

Diplomarbeit

**Der mTOR-Signalweg in chronisch cholestatischen
Lebererkrankungen**

eingereicht von

Aitak Farzi

Mat.Nr.: 0312759

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

**Klinischen Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie /
Universitätsklinik für Innere Medizin**

unter der Anleitung von

Univ. Prof. Dr. Michael Trauner

Graz, am 14. 07. 2009

.....

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 14. 07. 2009

(Aitak Farzi)

Vorwort

Aus Gründen der leichteren Lesbarkeit – vor allem in Hinblick auf die Vermeidung einer ausufernden Verwendung von Pronomen – habe ich mich dazu entschlossen, alle geschlechtsbezogenen Wörter nur in eingeschlechtlicher Form – der deutschen Sprache gemäß zumeist die männliche – zu verwenden. Selbstredend gelten alle Bezeichnungen gleichwertig für Frauen.

Danksagungen

An dieser Stelle bedanke ich mich bei all jenen Personen, die mich bei der Durchführung der Diplomarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Univ. Prof. Dr. Michael Trauner, der es mir ermöglicht hat, an der Universitätsklinik für Innere Medizin meine Diplomarbeit zu verfassen.

Weiters möchte ich mich bei Univ.-Doz. Dr. Peter Fickert für die Korrekturen und die Hilfe bei der Auswertung der histologischen Schnitte bedanken.

Danke auch an Mag. rer. nat. Tarek Moustafa für die Betreuung während der gesamten Arbeit.

Ein herzlicher Dank ergeht auch an Dagmar Silbert für ihre Hilfe bei der Laborarbeit. Durch die freundliche Atmosphäre hat das gemeinsame Arbeiten sehr viel Spaß gemacht.

Über diese Arbeit hinaus gebührt meiner Familie und meinen Freunden ein spezieller Dank.

Ich bedanke mich herzlich bei Univ. Ass. Mag. Dr. Nassim Ghaffari-Tabrizi für die Unterstützung. Vielen Dank auch an Michael Eisl für die Hilfe bei der statistischen Auswertung und Gerald Schreiner für das Korrekturlesen.

Zu guter Letzt möchte ich besonders meiner Mutter danken, die mir mit all ihrer Kraft und Liebe meinen Weg geebnet hat.

Zusammenfassung

HINTERGRUND: Chronisch cholestatische Lebererkrankungen sind eine wichtige Ursache der Leberfibrose, für die es bislang keine adäquaten medikamentösen Therapiemöglichkeiten gibt.

Die Kinase "Mammalian Target of Rapamycin" (mTOR) und ihr Signalweg spielen eine wichtige Rolle für das Zellwachstum und die Zellproliferation. mTOR ist auch für die Proliferation hepatischer Sternzellen ausschlaggebend, die durch die gesteigerte Produktion von Kollagen die hauptverantwortlichen Zellen für die Entstehung der Leberfibrose sind.

Das lipophile Makrolid Rapamycin ist in der Lage einige Funktionen von mTOR zu hemmen und weist daher antiproliferative Eigenschaften auf. In verschiedenen Tiermodellen der Leberfibrose gelang es bereits antifibrotische Wirkungen von Rapamycin nachzuweisen. Jedoch gibt es bislang keine Daten bezüglich der Wirkung von Rapamycin in Tiermodellen für eine sklerosierende Cholangitis. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung der Hemmung des mTOR-Signalweges durch Rapamycin in *Mdr2* (*Abcb4*) Knockout Mäusen, einem etablierten Tiermodell für eine chronisch cholestatische Lebererkrankung (Cholangiopathie), zu untersuchen, welche auch für die Testung antifibrotischer Medikamente sehr geeignet sind.

METHODEN: Das Ausmaß der Leberschädigung der *Mdr2* Knockout Mäuse wurde anhand der Leberlaborparameter Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Alkalische Phosphatase (AP) und dem totalen Bilirubin bestimmt. Die Leber- und Körpergewichtsrelation der beiden Versuchsgruppen wurde verglichen, um die Wirkung von Rapamycin auf die Hepatomegalie der Mäuse zu untersuchen. Zusätzlich wurde die Leber-Histologie der Versuchstiere anhand einer Hämatoxylin- und Eosin-Färbung untersucht, zudem wurden weiterführende immunhistochemische Untersuchungen für CD 11b (Marker für neutrophile Granulozyten), Cytokeratin 19 (CK 19, Marker für Gallengangsepithelzellen) und das ribosomale Protein S6 (RPS6, Effektorprotein des mTOR-Signalweges) durchgeführt. Die Quantifizierung der Genexpression von F4/80 (Marker für Makrophagen) und des Monozyten-chemotaktischen Proteins 1 (MCP-1, Entzündungsmarker) mittels der Real-Time PCR bestimmt. Die hepatischen Proteinspiegel von CK 19 und pRPS6 wurden mittels Western Blotting bestimmt.

ERGEBNISSE: Durch die Behandlung mit Rapamycin wurde der mTOR-Signalweg in *Mdr2* Knockout Mäusen gehemmt, was zu einer fehlenden Phosphorylierung des mTOR Substrates RPS6 führte. Die Hemmung des mTOR-Signalweges hatte aber keinen signifikanten Einfluss auf den cholestatischen Phänotyp und die biliäre Fibrose der Versuchstiere. Vielmehr waren die GPT-, AP- und Gesamtbilirubin-Werte, sowie die Anzahl der Makrophagen in der behandelten Gruppe erhöht.

SCHLUSSFOLGERUNG: Die Hemmung des mTOR-Signalweges hat keinen hemmenden Effekt auf die Progression der Fibrose im *Mdr2* Knockout-Mausmodell. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass der mTOR-Signalweg keine zentrale Bedeutung in der Pathogenese der Fibrose in diesem Modell hat.

SCHLÜSSELBEGRIFFE: Leberfibrose; *Mdr2* Knockout Maus; mTOR; Rapamycin

Abstract

BACKGROUND: Chronic cholestatic liver injuries often cause liver fibrosis which cannot yet be treated efficiently with drugs.

The kinase “mammalian target of rapamycin” (mTOR) and its signaling pathway play a pivotal role in cell growth and proliferation. mTOR has also been implicated in proliferation of hepatic stellate cells, which are the primary cell type responsible for liver fibrosis through increased synthesis of collagen.

The lipophilic macrolide rapamycin has antiproliferative properties by inhibiting some of mTOR’s functions. Rapamycin has already been shown to have some antifibrotic effects in different *in vivo* animal models of hepatic fibrosis, but so far no data in animal models of sclerosing cholangitis are available.

Our aim was to characterize the effects of mTOR inhibition by rapamycin in *Mdr2* (*Abcb4*) knockout mice, a well-established *in vivo* model of chronic cholestatic liver injuries and for the testing of potential antifibrotic agents.

METHODS: We quantified glutamic pyruvic transaminase (GPT), alkaline phosphatase (AP) and total bilirubin, which are laboratory parameters of liver function, to detect the degree of liver injury. The liver to body weight ratio of the two experimental groups was compared to analyze rapamycin’s effect on hepatomegaly of these mice. Additionally, liver histology of the mice was analyzed using the H&E staining for conventional light microscopy and continuative immunohistochemical analysis for CD 11b (marker for neutrophil granulocytes), cytokeratin 19 (CK 19, marker for biliary epithelial cells) and ribosomal protein S6 (RPS6, downstream target of mTOR signaling) were preformed. We used real-time PCR to quantify the gene expression of F4/80 (marker for macrophages) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1, inflammatory marker) and analyzed the hepatic protein levels of CK 19 and pRPS6 by western blotting.

RESULTS: mTOR signaling was inhibited by rapamycin in *Mdr2* knockout mice resulting in the absent phosphorylation of mTOR’s downstream target RPS6.

However, mTOR inhibition did not show a significant effect on the cholestatic phenotype and the biliary fibrosis of the laboratory animals. Furthermore the levels of GPT, AP and total bilirubin and the number of macrophages were elevated in the rapamycin treated group.

CONCLUSIONS: mTOR inhibition does not reverse the fibrosis of *Mdr2* knockout mice. These results indicate that mTOR signaling does not play a crucial role in the fibrogenesis in this model.

KEYWORDS: liver fibrosis; *Mdr2* knockout mouse; mTOR; rapamycin

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------|
| Vorwort..... | ii |
| Danksagungen..... | iii |
| Zusammenfassung..... | iv |
| Abstract..... | vi |
| Inhaltsverzeichnis..... | viii |
| Glossar und Abkürzungen..... | xi |
| Abbildungsverzeichnis..... | xiv |
| Tabellenverzeichnis..... | xvi |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Chronisch cholestatische Lebererkrankungen..... | 1 |
| 1.1.1 Die kanalikuläre Phospholipid-Exportpumpe MDR3..... | 2 |
| 1.1.2 Auswirkungen von <i>MDR3</i> Genmutationen..... | 3 |
| 1.2 Die primär sklerosierende Cholangitis..... | 4 |
| 1.2.1 Histologie der PSC..... | 4 |
| 1.3 Die Fibrose bei chronisch cholestatischen Lebererkrankungen..... | 6 |
| 1.3.1 Die Entstehung der Fibrose..... | 7 |
| 1.3.2 Aktivierung von Sternzellen..... | 8 |
| 1.3.3 Molekulare Mechanismen der Leberfibrose..... | 10 |
| 1.4 Detaillierte Charakterisierung der cholestatischen Leberschäden der <i>Mdr2</i> Knockout Maus..... | 13 |
| 1.4.1 Frühzeitige Veränderungen..... | 13 |
| 1.4.2 Veränderungen der Spätphase..... | 13 |
| 1.4.3 Die Cholangiopathie der <i>Mdr2^{-/-}</i> Maus..... | 14 |
| 1.4.4 Entstehung der periduktalen Fibrose..... | 14 |
| 1.4.5 Das entzündliche Infiltrat..... | 15 |
| 1.4.6 Beteiligung von Zyto- und Chemokinen..... | 15 |
| 1.4.7 Zeitlicher Verlauf der Genexpression in der <i>Mdr2</i> Knockout Maus..... | 16 |
| 1.5 mTOR – Mammalian Target of Rapamycin..... | 17 |
| 1.5.1 Zellwachstum und Proliferation..... | 17 |
| 1.5.2 Der Zellzyklus..... | 18 |
| 1.5.3 Aufbau von mTOR..... | 19 |
| 1.5.4 Die zwei mTOR Komplexe..... | 20 |

| | | |
|----------------------------|--|----|
| 1.5.5 | Die Hemmung von mTOR..... | 21 |
| 1.5.6 | Die Aktivierung von mTOR | 22 |
| 1.5.7 | mTORs Einfluss auf die Translation..... | 23 |
| 1.5.8 | mTORs Einfluss auf die Transkription..... | 24 |
| 1.5.9 | mTOR-Substrate..... | 25 |
| 1.5.10 | Folgen der Entgleisung des mTOR-Signalweges | 31 |
| 1.6 | Rapamycin | 32 |
| 1.6.1 | Unterschiedliche Wirkung von Rapamycin gegenüber S6K und 4E-BP1 | 33 |
| 1.7 | Der mTOR-Signalweg und die Leberfibrose | 35 |
| 1.7.1 | Die antifibrotische Wirkung von Rapamycin..... | 35 |
| 1.7.2 | <i>In vitro</i> Experimente | 35 |
| 1.7.3 | <i>In vivo</i> Experimente | 37 |
| 1.8 | Ziel dieser Arbeit | 42 |
| Material und Methoden..... | | 43 |
| 1.9 | Tiere..... | 43 |
| 1.10 | Rapamycin | 43 |
| 1.11 | Tierexperimentelles Protokoll..... | 43 |
| 1.11.1 | Rapamycin-Behandlung..... | 43 |
| 1.12 | Serum-Biochemie..... | 43 |
| 1.13 | Leber-Histologie | 44 |
| 1.13.1 | Hämatoxylin- und Eosin-Färbung..... | 44 |
| 1.13.2 | Immunhistochemie..... | 44 |
| 1.14 | RNA-Isolierung und Photometrie | 45 |
| 1.14.1 | RNA-Isolierung..... | 45 |
| 1.14.2 | Photometrie..... | 45 |
| 1.15 | Reverse Transkription und Real-Time PCR | 46 |
| 1.15.1 | Reverse Transkription..... | 46 |
| 1.15.2 | SYBR [®] Green Real-Time PCR | 47 |
| 1.16 | Quantifizierung von Proteinen durch Western Blotting..... | 50 |
| 1.16.1 | Protein-Isolierung und Quantifizierung von CK 19, RPS6, β -Actin.. | 50 |
| 1.16.2 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 50 |
| 1.16.3 | Western Blot | 51 |
| 1.16.4 | Detektion mit spezifischen Antikörpern | 51 |

| | | |
|--------|---|----|
| 1.16.5 | Densitometrie der Western Blots | 52 |
| 1.16.6 | Statistische Analyse..... | 52 |
| 2 | Ergebnisse | 53 |
| 2.1 | Verminderte Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 (RPS6) ... | 53 |
| 2.2 | GPT, AP und totales Bilirubin..... | 55 |
| 2.3 | F4/80..... | 57 |
| 2.4 | Lebergewicht..... | 58 |
| 2.5 | Morphologie der Leber | 59 |
| 2.6 | CK19 | 60 |
| 2.7 | CD 11b..... | 62 |
| 2.8 | MCP-1..... | 63 |
| 3 | Diskussion..... | 64 |
| 4 | Literaturverzeichnis | 70 |
| | Lebenslauf..... | 74 |

Glossar und Abkürzungen

| | |
|------------------|--|
| 4E-BP | Eukaryotischer Initiationsfaktor -4E-Bindungsprotein |
| AEC | 3-Amino-9-Ethylcarbazol |
| Akt | Proteinkinase B |
| ALT | Alanin-Aminotransferase |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| AMPK | AMP-aktivierte Proteinkinase |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| AST | Aspartat-Aminotransferase |
| ATM | Ataxia-Telangiectasia Mutated |
| ATP | Adenosin-tri-phosphat |
| CCl ₄ | Kohlenstofftetrachlorid |
| Cdc | Cell Division Cycle |
| CDK | Cyclin-dependent Kinase |
| CK | Cytokeratin |
| CKI | Cyclin-dependent Kinase-Inhibitor |
| CREM τ | cAMP- Response Element Modulator |
| CTGF | Connective Tissue Growth Factor |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| dUTP | Desoxyuridintriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECM | Extracellular Matrix |
| eEF | Eukaryotischer Elongationsfaktor |
| eIF | Eukaryotischer Initiationsfaktor |
| EMT | Epitheliale mesenchymale Transition |
| ERK | Extracellular Signal-related Kinase |
| FAK | Focal Adhesion Kinase |
| FKBP | FK506-Bindungs-Protein |
| FOX | Forkhead Box |
| FRAP | FKBP-12-Rapamycin Associated Protein |
| GAP | GTPase-aktivierendes Protein |
| G-Phase | Gap-Phase |
| GPT | Glutamat-Pyruvat-Transaminase |

| | |
|--------------|--|
| GSK | Glycogen Synthase Kinase |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HSC | Hepatic Stellate Cell |
| IGF | Insulin-like Growth Factor |
| IL | Interleukin |
| IRS | Insulin-Rezeptor-Substrat |
| JNK | c-Jun N-terminale Kinase |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Protein Kinase |
| MCP | Monocyte Chemoattractant Protein |
| MDR | Multidrug-Resistance |
| MEK | Mitogen-induced Extracellular Kinase |
| MMP | Matrix-Metalloproteinase |
| M-Phase | Mitose-Phase |
| mRNA | Messenger Ribonucleinsäure |
| Mrp2 | Multidrug resistance associated protein 2 |
| mTOR | Mammalian Target of Rapamycin |
| mTORC | mTOR Komplex |
| Oatp | Organic anion transporting polypeptide |
| TGF- β | Transforming Growth Factor-beta |
| TOS | TOR-Signaling |
| TRAP | Tartrate-resistant Acid Phosphatase |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PC | Phosphatidylcholin |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PDCD4 | Programmed Cell Death 4 |
| PDGF | Platelet-derived Growth Factor |
| PDGFR | Platelet-derived Growth Factor Receptor |
| PDK | Phosphoinositide-dependent Kinase |
| PIKK | Phosphatidyl-inositol-3-Kinase-ähnliche Kinase |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| PIP3 | Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat |
| PKC | Protein Kinase C |
| PPAR | Peroxisom Proliferator aktivierter Rezeptor |
| PRAS40 | Proline-rich Akt Substrate 40 kDa |

| | |
|---------------|---|
| PRR5 | PRoline-Rich Protein 5 |
| PSC | Primär sklerosierende Cholangitis |
| PTEN | Phosphatase and Tensin Homolog |
| Raptor | Regulatory Associated Protein of mTOR |
| rDNA | Ribosomale DNA |
| Rheb | Ras-homolog-enriched-in-brain |
| Rictor | Rapamycin-insensitive Companion of mTOR |
| RPS6 | Ribosomales Protein S6 |
| S6K | S6 Kinase |
| SDS-PAGE | Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis |
| SGK1 | Serum- and Glucocorticoid-inducible Kinase |
| SKAR | S6K1 Aly/REF-like Target |
| S-Phase | Synthese-Phase |
| STAT | Signal Transducers and Activators of Transcription |
| TAA | Thioacetamid |
| TBS | Tris Buffered Saline |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| TIMP | Tissue Inhibitor of Matrix-Metalloproteinase |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TOP | Terminal Oligo-pyrimidine |
| tRNA | Transfer-RNA |
| TSC | Tuberous Sclerosis Complex |
| tTG | Tissue Transglutaminase |
| UBF | Upstream Binding Factor |
| UDCA | Ursodeoxycholsäure |
| URI | Unconventional Prefoldin RPB5 Interactor |
| UTR | Untranslated Region |
| VCAM | Vascular Cell Adhesion Molecule |
| Wnt | Wingless Int 1 |
| YY1 | Ying Yang 1 |
| α -SMA | Alpha-Smooth Muscle Actin |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 3: Unterschied zwischen einer gesunden und einer <i>Mdr2</i> Knockout Maus (5)..... | 3 |
| Abbildung 4: Histologisches Bild bei PSC (7)..... | 5 |
| Abbildung 5: In der Produktion der extrazellulären Matrix involvierte Zellen (8)..... | 6 |
| Abbildung 6: Mechanismus der Fibrogenese in chronisch cholestatischen Lebererkrankungen (9)..... | 8 |
| Abbildung 7: Aktivierung der hepatischen Sternzelle (12)..... | 9 |
| Abbildung 8: Intrazelluläre Signalwege, die zur Proliferation der Sternzelle führen (14)..... | 11 |
| Abbildung 9: Die Entstehung der Cholangiopathie der <i>Mdr2</i> Knockout Maus (18)15 | |
| Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der Expression von Genen, die wichtig für die Entstehung der Fibrose im <i>Mdr2</i> Knockout Mausmodell sind (19)..... | 16 |
| Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der Cyclinexpression während des Zellzyklus (23)..... | 18 |
| Abbildung 12: Struktur von mTOR (22)..... | 19 |
| Abbildung 13: Der PI3K/mTOR-Signalweg (22)..... | 23 |
| Abbildung 14: Effekte von mTOR (30)..... | 25 |
| Abbildung 15: Die Initiation der Translation (31)..... | 26 |
| Abbildung 16: mTOR und die Translation (32)..... | 28 |
| Abbildung 17: S6K und ihre Substrate (33)..... | 31 |
| Abbildung 18: Wichtigste Aspekte des mTOR-Signalweges (33)..... | 31 |
| Abbildung 19: Rapamycin (35)..... | 32 |
| Abbildung 20: Rapamycin im Komplex mit FKBP12 und der FRB-Domäne von mTOR (35)..... | 32 |
| Abbildung 21: Prinzip der Real-Time RT-PCR (43)..... | 46 |
| Abbildung 22: Prinzip der SYBR Green PCR (43)..... | 48 |
| Abbildung 23: Effekt von Rapamycin auf pRPS6..... | 53 |
| Abbildung 24: Effekt von Rapamycin auf die Proteinexpression von pRPS6..... | 54 |
| Abbildung 25: Effekt von Rapamycin auf GPT- und AP-Werte..... | 55 |
| Abbildung 26: Effekt von Rapamycin auf das Gesamtbilirubin..... | 56 |
| Abbildung 27: Effekt von Rapamycin auf die mRNA Expression des Makrophagen-Marker F4/80..... | 57 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 28: Effekt von Rapamycin auf das Lebergewicht der <i>Mdr2</i> Knockout Mäuse | 58 |
| Abbildung 29: Effekt von Rapamycin auf die biliäre Fibrose der <i>Mdr2</i> ^{-/-} Maus..... | 59 |
| Abbildung 30: Effekt von Rapamycin auf CK19..... | 60 |
| Abbildung 31: Effekt von Rapamycin auf die Proteinexpression von CK19..... | 61 |
| Abbildung 33: Effekt von Rapamycin auf die mRNA Expression von MCP-1..... | 63 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Für die RT-PCR verwendeten Primer | 49 |
| Tabelle 2: Für Western Blot verwendete Antikörper | 51 |

1 Einleitung

1.1 Chronisch cholestatische Lebererkrankungen

Die Cholestase ist durch einen beeinträchtigten Abfluss der Galle von der Leber in das Intestinum gekennzeichnet. Sie kann durch eine mangelhafte Gallesekretion oder einer Behinderung des Galleflusses entstehen. Die Folge ist eine Retention von Gallensäuren und anderen Gallenbestandteilen in der Leber.

Ein häufiger pathophysiologischer Mechanismus der chronisch cholestatischen Lebererkrankungen ist die Schädigung von Cholangiozyten, unter anderem durch zytotoxische Gallensäuren, und ein dadurch verursachter Verlust von Gallengängen, der zu einer obstruktiven Cholestase führen kann.

Im Rahmen bestimmter cholestatischer Erkrankungen kommt es außerdem zu einem Austritt von Galle in den peribiliären Raum. Dies führt zu einer portalen Entzündung, zur Nekrose von Hepatozyten und in der Folge zu einer biliären Fibrose und schließlich zu einer Leberzirrhose.

Ein möglicher Angriffspunkt für die Therapie dieses Krankheitsbildes wäre der Versuch, die Entstehung der Fibrose medikamentös zu hemmen (1) (Abbildung 1).

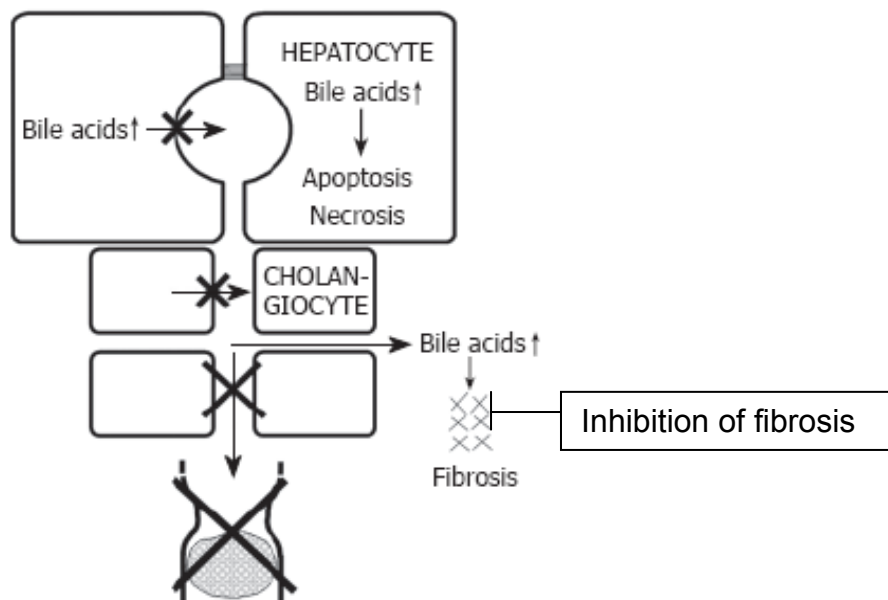


Abbildung 1: Mechanismen der Cholestase und möglicher Angriffspunkt der Therapie (1)

1.1.1 Die kanalikuläre Phospholipid-Exportpumpe MDR3

Ein möglicher Grund für die Entstehung der Cholestase sind Störungen von Transportsystemen der Hepatozytenmembran, die für die Sekretion von Gallensalzen und anderen Bestandteilen der Galle in den Gallenkanalikus verantwortlich sind.

MDR3 (Multidrug-resistance-3) P-Glykoprotein ist solch ein Transporter, der sich an der kanalikulären Membran menschlicher Hepatozyten befindet. Das Homolog zu MDR3 ist das Mdr2 P-Glykoprotein von Nagetieren (2) (Abbildung 2).

Durch Untersuchungen an *Mdr2* Knockout Mäusen, bei welchen das Gen für das Mdr2 P-Glykoprotein inaktiviert wurde, konnte gezeigt werden, dass Mdr2 als Flippase fungiert und Phosphatidylcholin (PC) von der inneren zur äußeren Schicht der kanalikulären Membran transloziert. Durch diesen Vorgang kann Phosphatidylcholin in die Galle sezerniert werden (2).

