

Kevin Sun Zhang

Dr. med.

The modulation of mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) via Proline-rich Akt Substrate of 40 kDa (PRAS40) in a Model of Endothelial Inflammation

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Dr. med. Mirko Völkers

Kardiovaskuläre Erkrankungen und Schlaganfälle gehören noch immer zu den führenden Todesursachen. Es ist unwahrscheinlich, dass die Bedeutung dieser Krankheiten zukünftig abnehmen wird. Ihren Ursprung haben viele kardiovaskuläre Erkrankungen in der Atherosklerose, einer chronisch-inflammatorischen Erkrankung der Blutgefäße. Das Endothel spielt dabei eine zentrale Rolle. Die pharmakologische Inhibition der mechanistic target of rapamycin Kinase hat vielversprechende Effekte in der Milderung von Entzündungsreaktionen und Prävention der Atherosklerose gezeigt. Jedoch schränken unerwünschte Arzneimittelwirkungen den klinischen Einsatz ein. Für den endogenen Inhibitor proline-rich Akt substrate of 40 kDa wurde gezeigt, dass er die besagte Kinase effektiv hemmt und sogar die Insulinsensitivität der Leber in Tierversuchen verbessert. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass proline-rich Akt substrate of 40 kDa die pathologischen, pro-atherogenen Prozesse abschwächen könnte, ohne dabei die Nebenwirkungen der Pharmaka zu zeigen.

Die Ziele dieser Arbeit wurden daher wie folgt definiert: erstens die Charakterisierung der mechanistic target of rapamycin Kinase im Endothel mithilfe von proline-rich Akt substrate of 40 kDa-Modulation; zweitens die Analyse dieser Kinase bezüglich der endothelialen Funktion und einer Tumornekrosefaktor α -induzierten Entzündungsreaktion; und drittens die Identifikation dieses Signalweges als möglichen Therapieansatz der Atherosklerose.

Um die Ziele zu untersuchen, wurden humane Endothelzellen der Umbilikalvene als Model des Endothels und das Zytokin Tumornekrosefaktor α als Stimulus für die Inflammation verwendet. Die Expression inflammatorischer Marker und die Adhäsion von Monozyten dienten zur Einschätzung der entzündlichen Prozesse, währenddessen die endotheliale Proliferation und Apoptose als Parameter für die endothelialen Zellfunktionen fungierten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass proline-rich Akt substrate of 40 kDa die endotheliale mechanistic target of rapamycin Kinase hemmt, wie es bereits für andere Zellarten beschrieben ist. Der Knockdown von proline-rich Akt substrate of 40 kDa erhöhte die Kinasenaktivität, was

durch Hyperphosphorylierung der nachgeschalteten Targets gezeigt werden konnte; währenddessen eine Überexpression die Aktivität senkte. Ebenfalls konnte eine Überexpression die zytokininduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen blocken, während der Knockdown hingegen die entzündliche Antwort des Endothels steigerte.

Die mechanistic target of rapamycin Kinase ist relevant für die Zellzyklusprogression, die Proliferation und das Zellüberleben. Die durchgeführten Experimente zeigten, dass der endogene Inhibitor die Proliferation von Endothelzellen dosisabhängig hemmt. Für das Zellüberleben besitzt die Kinase ebenfalls eine zentrale Bedeutung: ein Knockdown des Inhibitors erhöhte das Zellüberleben, während eine Hemmung der Kinase das Überleben senkte. Im Einklang mit der Literatur, die Rapamycin einen atheroprotektiven Effekt zuschreibt, legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass eine Inhibition der Kinase die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen und die Monozytenadhäsion unter Zytokinstimulation vermindert. Ohne Stimulation jedoch scheint die Inhibition der Kinase eine Inflammation zu begünstigen, was durch Literaturangaben gestützt wird, die medikamentenfreisetzenden Stents das Hervorrufen endothelialer Dysfunktion nachsagen.

Die *in vivo* Daten des Berliner Kooperationspartners von Mäusen mit endothelzellspezifischem Knockout des proline-rich Akt substrate of 40 kDa unterstützen die *in vitro* Ergebnisse. Der Knockout erhöhte die vaskuläre Expression inflammatorischer Adhäsionsmoleküle und die Intimadicke der Gefäße. Außerdem zeigte sich ein Makrophagen-Marker innerhalb der Gefäßwand erhöht.

Die durchgeführten Proliferationsexperimente stimmen mit publizierter Literatur überein: eine erhöhte Aktivität der Kinase erhöht die Zellvermehrung, während eine Hemmung zu einer verminderten Zellteilung führt. Falls eine Kontrolle von Endothelzellproliferation gewünscht ist, so wäre eine Therapie mittels Überexpression des endogenen Inhibitors durchaus denkbar.

Ebenso nimmt die Kinase, welche in zwei Komplexen (Komplex 1 & 2) vorkommt, signifikanten Einfluss auf das Zellüberleben. In der Literatur wird dem zweiten Komplex die Hauptbedeutung in der Apoptose und im Zellüberleben zugeschrieben. Die Daten dieser Arbeit zeigten jedoch, dass der Fokus auch auf den ersten Komplex erweitert werden sollte, da proline-rich Akt substrate of 40 kDa, welches ausschließlich den ersten Komplex inhibiert, das Zellüberleben maßgeblich beeinflusst.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch im Endothel die besagte Kinase ein bedeutender Regulator verschiedener Zellfunktionen ist. Unter pathologischen Stimuli könnte der endogene Inhibitor ein therapeutischer Ansatzpunkt in der Behandlung der Atherosklerose sein. Gleichzeitig steigert die Inhibition der Kinase jedoch auch die basal vorhandene

Entzündungsreaktion und stört grundlegende zelluläre Prozesse. Eine Therapie mithilfe von proline-rich Akt substrate of 40 kDa erscheint daher wie eine zweiseitige Klinge. Weitere Forschung auf diesem Gebiet ist notwendig, um die genaue Rolle der mechanistic target of rapamycin-Kinase in der Atherosklerose zu definieren und den Einfluss einer Überexpression des endothelialen proline-rich Akt substrate of 40 kDa *in vivo* zu untersuchen.