzzi, G (2010). Sirolimus therapy to halt the progression of ADPKD. *J Am Soc Nephrol* 21(6): 1031-40.
- Ponticelli, C and Locatelli, F (2010). Autosomal dominant polycystic kidney disease and mTOR inhibitors: the narrow road between hope and disappointment. *Nephrol Dial Transplant* 25(12): 3809-12.
- Reiling, JH and Sabatini, DM (2006). Stress and mTOR signaling. *Oncogene* 25(48): 6373-83.
- Renken, C, Fischer, DC, Kundt, G, Gretz, N and Haffner, D (2010). Inhibition of mTOR with sirolimus does not attenuate progression of liver and kidney disease in PCK rats. *Nephrol Dial Transplant* 26(1): 92-100.
- Sato, Y, Harada, K, Furubo, S, Kizawa, K, Sanzen, T, Yasoshima, M, Ozaki, S, Isse, K, Sasaki, M and Nakanuma, Y (2006). Inhibition of intrahepatic bile duct dilation of the polycystic kidney rat with a novel tyrosine kinase inhibitor gefitinib. *Am J Pathol* 169(4): 1238-50.
- Sattler, M, Guengerich, FP, Yun, CH, Christians, U and Sewing, KF (1992). Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat. *Drug Metab Dispos* 20(5): 753-61.
- Segerer, S and Meister, P (1998). [Acquired, cystic kidney disease in chronic dialysis patients: a retrospective study of 125 autopsies. 1: Cysts]. *Pathologe* 19(4): 292-8.
- Sehgal, SN (2003). Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* 35(3 Suppl): 7S-14S.
- Serra, AL, Poster, D, Kistler, AD, Krauer, F, Raina, S, Young, J, Rentsch, KM, Spanaus, KS, Senn, O, Kristanto, P, Scheffel, H, Weishaupt, D and Wuthrich, RP (2010). Sirolimus and kidney growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 363(9): 820-9.
- Shillingford, JM, Murcia, NS, Larson, CH, Low, SH, Hedgepeth, R, Brown, N, Flask, CA, Novick, AC, Goldfarb, DA, Kramer-Zucker, A, Walz, G, Piontek, KB, Germino, GG 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): 5466-71.
- Shneider, BL and Magid, MS (2005). Liver disease in autosomal recessive polycystic kidney disease. *Pediatr Transplant* 9(5): 634-9.
- Sweeney, WE, Jr. and Avner, ED (2006). Molecular and cellular pathophysiology of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Cell Tissue Res* 326(3): 671-85.
- Sweeney, WE, Jr., von Vigier, RO, Frost, P and Avner, ED (2008). Src inhibition ameliorates polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 19(7): 1331-41.
- Tao, Y, Kim, J, Schrier, RW and Edelstein, CL (2005). Rapamycin markedly slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 16(1): 46-51.
- Tejani, A, Alexander, S, Ettenger, R, Lerner, G, Zimmerman, J, Kohaut, E and Briscoe, DM (2004). Safety and pharmacokinetics of ascending single doses of sirolimus (Rapamune, rapamycin) in pediatric patients with stable chronic renal failure undergoing dialysis. *Pediatr Transplant* 8(2): 151-60.
- Torres, VE, Sweeney, WE, Jr., Wang, X, Qian, Q, Harris, PC, Frost, P and Avner, ED (2004). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition is not protective in PCK rats. *Kidney Int* 66(5): 1766-73.

- Veland, IR, Awan, A, Pedersen, LB, Yoder, BK and Christensen, ST (2009). Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease. *Nephron Physiol* 111(3): p39-53.
- Wahl, PR, Le Hir, M, Vogetseder, A, Arcaro, A, Starke, A, Waeckerle-Men, Y, Serra, AL and Wuthrich, RP (2007). Mitotic activation of Akt signalling pathway in Han:SPRD rats with polycystic kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 12(4): 357-63.
