

Aus dem Institut für Pharmakologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Das therapeutische Potential der pharmakologischen  
Interferenz mit dem Renin-Angiotensin-System im Modell der  
Sklerodermie

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anja Wieland

aus Filderstadt

Gutachter/in:     1. Prof. Dr. med. T. Unger  
                          2. Prof. Dr. med. R. Paus  
                          3. Prof. Dr. med. J. Grabbe

**Datum der Promotion: 01.02.2013**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Systemische Sklerodermie .....</b>	<b>7</b>
1.1.1 Definition und Epidemiologie .....	7
1.1.2 Klassifikation .....	7
1.1.3 Klinik.....	9
1.1.4 Pathogenese .....	10
1.1.5 Therapie und Prognose.....	13
<b>1.2 Das Renin-Angiotensin-System .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Der AT1-Rezeptor .....	14
1.2.2 Der AT2-Rezeptor .....	15
1.2.3 Der AT1-Antagonist Candesartan .....	17
1.2.4 Der AT2-Rezeptor-Agonist Compound 21 .....	18
<b>1.3 Die Haut .....</b>	<b>18</b>
1.3.1 Die Epidermis.....	19
1.3.2 Die Dermis .....	19
1.3.3 Die Subkutis .....	20
1.3.4 Kollagen .....	20
<b>1.4 Das Renin-Angiotensin-System in der Haut .....</b>	<b>21</b>
<b>1.5 Das Renin-Angiotensin-System und Sklerodermie .....</b>	<b>21</b>
<b>1.6 Versuchsmodell.....</b>	<b>22</b>
1.6.1 Bleomycin .....	22
<b>1.7 Fragestellung und Zielsetzung .....</b>	<b>24</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>25</b>
2.1.1 Verwendete Chemikalien und Farbstoffe.....	25
2.1.2 Verwendete Geräte .....	27
2.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	29
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>29</b>
2.2.1 Tiere .....	30
2.2.2 Versuchsaufbau .....	30
2.2.3 Aufbereitung der Geweblöcke.....	31
2.2.4 Histologische Untersuchungen.....	32
2.2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	32
2.2.4.2 Picrosirius-Rot-Färbung .....	32
2.2.4.3 Immunhistologie.....	33
2.2.5 Molekularbiologie .....	34
2.2.5.1 RNA-Isolation aus Gewebeprobe.....	34
2.2.5.2 cDNA-Synthese (reverse Transkription).....	35
2.2.5.3 Quantitative Real-Time PCR .....	37

## Inhaltsverzeichnis

2.2.5.3.1 Primer .....	38
2.2.5.3.2 Durchführung der Real-Time PCR .....	38
2.2.5.3.3 Auswertung der Real-Time PCR mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode .....	39
2.2.5.4 Semiquantitative RT-PCR .....	40
2.2.5.5 Protein-Isolation .....	42
2.2.5.6 Proteinmessung .....	42
2.2.5.7 Western Blot .....	43
2.2.5.7.1 SDS-PAGE .....	43
2.2.5.7.2 Immunoblot .....	44
2.2.5.7.3 Immundetektion .....	45
2.2.6 Statistik .....	49
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1 Histologische Untersuchungen der Hautpräparate .....</b>	<b>50</b>
3.1.1 Feststellung der Fibrosierung und Hautbeschaffenheit mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) .....	50
3.1.2 Spezifische Darstellung von Kollagen mittels Picosirius-Rot-Färbung .....	53
3.1.3 Spezifische Darstellung von Kollagen mittels Immunfluoreszenz .....	57
<b>3.2 Expression von Interleukin-6 .....</b>	<b>59</b>
<b>3.3 Expression von Monocyte chemoattractant protein (MCP) -1 .....</b>	<b>61</b>
<b>3.4 Expression von TGF-<math>\beta</math> .....</b>	<b>62</b>
<b>3.5 Expression von Kollagen Typ I .....</b>	<b>63</b>
<b>3.6 Expression von MMP-9 .....</b>	<b>65</b>
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>66</b>
<b>4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>67</b>
<b>4.2 Interpretation der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur .....</b>	<b>69</b>
4.2.1 Fibrose und Inflammation in der HE-Färbung .....	69
4.2.2 Fibrose und Kollagentypisierung in der Picosirius-Rot-Färbung .....	69
4.2.3 Fibrose und Kollagentypisierung in der Immunhistologie .....	70
4.2.4 Expression von IL-6 .....	71
4.2.5 Expression von MCP-1 .....	72
4.2.6 Expression von TGF- $\beta$ .....	73
4.2.7 Expression von Kollagen Typ I .....	74
4.2.8 Expression von Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) .....	74
<b>4.3 RAS, Inflammation und Fibrose .....</b>	<b>76</b>
<b>4.4 Wirksamkeit der pharmakologischen Interferenz mit dem RAS .....</b>	<b>77</b>
<b>4.5 Übertragbarkeit des Modells .....</b>	<b>78</b>
<b>4.6 Ausblick .....</b>	<b>79</b>

## Inhaltsverzeichnis

<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>80</b>
<b>6 LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>83</b>
<b>7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>92</b>
<b>8 PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>93</b>
<b>9 DANKSAGUNG .....</b>	<b>94</b>
<b>10 ERKLÄRUNG.....</b>	<b>95</b>

## Abkürzungsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	PLC	Phospholipase C
ACE	„Angiotensin Converting Enzyme“	PSS	Progressiv Systemische Sklerodermie
ADH	Anti-diuretisches Hormon	RAS	Renin-Angiotensin-System
Ang II	Angiotensin II	RNA	„Ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
ARA	„American Rheumatism Association“	RNAse	Ribonuklease
ARB	Angiotensin Typ 1-Rezeptor-Blocker	RT	Reverse Transkription
AT1	Angiotensin Typ 1 Rezeptor	s	Sekunde(n)
AT2	Angiotensin Typ 2 Rezeptor	s.c.	Subkutan
AUC	Area under the curve	SDS	Natriumdodecylsulfat
Bleo	Bleomycin	SDS-PAGE	„Sodium dodecyl polyacrylamid gel electrophoresis“
bp	Basenpaare	SEM	Standardabweichung der Mittelwerte
BSA	Bovines Serumalbumin	SSc	Systemische Sklerodermie
C	Celsius	TGF-β	„Transforming Growth Factor-beta“
C 21	Compound 21	TIMP	„Tissue inhibitor of matrixmetalloproetinase“
cDNA	„Complementary DNA“, „Copy DNA“, Desoxyribonukleinsäure-Kopie eines mRNA-Moleküls	U	Unit
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat	V	Volt
CollA1	Kollagen Typ 1 alpha 1	x g	-fache Gravitation
CTGF	„Connective tissue growth factor“		
d	Tag(e)		
DAG	Diacylglycerol		
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid		
DNA	„Desoxyribonuclein acid“, Desoxyribonukleinsäure		
dNTP	2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat		
dSSc	Diffuse Systemische Sklerodermie		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
et al.	„et alii“, und andere		
EZM	Extrazellulärmatrix		
h	Stunde(n)		
H <sub>2</sub> O	Wasser		
IL	Interleukin		
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat		
kDa	Kilo-Dalton		
lcSSc	Limitierte kutane Systemische Sklerodermie		
ISSc	Limitierte Systemische Sklerodermie		
M	Molar		
m	Meter		
µm	Mikrometer		
nm	Nanometer		
MCP	„Monocyte chemotactic protein“		
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid		
min	Minute(n)		
MMP	Matrixmetalloproteinase		
mRNA	Messenger RNA		
MW	Mittelwert		
NaCl	Natriumchlorid		
NO	„Nitric Oxide“, „Nitrogen Monoxide“		
PBS	„Phosphate Buffered Saline“, Phosphatpufferlösung		
PDGF	„Platelet Derived Growth Factor“		

# 1 Einleitung

## 1.1 Systemische Sklerodermie

### 1.1.1 Definition und Epidemiologie

Der Begriff der Sklerodermie leitet sich von skleros (=hart) und derma (=Haut) ab.

Die systemische Sklerodermie („*Systemic sclerosis*“, SSc) ist eine chronisch-progrediente Multisystemerkrankung, deren Ätiologie nach wie vor noch nicht endgültig geklärt ist. Sie zählt zu den Kollagenosen und ist klinisch durch eine Verdickung der Haut charakterisiert, sowie durch strukturelle und funktionelle Anomalien innerer Organe, wie Gastrointestinaltrakt, Niere, Lunge und Herz.

Hervorstechende Merkmale der SSc stellen Gefäßschädigungen mit Intimaproliferation und Mikrothromben, eine Aktivierung des Immunsystems (hier vor allem T-Zellen, Makrophagen, Mastzellen und Eosinophile) sowie eine übermäßige Produktion und Ablagerung extrazellulärer Matrix (hier vorwiegend Kollagen) dar.

Jährlich erkranken etwa 19 von 1 Million Menschen an SSc. Die Prävalenz wird mit 19 - 75/100.000 Einwohnern angegeben [Harrisons Innere Medizin, 2005].

Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem dritten und fünften Lebensjahrzehnt, wobei Frauen etwa dreimal so häufig betroffen sind wie Männer.

Es besteht eine gehäufte Assoziation bestimmter humaner Leukozytenantigene (sogenannte HLA-Typen) mit dem Auftreten von SSc. So ist HLA-DR5 mit der diffusen Verlaufsform assoziiert, während HLA-DR1, 4 und 8 vorwiegend bei der limitierten Verlaufsform gefunden werden.

### 1.1.2 Klassifikation

Eine Einteilung der SSc ist aufgrund ihrer Seltenheit, ihres variantenreichen Verlaufes und ihres schwer zu diagnostizierenden Anfangsstadiums erschwert.

Die „*American Rheumatism Association*“ (heute: „*American College of Rheumatology*“) erarbeitete 1981 folgende Kriterien für die Diagnose „Systemische Sklerodermie“ [ARA, 1981]:

## Einleitung

Hauptkriterium:

Sklerodermie der Haut proximal der Metacarpophalangealgelenke

Nebenkriterien:

Sklerodaktylie

Digitale Ulzerationen

Verlust von Fingerendgliedern

Bibasilare Lungenfibrose

Die Diagnose kann gestellt werden, wenn entweder das Hauptkriterium oder aber mindestens zwei Nebenkriterien erfüllt sind [Masi et al., 1980].