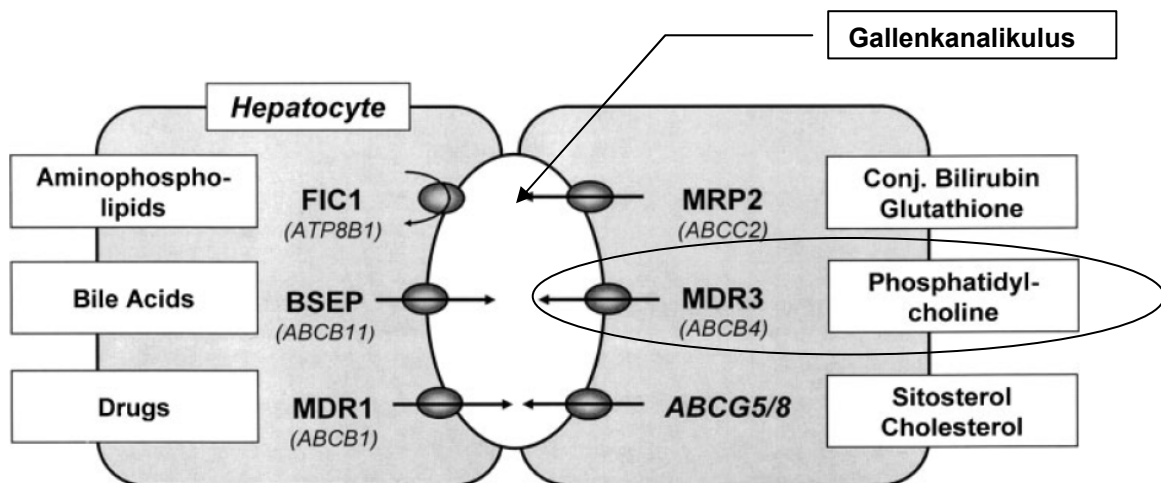


Abbildung 2: Kanalikuläre Transportsysteme der Hepatozyten (5)

Phosphatidylcholin und Cholesterol sind biliäre Lipide, die nach den Gallensalzen die zweitwichtigsten Gallenbestandteile darstellen. Durch Sekretion von Phosphatidylcholin wird Cholesterol durch Bildung von Mizellen löslich gemacht und die Bildung von Cholesterinsteinen verhindert (3).

Gemischte Mizellen sind kreisförmige Gebilde, die hydrophobe Lipide, wie Cholesterol, im Zentrum tragen und deren äußere Schicht von dem hydrophilen Phosphatidylcholin gebildet wird (4). Phosphatidylcholin inaktiviert auch die detergente Wirkung der Gallensalze und verhindert so eine Schädigung der Gallengangs- und Gallenblasenwand (3) (Abbildung 3).

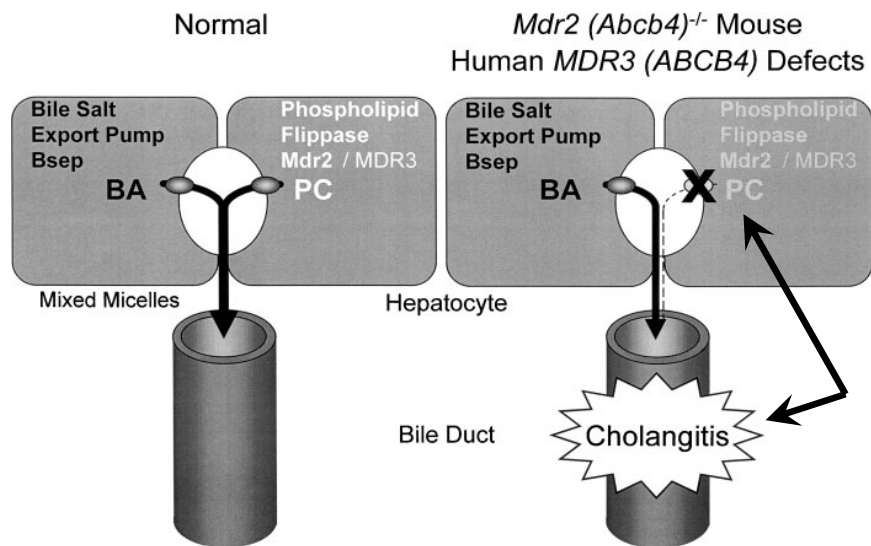


Abbildung 3: Unterschied zwischen einer gesunden und einer *Mdr2* Knockout Maus (5)

1.1.2 Auswirkungen von *MDR3* Genmutationen

Mutationen des *MDR3* Gens sind an einer Reihe von hepatobiliären Störungen beteiligt. Zu ihnen zählen unter anderem die progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 3, die Schwangerschafts-Cholestase und die intrahepatische Cholelithiasis. *MDR3*-Mutationen und Polymorphismen könnten zudem auch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber cholestatischen Leberschädigungen verursachen, die durch Medikamente oder Zytokine verursacht werden.

Die Leberpathologie von *Mdr2^{-/-}* Mäusen lässt auch vermuten, dass *MDR3* Defekte eine Rolle in der Pathogenese verschiedener Cholangiopathien, wie der primär sklerosierenden Cholangitis, spielen könnten (5).

1.2 Die primär sklerosierende Cholangitis

Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) ist eine chronisch cholestatische Lebererkrankung, deren Ätiologie unklar ist. So wird vermutet, dass eine genetische Prädisposition durch verschiedene Faktoren getriggert wird und zum Ausbruch dieser Krankheit führt. Zu diesen auslösenden Faktoren zählen autoimmune Prozesse, eine portale Bakteriämie, die Absorption von Toxinen aus dem Darm, ischämische Ursachen, virale Infektionen oder toxische Gallensäuren (6).

Im Verlauf dieser Erkrankung kommt es zu einer anhaltenden Entzündung, Zerstörung und Fibrose der intra- und extrahepatischen Gallengänge. Dieser Prozess führt zu einem Verschwinden der kleinen und Obliteration der großen Gallengänge, während es in den Gallengangsabschnitten vor den Strikturen zu einer Dilatation kommt. In den meisten Fällen führt diese Erkrankung zu einer biliären Zirrhose und schließlich zum Leberversagen.

Das durchschnittliche Manifestationsalter dieser Erkrankung beträgt 40 Jahre, wobei bevorzugt das männliche Geschlecht betroffen ist. Sehr häufig ist die PSC mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert (7).

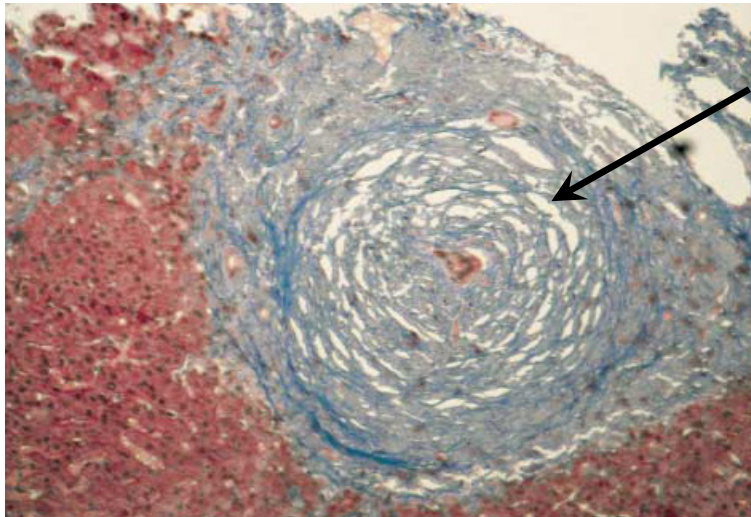
8-30% der PSC-Patienten entwickeln im Rahmen dieser Erkrankung auch ein cholangiozelluläres Karzinom. Ab dem Beginn der Symptome muss mit einer mittleren Überlebensdauer von 12 Jahren gerechnet werden, wobei die einzig kausale Therapie noch immer die Lebertransplantation darstellt (6).

1.2.1 Histologie der PSC

Histologisch wird die PSC in vier Stadien unterteilt:

1. Im Stadium I findet man eine Degeneration der Cholangiozyten und eine Infiltration der Gallengänge durch Lymphozyten und neutrophile Granulozyten. Außerdem kommt es zu einer Entzündung, Fibrose und Vergrößerung der periportalen Region. Man kann auch proliferierte Gallengänge und eine zwiebelschalenartige Fibrose der Gallengänge in der periportalen Region beobachten (7).

2. Im Stadium II breitet sich die Fibrose und Entzündung auch auf das Parenchym aus. Dadurch kommt es zu einer Zerstörung von Hepatozyten, die das Bild einer Mottenfraßnekrose entstehen lässt. Während die konzentrisch periduktale Fibrose abnimmt, kommt es in zunehmendem Maße zu einer Duktopenie. Vergrößerte periportale Regionen sind ein weiteres, häufiges Charakteristikum dieses Stadiums (Abbildung 4).



Zwiebelschalenartige
Fibrose

Abbildung 4: Histologisches Bild bei PSC (7)

3. Das Stadium III ist durch portoportale Bindegewebssepten gekennzeichnet. Es kommt zu einer Atrophie und einem Schwund der Gallengänge, während man in den periportalen und paraseptalen Hepatozyten Zeichen der Cholestase findet.

4. Schließlich findet man im Stadium IV das Bild einer biliären Zirrhose und als Folge von Obstruktionen der großen Gänge eine Proliferation und Dilatation der interlobulären Gallengänge sowie eine erhöhte Anzahl periportal neutrophiler Granulozyten (7).

1.3 Die Fibrose bei chronisch cholestatischen Lebererkrankungen

Die Leberfibrose ist die Hauptkomplikation vieler chronischer Lebererkrankungen. Während die Leber nach akuten und moderaten Schädigungen - dank ihrer regenerativen Fähigkeiten - in der Lage ist, wieder vollständig auszuheilen, kommt es durch persistierende, chronische Leberschädigungen zu einer Defektheilung im Sinne der Leberfibrose, die durch einen Ersatz der nekrotischen oder apoptotischen Zellen durch eine kollagenreiche extrazelluläre Matrix gekennzeichnet ist. Der überschüssigen Ablagerung von extrazellulärer Matrix liegt die Aktivierung Kollagen-produzierender Zellen, die durch diese Aktivierung einen myofibroblastischen Phänotyp entwickeln, zugrunde.

Zu diesen Zellen gehören unter anderem portale Fibroblasten und hepatische Sternzellen, aus welchen die Mehrzahl der myofibroblastischen Zellen entsteht. Außerdem können sich Epithelzellen, wie die Cholangiozyten, durch eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) zu Kollagen-produzierenden Zellen umwandeln. Bei chronisch cholestatischen Lebererkrankungen und der daraus resultierenden biliären Fibrose, sind in diesen Prozess besonders die periportalen Fibroblasten in der Umgebung biliärer Strukturen involviert (8) (Abbildung 5).

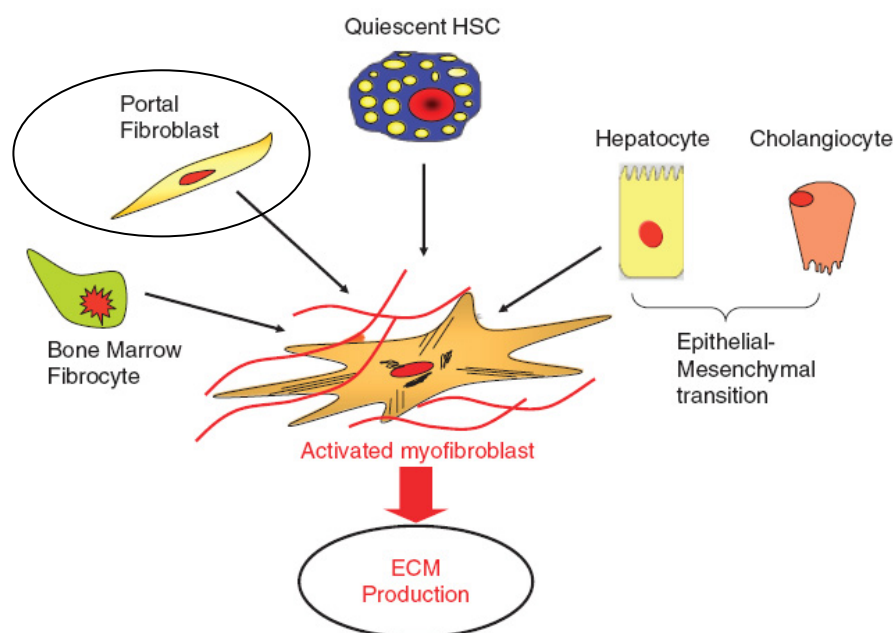


Abbildung 5: In der Produktion der extrazellulären Matrix involvierte Zellen (8)

1.3.1 Die Entstehung der Fibrose

1.3.1.1 Die Rolle der Cholangiozyten

Cholangiozyten beginnen als Antwort auf eine Zellschädigung und die Freisetzung von Zytokinen zu proliferieren. Dieser Prozess entsteht durch die Proliferation bereits existierender Duktuli, die Aktivierung von Progenitorzellen und das Auftreten metaplastischer Hepatozyten und wird duktiläre Reaktion genannt. Im Rahmen dieser duktilären Reaktion setzen die Cholangiozyten bestimmte Zytokine frei, die auslösende Faktoren der Fibrogenese sind.

Zu diesen Zytokinen gehören: Transforming Growth Factor-beta (TGF- β), Connective Tissue Growth Factor (CTGF), Platelet-derived Growth Factor-BB (PDGF-BB), Insulin-like Growth Factor (IGF-1) und MCP-1.

Diese Zytokine wirken auf parakrine Weise auf portale Fibroblasten und auf Sternzellen, die durch chemotaktische Reize zum Gebiet der Leberschädigung angezogen werden. Daher haben Cholangiozyten einen großen Einfluss auf die Entstehung der Fibrose in chronisch cholestatischen Lebererkrankungen (8).

1.3.1.2 Entzündungszellen

Ein weiterer Auslöser der Fibrose ist die Sezernierung von Metalloproteinasen durch Entzündungszellen, die das Gebiet der Leberschädigung infiltrieren. Diese bauen die physiologische extrazelluläre Matrix, die die Gallengänge umgibt, ab und führen dadurch zur Aktivierung von Myofibroblasten. Außerdem sind auch die Entzündungszellen für die Sekretion von chemotaktisch wirkenden Zytokinen verantwortlich, die die Migration Kollagen-produzierender Zellen verstärken (8).

1.3.1.3 Hepatozyten

Auch die geschädigten Hepatozyten selbst sezernieren Zytokine, die zur Aktivierung von Myofibroblasten führen. Auch ihre Apoptose, sowie jene der Cholangiozyten, ist ein Trigger der Fibrogenese, denn die dadurch entstehenden apoptotischen Körper können von Sternzellen phagozytiert werden und führen dadurch zu ihrer Aktivierung (8) (Abbildung 6).

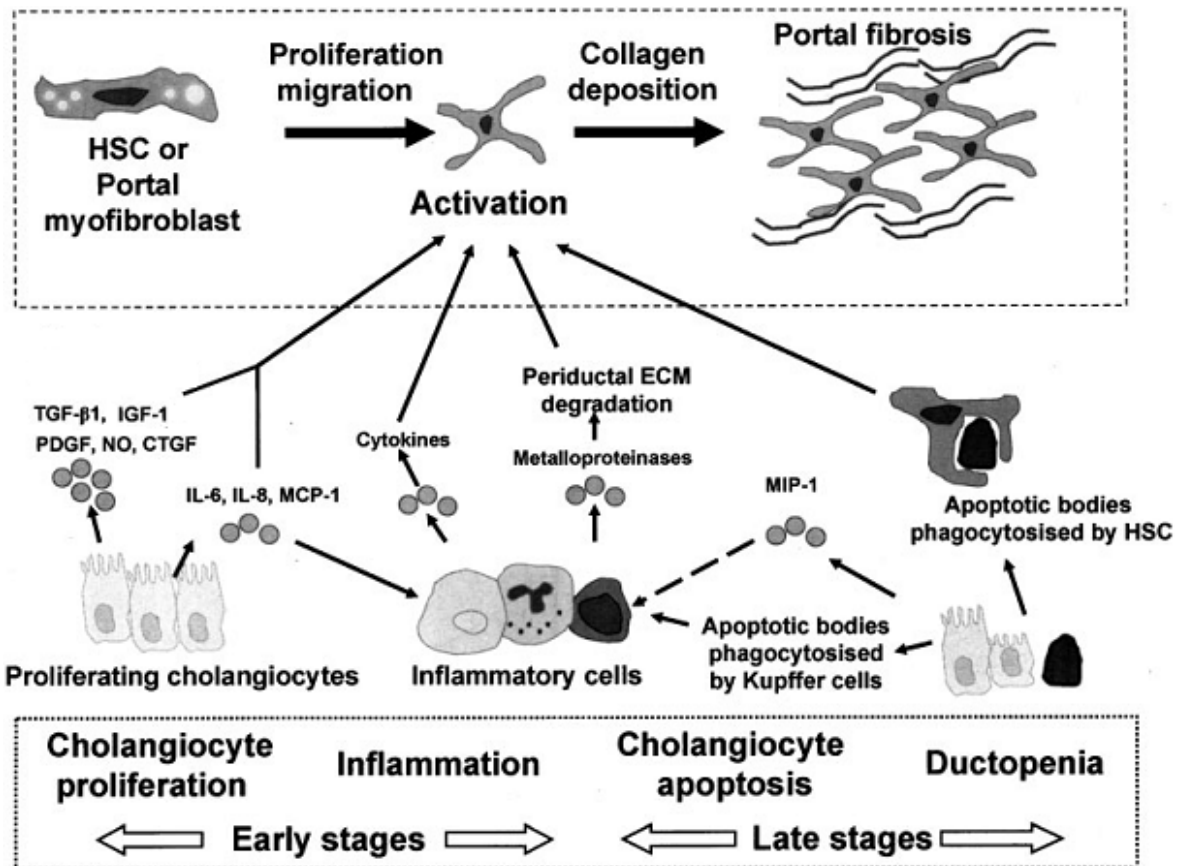


Abbildung 6: Mechanismus der Fibrogenese in chronisch cholestatischen Lebererkrankungen (9)

1.3.2 Aktivierung von Sternzellen

Obwohl mehrere Arten Matrix-produzierender Zellen in der Leber vorherrschen, sind die hepatischen Sternzellen jene Zellpopulation, die bisher am besten untersucht wurde.

Hepatische Sternzellen sind unter physiologischen Bedingungen Vitamin A speichernde Zellen, die sich im subendothelialen Raum zwischen Hepatozyten und den Endothelzellen der Sinusoide befinden (10).

Ihre Aktivierung lässt sich in zwei Phasen einteilen:

Die erste Phase ist die sogenannte Initiations- oder Präinflammatorische Phase. Diese Phase wird durch parakrine Stimulation der Sternzelle durch benachbarte Zellen und Veränderungen der sie umgebenden extrazellulären Matrix in Gang gesetzt. Eine wichtige Rolle in diesem Prozess spielen reaktive Sauerstoffmoleküle, die von geschädigten Zellen freigesetzt werden können (10).

Auch die aktivierten und infiltrierenden Kupfferzellen sind durch die Freisetzung von Zytokinen, wie TGF- β , TNF- α und reaktiven Sauerstoffmolekülen an dieser Phase beteiligt (11).

Die zweite Phase ist durch die Aufrechterhaltung des Aktivierungszustandes der Sternzellen charakterisiert. In diesem Kontext verändert die Sternzelle einige ihrer Funktionen: Sie proliferiert, betreibt Chemotaxis, wird durch die Expression des zytoskeletalen α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) kontraktile, enthält kein Vitamin A mehr und ist sowohl an der Produktion als auch am Abbau von extrazellulärer Matrix beteiligt (10) (Abbildung 7).

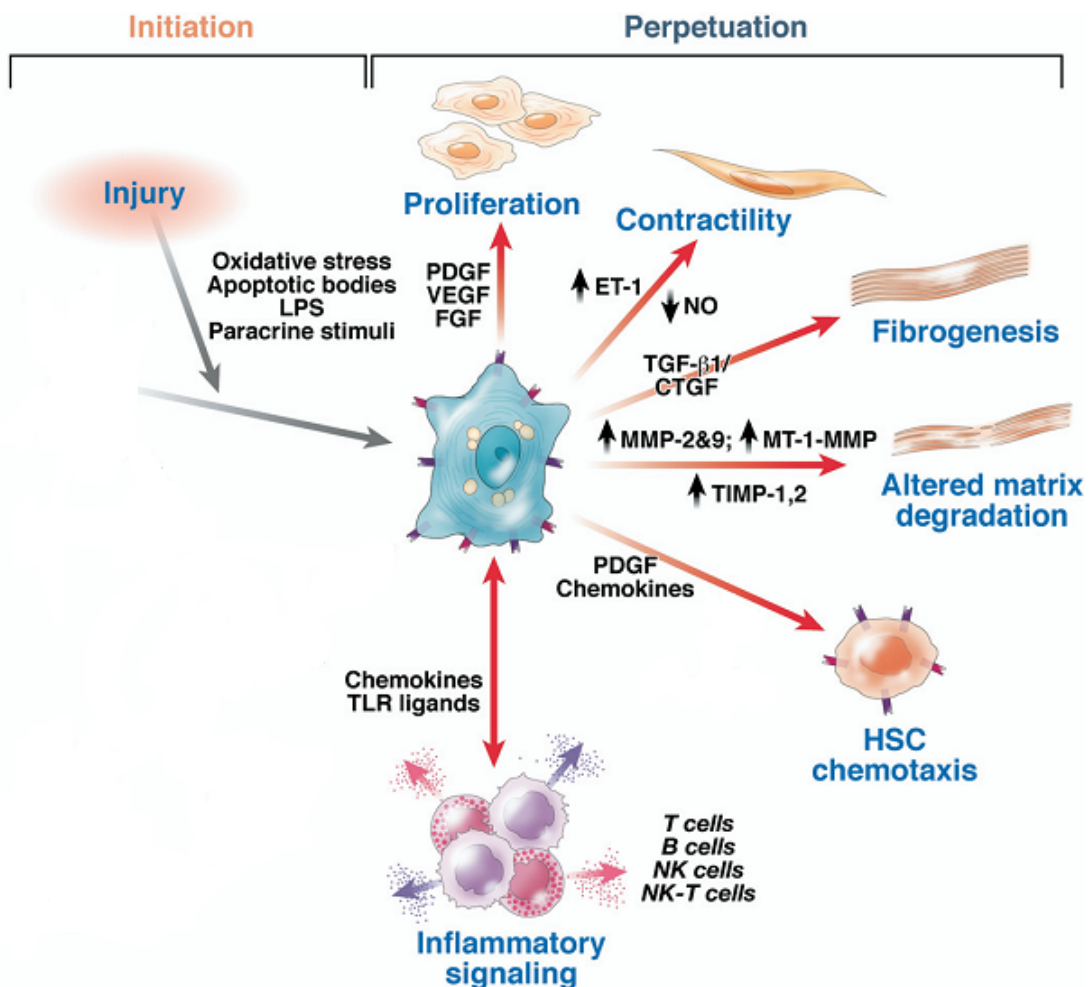


Abbildung 7: Aktivierung der hepatischen Sternzelle (12)

1.3.3 Molekulare Mechanismen der Leberfibrose

1.3.3.1 Platelet-derived Growth Factor (PDGF)

Sehr wichtig für die Proliferation der Sternzellen ist PDGF, da er ihr potentestes Mitogen ist. Dieser Wachstumsfaktor ist ein Dimer mit den drei möglichen Isoformen AA, BB und AB, wobei PDGF-BB die Proliferation der Sternzelle am besten stimulieren kann (13). Während der Aktivierung der Sternzelle wird auch ihre Ansprechbarkeit auf diesen Wachstumsfaktor durch die Ausbildung des PDGF-Rezeptors erhöht. PDGF hat zudem chemotaktische Wirkungen auf die Sternzelle (10).

Mehrere intrazelluläre Signalwege sind für die Proliferation der Sternzelle verantwortlich (Abbildung 8). Dazu gehört die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) - Familie. So konnte ihre Aktivierung nach einer Stimulation der Sternzellen mit PDGF sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden. PDGF aktiviert folgende Kaskade: Ras – Raf – Mitogen-induzierte extrazelluläre Kinase (MEK) – extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (ERK).

Auch die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) gehört zu den Proteinkinasen der MAPK-Familie und hat auch einen positiven Einfluss auf die Proliferation von Sternzellen.

Im Gegensatz dazu hat ein weiteres Mitglied der MAPK, nämlich p38, einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation der Sternzelle.

PDGF aktiviert weiters die fokale Adhäsionskinase (FAK). Diese interagiert als Teil des fokalen Adhäsionskomplexes über Integrine mit Proteinen der extrazellulären Matrix und ist ein Sensor ihrer Intaktheit. Für die Phosphorylierung von FAK wird neben PDGF auch Ras benötigt. Durch FAK und PDGF wird schließlich auch der PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) - Signalweg aktiviert, der auch sehr wichtig für die Proliferation der Sternzelle ist.

Es scheint auch eine Verbindung zwischen dem PI3K - und MAPK - Signalweg zu geben, denn der PI3K-Hemmer Wortmannin ist auch in der Lage die Aktivität von Erk zu senken. PI3K ist auch entscheidend in der Regulation der $\alpha 1(I)$ -Kollagen-Genexpression. So führt die Hemmung von PI3K zu einer verminderten Proliferation der Sternzellen und zu einem verminderten Gehalt der $\alpha 1(I)$ -Kollagen mRNA und des Kollagen Typ 1 Proteins.

PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) ist ein bekannter Tumorsuppressor, der die Effekte von PI3K hemmen kann.

Eine wichtige nachgeschaltete Kinase des PI3K-Signalweges ist mTOR. Auf sie wird im Kapitel „mTOR-Mammalian Target of Rapamycin“ näher eingegangen (14).