- Wahl, PR, Serra, AL, Le Hir, M, Molle, KD, Hall, MN and Wuthrich, RP (2006). Inhibition of mTOR with sirolimus slows disease progression in Han:SPRD rats with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Nephrol Dial Transplant* 21(3): 598-604.
- Walz, G (2006). Therapeutic approaches in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): is there light at the end of the tunnel? *Nephrol Dial Transplant* 21(7): 1752-7.
- Walz, G, Budde, K, Mannaa, M, Nurnberger, J, Wanner, C, Sommerer, C, Kunzendorf, U, Banas, B, Horl, WH, Obermuller, N, Arns, W, Pavenstadt, H, Gaedeke, J, Buchert, M, May, C, Gschaidmeier, H, Kramer, S and Eckardt, KU (2010). Everolimus in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 363(9): 830-40.
- Wang, S, Luo, Y, Wilson, PD, Witman, GB and Zhou, J (2004). The autosomal recessive polycystic kidney disease protein is localized to primary cilia, with concentration in the basal body area. *J Am Soc Nephrol* 15(3): 592-602.
- Wang, S, Zhang, J, Nauli, SM, Li, X, Starremans, PG, Luo, Y, Roberts, KA 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): 3241-52.
- Wang, X and Proud, CG (2006). The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)* 21: 362-9.
- Ward, CJ, Hogan, MC, Rossetti, S, Walker, D, Sneddon, T, Wang, X, Kubly, V, Cunningham, JM, Bacallao, R, Ishibashi, M, Milliner, DS, Torres, VE and Harris, PC (2002). The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet* 30(3): 259-69.
- Ward, CJ, Yuan, D, Masyuk, TV, Wang, X, Punyashtiti, R, Whelan, S, Bacallao, R, Torra, R, LaRusso, NF, Torres, VE and Harris, PC (2003). Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Hum Mol Genet* 12(20): 2703-10.
- Watnick, T and Germino, GG (2010). mTOR inhibitors in polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 363(9): 879-81.
- Wilson, PD (2004). Polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 350(2): 151-64.
- Woollard, JR, Punyashtiti, R, Richardson, S, Masyuk, TV, Whelan, S, Huang, BQ, Lager, DJ, vanDeursen, J, Torres, VE, Gattone, VH, LaRusso, NF, Harris, PC and Ward, CJ (2007). A mouse model of autosomal recessive polycystic kidney disease with biliary duct and proximal tubule dilatation. *Kidney Int* 72(3): 328-36.
- Wu, Y, Dai, XQ, Li, Q, Chen, CX, Mai, W, Hussain, Z, Long, W, Montalbetti, N, Li, G, Glynne, R, Wang, S, Cantiello, HF, Wu, G and Chen, XZ (2006). Kinesin-2 mediates physical and functional interactions between polycystin-2 and fibrocystin. *Hum Mol Genet* 15(22): 3280-92.
- Wullschleger, S, Loewith, R and Hall, MN (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124(3): 471-84.
- Zafar, I, Belibi, FA, He, Z and Edelstein, CL (2009). Long-term rapamycin therapy in the Han:SPRD rat model of polycystic kidney disease (PKD). *Nephrol Dial Transplant* 24(8): 2349-53.

- Zerres, K, Mucher, G, Becker, J, Steinkamm, C, Rudnik-Schoneborn, S, Heikkila, P, Rapola, J, Salonen, R, Germino, GG, Onuchic, L, Somlo, S, Avner, ED, Harman, LA, Stockwin, JM and Guay-Woodford, LM (1998). Prenatal diagnosis of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD): molecular genetics, clinical experience, and fetal morphology. *Am J Med Genet* 76(2): 137-44.
- Zerres, K, Rudnik-Schoneborn, S, Senderek, J, Eggermann, T and Bergmann, C (2003). Autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *J Nephrol* 16(3): 453-8.
- Zhang, Q, Taulman, PD and Yoder, BK (2004). Cystic kidney diseases: all roads lead to the cilium. *Physiology (Bethesda)* 19: 225-30.