Trotz zahlreicher Überschneidungen gibt es Bemühungen, klinisch unterschiedliche Phänotypen als Subtypen zu definieren. Hier ist das Modell nach LeRoy am besten akzeptiert und wird noch heute zur Einteilung der Patienten herangezogen [LeRoy et al., 1988]:

Limitierte Systemische Sklerodermie (lSSc): symmetrische Hautverdickungen beschränkt auf distale Extremitäten bis Ellenbogen- oder Kniegelenk.

Diffuse Systemische Sklerodermie (dSSc): symmetrische Hautverdickungen über das Ellenbogen- und Kniegelenk hinaus.

Später unterschied LeRoy zusätzlich bei der limitierten Sklerodermie zwei Formen [LeRoy and Medsger, 2001]:

Die limitierte SSc (lSSc) (wie oben beschrieben) und

Die limitiert kutane SSc (lcSSc), bei welcher Haut, Subkutan- und Muskelgewebe jedoch ohne eine systemische Beteiligung betroffen sind.

Dieses Modell ist jedoch sehr vereinfacht und berücksichtigt viele Untergruppen der SSc nicht.



### 1.1.3 Klinik

Eine Schädigung kleiner Arterien, Arteriolen und Kapillargefäße der Haut und innerer Organe geht der charakteristischen Fibrose voran. So stellt das Raynaud-Phänomen ein häufiges Erstsymptom der SSc dar. Hierbei kommt es zu episodischen Vasokonstriktionen vor allem der Finger durch Kälteexposition, Vibration oder emotionalen Stress. Dies führt zu einer vorübergehenden Blässe mit nachfolgender Rötung bei Wiedererwärmung der betroffenen Akren.

In der Frühphase der Erkrankung kommt es zusätzlich zu einer distal beginnenden und nach proximal fortschreitenden Schwellung vor allem der Finger und Hände („*puffy hands*“). Diese ödematöse Phase kann Wochen bis Monate anhalten. Bei einer fortschreitenden Generalisierung betreffen die Hautveränderungen zunächst die Extremitäten, dann das Gesicht und den Stamm. Hierbei handelt es sich um ein sogenanntes zentripetales Fortschreiten der Fibrose. Dieser Prozess kann sich über einige Jahre ziehen.

Durch die Straffung der Haut ist eine volle Extension der Extremitäten häufig nicht mehr möglich. Es bilden sich schmerzlose Beugekontrakturen aus, wodurch die Beweglichkeit stark eingeschränkt wird. Durch die Minderperfusion kann es zu Ulzerationen bis hin zu Nekrosen der Fingerspitzen (sogenannte „Rattenbissnekrosen“) kommen (siehe Abbildung 1). Der Befall des Gesichts führt charakteristischerweise zu einem Maskengesicht mit starrer Mimik (Hypomimie), einem Kleinerwerden der Mundöffnung (Mikrostomie), sowie einer radiären Faltenbildung um den Mund („Tabaksbeutelmund“). Arthralgien sowie Myalgien können ebenso auftreten. Bei beiden Formen der SSc kommt es häufig zu einer Beteiligung des Gastrointestinaltrakts. Hier sind eine Sklerosierung des Zungenbändchens (Skleroglosson) sowie eine Motilitätsstörung des Ösophagus charakteristisch. Bei etwa zwei Dritteln der Patienten tritt eine Fibrosierung der Lunge mit begleitender fibrosierender Alveolitis und daraus resultierender pulmonaler Hypertonie auf, welche heutzutage die häufigste Todesursache der SSc darstellt. Eine primäre Herzbeteiligung mit Perikarditis und Herzrhythmusstörungen ist ebenso häufig. Eine Beteiligung der Nieren kann zu einer renalen Krise führen, welche bis zur Einführung einer Therapie mit ACE-Hemmern die häufigste Todesursache darstellte.

Eine häufige Sonderform der ISSc stellt das CREST-Syndrom dar. Hierbei handelt es sich um das Vorkommen von Calcinosis cutis, Raynaud-Phänomen, oesophageale Motilitätsstörung, Sklerodaktylie und Teleangiektasien.



Abbildung 1: Kutane Manifestationen an den Fingern bei SSc [aus Yamamoto, 2009].

### 1.1.4 Pathogenese

Das führende Merkmal der SSc stellt die übermäßige Produktion an Kollagen und anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix dar (wie Fibronectin und Glykosaminoglykanen). Dieser Fibrose geht häufig eine Schädigung kleiner Arterien oder Arteriolen der Haut und innerer Organe voraus. Zunächst kommt es zu einer Schädigung der Endothelzellen und der Basallamina, welcher eine Intima- und Mediaproliferation mit perivaskulärer Fibrose folgen. Diese Veränderungen führen zu einer Einengung des Gefäßlumens und somit zu Durchblutungsstörungen bis hin zur Nekrose. Neben dieser Gefäßschädigung spielt die zellvermittelte Immunität eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Fibrose bei SSc. Hier sind T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen, sowie bestimmte Zytokine und Wachstumsfaktoren wichtige Mediatoren. So ist bereits im Anfangsstadium der SSc perivaskulär ein mononukleäres Zellinfiltrat aus aktivierten T-Helfer-Zellen und Makrophagen sichtbar. Diese Hyperaktivität des Immunsystems führt zu erhöhten Zytokinmustern bei SSc-Patienten. So sezernieren aktivierte Makrophagen vermehrt Interleukin-6 (IL-6), eines der wichtigsten Interleukine in der Pathogenese der SSc.