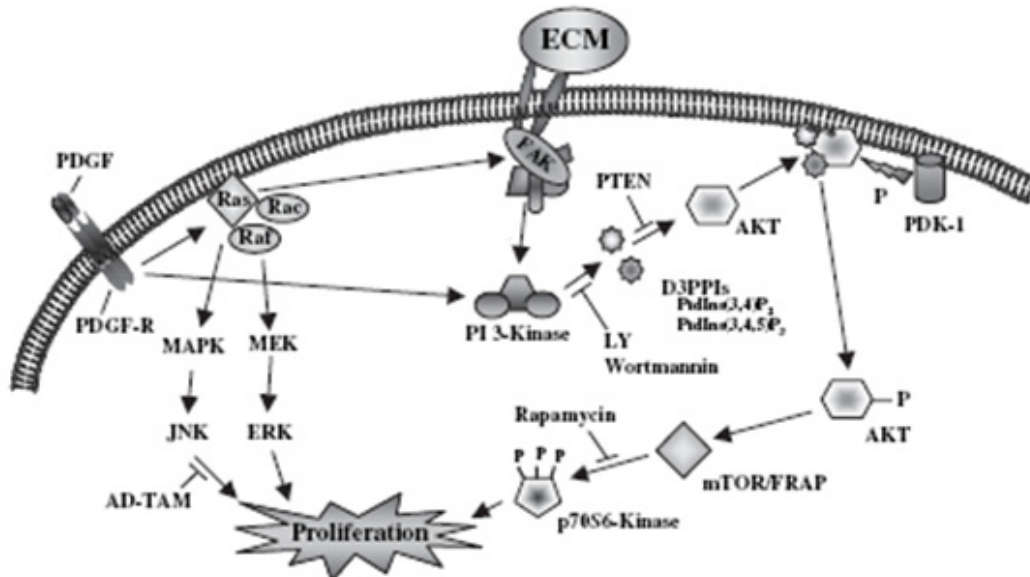


Abbildung 8: Intrazelluläre Signalwege, die zur Proliferation der Sternzelle führen (14)

1.3.3.2 Gallensäuren

Auch Gallensäuren lösen, in Konzentrationen, in denen sie während der Cholestase vorkommen, die Proliferation von Sternzellen aus und wirken daher profibrogen. Dies bewirken sie durch die Aktivierung des Epidermal Growth Factor Rezeptors und die in weiterer Folge ausgelöste Aktivierung des Protein Kinase C / ERK / mTOR – Signalweges (15).

Gallensäuren erhöhen auch den Gehalt an Cyclin E, das die Progression des Zellzyklus kennzeichnet.

Die Inhibitoren von PKC, ERK und mTOR hemmen alle den Anstieg an Cyclin E und senken die durch Gallensäuren induzierte Proliferation der Sternzellen auf Werte von nicht aktivierten Sternzellen (15).

1.3.3.3 Transforming Growth Factor (TGF)

Die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix in der fibrotischen Leber ist Kollagen Typ 1, dessen Expression sowohl während als auch nach der Transkription reguliert wird.

Zu den Faktoren, die die Bildung der extrazellulären Matrix durch Sternzellen erhöhen, gehören: TGF- β , CTGF und reaktive Sauerstoffmoleküle. Davon stellt TGF- β den potentesten fibrogenen Wachstumsfaktor dar und entfaltet seine Wirkung auf parakrine und autokrine Weise (10).

Der „klassische“ intrazelluläre Signalweg, der die Signale von TGF- β weiterleitet, erfolgt über Smad Proteine. Aber auch andere Signalwege, wie der p38 MAPK-Signalweg, haben einen Effekt auf die Kollagen-Genexpression. Beide Signalwege erhöhen unabhängig voneinander die $\alpha 1(I)$ -Kollagen-Genexpression durch eine erhöhte transkriptionelle Aktivität des $\alpha 1(I)$ -Kollagen-Gens.

p38 MAPK vermag es auch die Stabilität der $\alpha 1(I)$ -Kollagen-mRNA zu erhöhen und hat also auch einen post-transkriptionellen Einfluss auf das $\alpha 1(I)$ -Kollagen (14). Außerdem konnte an kultivierten Sternzellen gezeigt werden, dass auch der PI3K/mTOR-Signalweg durch TGF- $\beta 1$ aktiviert werden kann (16).

1.3.3.4 MMPs und TIMPs

Auch der Abbau von extrazellulärer Matrix durch sogenannte Matrix-Metalloproteinasen (MMP) ist wichtig für die Entstehung der Fibrose. So wird die physiologische Matrix aufgelöst, um von Narbengewebe ersetzt zu werden. Abhängig von ihren Substraten werden die Metalloproteinasen in mehrere Gruppen eingeteilt. Dazu zählen interstitielle Kollagenasen, wie zum Beispiel MMP-1 oder MMP-13, und Gelatinasen wie MMP-2. Die Sternzellen selbst können MMP-2 und MMP-13, das murine Ortholog von MMP-1, freisetzen.

Gehemmt werden diese MMP durch sogenannte TIMPs, den „Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen“. TIMP-1 und TIMP-2 wiederum werden von den Sternzellen selbst produziert. TIMP-1 hat außerdem eine antiapoptotische Wirkung auf die Sternzelle und führt dadurch zu einer erhöhten Anzahl dieser Zellpopulation (10).

1.4 Detaillierte Charakterisierung der cholestatischen Leberschäden der *Mdr2* Knockout Maus

1.4.1 Frühzeitige Veränderungen

Bereits einen Tag nach der Geburt zeigen die *Mdr2*^{-/-} Mäuse ein dichtes Infiltrat neutrophiler Granulozyten, proliferierende Fibroblasten und eine duktiläre Reaktion in den größeren periportalen Regionen (17). Diese Veränderungen verstärken sich nach einer Woche.

Nach 2 Wochen findet man eine Proliferation periduktaler Fibroblasten der mittleren und großen Gallengänge, die zu einer periduktalen Fibrose führt. Diese Gallengänge zeigen teilweise das Bild einer "zwiebelschalenartigen" Fibrose und sind auch von neutrophilen Granulozyten umgeben. Eine duktiläre Reaktion ist in den größeren, zentralen periportalen Regionen zu sehen. Zu diesem Zeitpunkt weisen diese Mäuse auch eine Hepatomegalie auf, die im Laufe der Zeit stetig zunimmt. Diese Veränderungen verstärken sich in der dritten und vierten Woche. Es kommt auch zu einer zunehmenden oblitierenden Fibrose der kleinen interlobulären Gallengänge. Weiters sind neutrophile Granulozyten, die als Zeichen einer akuten Cholangitis die Gallengänge infiltrieren, zu erkennen. Schließlich sind porto-portale Septen und proliferierte Duktuli ein weiteres Merkmal dieses Stadiums (17).

1.4.2 Veränderungen der Spätphase

Das histologische Bild der Leber von 2 bis 6 Monate alten Mäusen sieht jenem der PSC des Menschen äußerst ähnlich. So findet man porto-portale Septen, wie bei biliärer Fibrose, einer meist zwiebelschalenartigen periduktalen Fibrose der großen und mittleren, als auch der kleinen Gallengänge und den Ersatz kleinerer Gallengänge durch fibröse Stränge. In den älteren Tieren sind die periduktale Entzündung und der Parenchymschaden eher mild ausgeprägt. Während die Wände einiger großer Gallengänge aufgrund einer akuten Cholangitis ulzeriert sind, findet man gelegentlich nekrotische oder apoptotische Hepatozyten, aber auch Zellen in Mitose. Durch die toxische Wirkung der Galle kommt es auch zu konfluierenden Nekrosen, die als Galleinfarkte bezeichnet werden.

Auch segmentale Strikturen und Dilatationen der extra- und intrahepatischen Gallengänge spiegeln die Ähnlichkeit zum makroskopischen Bild der PSC wieder (17).

1.4.3 Die Cholangiopathie der *Mdr2*^{-/-} Maus

Bereits nach 2 Wochen zeigen die Knockout Mäuse eine veränderte Morphologie der Tight Junctions und der Basalmembran der Gallengänge, welche stellenweise unterbrochen ist. Außerdem ist der interzelluläre Raum zwischen den Cholangiozyten deutlich erweitert. Es kann auch ein Austritt von Galle in die periportalen Regionen beobachtet werden (Abbildung 9). Der Grund für diese Veränderungen dürfte der erhöhte Gehalt freier, potentiell toxischer Gallensäuren in der Galle sein. Gallensäuren sind außerdem in der Lage, die Produktion inflammatorischer Zyto- und Chemokine durch Makrophagen und Cholangiozyten zu induzieren. Bei der Schädigung der Basalmembran könnte auch die Interaktion infiltrierender Leukozyten mit den aktivierten Cholangiozyten beteiligt sein. Durch die obstruktive Cholangitis kommt es weiters zur Ruptur der Herring-Kanälchen und zur Entstehung von Galleninfarkten.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Gallengänge der 2 Wochen alten Mäuse durch die Veränderungen der Tight Junctions und der Basalmembran durchlässig werden, und es dadurch zu einer Regurgitation von Galle in die periportalen Regionen kommt (18).

1.4.4 Entstehung der periduktalen Fibrose

Die periduktale Entzündung und Fibrose dieser Mäuse wird zum Teil durch die chemotaktische und fibrotische Wirkung der Galle, die aus den geschädigten Gallengängen austritt, und dem Gallengangsepithel verursacht, das auch in der Lage ist, Zytokine zu produzieren und aktiv am Entzündungsprozess teilzunehmen.

Erst nach der vierten Woche kommt es dann auch zu einem gesteigerten Zelltod der Cholangiozyten. Zu diesem Zeitpunkt ist die zwiebelschalenartige Fibrose bereits vollkommen ausgebildet. Außerdem findet man eine erhöhte Anzahl an α -SMA-positiven Myofibroblasten. Dieser periduktale fibrotische Ring führt dazu, dass der peribiliäre Plexus vom Epithel der Gallengänge getrennt wird. Die verlängerte Diffusionsstrecke könnte als Konsequenz eine Atrophie und den Zelltod der Cholangiozyten nach sich ziehen (18) (Abbildung 9).

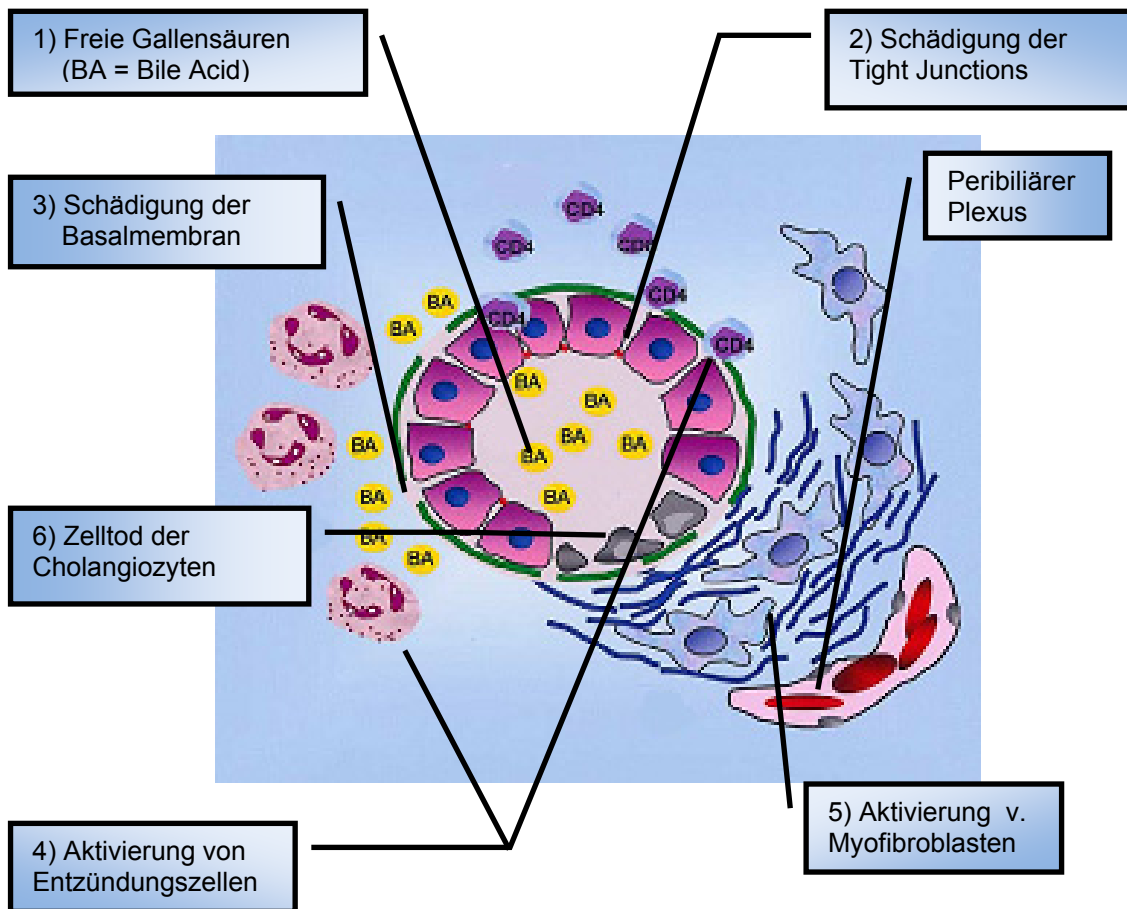


Abbildung 9: Die Entstehung der Cholangiopathie der *Mdr2* Knockout Maus (18)

1.4.5 Das entzündliche Infiltrat

In den periportalen Regionen der *Mdr2*^{-/-} Mäuse findet man eine erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten, die durch den Marker CD 11b erkannt werden kann. Die Zahl der Neutrophilen nimmt nach der vierten Woche ab, während die Zahl der CD4- und CD8-positiven Zellen zwischen der vierten und der achten Woche zunimmt. Die Zahl der F4/80 positiven Kupferzellen ist hingegen, im Vergleich mit den Kontrollen, ausschließlich in der 2. Woche erhöht.

1.4.6 Beteiligung von Zyto- und Chemokinen

TNF- α , TGF- β 1 und IL-1 β scheinen in der frühen Phase der sklerosierenden Cholangitis von Bedeutung zu sein, da IL-1 β in der zweiten Woche eine erhöhte Expression aufweist, während TNF- α und TGF- β 1 sowohl in der zweiten als auch in der vierten Woche erhöht sind (18).

1.4.7 Zeitlicher Verlauf der Genexpression in der *Mdr2* Knockout Maus

Die Zahl an α -SMA positiven Myofibroblasten ist besonders in der vierten Woche erhöht und nimmt zur achten Woche wieder ab. Die mRNA Werte von α -SMA weisen in der zweiten und achten Woche keinen Unterschied zu Kontrollen auf, während sie in der vierten Woche erhöht sind. Auch Gene, die in der Entstehung der Fibrose involviert sind, zeigen ein ähnliches chronologisches Expressionsmuster. Dazu zählen das profibrotische Zytokin TGF- β 1, sein Isoform TGF- β 2, welches vor allem von proliferierenden Cholangiozyten exprimiert wird, und der Rezeptor für PDGF-BB. Sie alle sind bereits in der zweiten Woche erhöht, erreichen ein Maximum in der vierten Woche und gehen nach acht Wochen wieder auf Werte wie in der zweiten Woche zurück (Abbildung 10).

Die Expression der Matrixmetalloproteinasen 13 - mRNA ist der von TGF- β , α -SMA und PDGFR- β entgegengesetzt. Sie ist in der zweiten Woche erhöht und geht in der vierten und achten Woche auf niedrige Werte zurück.

Der Protease Inhibitor TIMP-1, der so gut wie alle MMPs hemmt, ist zu allen Zeitpunkten stark erhöht.

Im Laufe der Zeit wird auch immer mehr Kollagen in der Leber abgelagert.

Im Gegensatz dazu zeigt die MMP-2 mRNA das gleiche Expressionsmuster wie die profibrotischen Transkripte und könnte daher auch profibrotische Eigenschaften haben.

Diese Beobachtungen zeigen, dass in diesem Mausmodell die Fibrogenese in der 4. Woche am aktivsten ist (19).

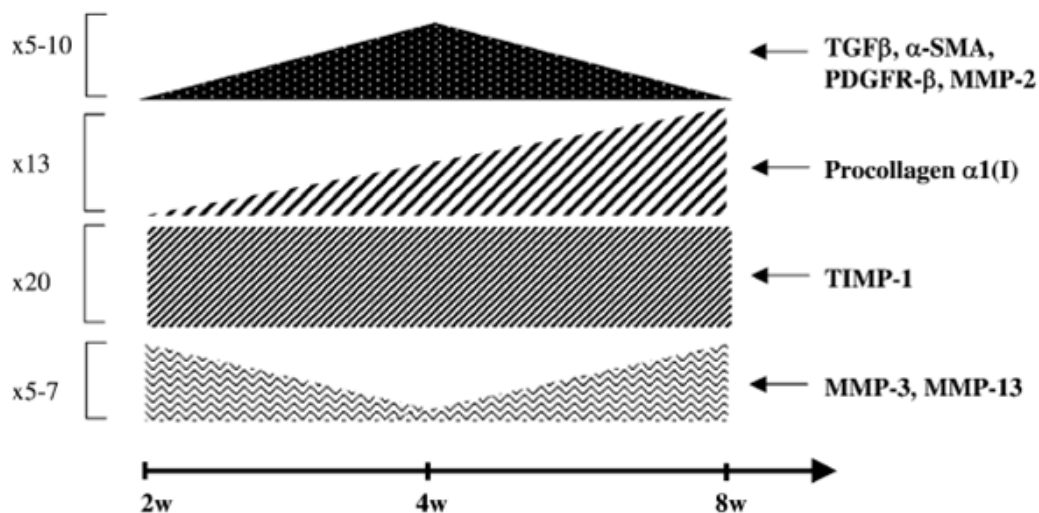


Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der Expression von Genen, die wichtig für die Entstehung der Fibrose im *Mdr2* Knockout Mausmodell sind (19)

1.5 mTOR – Mammalian Target of Rapamycin

TOR (Target of Rapamycin) ist eine Proteinkinase, die von entscheidender Wichtigkeit in der Kontrolle des Wachstums und des Metabolismus der Zelle ist.

Ursprünglich wurde TOR in der Hefe entdeckt und nach und nach festgestellt, dass es in allen Eukaryoten konserviert ist. Das TOR der Säugetiere wurde schließlich „Mammalian Target of Rapamycin“ (mTOR) genannt.

mTOR kontrolliert den Zellwachstum in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit an Wachstumsfaktoren, Nährstoffen, wie Aminosäuren, und zellulärer Energie in Form von ATP.

Es fördert die Proteinsynthese, Transkription, Ribosomenbiogenese, den Nährstofftransport und mitochondrialen Metabolismus.

Im Gegensatz dazu werden katabole Prozesse wie mRNA Degradation, Proteolyse, Autophagie und Apoptose von TOR gehemmt (20).

1.5.1 Zellwachstum und Proliferation

Im Kontext von Wachstum muss zwischen einer Hypertrophie und einer Hyperplasie unterschieden werden. Während die Hypertrophie einen Anstieg der Zellgröße durch einen gesteigerten Gehalt an Proteinen und RNA beschreibt, stellt die Hyperplasie eine erhöhte Zellzahl, die durch Proliferation zustande kommt, dar (21).

Für die Proliferation der Zelle ist ein ausreichendes Zellwachstum, also eine erhöhte Zellgröße und Zellmasse, eine unabdingbare Voraussetzung.

Obwohl sich Zellwachstum und Proliferation gegenseitig stark beeinflussen, werden sie durch unterschiedliche Signalwege reguliert. Jedoch ist der molekulare Mechanismus, der das Zellwachstum mit der Zellteilung koppelt, nicht bekannt.

Damit Zellen im Rahmen der Proliferation ihre Größe beibehalten können, ist die Zelle, dank mTOR, in der Lage, ihr Zellwachstum und die Progression des Zellzyklus aufeinander abzustimmen.

Es wäre möglich, dass mTOR primär den Zellwachstum regelt und dass der Einfluss von mTOR auf die Progression des Zellzyklus ein sekundäres Phänomen ist. mTOR könnte aber auch durch einen zweiten Mechanismus direkt auf den Zellzyklus wirken (22).

1.5.2 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus wird in die G1- (Gap1), S- (Synthese), G2- (Gap2) und M- (Mitose) Phase aufgeteilt. Während in der S-Phase die DNA Replikation stattfindet, ist die M-Phase durch eine mitotische Aktivität gekennzeichnet, in welcher die Kernteilung stattfindet. Die G1-Phase stellt die Phase vor der Synthese-Phase dar, während die G2-Phase jene vor der Mitose ist. Nicht mehr teilungsfähige Zellen verweilen in der Ruhephase G0. Die Progression des Zellzyklus wird durch Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) und Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CKI) gesteuert.

Cyclin-abhängige Kinasen sind Serin/Threonin-Kinasen, die eine Bindung von Cyclinen, welche ihre regulatorischen Untereinheiten darstellen, benötigen, um aktiviert zu werden.

Während des Überganges von der G1- in die S-Phase werden die Cycline D1, D2 und D3 als erste aktiviert. Danach kommt es auch zu einem Anstieg von Cyclin E, dessen höchster Wert in der späten G1-Phase erreicht wird (23).

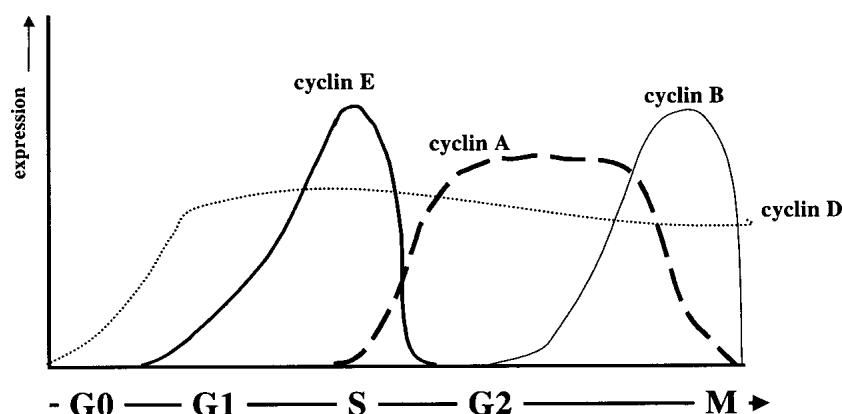


Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der Cyclinexpression während des Zellzyklus (23)

In aktivierten Sternzellen findet man eine erhöhte Expression der Cycline D1, D2 und E (14).

Die Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren regulieren wahrscheinlich die Aktivität der CDKs. Ein Vertreter der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren ist p27, der sowohl die D- als auch die E-Cyclin/CDK Komplexe bindet. Sein Gehalt ist besonders in ruhenden Zellen sehr hoch und wird durch Wachstumsfaktoren herabgesetzt (23).

p21 ist ein weiterer Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor. Seine Induktion führt zum Stillstand des Zellzyklus, aber seine Hemmung kann, je nach Situation,

verschiedene Auswirkungen haben. Es kann nämlich die Interaktion von Cyclin D mit CDK4/CDK6 stabilisieren und dadurch sogar positiv auf den Zellzyklus wirken. So ist es während dem Übergang der G1- in die S-Phase vorhanden. Wenn es nun in dieser Phase gehemmt wird, so führt dies zu einer eingeschränkten Progression des Zellzyklus durch den verminderten Gehalt an Cyclin D-CDK4/CDK6 Komplexen (24).

1.5.3 Aufbau von mTOR

mTOR ist eine atypische Serin/Threonin Kinase und ist Teil der Phosphatidylinositol Kinase-verwandten Kinase-Superfamilie (PIKK).

Strukturell besteht mTOR aus 20 HEAT Wiederholungen, der FAT-, FRB-, Kinasen- und FATC-Domäne. HEAT ist eine Protein-Protein Interaktions-Struktur, die aus 2 anti-parallelen α -Helices aufgebaut wird und in Huntingtin, Elongationsfaktor 3, PR65/A und TOR vorkommt.

FAT ist ein Bestandteil aller Mitglieder der PIKK Familie und steht für FRAP, ATM und TRAP. Es wird vermutet, dass FAT und FATC (=FAT C-Terminus) über noch unbekannte Mechanismen die Kinaseaktivität von mTOR beeinflussen.

Schließlich steht FRB für FKBP12/Rapamycin Bindungsdomäne und stellt die Bindungsstelle für den mTOR-Inhibitor Rapamycin im Komplex mit FK506-Bindungs-Protein 12 (FKBP12) dar (25) (Abbildung 12).

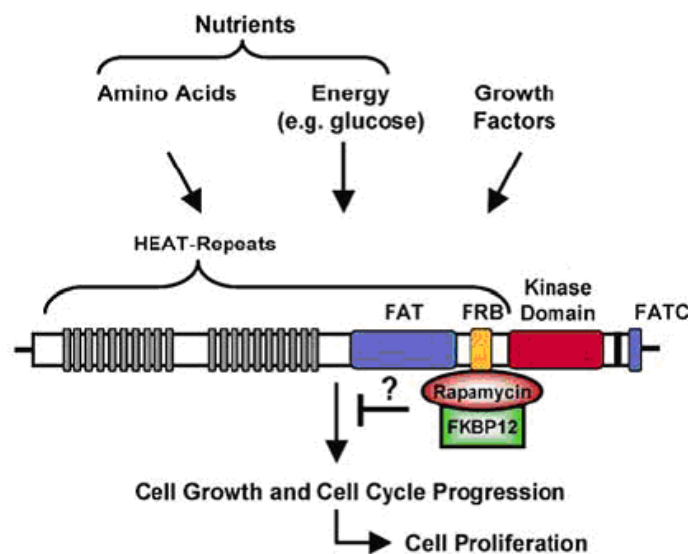


Abbildung 12: Struktur von mTOR (22)

1.5.4 Die zwei mTOR Komplexe

mTOR entfaltet seine Wirkung im Komplex mit assoziierten Proteinen, dem mTOR Komplex 1 (mTORC1) und dem mTOR Komplex 2 (mTORC2).