IL-6 ist ein multifunktionales Zytokin, welches eine zentrale Rolle bei der Abwehr von Infektionen und bei Gewebeverletzungen spielt. Biologische Wirkungen von IL-6 beinhalten

## Einleitung

unter anderem die Immunglobulinbildung in B-Zellen, die Synthese von Akute-Phase-Proteinen sowie Wachstum und Differenzierung von T-Zellen. Über die Aktivierung von Kollagen- und Glykosaminoglykanbildung wirkt IL-6 profibrotisch. So hat IL-6 sowohl auf Kollagensynthese als auch auf das Immunsystem einen aktivierenden Effekt.

SSc-Patienten weisen einen erhöhten Serumspiegel an IL-6 auf. In vitro-Versuche konnten zeigen, dass Fibroblasten von SSc-Patienten höhere Level an IL-6 im Vergleich zu Fibroblasten gesunder Spender exprimieren [Feghali et al., 1994].

Zudem aktiviert dieses Zytokin einen weiteren pro-fibrotisch wirkenden Marker, „*Monocyte chemoattractant protein-1*“ (MCP-1).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Bleomycin die Level an MCP-1 deutlich steigert und dass bei MCP-1-Knock-out-Mäusen diese Fibrosierung ausbleibt [Ferreira et al., 2006]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass MCP-1 die Produktion von Kollagen erhöht und so zur Fibrose führt [Yamamoto, Nishioka, 2003]. Patienten mit SSc weisen erhöhte Serumlevel an MCP-1 auf [Hasegawa et al., 1999]. So konnte eine deutlich erhöhte MCP-1-Expression in der Haut von SSc-Patienten nachgewiesen werden, wohingegen in der Haut von gesunden Probanden kein MCP-1 nachweisbar war.

Eine weitere Wirkung von IL-6 ist die Stimulation von Gewebisinhibitoren der Metalloproteinasen (TIMP), was zu einer limitierten Aufspaltung und somit Akkumulation von Kollagen führt.

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) gehören der Familie der Endopeptidasen an und sind wesentlich am Umbau von extrazellulärer Matrix beteiligt. Die Aktivität der MMP wird durch ihre Inhibitoren (TIMP) kontrolliert.

SSc-Patienten weisen sowohl deutlich höhere Konzentrationen an MMP-9 und seinem Gegenspieler TIMP-1 als auch eine höhere Ratio von MMP-9 zu TIMP-1 auf. Zudem sind die Serum-Konzentrationen an MMP-9 beim diffusen Typ der SSc signifikant höher als beim limitierten Typ. Der Serumspiegel an MMP-9 korreliert mit dem Schweregrad der Hautbeteiligung und mit der Höhe der Serumkonzentrationen an „*transforming growth factor*“ (TGF- $\beta$ ). In Zellversuchen exprimieren dermale Fibroblasten von SSc-Patienten deutlich höhere Level an MMP-9 als Fibroblasten gesunder Spender [Kim et al., 2005]. Einer der wichtigsten Aktivatoren von TIMP-1 stellt TGF- $\beta$  dar.

TGF- $\beta$  wird von aktivierten Makrophagen sezerniert und spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der SSc. Dieser pro-fibrotische Faktor stimuliert die Fibroblastenproliferation sowie die Synthese von extrazellulären Matrix-Proteinen, wie Kollagen I, III, VI, VII, X, Fibronectin

## Einleitung

und Proteoglykanen. TGF- $\beta$  wird sowohl von Fibroblasten selbst als auch von Endothelzellen, Keratinozyten und Entzündungszellen synthetisiert [Massagué, 1990].

TGF- $\beta$  aktiviert weiterhin CTGF, welches die DNA-Synthese von Kollagen, Fibronectin und Integrin in Fibroblasten stimuliert.

PDGF wird ebenfalls durch TGF- $\beta$  aktiviert und wirkt chemotaktisch, vasoaktiv und stimulierend auf die Synthese bestimmter inflammatorischer Zytokine.

Desweiteren konnte bei SSc-Patienten eine Überexpression des TGF- $\beta$ -Rezeptors nachgewiesen werden [Kawakami et al., 1998].

Für die Entstehung der SSc wird heutzutage ein multifaktorieller Pathomechanismus angenommen (siehe Abbildung 2). Obwohl die Ätiologie nach wie vor nicht vollständig geklärt ist, werden zahlreiche Autoantikörper mit der Pathogenese der systemischen Sklerodermie assoziiert, wie beispielsweise Anti-Zentromer, Anti-Scl-70, Anti-RNA-Polymerase I/III, Anti-Fibrillarin und Anti-PM/Scl [LeRoy and Medsger, 2001].

Zudem werden auch genetische Faktoren (wie beispielsweise HLA-Typ) mit Anfälligkeit und Ausprägung der SSc assoziiert.

Seit einigen Jahren wird zunehmend Mikrochimerismus als Trigger für die Entstehung der SSc diskutiert [Adams et al., 2004; Jimenez et al., 2005]. Hierbei kommt es zu einer Persistenz fetaler Zellen nach der Geburt. Dies ruft eine Immunreaktion im Körper hervor, welche sich chronifizieren und letztlich bis hin zum Vollbild der SSc entwickeln kann. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass häufig Frauen nach der Geburt erkranken.

Doch gibt es bisher noch keine gesicherten Ergebnisse, dass Mikrochimerismus tatsächlich in der Pathogenese der SSc eine Rolle spielt.

# Einleitung

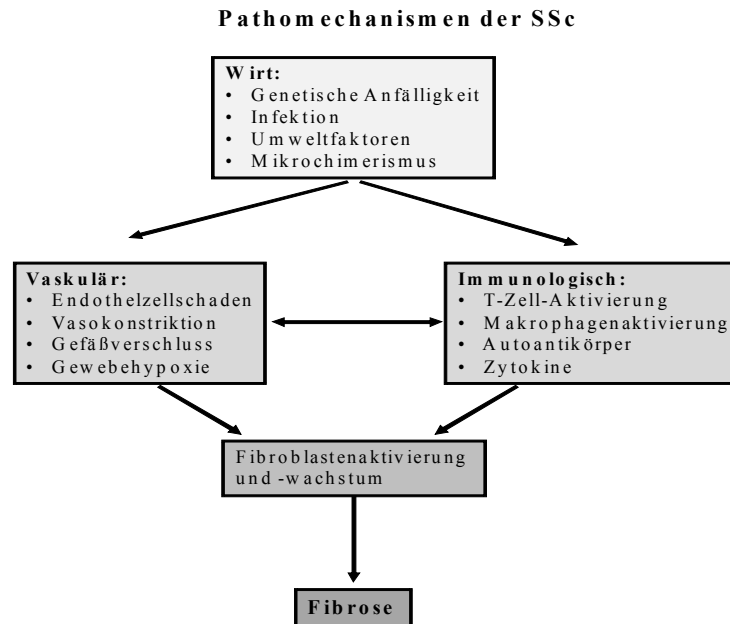


Abbildung 2: Algorithmus für die multifaktoriellen Pathomechanismen der systemischen Sklerose [aus Harrisons Innere Medizin]

## 1.1.5 Therapie und Prognose

Die Prognose der SSc ist sehr variabel und abhängig von den einzelnen Subtypen. Beide Untergruppen der SSc, sowohl die limitierte als auch die diffuse Form, sind mit einer erhöhten Mortalität assoziiert. Die limitiert kutane SSc (lSSc) hat generell eine gute Prognose. Doch auch diese Erkrankung führt in etwa 10 % der Fälle zu einer pulmonalen Hypertonie. Während die Mortalität bei Patienten mit lSSc etwa zweifach erhöht im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung gleichen Alters und Geschlechts ist, steigt sie bei der diffusen Form (dSSc) im Vergleich auf das Acht- bis Zehnfache. Die 10-Jahresüberlebensrate bei diffuser Verlaufsform beträgt etwa 70 % [aus: Innere Medizin, Herold G und Mitarbeiter, 2009]. Die Todesursache der SSc ist häufig auf eine kardiale, pulmonale oder renale Beteiligung der Erkrankung zurückzuführen.

Aufgrund des komplexen Krankheitsbildes umfasst eine Therapie meist drei Bereiche:

Das Gefäßsystem, das Immunsystem und die Fibrose.

Doch kann mit einer medikamentösen Behandlung keine Heilung der SSc erreicht werden. Die Therapie richtet sich lediglich auf die Linderung der Beschwerden, die Verbesserung der Organfunktion und längeres Überleben. So existiert bis heute keine kausale Therapie der SSc, lediglich eine symptomatische Therapie dieser Erkrankung ist möglich. Hinzu kommt, dass aufgrund der Seltenheit und des variablen Verlaufs der Erkrankung die Durchführung kontrollierter Medikamentenstudien erschwert wird.

## Einleitung

Die Inzidenz und Mortalität der vormals häufigsten Todesursache der SSc, des Nierenversagens, konnte durch den Einsatz von ACE-Hemmern deutlich gesenkt werden [Steen, 2003].

Heutzutage stellt die pulmonale Hypertonie trotz neuer therapeutischer Ansätze, wie Endothelin-Rezeptor-Antagonisten oder Phosphodiesteraseinhibitoren, die häufigste Todesursache der SSc dar.

Bereits heute werden neben anderen Pharmaka AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten zur Prophylaxe bei Raynaud-Phänomen eingesetzt.

Während die immunologische Komponente der Erkrankung mit Immunsuppressiva behandelt werden kann, gibt es bis heute kein befriedigendes Therapiekonzept zur Inhibierung der progressiven Fibrose.

### 1.2 Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) gehört zu den am längsten und genauesten untersuchten hormonellen Systemen des Menschen. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde von Tigerstedt und Bergmann eine in der Niere synthetisierte Substanz mit blutdrucksteigernder Wirkung entdeckt. In den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts begann die schrittweise Identifizierung des gesamten Systems mit seinen verschiedenen Komponenten. Das RAS stellt eines der wichtigsten Hormonsysteme des Körpers zur Regulierung des Salz- und Wasserhaushaltes und des Blutdrucks dar.

Bei Blutdruckabfall oder Hypovolämie wird Renin im juxtaglomerulären Apparat der Niere gebildet. Als Protease spaltet Renin das in der Leber gebildete Angiotensinogen im Plasma zu Angiotensin I. Dieses wird wiederum durch das „*Angiotensin-Converting-Enzyme*“ (ACE), welches vorwiegend in Endothelzellen gebildet wird, zu Angiotensin II (Ang II), dem bedeutendsten Effektorhormon dieses Systems, umgewandelt. Die wichtigsten heute bekannten Rezeptoren dieses Oktapeptids sind der Angiotensin Typ 1 (AT<sub>1</sub>)- und der Angiotensin Typ 2 (AT<sub>2</sub>)- Rezeptor.