1.5.4.1 mTORC1

Der mTOR Komplex 1 (mTORC1) setzt sich aus mTOR, Regulatory Associated Protein of mTOR (Raptor) und mLST8 zusammen und ist jener Komplex, der durch Rapamycin gehemmt wird. Besonders Raptor ist eine essentielle und wahrscheinlich nicht-enzymatische Untereinheit von mTORC1. Ähnlich wie bei mTOR, führt der Genverlust von Raptor in Mäusen zu ihrem frühen embryonalen Tod. Besonders für die Phosphorylierung der mTOR-Effektoren S6 Kinase 1 (S6K1) und Eukaryotischer Initiationsfaktor - 4E-Bindungsprotein (4E-BP1) durch mTOR ist Raptor unabdingbar. Jedoch gibt es gegensätzliche Ansichten bezüglich der Wirkung Raptors auf mTOR. Denn während es in einigen Experimenten einen positiven Effekt auf mTOR hatte, wurde bei anderen Experimenten eine negative Wirkung auf mTOR nachgewiesen (25).

1.5.4.2 mTORC2

mTORC2 wird aus mTOR, Rapamycin-insensitive Companion of mTOR (Rictor), Sin1 und mLST8 zusammengesetzt.

mTORC2 hat ganz andere physiologische Aufgaben als mTORC1. Es dürfte ähnliche Funktionen haben wie das TORC2 der Hefe, welches das Actin-Cytoskelett über die Familie der kleinen Rho GTPasen reguliert.

Über die Aktivierung von mTORC2 ist noch nicht viel bekannt. mTORC2 reagiert zum Beispiel nicht auf Aminosäuren. Wachstumsfaktoren hingegen können mTORC2 aktivieren. Der Mechanismus dieser Aktivierung muss jedoch noch genauer untersucht werden (25).

Es konnte gezeigt werden, dass mTORC2 die lang gesuchte Phosphoinositide-dependent Kinase (2PDK2) darstellt, die neben PDK1 für die Phosphorylierung von Akt zuständig ist. Diese Phosphorylierung ist aber nicht für die Aktivierung der Kinase notwendig, wird aber benötigt, um andere Substrate, wie den Transkriptionsfaktor FoxO, zu phosphorylieren.

mTORC2 wird außerdem für die Phosphorylierung von PKC α benötigt und erhöht dadurch dessen Stabilität (26).

Es wurde auch eine neue Komponente von mTORC2 entdeckt, die auch einen Einfluss dieses Komplexes auf den Zellwachstum und die Zellproliferation annehmen lässt. Bei dieser Komponente handelt es sich um Proline-Rich Protein 5 (PRR5), das mit Rictor interagieren kann. Seine Hemmung führt zu einer verminderten Phosphorylierung von Akt und S6K1 und geht mit einer verminderten Expression des PDGFR- β Rezeptors einher (27).

1.5.5 Die Hemmung von mTOR

1.5.5.1 Tuberöse Sklerose Komplex 1 und 2

Tuberous Sclerosis Komplex 1 (TSC1) und TSC2 sind Tumorsuppressorgene, deren Mutationen zur Tuberösen Sklerose führen können. Bei ungünstigen Bedingungen, wie Nährstoffmangel, unterdrückt der TSC1/TSC2 Komplex die Aktivität von mTORC1 durch Ras-homolog-enriched-in-brain (Rheb). Rheb ist eine GTPase, die mTORC1 aktiviert. TSC2 hemmt Rheb, indem es als GTPase-aktivierendes Protein fungiert und dadurch Rheb vom GTP-gebundenen, aktiven Zustand in den GDP-gebundenen, inaktiven Zustand überführt. Durch die Hemmung von TSC wird der hemmende Effekt auf mTORC1 aufgelöst und die Steigerung des Zellwachstums in Gang gesetzt (25).

TSC stellt auch die Verbindungsstelle des PI3K/Akt- und des Ras-Raf-MAPK-ERK-Signalweges mit dem mTOR-Signalweg dar, denn beide Signalwege sind in der Lage, TSC zu hemmen (21). Weiters konnte gezeigt werden, dass es durch TSC auch zu einer höheren Aktivität von mTORC2 gegenüber Akt kommt. Dieser Effekt scheint aber unabhängig von Rheb zu sein (28).

1.5.5.2 PRAS40

Proline-rich Akt substrate 40 kDa (PRAS40) hemmt die Funktion von mTORC1 auf direkte Art. Noch ist die Funktionsweise dieser Hemmung nicht eindeutig geklärt. Es könnte direkt die Kinase-Domäne von mTOR binden oder auch über Raptor mit mTOR assoziiert sein. PRAS40 vermittelt auch Signale von Wachstumsfaktoren an mTORC1, aber ob es auch die Verfügbarkeit an Nährstoffen erkennen kann, ist noch nicht bekannt (25).

1.5.5.3 Energiemangel

mTORC1 ist in der Lage, die Menge an ATP in der Zelle zu erkennen und bei Energiemangel die Proteintranslation via S6K1 und 4E-BP1 zu vermindern. Der Sensor für die zelluläre Energie ist dabei die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), die durch die AMP-ATP Ratio reguliert wird. Eine hohe AMP/ATP-Ratio bewirkt die Bindung von AMP an AMPK. Dadurch wird AMPK aktiviert, phosphoryliert in weiterer Folge TSC2 und führt so zu einer Hemmung der Proteintranslation (25).

AMPK scheint aber auch Raptor zu phosphorylieren und dadurch zu dessen Bindung an 14-3-3 zu führen und mTORC1 zu inhibieren (28).

1.5.6 Die Aktivierung von mTOR

1.5.6.1 Nährstoffe

Nährstoffe sind ein wichtiger Stimulus für TOR. So können hohe Mengen an Aminosäuren das Fehlen anderer mTORC1 Inputs kompensieren. In einzelligen Organismen wird TOR einzig durch Nährstoffe aktiviert. Der genaue Mechanismus, wie Nährstoffe mTORC1 aktivieren, ist jedoch nicht zur Gänze geklärt (20).

1.5.6.2 Wachstumsfaktoren

Zu den Signalwegen, die zu einer Aktivierung von mTOR durch Wachstumsfaktoren führen, zählen der PI3K/Akt- und ERK/RSK-Signalweg. Auch die Phosphatidsäure führt zu einer Aktivierung von mTOR durch Wachstumsfaktoren (28).

1.5.6.2.1 Der PI3K-Signalweg

PI3K hat viele Funktionen in der Zelle. Neben ihrem Einfluss auf Zellwachstum, Zellzyklus-Progression und Proliferation ist sie auch für das Zellüberleben und die Zellmigration zuständig. Der PI3K-Signalweg liegt parallel zum mTOR-Signalweg, ist ihm aber auch vorgeschaltet. Diese beiden Signalwege fließen schließlich an denselben Effektoren zusammen. Während mTOR besonders für das Erkennen des Aminosäuren- und Energiegehaltes der Zelle verantwortlich ist, leitet PI3K die Signale von Wachstumsfaktoren, Mitogenen und Hormonen weiter.

Außerdem sind die zwei eigentlichen PI3K Inhibitoren Wortmannin und LY294002 auch in der Lage, mTOR selbst zu hemmen (22) (Abbildung 13).

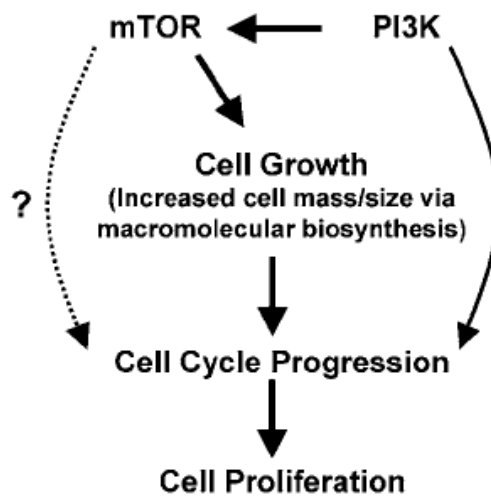


Abbildung 13: Der PI3K/mTOR-Signalweg (22)

Die Bindung von Wachstumsfaktoren an ihren Oberflächenrezeptor führen zur Produktion des Second Messengers Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) durch die Lipidkinase PI3K. PIP₃ wiederum rekrutiert PDK1 und Akt zur Membran, wo Akt durch PDK1 phosphoryliert und dadurch aktiviert wird. Aktiviertes Akt ist nun in der Lage, TSC2 und PRAS40 zu inaktivieren und so deren hemmende Wirkung auf mTOR aufzuheben (20).

1.5.6.2.2 Phosphatidsäure

Durch die Stimulation der Phospholipase D1 (PLD1) durch Rheb kommt es zu einer erhöhten Produktion von Phosphatidsäure (PA), die in der Lage ist, mit der FRB Domäne von mTOR zu interagieren und mTOR zu aktivieren. Es besteht weiters eine Überlappung zwischen den Bindungsstellen von Rapamycin und der Phosphatidsäure, die die Aktivierung von mTOR durch PA beeinflussen könnte (28).

1.5.7 mTORs Einfluss auf die Translation

Die gesteigerte Proteinsynthese, die die Voraussetzung für Zellwachstum und Proliferation darstellt, ist Folge einer gesteigerten Translation, die sich aus drei Phasen zusammensetzt, nämlich der Initiation, Elongation und der Termination (21).

mTOR bewirkt die Phosphorylierung von Faktoren, die eine Rolle in der Translations-Initiation spielen und führt dadurch zu einer erhöhten Translation bestimmter mRNAs, die beschleunigtes Wachstum und Proliferation erzeugen (29).

Auch der Wnt-Signalweg kann durch den TSC-mTORC1-Signalweg das Zellwachstum durch erhöhte Translation stimulieren. Wnt (wingless and int) bewirkt durch seine Bindung an die Rezeptoren der Frizzled-Familie eine Kaskade an intrazellulären Signalen. Wnt erreicht die Aktivierung von mTOR, indem es die hemmende Wirkung von Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) auf mTORC1 aufhebt (25).

1.5.8 mTORs Einfluss auf die Transkription

Die Proteintranslation ist auch abhängig von einer genügenden Anzahl an Ribosomen, die mTOR durch die Regulation der Ribosomenbiogenese beeinflusst (21).

Ein Effektor von mTOR ist Unconventional Prefoldin RPB5 Interactor (URI), der die RNA aller drei Polymerasen bindet und wichtig für die transkriptionelle Regulation ist.

Es ist auch in der Lage, mit Hilfe von S6K1 den Transkriptionsfaktor Upstream Binding Factor (UBF) zu phosphorylieren, die Transkription der rDNA zu aktivieren und somit die Ribosomenbiogenese zu fördern (22).

So stimuliert mTOR also die Transkription aller Gene, die in den Prozess der Ribosomenbiogenese involviert sind. Dazu gehört die Transkription von rRNA Genen durch die RNA Polymerase I, von ribosomalen Proteingenen durch die RNA Polymerase II und die Transkription von tRNA und 5S Genen durch die RNA Polymerase III.

Einen weiteren Einfluss auf die Transkription erlangt es über die Phosphorylierung von Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) und STAT3 und die Aktivierung des nuklearen Peroxisom Proliferator Aktivierten Rezeptors Gamma (PPAR γ) (29) (Abbildung 14). Außerdem reguliert mTORC1 die Expression mitochondrialer Gene über den Transkriptionsfaktor Ying Yang 1 (YY1) und beeinflusst den mitochondrialen Metabolismus (28).

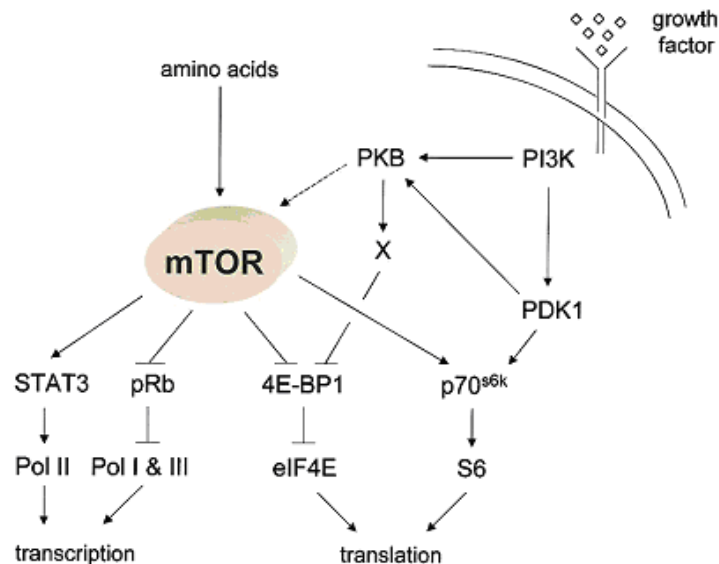


Abbildung 14: Effekte von mTOR (30)

1.5.9 mTOR-Substrate

mTOR reguliert die Proteinbiosynthese, den Zellwachstum und in weiterer Folge auch die Proliferation durch dieselben Effektoren S6K1 und 4E-BP1.

Damit mTOR seine Substrate S6K und 4E-BP phosphorylieren kann, müssen diese ein funktionierendes TOR Signaling (TOS) Motiv enthalten. Raptor bildet einen Komplex mit seinen Effektorproteinen, indem es über dieses Motiv mit ihnen interagiert (22). Zusätzlich enthält 4E-BP1 auch ein RAIP Motiv, das für seine ausreichende Phosphorylierung durch mTORC1 benötigt wird und die Interaktion mit Raptor reguliert (28).

In der Folge wird die Rolle dieser 2 mTOR Substrate in der Translation näher beschrieben.

1.5.9.1 Allgemeines zur Initiation der Translation

Die Translation der mRNA erfolgt an den Ribosomen. Diese binden nicht direkt an die mRNA, sondern müssen zur mRNA rekrutiert werden. Für diesen Vorgang werden eukaryotische Initiationsfaktoren (eIF) benötigt. Diese Rekrutierung stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Translation dar.

Alle im Kern transkribierten mRNAs weisen eine Cap-Struktur (m^7GpppN) an ihrem 5' Ende auf. Diese Struktur ist sehr wichtig für die Initiation der Translation, denn sie wird von eIF4E erkannt. Zusammen mit dem Adapterprotein eIF4G führt es die Translationsmaschinerie mit dem 5' Ende der mRNA zusammen.

eIF4E und eIF4G sind Bestandteile eines Komplexes, der eIF4F genannt wird. Das dritte Mitglied dieses Komplexes ist die RNA Helikase eIF4A.

eIF4F bindet an das 5' Ende der mRNA und bewirkt die Auflösung der Sekundärstruktur der mRNA an ihrem 5' untranslatierten Bereich (5' UTR) durch eIF4A und dem Kofaktor eIF4B.

Das Adapterprotein eIF4G vermittelt den Kontakt mit anderen Komponenten der Translationsmaschinerie, wie zum Beispiel dem eIF3. Durch seine Interaktion mit eIF3 und seine Bindung an die mRNA verbindet es die mRNA mit der 40S ribosomalen Untereinheit. Die an die mRNA gebundene 40S ribosomale Untereinheit läuft daraufhin in 3'-Richtung auf der mRNA entlang und sucht das Startcodon AUG und ermöglicht so die weiteren Schritte der Translation (31) (Abbildung 15).

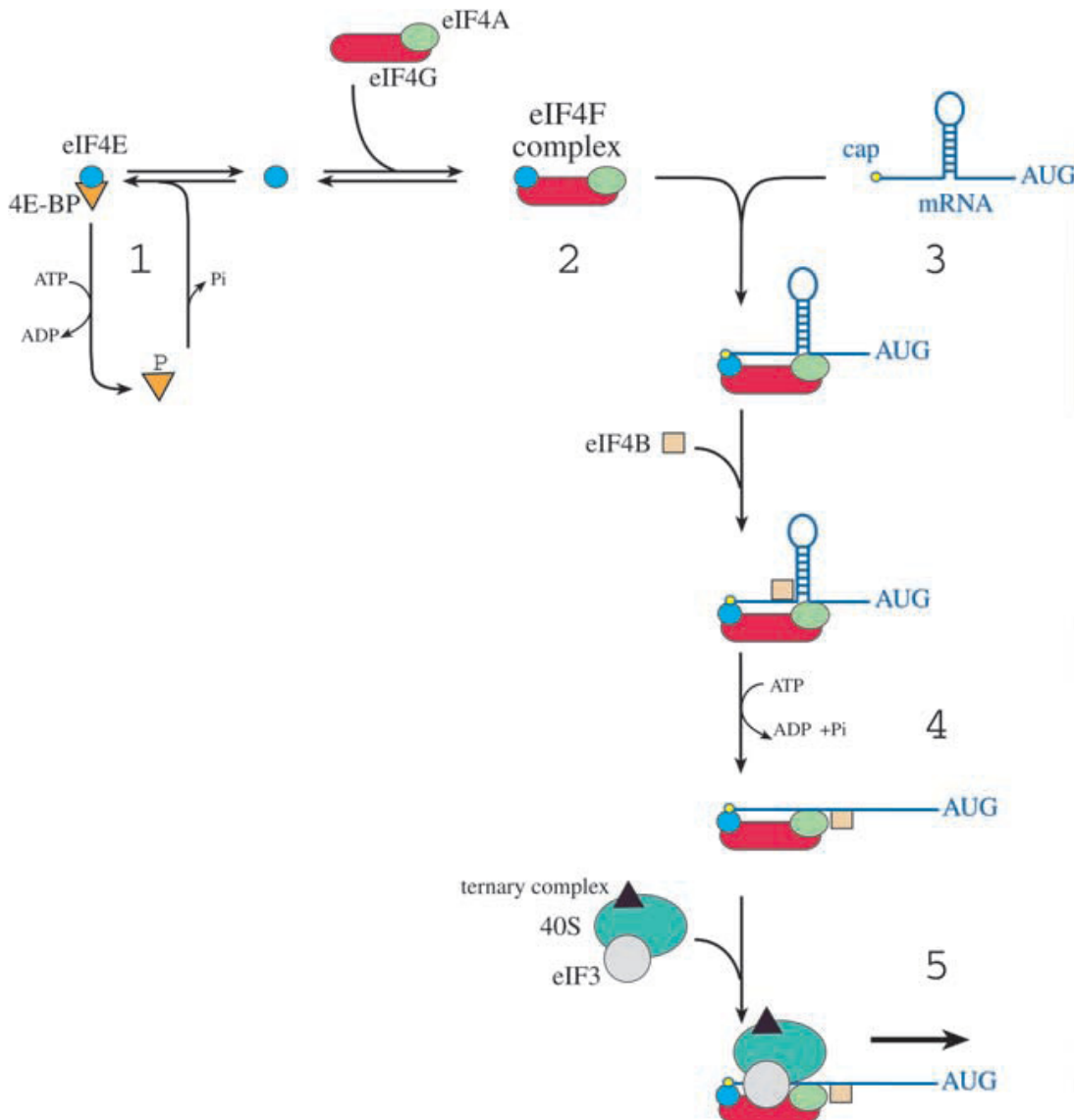


Abbildung 15: Die Initiation der Translation (31)

1.5.9.2 eIF4E-BP1

Das eIF4E-BP1 ist ein Translationsrepressor-Protein, das die Cap-abhängige mRNA Translation hemmt, indem es sich an den eukaryotischen Translations-Initiationsfaktor 4E (eIF4E) bindet (25).

eIF4E-BP1 konkurriert gegen eIF4G um die gleiche Bindungsstelle auf eIF4E. mTOR phosphoryliert eIF4E-BP1 an mehreren Stellen, löst eIF4E-BP1 von eIF4E und leitet dadurch die Translation ein (29) (Abbildung 16).

Außerdem beeinflusst mTOR die intrazelluläre Position von eIF4E, und eine erhöhte Expression von eIF4E führt zu einem Anstieg spezifischer Proteine wie c-myc oder Cyclin D1 (32).

1.5.9.2.1 Die Phosphorylierung von 4E-BP1

Die Phosphorylierung von 4E-BP1 findet in einer bestimmten Reihenfolge an mehreren Stellen statt (22). Es wird an 7 Stellen phosphoryliert, wobei mTOR für die Phosphorylierung von mindestens 4 Stellen verantwortlich ist (32). Zwei dieser Phosphorylierungsstellen sind Rapamycin-resistent. Das lässt darauf schließen, dass auch andere Kinasen diese Stellen phosphorylieren können. Die anderen 2 Stellen werden wahrscheinlich entweder durch mTOR-abhängige Kinasen oder in Folge einer Hemmung von Phosphatasen durch mTOR phosphoryliert. Denn mTOR phosphoryliert diese Stellen nicht *in vitro*.

Die Phosphorylierung von 4E-BP1 wird außerdem von PI3K und wahrscheinlich auch von MAPK reguliert (22).

1.5.9.3 S6K1

Zellen von Säugetieren enthalten zwei verschiedene S6 Kinasen, die als S6K1 und S6K2 bezeichnet werden. S6K1 spielt eine wichtige Rolle für Zell- und Körperwachstum, während S6K2 diesen Effekt nicht zeigt.

Während für viele Jahre nur das ribosomale Protein S6 (RPS6) als einziges S6K Substrat bekannt war, kennt man heute einige andere Substrate dieses Enzyms (Abbildung 17).

Zu den Substraten, die Teil der Translationsmaschinerie sind, gehören das ribosomale Protein S6, die eukaryotische Elongationsfaktor 2-Kinase und der eukaryotische Translations-Initiationsfaktor 4B.

Es wurde angenommen, dass S6K1 die Zellgröße durch eine erhöhte Translation von 5'TOP (terminaler Oligopyrimidin) mRNAs reguliert. Diese mRNAs kodieren für Komponenten, die während der Translation gebraucht werden. Diese Annahme stellte sich aber nicht als richtig heraus. Es konnte noch nicht eindeutig festgestellt werden, auf welche Weise mTOR die Translation von TOP mRNAs reguliert (33). In Abwesenheit von Wachstumsstimuli ist S6K1 an den eukaryotischen Initiationsfaktor 3 (eIF3) gebunden und somit inaktiv. mTOR kann eIF3 binden und S6K1 phosphorylieren. Dadurch wird S6K1 von eIF3 gelöst und aktiviert. Nun kann sie Substrate wie S6 phosphorylieren und dadurch Translation und Zellwachstum auslösen (25) (Abbildung 16).

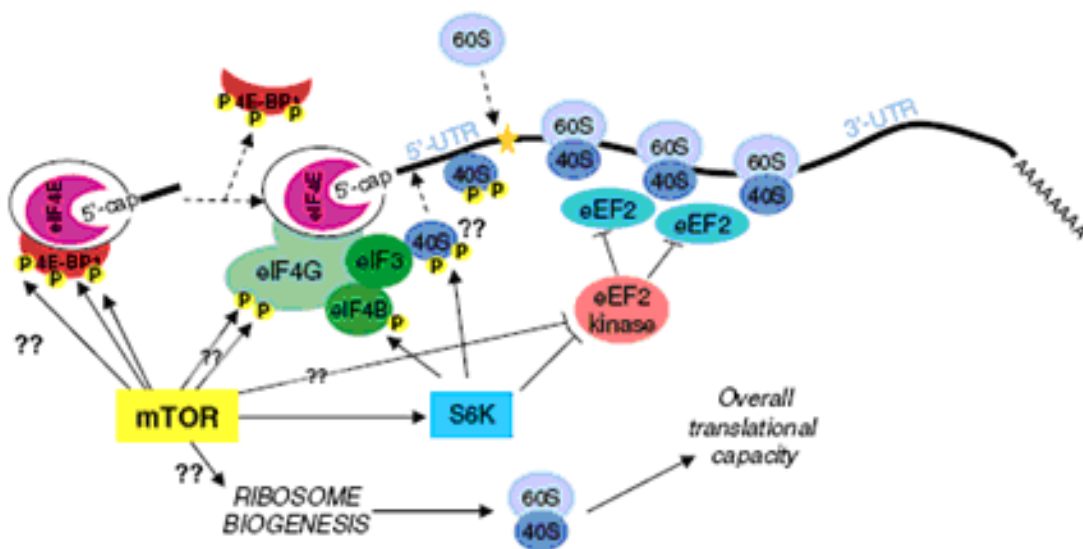


Abbildung 16: mTOR und die Translation (32)

1.5.9.3.1 Die Phosphorylierung von S6K1

S6K1 wird auf komplexe Weise reguliert und enthält mindestens 8 Phosphorylierungsstellen, die unter anderem von mTOR beeinflusst werden.

Auch einige Effektoren von PI3K sind für die Aktivierung von S6K1 verantwortlich. Zu ihnen zählen: PDK1, Akt, PKC ζ und λ und die kleinen G-Proteine Csc42 und Rac1. Besonders wichtig für ihre Aktivität ist die Phosphorylierung von Serin 371, deren verantwortliche Kinase nicht bekannt ist, und Threonin 389, das von mTOR phosphoryliert wird. Threonin 389 ist auch jene Stelle, die am empfindlichsten auf die Hemmung durch Rapamycin reagiert.

mTOR hat auch einen Einfluss auf zwei weitere Phosphorylierungsstellen, die durch Rapamycin dephosphoryliert werden können. Dieser Effekt wird durch Phosphatasen, die durch mTOR gehemmt werden, ausgelöst. Rapamycin bewirkt

durch die Hemmung von mTOR deren Aktivierung und die Dephosphorylierung von S6K.

Aber auch PI3K-abhängige Signale scheinen im Stande zu sein, Threonin 389 zu phosphorylieren (22).

1.5.9.3.2 RPS6

Ribosomen von höheren Eukaryoten bestehen aus der kleinen 40S- und der großen 60S-Untereinheit. Die kleine Untereinheit wird durch die 18S rRNA und 33 Proteine aufgebaut, während die große Untereinheit aus 3 RNA Molekülen und 46-47 Proteinen zusammengesetzt wird. Eines dieser Proteine ist RPS6. Es befindet sich zwischen den beiden Ribosomenuntereinheiten und interagiert mit tRNA, Initiationsfaktoren und mRNA.