#### 1.2.1 Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor

Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor (AT<sub>1</sub>) ist beim Erwachsenen der dominierende Rezeptortyp in vielen Geweben.

Es handelt sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor mit sieben transmembranären Domänen. Die Bindung von Ang II an diesen Rezeptor bewirkt eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC), welche wiederum zur Bildung von Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) führt. IP<sub>3</sub> bewirkt einen Anstieg des intrazellulären Calciums und

resultiert in einer Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur und der Sekretion von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Die durch DAG aktivierte Proteinkinase C bewirkt eine Phosphorylierung der Schlüsselproteine für Gefäßkontraktion und Zellwachstum.

Die so über AT<sub>1</sub> vermittelte Vasokonstriktion bewirkt einen direkten Anstieg des Blutdrucks, während das freigesetzte Aldosteron in der Niere eine Retention von Wasser und Natrium bewirkt und so indirekt zu einem Blutdruckanstieg führt. In der Hypophyse fördert Ang II über AT<sub>1</sub> die Freisetzung von antidiuretischem Hormon (ADH), welches ebenfalls eine verminderte Wasserausscheidung über die Niere und so einen Anstieg des Blutdrucks bewirkt. Durch negative Rückkopplung hemmen ein hoher Blutdruck, Ang II und Aldosteron die Renin-Freisetzung aus der Niere.

Obwohl das RAS eines der am längsten erforschten Systeme darstellt, wurde erst kürzlich eine weitere Funktion des AT<sub>1</sub> nachgewiesen: Neben der Regulierung des Wasser- und Elektrolythaushaltes wirkt Ang II über AT<sub>1</sub> auch fördernd auf Zellproliferation und -hypertrophie, die Synthese von extrazellulärer Matrix (EZM) und auf inflammatorische Prozesse [De Gasparo et al., 2000].

Die Produktion von EZM durch Stimulation mit Ang II wird über den pro-fibrotischen Faktor TGF- $\beta$  vermittelt [Kagami et al., 1994; Weber et al., 1999; Ghiggeri et al., 2000].

### 1.2.2 Der AT<sub>2</sub>-Rezeptor

Über den AT<sub>2</sub>-Rezeptor (AT<sub>2</sub>) ist bis zum heutigen Zeitpunkt weit weniger bekannt. Mit Hilfe selektiver Rezeptorliganden gelingt in zunehmendem Maße die weitere funktionelle Charakterisierung dieses Angiotensinrezeptor-Subtyps. Bereits 1994 wies eine Sequenzanalyse der Gene für AT<sub>2</sub> eine Homologie von etwa 90% bei Mensch und Maus auf [Martin et al., 1994; Tsuzuki et al., 1994]. Ang II bindet mit ähnlicher Affinität sowohl an AT<sub>1</sub> als auch an AT<sub>2</sub>. Dennoch unterscheiden sich diese beiden Rezeptorsubtypen hinsichtlich ihrer Gensequenzen erheblich, sie weisen lediglich eine Aminosäuresequenzhomologie von etwa 34% auf. Obwohl die Signaltransduktionswege des AT<sub>2</sub> bislang nur unvollständig aufgeklärt sind, geht man heute davon aus, dass es sich beim AT<sub>2</sub> wie auch beim AT<sub>1</sub> um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor mit sieben transmembranären Domänen handelt [Kambayashi et al., 1993; de Gasparo et al., 2000; Kaschina and Unger 2003].

Es scheint drei wichtige Signaltransduktionswege durch Aktivierung des AT<sub>2</sub> zu geben:

1. Die Aktivierung verschiedener Protein-Phosphatasen, welche eine Protein-Dephosphorylierung bewirken,
2. Die Aktivierung des NO/cGMP-Systems und

3. Die Stimulation von Phospholipase A2 mit einer nachfolgenden Freisetzung von Arachidonsäure.

[Nouet and Nahmias, 2000]

Während Ang II über den vorwiegend dominierenden AT<sub>1</sub> pro-fibrotische und pro-inflammatorische Eigenschaften besitzt, zeigt eine Stimulation des AT<sub>2</sub> gegenteilige Effekte. Ein antiproliferativer Effekt wurde erstmals von Stoll et al. in koronaren Endothelzellen in vitro beobachtet [Stoll et al., 1995]. Zudem reguliert AT<sub>2</sub> sowohl Natriurese, Körpertemperatur, Blutdruck, Reproduktion, Embryonalentwicklung als auch Zelldifferenzierung, Gewebeheilung und Apoptose [Steckelings et al., 2005].

Bei verschiedenen Gewebedefekten (wie beispielsweise Myokardinfarkt, Verletzungen der Haut und andere) kann eine Überexpression des AT<sub>2</sub> beobachtet werden. Aufgrund seiner anti-fibrotischen und anti-inflammatorischen Effekte werden dem AT<sub>2</sub> gewebeprotective Eigenschaften zugeschrieben [Wu et al., 2001; Suzuki et al., 2003; Min et al., 2004]. In gesunder Haut wird der AT<sub>2</sub> in Epidermis und verschiedenen dermalen Strukturen, wie Gefäßwänden oder Talgdrüsen, exprimiert [Steckelings et al., 2004]. Bei Hautwunden findet eine Überexpression des AT<sub>2</sub> in der gesamten Dermis statt [Steckelings et al., 2005].

Auf funktioneller Ebene scheint ein negativer „*Crosstalk*“ zwischen AT<sub>1</sub> und AT<sub>2</sub> zu existieren. So moduliert der AT<sub>2</sub> verschiedene AT<sub>1</sub>-gekoppelte Effekte und zeigt eine protektive Wirkung in defektem Gewebe [Unger, 1999].



## Das Renin-Angiotensin-System

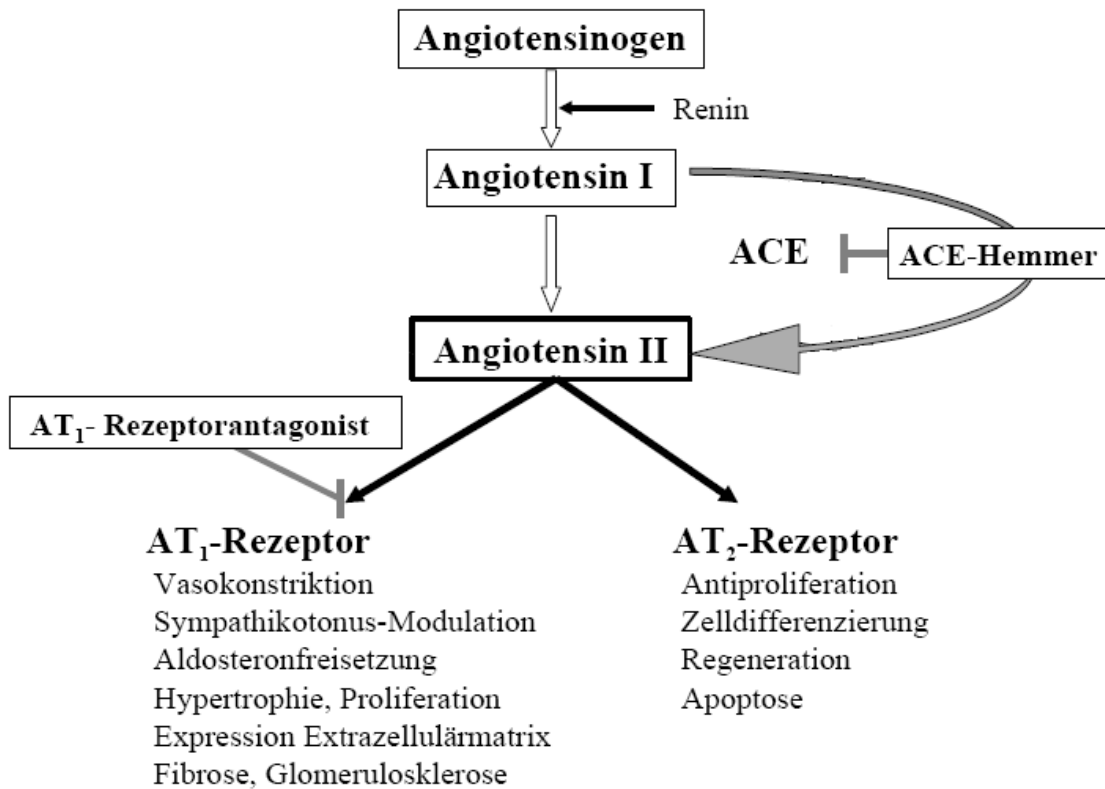


Abbildung 3: Das Renin-Angiotensin-System [modifiziert nach Unger et al., 1996]

### 1.2.3 Der AT<sub>1</sub>-Antagonist Candesartan

Candesartan gehört der Klasse der AT<sub>1</sub>-Blocker (ARB) an. Ihre Wirkweise beruht auf einer kompetitiven Hemmung des AT<sub>1</sub> und somit in einer Modulierung des RAS. Eine Therapie mit ARBs ist allgemein gut verträglich und effektiv in der Behandlung von Bluthochdruck, Herzinsuffizienz mit linksventrikulärer Dysfunktion und der Prävention einer Progression der diabetischen Nephropathie. ARBs inhibieren das Fortschreiten der Fibrose in Niere, Herz und Leber durch Hemmung der TGF- $\beta$ -vermittelten Effekte und bewirken so eine verminderte Produktion von extrazellulären Matrixproteinen.

Candesartan ist ein hoch potenter, lang-wirksamer und selektiver ARB. Bereits 1998 wurde es als Therapeutikum bei Bluthochdruck eingeführt. Seither wurde eine Reihe weiterer Wirkqualitäten von Candesartan experimentell und z. T. auch klinisch gezeigt. So konnte beispielsweise ein Nutzen in der Behandlung von Schlaganfall, Herzinsuffizienz und diabetischer Nephropathie gezeigt werden [Fujiyama et al., 2001; Cuntai et al., 2006; Meiko H et al., 2006; Kintscher et al., 2008]. Candesartan verbesserte in der CHARM-Studie das Outcome

## Einleitung

bei Patienten mit Herzinsuffizienz im Vergleich zu einem Placebo [Pfeffer et al., 2003; Solomon et al., 2004]. In der DIRECT-Studie konnte erst kürzlich ein positiver Effekt von Candesartan auf die diabetische Retinopathie nachgewiesen werden: blutdruckunabhängig konnte sowohl das Auftreten einer diabetischen Retinopathie bei Typ-I-Diabetikern als auch ein weiteres Fortschreiten dieser Erkrankung bei Typ-II-Diabetikern reduziert werden [Chaturvedi et al., 2008; Sjølie et al., 2008].