Für die volle Phosphorylierung von RPS6 werden sowohl S6K1, als auch S6K2 benötigt, wobei vor allem S6K2 für die Phosphorylierung zuständig ist.

Außerdem wird die Phosphorylierung von RPS6 an zwei Stellen durch die MAPK-abhängige Kinase vollzogen.

RPS6 bewirkt durch seine Phosphorylierung das Wachstum von Zellen. In Maus-Embryo-Fibroblasten (MEF) scheint die Phosphorylierung von RPS6 jedoch die Proteinsynthese und Proliferation zu vermindern.

Die erhöhte Proteinsynthese und Zellproliferation in RPS6^{P-/-} Zellen könnte dadurch erklärt werden, dass S6K unter physiologischen Umständen vor allem RPS6 phosphoryliert, da es im Übermaß in der Zelle vorhanden ist. Dadurch würden andere Substrate von S6K nicht in hohem Maße phosphoryliert werden. In Abwesenheit von RPS6 würden dann diese Substrate einer gesteigerten Phosphorylierung ausgesetzt sein, welche zu ihrer erhöhten Aktivierung und in weiterer Folge zu einer gesteigerten Proteinsynthese und Proliferation führen könnte.

RPS6 könnte auch ein Protein mit zwei verschiedenen Funktionen darstellen, das auch extra-ribosomale Prozesse beeinflussen kann. So wurde RPS6 auch in Assoziation mit dem Chromatin von Hepatozyten beobachtet, dessen Phosphorylierung im Kern der Zelle stattfand (33).

1.5.9.3.3 Andere S6K Substrate

Die eukaryotische Elongationsfaktor 2-Kinase hemmt den eukaryotischen Elongationsfaktor 2 und vermindert daher die Translation. Nach einer Phosphorylierung der Kinase durch S6K1 wird diese Hemmung rückgängig gemacht.

Der eukaryotische Translations-Initiationsfaktor 4B ist ein Kofaktor des eukaryotischen Initiationsfaktors 4A. Er erhöht dessen Prozessivität und die Translationsrate von mRNAs mit stark strukturierten 5' UTRs. Die Phosphorylierung von eIF4B durch S6K1 scheint eine Wirkung auf dessen Rekrutierung zu eIF4A zu haben (33).

In diesen Prozess soll auch die Phosphorylierung des Programmed Cell Death Protein 4 (PDCD4) impliziert sein. Dies ist ein Tumorsuppressor, der die RNA Helikase eIF4A hemmt (34).

1.5.9.3.4 Zytoplasmatische und kernständige Substrate

Zu den ersteren zählt das proapoptotische Protein BAD. Diese Protein wird durch S6K1 gehemmt und dadurch eine Apoptose verhindert (33). Außerdem phosphoryliert S6K1 das Insulin Rezeptor Substrat-1 (IRS-1) und fördert dessen Abbau. Durch diesen negativen Feedback Mechanismus kommt es zur Hemmung des mTOR-Signalweges und zu einer Insulinresistenz.

Schließlich ist auch mTOR selbst ein Substrat von S6K. Die Auswirkungen dieser Phosphorylierung sind jedoch noch nicht geklärt. S6K könnte aber die intrinsische Kinaseaktivität von mTOR erhöhen und dadurch die Funktion von mTORC1 durch S6K1 regulieren (25).

Zu den Substraten im Zellkern gehören SKAR, CREM_T und CB80.

SKAR ist die Abkürzung von S6K1 Aly/REF-like Target. SKAR rekrutiert aktiviertes S6K1 zum Exon-Junction-Komplex der mRNA und steigert dadurch die Effizienz der Translation (28).

CREM_T steht für „Responsive Element Modulator _T“ und ist ein Transkriptionsfaktor. Die Rolle seiner Phosphorylierung in der Steuerung der Transkription konnte jedoch noch nicht geklärt werden.

CBP80 ist eine Untereinheit des Cap-Bindungskomplexes. Jedoch konnte nicht eindeutig gezeigt werden, dass es tatsächlich ein S6K Substrat ist, und auch die Konsequenz seiner Phosphorylierung ist nicht bekannt (33).

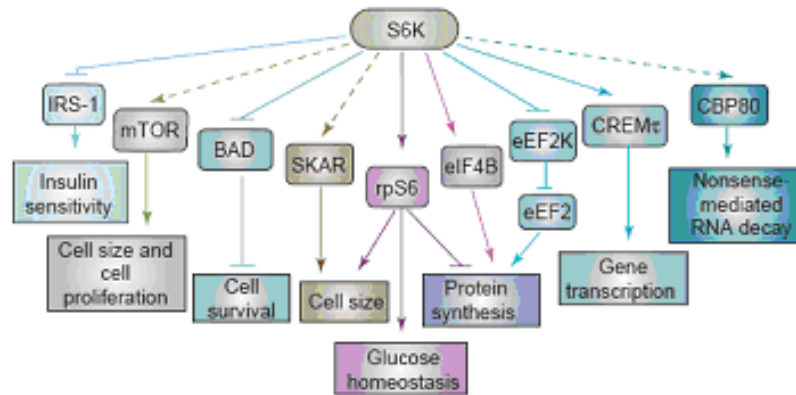


Abbildung 17: S6K und ihre Substrate (33)

1.5.10 Folgen der Entgleisung des mTOR-Signalweges

mTOR wird durch sehr komplexe Signale reguliert, und die Aktivierung dieses Signalweges hat wiederum sehr vielfältige Auswirkungen (Abbildung 18).

Deshalb spielt dieser Signalweg eine wichtige Rolle bei vielen Prozessen wie Neoplasien, kardiovaskulären, entzündlichen und metabolischen Erkrankungen.

Obwohl die Rolle von TOR bei der Wachstumskontrolle von einzelnen Zellen recht gut untersucht wurde, ist seine Wirkung in multizellulären Geweben und Organismen noch nicht zur Gänze erforscht.

Daher ist es von großer Wichtigkeit, die Rolle des mTOR-Signalweges in verschiedenen Geweben, wie zum Beispiel der Leber, genauer zu untersuchen (20).

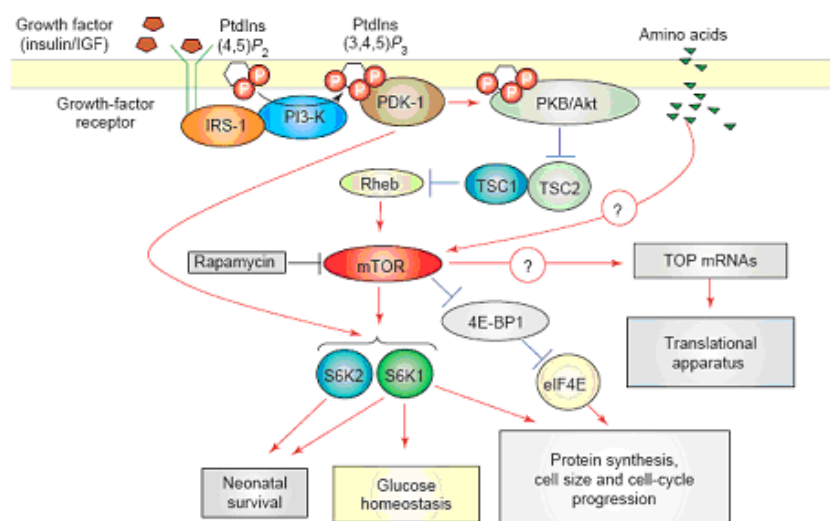


Abbildung 18: Wichtigste Aspekte des mTOR-Signalweges (33)

1.6 Rapamycin

Rapamycin wurde in einer Bodenprobe, die auf den Osterinseln gesammelt wurde, gefunden und nach seinem Entdeckungsort, Rapa Nui, benannt. Isoliert wurde es aus dem Bakterienstamm *Streptomyces hygroscopicus*.

Anfänglich wurde Rapamycin als fungizides Mittel verwendet, bevor man seine immunsuppressiven und antiproliferativen Eigenschaften entdeckte.

Es ist ein lipophiles Makrolid mit der chemischen Formel $C_{51}H_{79}NO_{13}$ (21) (Abbildung 19).

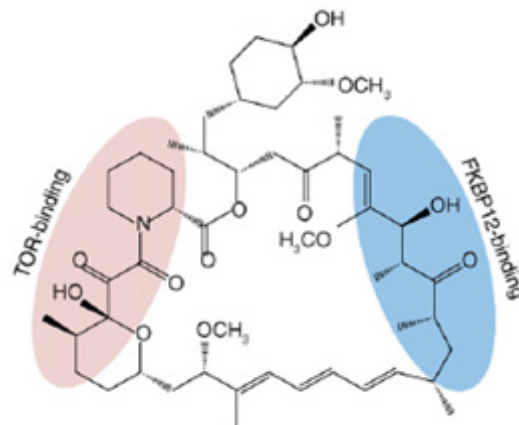


Abbildung 19: Rapamycin (35)

Seine Wirkung entfaltet Rapamycin durch Bindung und Hemmung von mTOR in der Zelle. Um dies zu erreichen, muss es zuvor einen Komplex mit dem FK506-Bindungsprotein 12 (FKBP12) bilden (25) (Abbildung 20).

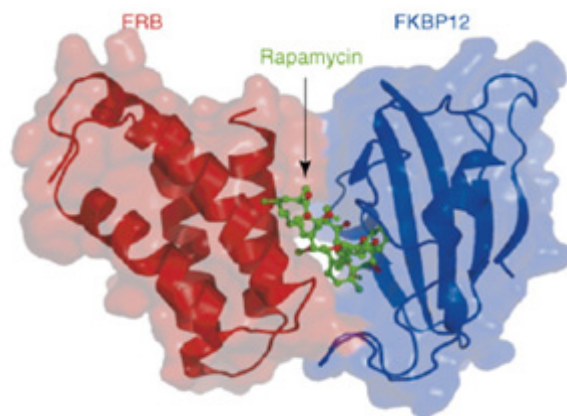


Abbildung 20: Rapamycin im Komplex mit FKBP12 und der FRB-Domäne von mTOR (35)

Es konnte jedoch noch nicht eindeutig festgestellt werden, ob es direkt die intrinsische Kinaseaktivität oder die Interaktion von mTOR mit seinen Substraten hemmt (25).

Durch die Hemmung von mTOR kommt es zu einer Hemmung der Synthese von Proteinen, die für die Ribosomen-Biosynthese, die Protein-Translation und den Übergang des Zellzyklus von der G₁- in die S-Phase benötigt werden (36).

Seine immunsuppressive Wirkung ist auf die Blockierung der Proliferation von B- und T-Lymphozyten zurückzuführen.

Jedoch unterscheidet sich das Ausmaß der Hemmung des Zellzyklus durch Rapamycin in verschiedenen Zelltypen von Säugetieren. In Zellen, die gar keine mTOR-Kinaseaktivität aufweisen, zeigt Rapamycin sogar eine noch stärkere Wirkung hinsichtlich der Zellgröße und G₁-Phasen-Progression. Es wäre also möglich, dass Rapamycin nicht zu einer vollkommenen Inhibierung der mTOR-Funktion führt oder dass mTOR den Zellwachstum und Zellzyklus auch auf Rapamycin-resistente Art beeinflussen kann (22).

So wurde angenommen, dass mTORC2 nicht durch Rapamycin gehemmt werden kann, weil einige Komponenten von mTORC2 die Bindung von Rapamycin/FKBP12 an die FRB Domäne von mTOR verhindern (25). Es konnte aber gezeigt werden, dass eine verlängerte Rapamycin-Behandlung bestimmter Zellen zu einem verminderten Gehalt des mTORC2-Komplexes führt. Dieser Effekt kommt wahrscheinlich dadurch zustande, dass der Rapamycin-FKBP12 Komplex an neu gebildetes mTOR bindet und somit eine Bindung von Rictor an diese Stelle verhindert (32).

In Fibroblasten scheint aber Rapamycin keinen Effekt auf mTORC2 zu haben (26). Zusätzlich zu seiner Hemmung aktiviert Rapamycin auch die Typ 2A Phosphatase, wodurch es zu einer Dephosphorylierung der mTOR Substrate S6K1 und 4E-BP1 kommt (29).

1.6.1 Unterschiedliche Wirkung von Rapamycin gegenüber S6K und 4E-BP1

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass Rapamycin die Phosphorylierung von S6K und 4E-BP1 nicht in gleichem Maße inhibiert und diese Wirkung von der Art des Zelltyps abhängig ist. In diesem Versuch wurden verschiedene Zellen 24 Stunden lang mit Rapamycin behandelt. Während Rapamycin die Aktivität von S6K in der gesamten Zeit hemmen konnte, wurde die Phosphorylierung von 4E-BP1 nur in den ersten drei Stunden gehemmt.

mTORC1 scheint mit der Zeit eine Resistenz gegenüber Rapamycin zu entwickeln, besonders hinsichtlich der Phosphorylierung von 4E-BP1. Als Folge der Rephosphorylierung von 4E-BP1 wird die Cap-abhängige Translation und die Translation von Genen mit einer stark strukturierten 5' UTR trotz der mTOR-Inhibition wieder in Gang gesetzt. Denn eine erhöhte Verfügbarkeit von eIF4E führt zu einer bevorzugten Translation von mRNAs mit stark strukturierten 5' UTRs.

Durch Rapamycin verändert sich zwar die Konformation des mTORC1 Komplexes zu einem weniger aktiven Zustand, für die Rephosphorylierung von 4E-BP1 wird jedoch dennoch mTORC1 gebraucht. Das könnte dadurch erklärt werden, dass durch eine verlängerte Rapamycin-Behandlung die molekulare Interaktion zwischen 4E-BP1, mTOR und Raptor verändert wird. Dadurch bleibt zwar die Aktivität von mTORC1 erhalten, aber die Bindung an sein Substrat könnte verändert sein.

Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass andere noch nicht bekannte Substrate von mTOR womöglich auch durch andere Mechanismen reguliert werden könnten und eine Inhibition der Phosphorylierung von S6 nicht bedeuten muss, dass andere mTOR Substrate auch gehemmt werden (37).

1.7 Der mTOR-Signalweg und die Leberfibrose

1.7.1 Die antifibrotische Wirkung von Rapamycin

Zhu et al. (38) gelang es erstmals 1999 zu zeigen, dass eine Hemmung von mTOR durch Rapamycin eine Hemmung der Fibrogenese, bei Ratten mit einer durch Kohlenstofftetrachlorid (CCl₄) ausgelösten Leberfibrose, zur Folge hat. Den Ratten wurde 8 Wochen lang CCl₄ injiziert, und eine Leberfibrose mit zentrilobulärer und periportal Ablagerung von extrazellulärer Matrix ausgelöst. Jene Ratten, die gleichzeitig zur CCl₄ Gabe mit Rapamycin behandelt wurden, zeigten lichtmikroskopisch einen verminderten Gehalt an extrazellulärer Matrix. Diese Beobachtung konnte durch Messung eines erniedrigten Gehaltes an Kollagen bestätigt werden.

Rapamycin war auch in der Lage, die durch CCl₄ verursachte Erhöhung der Prokollagen und TGF-β1 mRNA aufzuheben. Auch der Gehalt der Gewebstransglutaminase (tTG), die in der Verbindung der extrazellulären Matrix involviert und deren Aktivität bei Leberschädigung und Fibrose erhöht ist, konnte durch Rapamycin signifikant vermindert werden (38).

1.7.2 In vitro Experimente

1.7.2.1 Stimulation der Sternzelle durch PDGF

Die gleiche Gruppe untersuchte auch die Wirkung von Rapamycin in einem *in vitro* Versuch an Fibroblasten der Haut und an Sternzellen von Ratten. Hier hatte Rapamycin keinen Effekt auf die Prokollagen oder TGF-β1 mRNA.

In Sternzellen, die mit PDGF stimuliert wurden, konnte Rapamycin jedoch die gesteigerte DNA-Synthese und somit ihre Proliferation inhibieren (38). In einem weiteren *in vitro* Experiment wurden Sternzellen mit PDGF stimuliert und die Phosphorylierung von S6K beobachtet, die in Abwesenheit von PDGF sehr schwach ausgeprägt war. Behandelte man nun diese Zellen mit Rapamycin, führte das zu einer Aufhebung der Phosphorylierung von S6K.

Hinsichtlich der Wirkung von Rapamycin auf die α1 Kollagen mRNA Expression und Typ1 Kollagen Protein Expression zeigte sich, dass Rapamycin die intra- und extrazelluläre Typ1-Kollagen Proteinexpression hemmen konnte, während es keine Verminderung der mRNA Expression von α1-Kollagen erzielte.

Da Rapamycin keine Auswirkungen auf die Höhe der α -SMA Expression hatte, scheint mTOR in der Aktivierung von Sternzellen keine Rolle zu spielen. Die Proliferationsrate der Sternzellen wurde hingegen durch Rapamycin deutlich reduziert.

Es wurde auch die Wirkung von TGF- β und TNF- α auf die kultivierten Sternzellen untersucht. In diesem Modell induzierte jedoch keines dieser Zytokine eine Phosphorylierung von S6K.

Durch dieses Experiment konnte also gezeigt werden, dass mTOR ein ausschlaggebender Faktor für die Proliferation der Sternzelle, ihre Kollagen-Proteinexpression und die Regulation des Zellzyklus nach einer Stimulation mit PDGF ist. Außerdem führte es zur Annahme, dass Rapamycin in der Lage ist, die Proliferation dieser Sternzellen zu verhindern und in weiterer Folge die Ablagerung von Kollagen zu minimieren (39).

1.7.2.2 Stimulation durch TGF

Nach einer Stimulation von kultivierten embryonalen Maus-Fibroblasten durch TGF- β zeigte sich, dass die zwei mTOR Komplexe mTORC1 und mTORC2 verschiedene Effekte haben (26). So wurde auch evident, dass TGF- β mTORC1 in Fibroblasten aktivieren kann und verantwortlich für ihr Wachstum ist. mTORC1 scheint aber keine Auswirkungen auf Veränderungen in Bezug auf Translation oder Transkription nach einer Stimulation mit TGF- β zu haben. mTORC2 hingegen hat einen Einfluss auf die durch TGF- β ausgelösten morphologischen Veränderungen von Fibroblasten. Es wurde auch eine Wirkung von mTORC2 auf den Kollagen Typ 1 Promoter beobachtet. mTOR spielt außerdem eine Rolle bei der durch TGF- β ausgelösten epithelial-mesenchymalen Transition.

In diesem Experiment hatte Rapamycin eine Auswirkung auf die kultivierten embryonalen Fibroblasten, die durch TGF- β stimuliert wurden. Es verhinderte deren Wachstum, hatte aber keinen Einfluss auf ihre morphologische Transformation oder die transkriptionelle Induktion von Kollagen Typ1.

Jedoch scheint eine kurzfristige Inhibition von mTORC1 andere Wirkungen zu haben als eine längerfristige. Denn die Inaktivierung von Raptor führte zu einer leichten Senkung der Kollagen Typ 1 Promoter-Aktivität.

Ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus dieser Beobachtungen wäre, dass Rapamycin in der Lage ist, die Translation wichtiger Effektoren von TGF- β zu verhindern (26).

TGF- β 1 reguliert außerdem den Gehalt der MMP-13 mRNA in Abhängigkeit der Kinasen p38MAPK, PI3K, AKT und S6K.

In einem *in vitro* Versuch an aktivierten Sternzellen von Mäusen konnte gezeigt werden, dass es 5 Minuten nach einer Verabreichung von TGF- β 1 zu einem vorübergehenden Anstieg von phosphorylierter S6K kommt, die nach 30 Minuten wieder sank. Nach 24 Stunden war der Gehalt der phosphorylierten S6K aber wieder signifikant erhöht.

Durch die Verabreichung von Rapamycin wurde sowohl der basale Wert der phosphorylierten S6K erniedrigt, als auch der durch TGF- β 1 erzielte Effekt aufgehoben. Rapamycin war auch imstande, die Erhöhung der MMP-13 mRNA Werte durch TGF- β 1 zu verhindern, während die Expression der α 1(I)-Kollagen mRNA unverändert blieb (40).

1.7.2.2.1 Effekt von Rapamycin auf Cycline

Die Untersuchung der Wirkung von Rapamycin auf Cycline zeigte, dass Rapamycin zu einer signifikanten Reduktion der Expression von Cyclin D1, D3 und Cyclin E führte und so das Voranschreiten der Sternzellen von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus verhindern konnte. Somit stand fest, dass der PI3k-Akt-mTOR-Signalweg auch in kultivierten Sternzellen den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus reguliert (39).

1.7.3 In vivo Experimente

Eine weitere Gruppe untersuchte die Wirkung von Rapamycin an Gallengang-ligierten Ratten. Diese Tiere entwickeln 4 Wochen nach der Abbindung des Gallenganges das volle Bild einer sekundär biliären Zirrhose mit proliferierenden Gallengängen, einem verminderten Gehalt an funktionellem Parenchym und der Ausbildung einer Fibrose. In diesem Versuch wurde die Behandlung mit Rapamycin unmittelbar nach der Ligatur des Gallenganges begonnen.

Es stellte sich heraus, dass durch Rapamycin der Zustand der Gallengang-ligierten Ratten verbessert werden konnte. So verminderte Rapamycin die Gewichtszunahme der Leber in den Gallengang-ligierten Ratten. Außerdem hatten

die mit Rapamycin behandelten Tiere kein erhöhtes Gewicht der Milz. Dies weist darauf hin, dass diese Tiere im Gegensatz zu den Gallengang-ligierten Ratten keine portale Hypertension hatten. Im Allgemeinen hatte Rapamycin auch einen positiven Einfluss auf die hämodynamischen Parameter und bewirkte auch die Senkung der AST-, Bilirubin-, und Gallensäurewerte. Morphologisch zeigten die mit Rapamycin behandelten Ratten im Vergleich zu den nicht behandelten Ratten einen niedrigeren Gehalt an Bindegewebe, Gallengangepithelzellen und aktivierten Sternzellen, während die Anzahl ihrer Hepatozyten erhöht war.

Es konnte also wieder eine deutliche Verminderung der Entstehung der Leberfibrose und eine Verminderung der Gallengangs-Proliferation durch Rapamycin nachgewiesen werden (13).

1.7.3.1 Effekt von Rapamycin auf für die Fibrogenese entscheidende Zytokine

Rapamycin war in der Lage, sowohl die Expression der TGF- β 1 mRNA als auch die TGF- β 1 Werte im Plasma zu senken.

Dieser Effekt scheint leberspezifisch zu sein, da in anderen Geweben, wie der Niere oder Lymphozyten, Rapamycin zu einem Anstieg der TGF- β 1 mRNA führt. Der größte Effekt von Rapamycin zeigte sich an CTGF. Hier senkte Rapamycin die CTGF mRNA um das 8-fache.

Die mRNA Werte der B-Kette konnten durch Rapamycin im Vergleich zu den Kontrollen um mehr als das Dreifache gesenkt werden.

Diese Ergebnisse zeigten, dass Rapamycin *in vivo* durch eine Hemmung der Proliferation auch die Genexpression der wichtigsten fibrogenen Zytokine inhibieren kann (13).

1.7.3.2 Rapamycins Einfluss auf Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren

Während der mRNA Gehalt von p27 in allen Gruppen gleich war, hatten die Gallengang-ligierten Tiere einen erniedrigten Gehalt des p27 Proteins. Durch Rapamycin wurde dieser Wert gesteigert und somit eine Proliferation gehemmt.

Die Proteinwerte von p21 hingegen waren in der Gruppe der Gallengang-ligierten Tiere am höchsten und wurden durch Rapamycin gehemmt. Dies ist ein Mechanismus, der die hemmende Wirkung von Rapamycin auf die Proliferation von Gallengängen und die Aktivierung von Sternzellen erklärt (13).

1.7.3.3 Rapamycin und 4E-BP1

Eine Wirkung von Rapamycin auf die Phosphorylierung von 4E-BP1 konnte in diesem Modell jedoch nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Zellkulturen und der gesunden Leber, hat Rapamycin in der regenerierenden und cholestatischen Leber anscheinend keine Wirkung auf die Phosphorylierung von 4E-BP1. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass die Phosphorylierung von 4E-BP1 bei niedriger mitogener Aktivität durch mTOR reguliert, bei einer Leberschädigung aber eine zusätzliche Rapamycin-resistente Kinase induziert wird.

Auf die Phosphorylierung von S6K zeigte Rapamycin aber den erwarteten hemmenden Effekt (13).

1.7.3.4 Die Wirkung von Rapamycin auf bereits bestehende Leberfibrose

Da man auch in der Praxis erst bei einer bestehenden Fibrose mit einer antifibrotischen Therapie beginnen würde, wurde die Wirkung von Rapamycin auch in diesem Kontext untersucht.

In einem weiteren Versuch wurde die Leberzirrhose entweder durch eine Gallengang-Ligatur oder durch Thioacetamid-Injektionen (TAA) hervorgerufen.

Bei den Gallengang-ligierten Ratten wurde nach 4 Wochen mit der Behandlung mit Rapamycin begonnen, während die mit TAA behandelten Ratten nach 6 Wochen Rapamycin erhielten, da sich bei ihnen erst zu diesem Zeitpunkt das volle Bild der Leberfibrose ausbildet. Die Behandlung mit Rapamycin wurde 14 beziehungsweise 28 Tage lang durchgeführt.

Die Wirkung von Rapamycin wurde auch an schein-operierten Ratten untersucht, zeigte jedoch keinerlei Auswirkungen.

Rapamycin verlängerte die Überlebensrate der Gallengang-ligierten Tiere. Die durch den Aminopyrin-Atemtest gemessene Leberfunktion verbesserte sich in beiden Fibrose-Modellen nach der 14-tägigen Behandlung mit Rapamycin. Nach der 28-tägigen Behandlung konnte dieser positive Effekt von Rapamycin nicht mehr nachgewiesen werden. Auf die erhöhte Prokollagen- α 1 mRNA hatte Rapamycin in keiner der Gruppen eine Wirkung (41). Die Wirkungen von Rapamycin auf die restlichen Parameter unterschieden sich abhängig von der Ätiologie der Leberschädigung.

1.7.3.4.1 Gallengang-Ligatur

Die durch die Gallengang-Ligatur hervorgerufene Wachstumseinschränkung und Hepato- und Splenomegalie, die als Indikator der portalen Hypertonie diente, konnten nach 14-tägiger Rapamycin-Behandlung positiv beeinflusst werden. Nach 28 Tagen war die Verbesserung im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch nicht mehr statistisch signifikant.

Rapamycin senkte den erhöhten Anteil an extrazellulärer Matrix in der Gallengang-ligierten Gruppe sowohl nach 14, als auch nach 28 Tagen. Auch der wesentlich erniedrigte Anteil an Hepatozyten der Gallengang-ligierten Ratten konnte durch Rapamycin nach sowohl 14, als auch nach 28 Tagen wieder gesteigert werden.

Einen weiteren positiven Effekt hatte Rapamycin auf die gesteigerte Zahl an periduktalen und sinusoidalen α -SMA positiven Zellen, also den portalen Fibroblasten und Sternzellen, nach 14, aber nicht nach 28 Tagen.

Die durch Messung des hepatischen Hydroxyprolins quantifizierte Leberfibrose wurde durch Gabe von Rapamycin nach 14- und 28-tägiger Behandlung vermindert.

Auch der Anteil an phosphorylierter S6K und die erhöhte MMP-2 Aktivität wurden durch Rapamycin sowohl nach 14, als auch nach 28 Tagen gesenkt.

Die TGF- β 2 mRNA Expression, die besonders in den Gallengang-ligierten Ratten erhöht war, wurde durch Rapamycin nur in der 14-tägig behandelten Gallengang-ligierten Gruppe gesenkt (41).

1.7.3.4.2 TAA-Injektionen

In der TAA Gruppe zeigten die Ratten eine Gewichtsabnahme nach 14 Tagen und eine Splenomegalie nach 14 und 28 Tagen.

Durch Rapamycin wurde die Gewichtsabnahme nach 14 Tagen sogar verstärkt und eine Wachstumsreduktion nach 28 Tagen hervorgerufen.

Das Leber- und Milzgewicht konnten nur nach der 14-tägigen, aber nicht nach der 28-tägigen Behandlung gesenkt werden. Auch der Anteil der extrazellulären Matrix und der α -SMA exprimierenden Zellen konnte nur nach 14-tägiger Rapamycin-Gabe reduziert werden.

Weiters war die Verminderung des erhöhten Hydroxyprolins, der erhöhten MMP-2 Aktivität und der Expression der TGF- β 1 mRNA durch Rapamycin auch nur nach 14-tägiger Behandlung zu beobachten (41).

Auch in diesem Experiment war Rapamycin also in der Lage, das Ausmaß der Leberfibrose zu vermindern und die Leberfunktion der Tiere zu verbessern. Dies war ein weiterer Beweis, dass die PI3-K/Akt-abhängige Aktivierung von mTOR eine zentrale Bedeutung in der Aktivierung von Sternzellen im Rahmen der Fibrogenese hat und der mTOR/S6K-Signalweg einen attraktiven Angriffspunkt für eine antifibrotische Therapie darstellen kann.

In der TAA Gruppe, die 28 Tage lang behandelt wurde, war Rapamycin nicht in der Lage, seine Wirkungen zu entfalten. Die hemmende Wirkung von Rapamycin auf die Leberfibrose könnte also von der Ätiologie der Leberschädigung abhängig sein. Die Hemmung von mTOR könnte auch durch alternative Mechanismen kompensiert werden und zu einer Resistenz gegenüber Rapamycin führen.

1.8 Ziel dieser Arbeit

Die oben dargelegten Ergebnisse über die positiven Auswirkungen von Rapamycin auf die hepatische Fibrose führten uns zur Hypothese, dass die Hemmung des mTOR-Signalweges auch zu einer Verminderung der Fibrose im *Mdr2* Knockout-Mausmodell einer sklerosierenden Cholangitis führen könnte.

Unser Ziel war es daher, die Auswirkungen der Hemmung des mTOR-Signalweges auf die Progression der Fibrose bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen zu untersuchen.

Material und Methoden

1.9 Tiere

Die Experimente wurden an 4 Wochen alten, männlichen *Mdr2* Knockout Mäusen durchgeführt (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Die Mäuse wurden einem 12:12 Stunden-Zyklus an Licht und Dunkelheit ausgesetzt und konnten nach Belieben Wasser und Standard-Mäusenahrung (Sniff, Soest, Deutschland) konsumieren.

Das Tierschutzgesetz wurde eingehalten und der Tierversuch nach den Richtlinien der Publikation „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ in NIH Publication 86-23, revised 1985, durchgeführt.

1.10 Rapamycin

Rapamune[®] (C₅₁H₇₉NO₁₃) im Vertrieb der Firma Wyeth Ayerst Pharmaceuticals.

1.11 Tierexperimentelles Protokoll

1.11.1 Rapamycin-Behandlung

Die Testgruppe erhielt Standard-Mäusenahrung (Sniff, Soest, Deutschland) und wurde 4 Wochen lang täglich mit Rapamycin behandelt. Rapamycin wurde mit der Standard-Mäusenahrung (Sniff, Soest, Deutschland) in einer Konzentration von 4mg/kg Körpergewicht vermischt.

Die Kontrollgruppe wurde mit einer Standard-Mäusenahrung gefüttert (Sniff, Soest, Deutschland).

1.12 Serum-Biochemie

Der Gehalt der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), der Alkalischen Phosphatase (AP) und dem totalem Bilirubin wurde an einem Hitachi 917 Analyzer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) gemessen.

1.13 Leber-Histologie

1.13.1 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Für die konventionelle Lichtmikroskopie wurden die mit Formalin fixierten Leberstücke in Paraffin eingebettet. Daraus wurden 3 µm dicke Schnitte hergestellt und die Hämatoxylin- und Eosin-Färbung durchgeführt.

Die Schnitte wurden geblindet von einem Hepatologen (P. F.) begutachtet.

1.13.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde für CD 11b, CK 19 und RPS6 durchgeführt.

Die Bindung des Antikörpers wurde durch den Streptavidin-Biotinperoxidase-Komplex (StreptABCComplex) (Dako) mit AEC (Dako) als Substrat ermittelt (42).

1.13.2.1 Neutrophilen Marker CD 11b

Die Immunhistochemie für den Neutrophilen Marker CD 11b wurde an Kryoschnitten durchgeführt, die in Formol/Methanol/Aceton fixiert wurden.

Die Fixierung erfolgte für jeweils 5 Minuten in 4% Formol in PBS, PBS und Methanol bei -20°C und für 3 Minuten in Aceton bei -20°C.

Als Antikörper diente der monoklonale Ratten Anti-CD 11b (Fa. PharMingen, San Diego, USA). Die Antikörper-Verdünnung betrug 1:50.

1.13.2.2 Cytokeratin 19 (CK 19)

Die Immunhistochemie für CK19 wurde an Kryoschnitten durchgeführt, die in Formol/Methanol/Aceton fixiert wurden.

Hier diente als Antikörper der Ratten Anti-Troma III Antikörper (Hybridoma Bank, Max Planck Institut, Freiburg, Deutschland) mit einer Verdünnung von 1:500.

1.13.2.3 Ribosomales Protein S6 (RPS6)

Die Immunhistochemie für RPS6 wurde an Paraffinschnitten durchgeführt, die in 0.1%-igem Na-Citratpuffer fixiert wurden. Vor der Fixierung wurden die Schnitte über Nacht im Brutschrank bei 60°C getrocknet und für 20 Minuten auf 67°C erhitzt. Danach erfolgte eine Entparaffinierung durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe.

Als Antikörper diente ein Hasen-Antikörper (Fa. Cell Signaling). Die Antikörperverdünnung betrug 1:50.

1.14 RNA-Isolierung und Photometrie

1.14.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde unter Verwendung von TRizol Reagent (Invitrogen, Österreich) nach dem Hersteller-Protokoll isoliert.

Das Protokoll besteht aus 5 Schritten:

Homogenisation: Die in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Leberproben wurden in 800µl TRIzol® Reagent (Invitrogen, Österreich) gefüllt und zweimal für 20 Sekunden zentrifugiert.

Separation: Um die Lösung in ihre verschiedenen Phasen aufzutrennen, wurde Chloroform hinzugefügt.

Nach 15-minütigem Drehen auf einer Rotationsplatte und 20-minütiger Zentrifugation erhält man drei verschiedene Phasen. Die untere Phase enthält Proteine, die mittlere Phase DNA, und in der oberen Phase befindet sich die RNA.

Präzipitation: Die RNA enthaltende Phase wurde in eine neue Tube transferiert und mit 5 µl Isopropanol vermischt und anschließend für 15 Minuten zentrifugiert. Danach erhält man die präzipitierte RNA als Pellet am Boden der Tube.

Waschung der RNA: Das RNA-Pellet wurde mit 75%-igem Ethanol gewaschen und für 15 Minuten zentrifugiert.

Lösung der RNA: Das Ethanol wurde wieder entfernt und die RNA 10 Minuten lang luftgetrocknet. Danach wurde es in sterilem Aqua dest. gelöst und für 10 Minuten bei 60°C inkubiert.

Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurde nach der Isolierung ein RNA-Checkgel durchgeführt.

1.14.2 Photometrie

Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch Spektrophotometrie an einem Eppendorf BioPhotometer bei einer Wellenlänge von 260nm. Bei dieser Wellenlänge absorbiert Nukleinsäure die maximale Menge an Licht, und es besteht eine lineare Beziehung zwischen der Absorption von Licht und der Nukleinsäure.

Die Reinheit der Proben wurde durch die A260/A280 nm Ratio ermittelt, die zwischen 1.8 und 2.1 sein sollte.

1.15 Reverse Transkription und Real-Time PCR

Die Real-Time Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) ist die sensitivste Methode zur quantitativen Bestimmung der Genexpression.

Durch diese Methode werden definierte RNA-Sequenzen zunächst durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt, um dann durch die Polymerase Kettenreaktion exponentiell amplifiziert werden zu können. Diese Prozesse finden in einem kombinierten Thermocycler und Detektor statt. Ein integrierter Laser induziert durch Erregung von Fluorochromen in der PCR-Lösung eine Fluoreszenz, die durch die CCD-Kamera nach jedem Zyklus detektiert und mithilfe einer Computer-Software quantifiziert wird (43) (Abbildung 21).

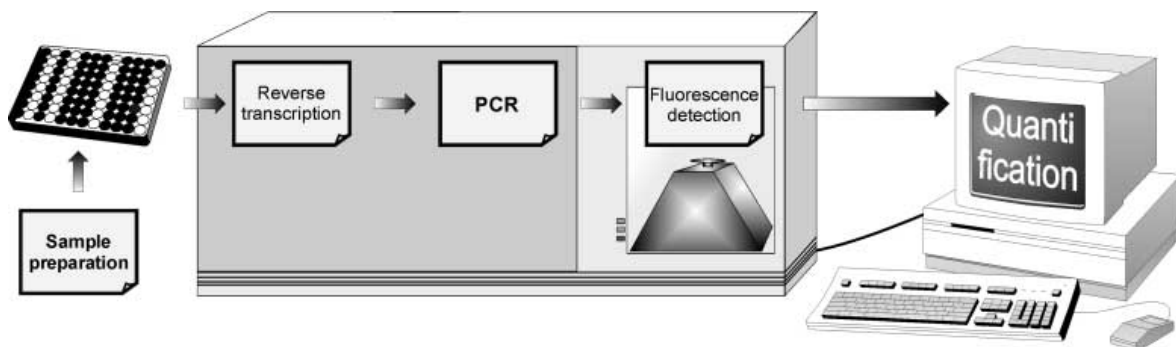


Abbildung 21: Prinzip der Real-Time RT-PCR (43)

1.15.1 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription der RNA in cDNA verwendeten wir SuperScript™ II Reverse Transkriptase (Invitrogen, Österreich) und folgten dem Protokoll für die Erst-Strang cDNA Synthese. Es wurden 1.5 µl an RNA transkribiert.

Die Synthese der cDNA wurde mit Hilfe von My Cycler™ BIORAD in folgender Reihenfolge durchgeführt:

1. 65°C für 5 Minuten
2. 25°C für 10 Minuten
3. 42°C für 90 Minuten
4. 70°C für 15 Minuten

Zuerst wurde zu den 1.5µl an RNA, 0.4µl Randomhexamer, welches als Primer dient, und 10 µl Aqua dest hinzugefügt und bei 65°C denaturiert. Danach wurde der „Mastermix“ bei 42°C hinzugefügt. Der „Mastermix“ bestand aus: 1.75µl Aqua dest, 4µl Erst-Strang Puffer (Invitrogen, Österreich), 2 µl 0.1M DTT (Invitrogen, Österreich), 1.25 µl GeneAmp® dNTP Blend, 12.5mM mit dUTP (Applied Biosystems, CA, USA), 0.5 µl Prime RNase Inhibitor™ (Eppendorf, Deutschland) und 0.5 µl Super Script™ II Reverse Transkriptase (Invitrogen, Österreich). Die entstandene cDNA wurde dann für die weitere Verwendung im Verhältnis 1:20 verdünnt.

1.15.2 SYBR® Green Real-Time PCR

Die quantitative Bestimmung der Genexpression erfolgte durch die Amplifikation der komplementären cDNA-Sequenzen mittels ABI PRISM 7900®HT Sequence Detection System.

Dieses Gerät besteht aus einem Thermocycler und einem Spektrografen mit einer CCD (charge-coupled device) – Kamera (43).

Als Fluorochrom verwendeten wir SYBR Green I, der sich an jede doppelsträngige DNA bindet und dadurch zu einer Steigerung seiner Fluoreszenz führt (44).

So besteht während der Denaturation (bei 95°C) keine hohe Fluoreszenz, da SYBR Green I in ungebundener Form vorkommt (Abbildung 22, A).

Wenn die Hybridisierungstemperatur erreicht ist und die Elongation in Gang gesetzt wird (bei 60°C), kommt es zur gewünschten Fluoreszenzsteigerung, die nach jedem PCR Zyklus gemessen werden kann (Abbildung 22, B+C).

Während der Denaturation löst sich der Farbstoff wieder von der DNA, was die Verminderung seiner Fluoreszenz zur Folge hat (43) (Abbildung 22, D).

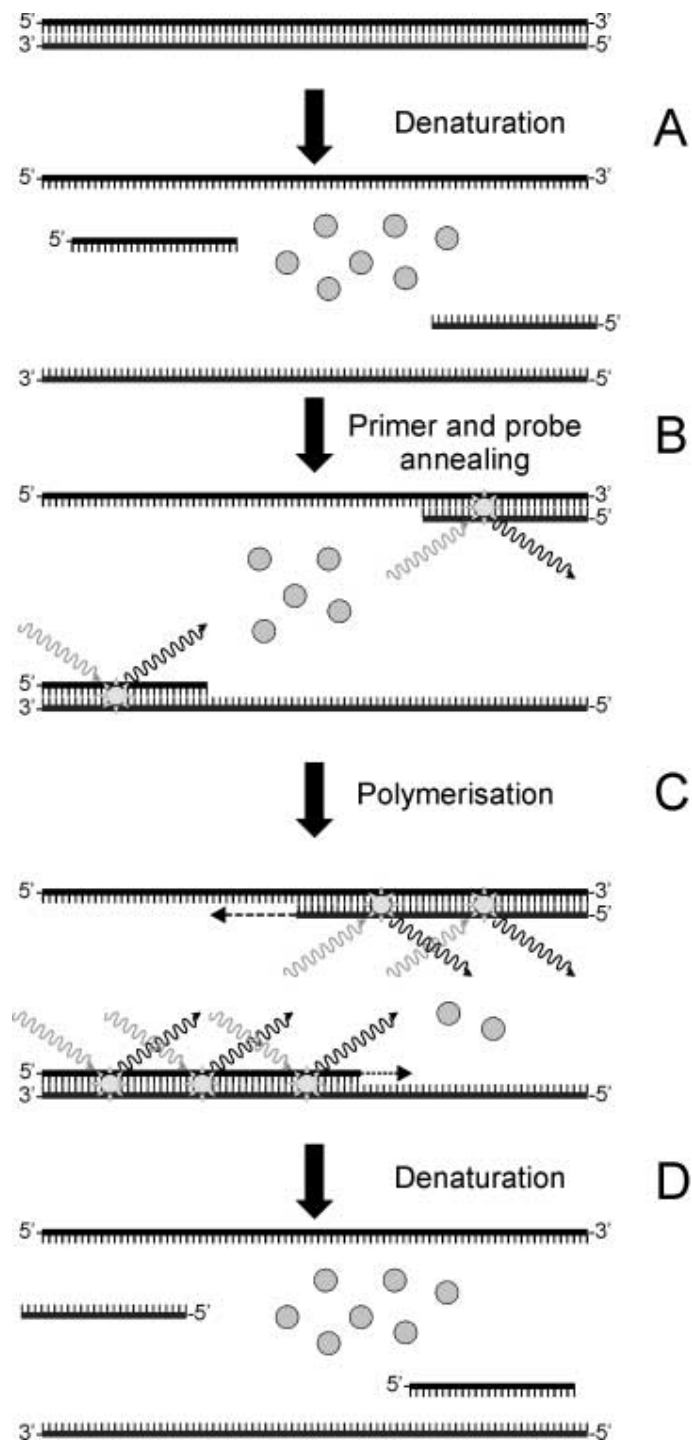


Abbildung 22: Prinzip der SYBR Green PCR (43)

Um die Genexpression von F4/80, MCP-1 und 18S zu bestimmen, wurde 5 µl an verdünnter cDNA, 15 µl SYBR[®] Green PCR Mastermix (enthält SYBR[®] Green I Farbstoff, AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP, Passive Reference 1 (ROX[™]) Farbstoff) (Invitrogen, Österreich), 2 µl von jedem Primer und 6 µl Aqua dest. Die PCR-Ansätze wurden in Reaktions-Platten gefüllt, abgedeckt und zentrifugiert.

Wir verwendeten die Software PRIMER3 (Witehead Institut for Biochemical Research) für das Designen der Primer (Tabelle 1).

| Gene | Forward Primer | Reverse Primer |
|-----------|----------------------------|----------------------------|
| mcp1/ccl2 | ggc tgg aga gct aca aga gg | atg tct gga ccc att cct tc |
| f4/80 | ttg gcc aag att ctc ttc ct | tca ctg cct cca cta gca tc |
| 18s rRNA | gta acc cgt tga acc cca tt | cca tcc aat cgg tag tag cg |

Tabelle 1: Für die RT-PCR verwendeten Primer

Folgende Real-Time PCR Zyklen wurden verwendet:

1. Inkubation bei 50°C für 2 Minuten
2. Erhitzung auf 95°C für 10 Minuten (wird für die Aktivierung der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase benötigt)
3. Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden
4. Hybridisierung und Elongation bei 60°C für eine Minute

Die letzten 2 Schritte wurden 40 Mal wiederholt.

Um das Amplicon identifizieren zu können, wurde dann anhand der spezifischen Schmelztemperatur des Amplicons eine Schmelzkurve hergestellt (45). Dafür wurden folgende Zyklen durchgeführt:

5. Erhitzung auf 95°C für 15 Sekunden
6. 60°C für 15 Sekunden
7. Von 60°C auf 95°C in 15 Sekunden

Mittels der ABI PRISM 7900®HT SDS Software wurde dann der CT-Wert (Threshold Cycle) für jede Probe ermittelt.

Der CT-Wert ist beschreibt jenen Zeitpunkt, an dem das Fluoreszenz Signal erstmals mit statistischer Signifikanz höher ist als das Hintergrundsignal (43).

Zur Quantifizierung der Genexpression verwendeten wir die Standardkurven-Methode. Dabei wird das PCR Signal des Targetgens relativ zu einer anderen Probe, zum Beispiel einer unbehandelten Kontrolle, exprimiert (46).

Für die Erzeugung der Standardkurve wurde die cDNA einer Maus aus der Kontrollgruppe herangezogen und eine Standardverdünnung einer bekannten Konzentration der RNA erzeugt.

Die ribosomale 18S RNA wurde als „Housekeeping Gen“ genützt.

1.16 Quantifizierung von Proteinen durch Western Blotting

Beim Western-Blot-Verfahren werden Unterschiede in der Expression von Proteinen mit immunochemischen Methoden detektiert (47). Dazu müssen die Zellen lysiert werden, um dann das Gesamtprotein mittels Gelelektrophorese auftrennen zu können (48). Anschließend werden die Proteine mit Blotting-Verfahren auf eine Membran transferiert und mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert.

1.16.1 Protein-Isolierung und Quantifizierung von CK 19, RPS6, β -Actin

Etwa 50 mg an gefrorener Mäuseleber wurde mit 1ml Homogenisierungspuffer (0.25 M Saccharose, 0.01 M HEPES-KOH, pH=7.5, 0.0001 M EDTA, pH=8) und Proteaseinhibitor (Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin und PMSF, verdünnt zu 1:1000) vermischt. Daraufhin wurde die Lösung drei Mal geschallt (Homogenizer Sonicator, Ultrasonic Processor UP50H) und eine Minute lang auf Eis gelegt.

Die Proteinkonzentration wurde durch Photometrie bei 575nm mit Hilfe des Bradford Kit (Bio Rad, CA, USA) bestimmt (49).

1.16.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinproben wurden durch Gelelektrophorese nach einem SDS-Polyacrylamidgel-System aufgetrennt.

Das Polyacrylamidgel ist aus einem Trenngel (lower gel, 1,5M Tris; 0,4% SDS; pH 8,8) und einem Sammelgel (upper gel, 0,5M Tris; 0,4% SDS; pH 6,8) aufgebaut. Zur Polymerisierung von Trenn- und Sammelgel wurden Tetra-methylethyldiamin (Temed) und 10 % Ammoniumpersulfat verwendet.

Die Elektrophoresekammern wurden mit Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben wurden in die einzelnen Geltaschen pipettiert, um anschließend elektrophoretisch getrennt zu werden. Die angelegte Spannung betrug 110-150 V.

1.16.3 Western Blot

Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinbanden wurden im Western-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dieser Proteintransfer fand in einer Transferkammer (Biorad, CA, USA) unter Verwendung eines Transferpuffers (7g Tris, 35,75g Glycin, 500ml Methanol) statt.

1.16.4 Detektion mit spezifischen Antikörpern

Nach dem Transfer wurden die Membranen in Ponceau-S-Lösung gefärbt und zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen für eine Stunde mit 5% Magermilch und TBS-T (TBS + Tween, ph = 7,6, 24,2g TRIS Base (20mM), 80g NaCl (137mM)) inkubiert

Anschließend folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper und Magermilch über Nacht (Tabelle 2). Danach wurde die Membran zwei Mal für 30 min mit 5% Magermilch und für weitere 30 min mit TBS-T gespült.

Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in Verdünnung mit TBS-T für eine Stunde. Im Anschluss wurde die Membran drei Mal für 20 Minuten mit TBS-T gewaschen.

| 1. Antikörper | Hersteller | Verdünnung | 2. Antikörper |
|---------------------------|----------------|------------|----------------|
| Ratten-Anti-Ck 19 | R&D Systems | 1:2000 | DAKO |
| Ratten Anti-RPS6 | Cell Signaling | 1:1000 | Cell Signaling |
| Maus Anti- β -Actin | Sigma | 1:5000 | DAKO |

Tabelle 2: Für Western Blot verwendete Antikörper

Zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers wurde das ECL (enhanced chemiluminescence)-Plus-Detektions-Kit (Firma GE Healthcare, Freiburg) verwendet und in der Dunkelkammer einem Film exponiert.

Die Stellen der antikörpermarkierten Proteinbanden führen dadurch zu einer Schwarzfärbung des Films (Kodak XDA Plus).

1.16.5 Densitometrie der Western Blots

Um Unterschiede in der Protein-Expression zu erkennen, wurde eine Densitometrie-Software (Chemi Doc XRS) verwendet.

1.16.6 Statistische Analyse

Es wurden 4 Tiere pro Gruppe untersucht. Die Werte wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Zur statistischen Analyse wurde zum Vergleich der Kontroll- und Versuchsgruppe der Student T-Test mit Hilfe der Statistik Software SPSS durchgeführt. Ein p-Wert von < 0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

2 Ergebnisse

2.1 Verminderte Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 (RPS6)

Um zu überprüfen, ob die Behandlung mit Rapamycin in der Lage war, den mTOR-Signalweg zu hemmen, verglichen wir die Immunhistochemie für phosphoryliertes RPS6 (pRPS6), das durch das mTOR Substrat SK61 phosphoryliert wird.

Es gelang uns durch Rapamycin die Phosphorylierung des RPS6 in der *Mdr2* Knockout Maus drastisch zu senken (Abbildung 23).

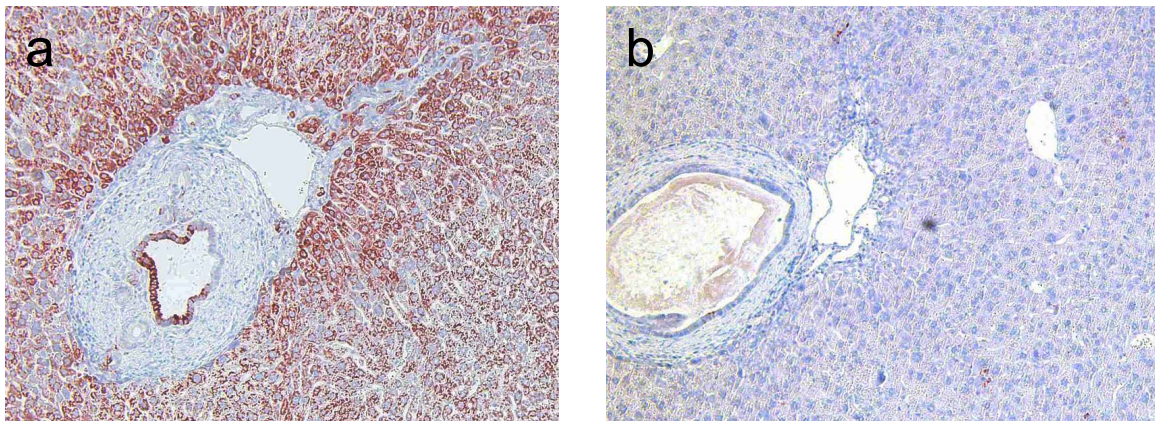


Abbildung 23: Effekt von Rapamycin auf pRPS6

Wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, wurde die Immunhistochemie für pRPS6 durchgeführt: (a) Die Kontrollgruppe zeigt eine starke Färbung des pRPS6 (rot). (b) In der mit Rapamycin behandelten Gruppe ist die Färbung des pRPS6 kaum mehr sichtbar. (10-fache Vergrößerung)

Zur weiteren Objektivierung führten wir einen Western Blot durch, welcher als Bestätigung dieses Ergebnisses in den mit Rapamycin behandelten *Mdr2* Knockout Mäusen eine Senkung des Gehaltes an phosphoryliertem RPS6 um 37% anzeigte (Abbildung 24).

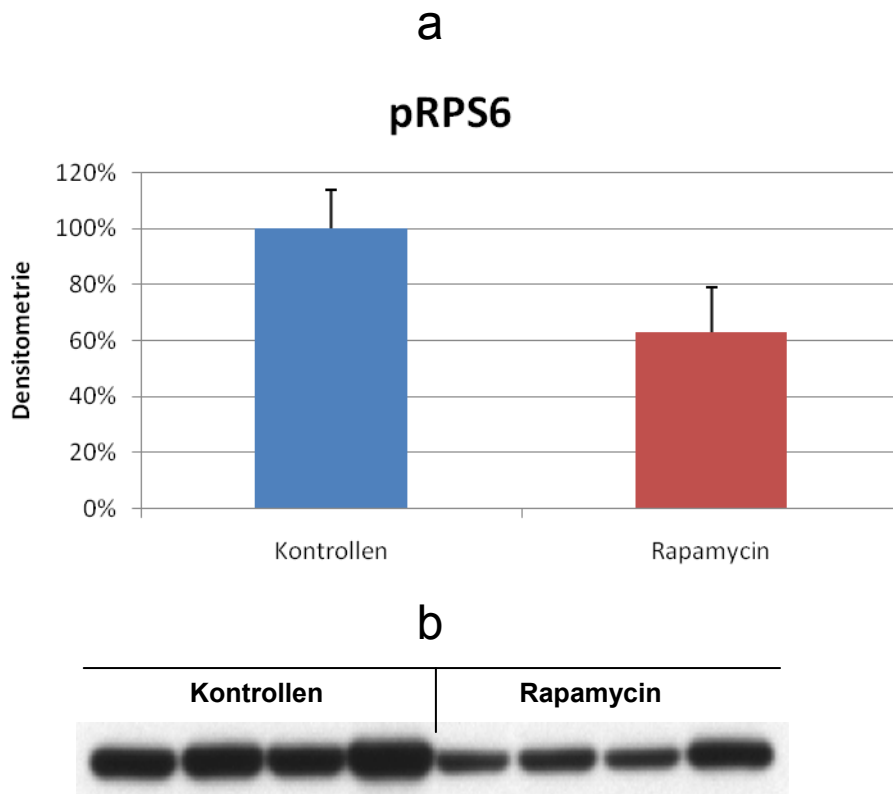


Abbildung 24: Effekt von Rapamycin auf die Proteinexpression von pRPS6

Wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, wurde der Western Blot für pRPS6 durchgeführt: (a) Densitometrische Analyse der Western Blots: Die mit Rapamycin behandelten *Mdr2* Knockout Mäuse zeigen einen um 37% niedrigeren Gehalt des pRPS6 im Vergleich zur Kontrollgruppe. (Es werden Mittelwert und Standardabweichung dargestellt, n=4 pro Gruppe) (b) Western Blot der 4 Tiere jeder Gruppe: Die Proteinexpression der *Mdr2* Knockout Mäuse der Kontrollgruppe (erste vier Banden) ist stärker als jene der mit Rapamycin behandelten Gruppe (letzte vier Banden).

2.2 GPT, AP und totales Bilirubin

Um die Wirkung von Rapamycin auf die Leberschädigung und Cholestase der *Mdr2* Knockout Mäuse zu analysieren, wurde die Messung der Leberlaborparameter Glutamat-Pyruvat-Transaminase/Alanin-Aminotransferase (GPT/ALT), Alkalische Phosphatase (AP) und Bilirubin durchgeführt.

Die mit Rapamycin behandelten *Mdr2* Knockout Mäuse zeigten sogar tendenziell höhere GPT-, AP- und Bilirubin-Werte als die unbehandelten *Mdr2* Knockout Mäuse, wobei nur der höhere Gehalt an Bilirubin in der Rapamycin-Gruppe statistisch signifikant war. (Abbildung 25, Abbildung 26).

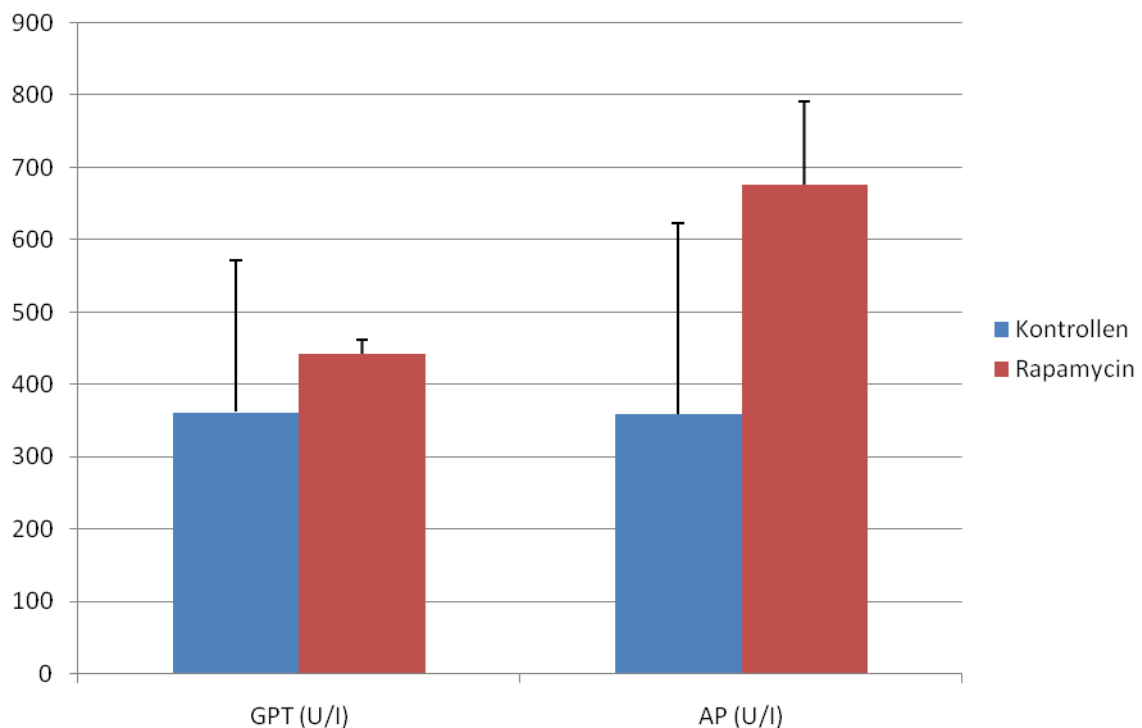


Abbildung 25: Effekt von Rapamycin auf GPT- und AP-Werte

Es erfolgte die biochemische Analyse des Serums der *Mdr2* Knockout Mäuse (blau) und der mit Rapamycin behandelten *Mdr2* Knockout Mäuse (rot). Die mit Rapamycin behandelten *Mdr2* Knockout Mäuse zeigen eine steigende Tendenz der Leberlaborparameter GPT und AP. (Es werden Mittelwert und Standardabweichung dargestellt, n=4 pro Gruppe)

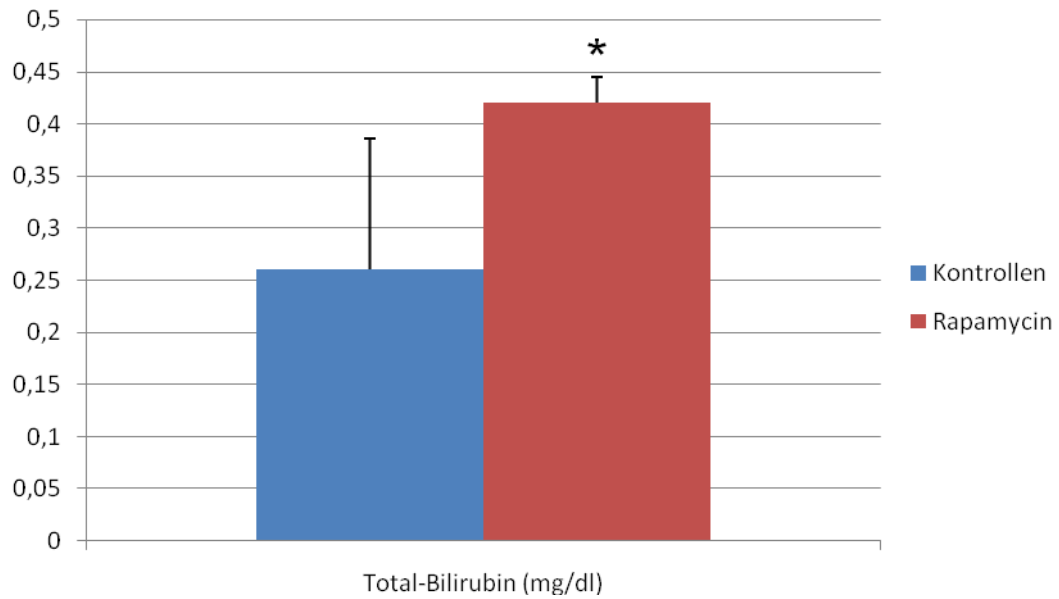


Abbildung 26: Effekt von Rapamycin auf das Gesamtbilirubin

Es erfolgte die biochemische Analyse des Serums der *Mdr2* Knockout Mäuse (blau) und der mit Rapamycin behandelten *Mdr2* Knockout Mäuse (rot). Die mit Rapamycin behandelten *Mdr2* Knockout Mäuse zeigen eine statistisch signifikante Erhöhung des Gesamtbilirubins. (Es werden Mittelwert und Standardabweichung dargestellt, n=4 pro Gruppe, * P< 0.05 (Student T-Test))

2.3 F4/80

Um Informationen über den Effekt von Rapamycin auf die im Rahmen der sklerosierenden Cholangitis vorkommenden Inflammation der *Mdr2* Knockout Mäuse zu gewinnen, wurde die mRNA Expression des Makrophagen-Markers F4/80 gemessen. Hier zeigte sich, dass die mit Rapamycin behandelten Mäuse im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine statistisch signifikante Erhöhung des Makrophagen-Markers F4/80 aufweisen (Abbildung 27).

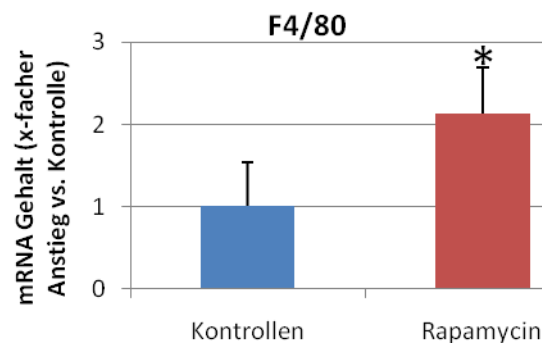


Abbildung 27: Effekt von Rapamycin auf die mRNA Expression des Makrophagen-Marker F4/80

Es erfolgte eine RNA-Isolierung aus den Leberproben der Kontroll- und Testgruppe und die Analyse dieser durch Real-Time RT-PCR, wie es im Kapitel Material und Methoden beschrieben wurde. Die mit Rapamycin behandelten *Mdr2* Knockout Mäuse (rot) zeigen eine statistisch signifikante Erhöhung der mRNA des Makrophagen-Markers F4/80 im Vergleich zu den unbehandelten *Mdr2* Knockout Mäusen. (Es werden Mittelwert und Standardabweichung dargestellt, n=4 pro Gruppe, * P< 0.05 (Student T-Test))

2.4 Lebergewicht

Um zu überprüfen, ob Rapamycin die Hepatomegalie der *Mdr2* Knockout Mäuse beeinflussen würde, verglichen wir das relative Lebergewicht der Kontroll- und Testgruppe miteinander. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Lebergewichtes dieser zwei Gruppen (Abbildung 28).

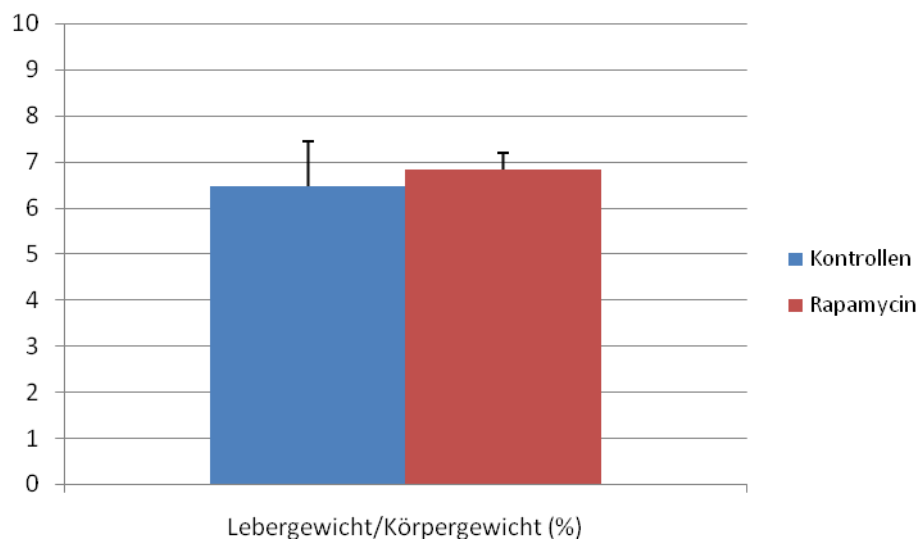


Abbildung 28: Effekt von Rapamycin auf das Lebergewicht der *Mdr2* Knockout Mäuse

Um das Lebergewicht der *Mdr2* Knockout Mäuse miteinander vergleichen zu können, wurde das Lebergewicht (g) durch das Körpergewicht (g) dividiert. Das so erhaltene relative Lebergewicht zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den behandelten und den nicht behandelten *Mdr2* Knockout Mäusen. (Es werden Mittelwert und Standardabweichung dargestellt, n=4 pro Gruppe)

2.5 Morphologie der Leber

Das histologische Bild der unbehandelten *Mdr2*^{-/-} Mäuse in der HE Färbung zeigte die erwarteten Veränderungen im Sinne der sklerosierenden Cholangitis mit einer oblitierenden Fibrose der Gallengänge und porto-portalen Septen. Um zu untersuchen, ob Rapamycin einen Einfluss auf die biliäre Fibrose der *Mdr2* Knockout Maus haben würde, wurden die Schnitte geblindet analysiert. Es war kein Unterschied zwischen der Kontroll- und Versuchsgruppe zu sehen. Die mit Rapamycin behandelten *Mdr2*^{-/-} Mäuse zeigten genauso wie die Kontrollgruppe die Charakteristika der sklerosierenden Cholangitis, wie zum Beispiel die zwiebelschalenartige Fibrose der Gallengänge

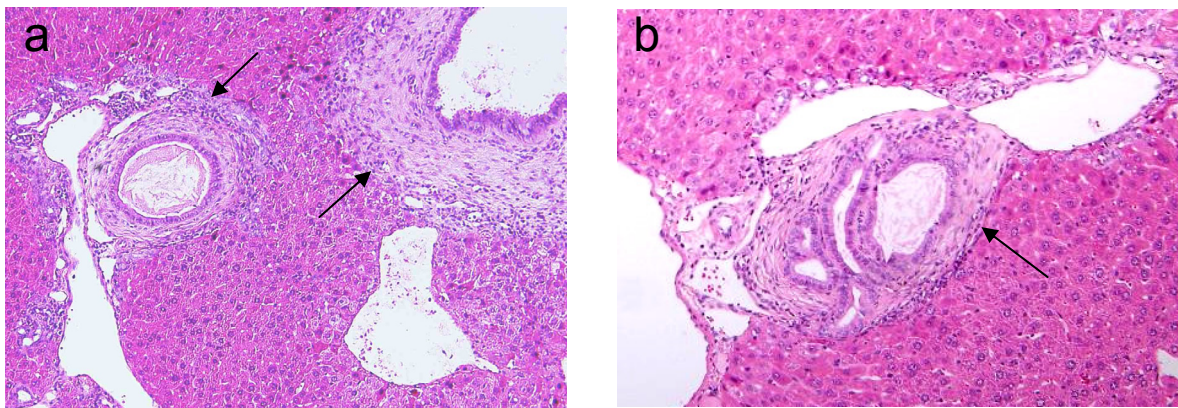


Abbildung 29: Effekt von Rapamycin auf die biliäre Fibrose der *Mdr2*^{-/-} Maus

Wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, wurde an den histologischen Schnitten der Leberproben der *Mdr2*^{-/-} Mäuse eine Hämatoxylin- und Eosin-Färbung durchgeführt: (a) Die *Mdr2*^{-/-} Mäuse der Kontrollgruppe zeigen Zeichen einer sklerosierenden Cholangitis, wie eine zwiebelschalenartigen Fibrose der Gallengänge (Pfeile). (b) Auch die mit Rapamycin behandelten Mäuse zeigen die gleichen Merkmale der biliären Fibrose (Pfeil) wie die Kontrollgruppe. (10-fache Vergrößerung)

2.6 CK19

Zur Analyse der duktilären Reaktion wurde der Gehalt des Cholangiozyten Markers Cytokeratin 19 (CK19) immunhistochemisch und durch Western Blot untersucht. Es zeigte sich in beiden Untersuchungen kein Unterschied im CK 19 Gehalt der *Mdr2* Knockout Mäuse im Vergleich zu den mit Rapamycin behandelten *Mdr2* Knockout Mäusen (Abbildung 30, Abbildung 31).

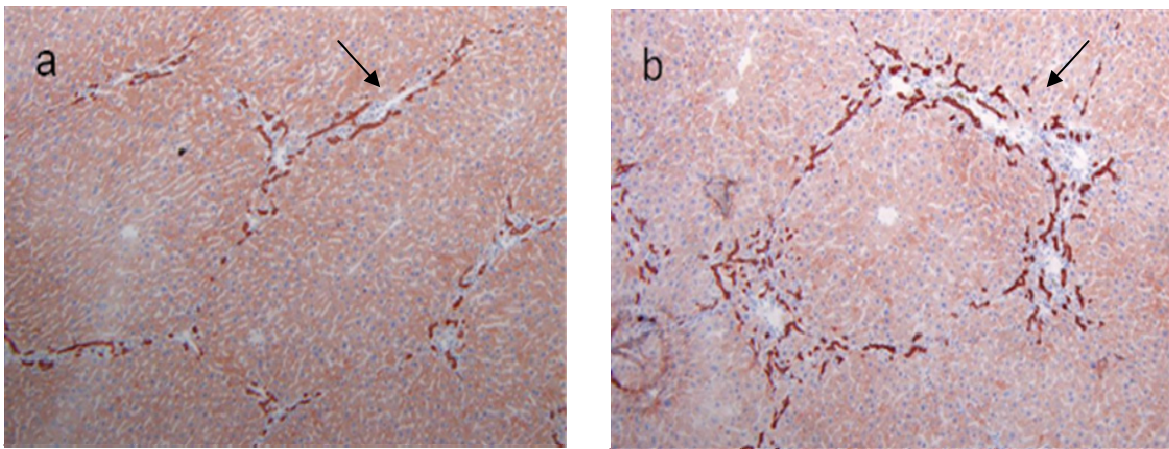


Abbildung 30: Effekt von Rapamycin auf CK19

Wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, wurde die Immunhistochemie für CK19 durchgeführt: (a) Die Kontrollgruppe zeigt Leberläppchen einer *Mdr2* Knockout Maus mit den gefärbten umgebenden Gallengängen (Pfeil) (rot). (b) In der mit Rapamycin behandelten Gruppe ist die Färbung von CK19 in gleichem Maße erkennbar. (10-fache Vergrößerung)

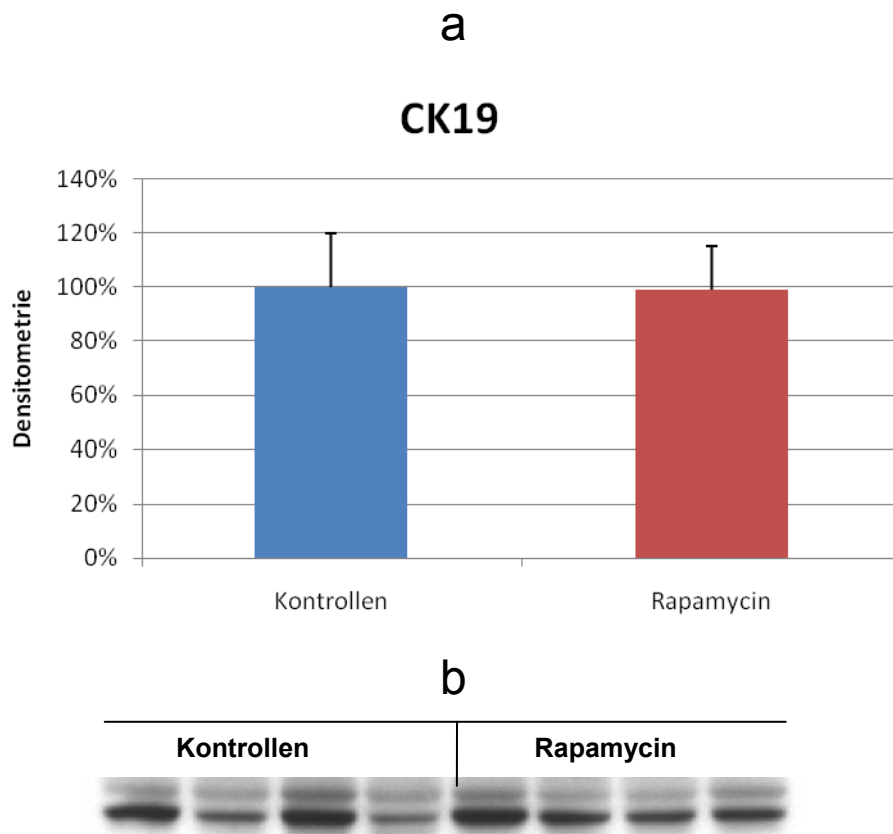


Abbildung 31: Effekt von Rapamycin auf die Proteinexpression von CK19

Wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, wurde der Western Blot für CK19 durchgeführt: (a) Densitometrische Analyse der Western Blots: Die mit Rapamycin behandelten *Mdr2* Knockout Mäuse zeigen vergleichbare Werte mit den *Mdr2* Knockout Mäusen der Kontrollgruppe. (Es werden Mittelwert und Standardabweichung dargestellt, n=4 pro Gruppe) (b) Western Blot der 4 Tiere jeder Gruppe: Es zeigt sich kein großer Unterschied in der Proteinexpression der vier *Mdr2* Knockout Mäuse der Kontrollgruppe (erste vier Banden) und den mit Rapamycin behandelten Tieren (letzte vier Banden).

2.7 CD 11b

Zur Analyse der Wirkung von Rapamycin auf die in der *Mdr2*^{-/-} Maus vorkommenden periduktalen Entzündungsreaktion, führten wir die Immunhistochemie für den Neutrophilen-Marker CD 11b durch. Die histologischen Schnitte zeigten keine Unterschiede der mit Rapamycin behandelten Gruppe im Vergleich zu den nicht behandelten *Mdr2* Knockout Mäusen (Abbildung 32).

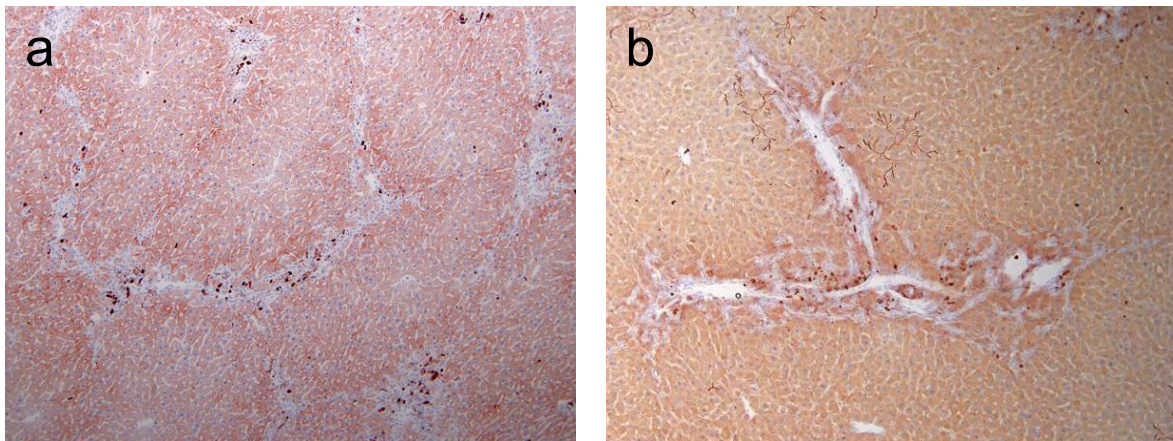


Abbildung 32: Effekt von Rapamycin auf den Neutrophilen-Marker CD11b

Wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, wurde die Immunhistochemie für CD 11b durchgeführt: (a) Die *Mdr2*^{-/-} Mäuse der Kontrollgruppe zeigen den Gallengang infiltrierende CD 11b positive neutrophile Granulozyten (rot). (b) Auch die Gallengänge der mit Rapamycin behandelten *Mdr2*^{-/-} Mäuse werden von neutrophilen Granulozyten infiltriert. (10-fache Vergrößerung)

2.8 MCP-1

Um eine mögliche Auswirkung von Rapamycin auf das in der Entstehung der biliären Fibrose der *Mdr2*^{-/-} Maus mitwirkende Zytokin Monozytenchemotaktisches Protein 1 (MCP-1) festzustellen, wurde die mRNA Expression dieses Proteins gemessen. Die MCP-1 mRNA Werte der *Mdr2*^{-/-} Mäuse wurden durch Rapamycin jedoch nicht verändert, wobei allerdings eine starke Schwankung in den unbehandelten Kontrollen zu beobachten war (Abbildung 33).

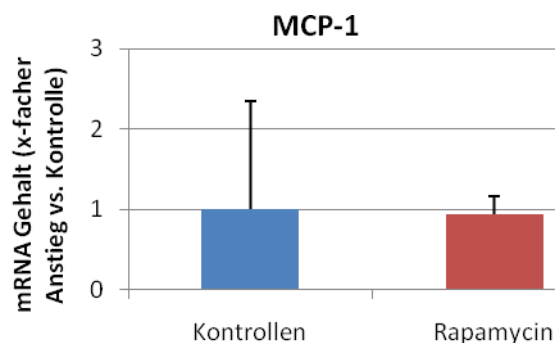


Abbildung 33: Effekt von Rapamycin auf die mRNA Expression von MCP-1

Es erfolgte eine RNA-Isolierung aus den Leberproben der Kontroll- und Testgruppe und die Analyse dieser durch Real-Time RT-PCR, wie es im Kapitel Material und Methoden beschrieben wurde. Die mit Rapamycin behandelten *Mdr2* Knockout Mäuse (rot) zeigen keine Veränderung des mRNA Gehaltes von MCP-1 im Vergleich zu den unbehandelten *Mdr2* Knockout Mäusen (blau). (Es werden Mittelwert und Standardabweichung dargestellt, n=4 pro Gruppe)

3 Diskussion

Die Behandlung chronisch cholestatischer Lebererkrankungen stellt noch immer eine große Herausforderung für die Medizin dar. Im letzten Jahrzehnt kam es zu einem großen Fortschritt im Verständnis der molekularen Grundlagen und Pathogenese der Cholestase. So können hepatozelluläre Transportdefekte, wie jener der Phospholipid-Exportpumpe MDR3, für verschiedenste cholestatische Krankheitsbilder verantwortlich sein.

Durch den Knockout von *Mdr2*, dem murinen Ortholog des humanen MDR3 in Mäusen, wurde ein äußerst geeignetes Tiermodell für eine der wichtigsten chronisch cholestatischen Lebererkrankungen des Menschen, nämlich die sklerosierende Cholangitis, hergestellt. Aufgrund der "toxischen Galle" kommt es in diesen Mäusen zu einer periduktalen Entzündungsreaktion, die eine Stimulation der Fibrogenese zur Folge hat und deren Konsequenz die biliären Fibrose ist (18). Ein möglicher Therapieansatz dieses Krankheitsbildes wäre somit die Hemmung der Fibrose (1).

Bislang existiert noch keine etablierte Behandlung für die primär sklerosierende Cholangitis. Die bisherige Standardtherapie der primär sklerosierenden Cholangitis war Ursodeoxycholsäure (UDCA). Doch die Ergebnisse einer rezent durchgeführten, geblindeten, randomisiert kontrollierten Studie zeigten, dass eine hoch dosierte Therapie mit UDCA zu schlechteren Ergebnissen als die Placebo-Therapie führt.

UDCA war, im Vergleich mit einem Placebo, nicht in der Lage, das Überleben der Patienten zu verlängern und führte im Gegensatz dazu sogar zu erhöhten Komplikationsraten. So waren die Sterberate und die Häufigkeit von Ösophagusvarizen in der mit UDCA behandelten Gruppe höher als in der Placebo-Gruppe. Zudem war eine höhere Anzahl an Patienten in der UDCA-Gruppe auf eine Lebertransplantation angewiesen (50). Aufgrund dieser Ergebnisse sollte von Hochdosis-UDCA als Therapeutikum bei PSC abgesehen werden.

Einen medikamentösen Ansatz mit möglichen antifibrotischen Wirkmechanismen stellt der mTOR Inhibitor Rapamycin dar. mTOR ist eine Proteinkinase, die Zellwachstum und Proliferation verschiedener Zellen fördert (25). So bewirkt Rapamycin durch die Inhibierung des mTOR-Signalweges die Hemmung der Weiterleitung von mitogenen Signalen und führt so zu einer verminderten Zellgröße, einer verminderten Rate der Zellzyklus-Progression und einer verminderten Proliferationsrate verschiedener Zellen (22).

Zurzeit findet Rapamycin aufgrund seiner Eigenschaften bereits als Immunsuppressivum nach Organtransplantationen (durch die Blockierung der Proliferation von B- und T-Lymphozyten), zur Prävention von Stenosen nach Angioplastie und als Therapeutikum zur Behandlung verschiedener Neoplasien Anwendung (25).

Eine antifibrotische Wirkung von Rapamycin wurde erstmals von Zhu et al. (38) in Ratten beobachtet, welche eine durch CCl₄ – Injektionen ausgelöste Leberfibrose entwickelten. Durch die zeitgleiche Behandlung mit Rapamycin gelang es dieser Gruppe einen erniedrigten Gehalt an Kollagen in der Leber dieser Tiere nachzuweisen. In einem *in vitro* Versuch wurde daraufhin festgestellt, dass Rapamycin in der Lage war, die Proliferation der hepatischen Sternzellen zu hemmen.

Die Auswirkungen der Hemmung des mTOR-Signalweges wurden daraufhin auch in Tiermodellen der biliären Fibrose untersucht. Als Tiermodell dienten in diesen Versuchen Ratten, deren Gallengang ligiert wurde, und welche als Folge der mechanischen Obstruktion eine biliäre Fibrose entwickelten.

Jedoch sollte berücksichtigt werden, dass die Gallengang-Ligatur einen viel stärkeren Auslöser einer Leberfibrose darstellt, als die meisten Ätiologien der Leberfibrose bei Menschen (41). Außerdem ist die medikamentöse Therapie einer mechanisch-obstruktiven Cholestase nicht zu erwägen. Daher ist die klinische Relevanz dieser Ergebnisse limitiert. Die Effekte von Rapamycin in den Gallengang-ligierten Tieren sollten nur als Nachweis einer prinzipiell antifibrotischen Wirkung von Rapamycin angesehen werden.

Hier zeigten sich verschiedene Ergebnisse in Abhängigkeit von Zeitpunkt und Dauer der Behandlung mit Rapamycin.

Biecker et al. (13) zeigten, dass die Behandlung mit Rapamycin unmittelbar nach der Ligatur des Gallenganges imstande war, die durch die Ligatur hervorgerufene Gewichtszunahme der Leber zu vermindern. Rapamycin bewirkte auch die Senkung der AST-, Bilirubin-, und Gallensäurewerte der Gallengang-ligierten Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Morphologisch zeigten die mit Rapamycin behandelten Ratten im Vergleich zu den nicht behandelten Ratten einen niedrigeren Gehalt an Bindegewebe, Gallengangepithelzellen und aktivierten Sternzellen.

Neef et al. (41) begannen mit der Behandlung mit Rapamycin erst 4 Wochen nach der Gallengang-Ligatur und zeigten andere Wirkungen der mTOR-Hemmung, die wiederum von der Länge der Therapie mit Rapamycin abhängig waren. So verbesserte sich die Leberfunktion der Ratten zwar nach einer 14-tägigen Behandlung mit Rapamycin, aber nicht nach einer 28-tägigen Behandlung. Auch die durch die Gallengang-Ligatur hervorgerufene Hepatomegalie konnte nur nach 14-tägiger Rapamycin-Behandlung positiv beeinflusst werden.

Die 28-tägige Therapie mit Rapamycin führte in diesen Tieren zu keiner Verminderung der Hepatomegalie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die gesteigerte Anzahl der α -SMA positiven portalen Fibroblasten und Sternzellen konnte durch die vierwöchige Rapamycin-Therapie nicht gesenkt werden.

Wir konnten in unserem Versuch an *Mdr2* Knockout Mäusen, einem Tiermodell der chronisch cholestatischen Lebererkrankungen, zeigen, dass es durch Rapamycin zu einer erfolgreichen Hemmung des mTOR-Signalweges gekommen ist. Wir behandelten vier Wochen alte *Mdr2* Knockout Mäuse vier Wochen lang mit Rapamycin und zeigten, dass diese Mäuse im Gegensatz zur Kontrollgruppe einen verminderten Gehalt an phosphoryliertem ribosomalen Protein S6, das als Folge einer Aktivierung von mTOR phosphoryliert wird, aufweisen. Trotz dieser suffizienten Hemmung des mTOR-Signalweges war Rapamycin nicht in der Lage, die biliäre Fibrose in der *Mdr2* Knockout Maus zu hemmen.

Weiters führte die Hemmung des mTOR-Signalweges zu keiner Verminderung der Hepatomegalie dieser Mäuse. Zu diesem Ergebnis kamen auch Neef et al. (41), was darauf schließen lässt, dass eine längerfristige Therapie mit Rapamycin keine Auswirkung auf die durch die Fibrose bedingte Hepatomegalie haben dürfte.

Die Leberschädigungsparameter GPT, AP und Gesamtbilirubin der *Mdr2* Knockout Mäuse wurden in unserem Versuch durch Rapamycin sogar erhöht. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu jenen von Biecker et al. (13), welche eine Senkung der AST- und Bilirubinwerte angaben. Jedoch wurde in diesem Versuch zu einem früheren Zeitpunkt, nämlich vor der Ausbildung einer Fibrose, mit der Rapamycin-Therapie begonnen. Neben den Unterschieden im experimentellen Design könnte auch die Spezies der Versuchstiere für die unterschiedliche Auswirkung von Rapamycin verantwortlich sein. So wäre es möglich, dass die Pharmakokinetik von Rapamycin in Mäusen von jener in Ratten differiert und es dadurch zu unterschiedlichen Effekten von Rapamycin in verschiedenen Spezies kommt.

Die anderen Gruppen, welche die Effekte von Rapamycin auf die Leberfibrose beschrieben, machten keine genaueren Aussagen bezüglich der Wirkung von Rapamycin auf Leberschädigungsparameter wie GPT, AP oder Bilirubin.

Interessanterweise stellten Bramow et al. (51) fest, dass eine 14 tägige Rapamycin-Behandlung von gesunden Ratten eine Cholestase dieser Tiere zur Folge hatte, die durch erhöhte GPT- und AP Werte reflektiert wurde. Diese Gruppe kam auch zur Erkenntnis, dass Rapamycin eine Senkung der mRNA Werte des Multidrug-Resistenz-assoziierten Proteins 2 (Mrp2) bewirkte, während die mRNA Werte des organischen Anionen transportierenden Proteins 2 (Oatp2) durch Rapamycin erhöht wurden.

Mrp2 ist wie MDR3 ein kanalikuläres Transportsystem der Hepatozyten. Es ist eine ATP-abhängige, multispezifische Konjugatexportpumpe, die organische Anionen, wie Bilirubin-Diglukuronid, in die Galle transportiert und zum Gallensalz-unabhängigen Gallenfluss beiträgt (2).

Oatp ist ein multispezifischer Transporter der basolateralen Hepatozyten-Membran, der für die Aufnahme verschiedener Substrate aus dem Pfortaderblut in den Hepatozyten verantwortlich ist.

Die Verminderung von Mrp2 durch Rapamycin könnte die Akkumulation von toxischen Metaboliten im Hepatozyten bedingen und eine Cholestase zur Folge haben. Dieser Zustand könnte durch den gesteigerten Gehalt von Oatp2 verstärkt werden, der zu einer erhöhten Aufnahme von Gallensäuren und anderen organischen Anionen in Hepatozyten führt (51).

Auch unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass Rapamycin die Cholestase der *Mdr2* Knockout Maus verstärken könnte und daher zur Erhöhung der GPT-, AP- und Bilirubin-Werte führt. Wir verwendeten in unserem Versuch sogar eine zehnfach höhere Dosierung an Rapamycin als jene, die zu einer nachgewiesenen Cholestase in Ratten führte. So wäre es denkbar, dass eine niedrigere Dosierung als die von uns verwendete die cholestatistische Nebenwirkung von Rapamycin minimieren würde und dadurch die antifibrotischen Wirkmechanismen von Rapamycin entfaltet werden könnten.

Weiters war der Gehalt an F4/80 positiven Makrophagen in den mit Rapamycin behandelten *Mdr2*^{-/-} Mäusen sogar höher als in der Kontrollgruppe. Rapamycin scheint somit die Entzündungsreaktion der *Mdr2* Knockout Maus sogar zu verstärken. Dieses Ergebnis könnte durch den höheren Grad der Cholestase erklärt werden.

Auf die histologischen Merkmale der *Mdr2* Knockout Mäuse, wie die periduktale Fibrose, die Ausdruck ihrer chronisch cholestatistischen Lebererkrankung ist, hatte die Behandlung mit Rapamycin in unserem Tiermodell der chronisch cholestatistischen Lebererkrankungen keinen positiven Effekt. So konnten keine Unterschiede in der Morphologie der mit Rapamycin behandelten Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

Auch auf die dukuläre Proliferation, die ein wichtiger Faktor in der Progression der biliären Fibrose in der *Mdr2* Knockout Maus ist, hatte Rapamycin keine Wirkung. Weiters konnte kein Unterschied bezüglich des Gehaltes an neutrophilen Granulozyten erkannt werden. Zudem hatte Rapamycin keine senkende Wirkung auf das in der Pathogenese der Fibrose involvierte Zytokin MCP-1, welches unter

anderem von proliferierenden Cholangiozyten freigesetzt wird und chemotaktisch auf Entzündungszellen und aktivierend auf Sternzellen wirkt (9).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Rapamycin die biliäre Fibrose der *Mdr2* Knockout Maus nicht zu hemmen vermag und dass dieses Tiermodell einer chronisch cholestatischen Lebererkrankung keinen Benefit von der Hemmung des mTOR-Signalweges davonträgt.

Im Gegensatz dazu scheint die Behandlung der *Mdr2* Knockout Mäuse mit Rapamycin die Cholestase und Entzündungsreaktion dieser Tiere sogar zu verstärken und zu einem höheren Gehalt verschiedener Leberschädigungsparameter und Makrophagen zu führen.

Jedoch gibt es Unterschiede in der Pathogenese der sklerosierenden Cholangitis der *Mdr2* Knockout Maus und jener des Menschen. So gilt die humane primär sklerosierende Cholangitis als eine immunmedierte Erkrankung, die mit dem Vorkommen von Autoantikörpern, bestimmten HLA Haplotypen und verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziiert ist (52). Die sklerosierende Cholangitis im *Mdr2* Knockout Mausmodell wird jedoch primär durch die Wirkung der toxischen Galle bedingt, die erst sekundär eine Entzündungsreaktion auslöst (18).

Aufgrund dessen ist nicht auszuschließen, dass Rapamycin trotz der fehlenden Hemmung der Fibrose im *Mdr2* Knockout Mausmodell vor allem durch seine immunsuppressiven Eigenschaften einen therapeutischen Effekt auf die primär sklerosierende Cholangitis des Menschen haben könnte.

4 Literaturverzeichnis

1. Paumgartner G. Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets. *World J Gastroenterol.* 2006 Jul 28;12(28):4445-51.
2. Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med.* 1998 Oct 22;339(17):1217-27.
3. Elferink RP, Tytgat GN, Groen AK. Hepatic canalicular membrane 1: The role of mdr2 P-Glykoprotein in hepatobiliary lipid transport. *FASEB J.* 1997 Jan;11(1):19-28.
4. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie & Pathobiochemie.* 8. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2007. p. 39.
5. Trauner M, Fickert P, Wagner M. MDR3 (ABCB4) defects: a paradigm for the genetics of adult cholestatic syndromes. *Semin Liver Dis.* 2007 Feb;27(1):77-98.
6. Angulo P, Lindor KD. Primary sclerosing cholangitis. *Hepatology.* 1999 Jul;30(1):325-32.
7. Lee YM, Kaplan MM. Primary sclerosing cholangitis. *N Engl J Med.* 1995 Apr 6;332(14):924-33.
8. Svegliati-Baroni G, De Minicis S, Marzioni M. Hepatic fibrogenesis in response to chronic liver injury: novel insights on the role of cell-to-cell interaction and transition. *Liver Int.* 2008 Sep;28(8):1052-64.
9. Xia X, Demorrow S, Francis H, Glaser S, Alpini G, Marzioni M, et al. Cholangiocyte injury and ductopenic syndromes. *Semin Liver Dis.* 2007 Nov;27(4):401-12.
10. Friedman SL. Hepatic fibrosis -- overview. *Toxicology.* 2008 Dec 30;254(3):120-9.
11. Kisseleva T, Brenner DA. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006 Oct;21 Suppl 3:S84-7.
12. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008 May;134(6):1655-69.
13. Biecker E, De Gottardi A, Neef M, Unternahrer M, Schneider V, Ledermann M, et al. Long-term treatment of bile duct-ligated rats with rapamycin (sirolimus) significantly attenuates liver fibrosis: analysis of the underlying mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Jun;313(3):952-61.
14. Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007 Jun;22 Suppl 1:S79-84.
15. Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Hannivoort R, Saccomanno S, Homan M, De Minicis S, et al. Bile acids induce hepatic stellate cell proliferation via activation of the epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology.* 2005 Apr;128(4):1042-55.
16. Le Pabic H, L'Helgoualc'h A, Coutant A, Wewer UM, Baffet G, Clement B, et al. Involvement of the serine/threonine p70S6 kinase in TGF-beta1-induced ADAM12 expression in cultured human hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 2005 Dec;43(6):1038-44.
17. Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Stumptner C, Weiglein AH, Lammert F, et al. Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct-ligated and Mdr2 knockout mice via disruption of cholangioles. *Gastroenterology.* 2002 Oct;123(4):1238-51.
18. Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, Zollner G, Kaser A, Tilg H, et al. Regurgitation of bile

-
- acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology*. 2004 Jul;127(1):261-74.
19. Popov Y, Patsenker E, Fickert P, Trauner M, Schuppan D. Mdr2 (Abcb4)^{-/-} mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes. *J Hepatol*. 2005 Dec;43(6):1045-54.
 20. Hall MN. mTOR-what does it do? *Transplant Proc*. 2008 Dec;40(10 Suppl):S5-8.
 21. Yang X, Yang C, Farberman A, Rideout TC, de Lange CF, France J, et al. The mammalian target of rapamycin-signaling pathway in regulating metabolism and growth. *J Anim Sci*. 2008 Apr;86(14 Suppl):E36-50.
 22. Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*. 2004 Apr 19;23(18):3151-71.
 23. Hulleman E, Boonstra J. Regulation of G1 phase progression by growth factors and the extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*. 2001 Jan;58(1):80-93.
 24. Gartel AL, Radhakrishnan SK. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res*. 2005 May 15;65(10):3980-5.
 25. Yang Q, Guan KL. Expanding mTOR signaling. *Cell Res*. 2007 Aug;17(8):666-81.
 26. Rahimi RA, Andrianifahanana M, Wilkes MC, Edens M, Kottom TJ, Blenis J, et al. Distinct roles for mammalian target of rapamycin complexes in the fibroblast response to transforming growth factor-beta. *Cancer Res*. 2009 Jan 1;69(1):84-93.
 27. Woo SY, Kim DH, Jun CB, Kim YM, Haar EV, Lee SI, et al. PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. *J Biol Chem*. 2007 Aug 31;282(35):25604-12.
 28. Dunlop EA, Tee AR. Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. *Cell Signal*. 2009 Jun;21(6):827-35.
 29. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004 Aug 15;18(16):1926-45.
 30. Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell*. 2000 Oct 13;103(2):253-62.
 31. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev*. 2001 Apr 1;15(7):807-26.
 32. Averous J, Proud CG. When translation meets transformation: the mTOR story. *Oncogene*. 2006 Oct 16;25(48):6423-35.
 33. Ruvinsky I, Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci*. 2006 Jun;31(6):342-8.
 34. Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science*. 2006 Oct 20;314(5798):467-71.
 35. Tsang CK, Qi H, Liu LF, Zheng XF. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today*. 2007 Feb;12(3-4):112-24.
-

-
36. Mita MM, Mita A, Rowinsky EK. The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biol Ther.* 2003 Jul-Aug;2(4 Suppl 1):S169-77.
 37. Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP, Blenis J. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Nov 11;105(45):17414-9.
 38. Zhu J, Wu J, Frizell E, Liu SL, Bashey R, Rubin R, et al. Rapamycin inhibits hepatic stellate cell proliferation in vitro and limits fibrogenesis in an in vivo model of liver fibrosis. *Gastroenterology.* 1999 Nov;117(5):1198-204.
 39. Gabele E, Reif S, Tsukada S, Bataller R, Yata Y, Morris T, et al. The role of p70S6K in hepatic stellate cell collagen gene expression and cell proliferation. *J Biol Chem.* 2005 Apr 8;280(14):13374-82.
 40. Lechuga CG, Hernandez-Nazara ZH, Dominguez Rosales JA, Morris ER, Rincon AR, Rivas-Estilla AM, et al. TGF-beta1 modulates matrix metalloproteinase-13 expression in hepatic stellate cells by complex mechanisms involving p38MAPK, PI3-kinase, AKT, and p70S6k. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 Nov;287(5):G974-87.
 41. Neef M, Ledermann M, Saegesser H, Schneider V, Reichen J. Low-dose oral rapamycin treatment reduces fibrogenesis, improves liver function, and prolongs survival in rats with established liver cirrhosis. *J Hepatol.* 2006 Dec;45(6):786-96.
 42. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 2005 Jul;42(4):405-26.
 43. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000 Oct;25(2):169-93.
 44. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques.* 1998 Jun;24(6):954-8, 60, 62.
 45. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 1997 Feb 15;245(2):154-60.
 46. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
 47. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Sep;76(9):4350-4.
 48. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
 49. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
 50. Lindor KD, Kowdley KV, Luketic VAC, Harrison ME, McCashland T, Befeler AS, et al. High dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2009
 51. Bramow S, Ott P, Thomsen Nielsen F, Bangert K, Tygstrup N, Dalhoff K. 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.* 2001

Sep;89(3):133-9.

52 Chapman R, Cullen S. Etiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis. World J Gastroenterol. 2008 Jun 7;14(21):3350-9.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Familienname, Vorname: Farzi, Aitak
Kontakt: aitak@gmx.at
Geburtsdatum: 24. 05. 1985
Staatsangehörigkeit: Österreich



Ausbildung:

Seit 10/2003 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität
Graz

- 3. Abschnitt seit 10/2008
- 2. Abschnitt 09/2008 beendet
- 1. Abschnitt 10/2004 beendet

09/1995 – 06/2003 B(R)G Pestalozzistraße

Reifeprüfung 2003 mit sehr gutem Erfolg bestanden

Praktika während des Studiums:

Pflichtfamulaturen im Rahmen des 2. Studienabschnittes:

- 04/2006: 2 Wochen an der Abteilung für Endokrinologie und Nuklearmedizin,
Universitätsklinik für Innere Medizin, LKH Graz
- 09/2006: 4 Wochen an der Abteilung für Chirurgie, LKH Graz West
- 02/2007: 2 Wochen an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde,
LKH Graz
- 07/2007: 2 Wochen an der Universitätsklinik für Neurologie, LKH Graz
- 02/2008: 3 Wochen am Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Medizinische
Universität Graz
- 06/2008: 4 Wochen im First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College,
China

Praktika im Rahmen des 6. Jahres:

- 10/2008: 2 Wochen an der Abteilung für Infektionskrankheiten, Royal Brisbane and Women's Hospital, University of Queensland, Australien
- 11/2008: 4 Wochen an der Abteilung für Innere Medizin, Royal Brisbane and Women's Hospital, University of Queensland, Australien
- 12/2008: 3 Wochen am Institut für Pathologie, Gold Coast Campus and Gold Coast Hospital, Griffith University, Australien
- 03/2009: 5 Wochen in der Lehrarztpraxis für Allgemeinmedizin, Dr. Ewald Schneeberger, Anger bei Weiz
- 04/2009: 10 Wochen an der Universitätsklinik für Neurochirurgie, LKH Graz

Interessen:

- Seit 09/2007 Studium des „Lehrgang Klassik“ am Johann-Joseph-Fux-Konservatorium des Landes Steiermark in Graz mit dem Hauptfach Violine
- 1994 – 2007 Geigenunterricht am Johann-Joseph-Fux-Konservatorium mit Absolvierung der Unter-, Mittel- und Oberstufe
- Seit 2002 Mitglied des Sinfonieorchesters des Johann-Joseph-Fux-Konservatorium
- 2004 Gründung des Aitak Farzi Quartet
- 01/2006 CD Aufnahme: Aitak Farzi Quartet – “Live – Friday night at ISOP”
- 06/2007 CD Aufnahme: Aitak Farzi Quintet – “If time heals wounds ...”

Sprachen:

Englisch, Persisch, Italienisch, Chinesisch