### 1.2.4 Der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist Compound 21

Compound 21 (C 21) ist der erste selektive, nichtpeptidische AT<sub>2</sub>-Agonist [Wan et al., 2004]. Compound 21 besitzt einen K<sub>i</sub> Wert von 0.4 nM für den AT<sub>2</sub> und einen K<sub>i</sub>-Wert von >10.000 nM für den AT<sub>1</sub> und ist somit hoch selektiv für den AT<sub>2</sub>. Es besitzt in der Ratte eine Bioverfügbarkeit von 20-30 % nach oraler Applikation bei einer Halbwertszeit um 4 Stunden. Compound 21 ist von dem nichtselektiven AT<sub>1</sub>-/AT<sub>2</sub>-Agonisten L-162313 abgeleitet und wird als sehr wertvolles Forschungswerkzeug für Studien über den AT<sub>2</sub>-Rezeptor sowie perspektivisch als Pharmakon eingesetzt.

Erst kürzlich konnte in Ratten eine signifikante Besserung des Outcomes nach induziertem Herzinfarkt durch Therapie mit Compound 21 in vivo nachgewiesen werden [Kaschina et al., 2008]: Compound 21 verbesserte signifikant die systolische und diastolische ventrikuläre Funktion, verkleinerte die Größe der entstehenden Narbe und zeigte sowohl einen anti-apoptischen als auch einen anti-inflammatorischen Effekt. Zudem konnte erst kürzlich eine anti-inflammatorische Wirkung von Compound 21 durch Inhibition von Interleukin-6 gezeigt werden [Rompe et al., 2010]. So scheint eine direkte Stimulation des AT<sub>2</sub> einen neuartigen und vielversprechenden Therapieansatz nicht nur bei Herzinfarkt darzustellen.

## 1.3 Die Haut

Die Haut ist – von außen nach innen – aus drei Schichten aufgebaut:

- Epidermis
- Dermis
- Subkutis

## Aufbau der Haut

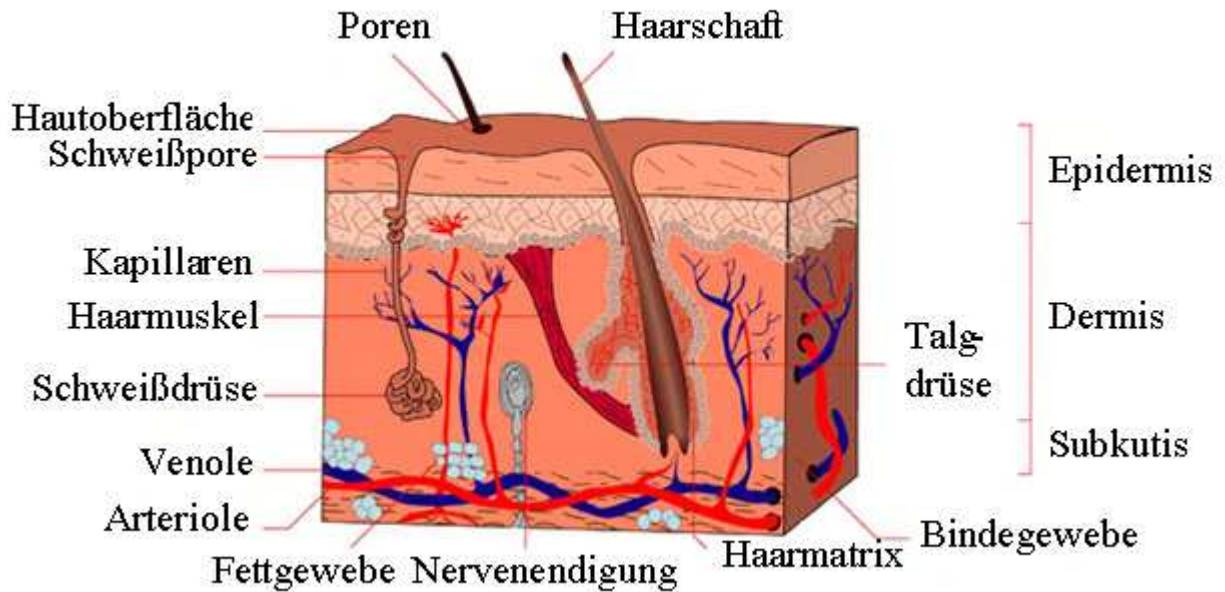


Abbildung 4: Morphologie der Haut [modifiziert nach [http://www.infovisual.info/03/img\\_en/036](http://www.infovisual.info/03/img_en/036) Cross section of skin.jpg]

### 1.3.1 Die Epidermis

Die Epidermis besteht aus einem mehrschichtigen Plattenepithel, welches zu etwa 90% aus Keratinozyten besteht. Diese Zellen dienen der mechanischen Widerstandsfähigkeit. Zudem finden sich Melanozyten zur Bildung von Melanin, Merkelzellen zur Vermittlung des Tastempfindens, sowie Langerhans-Zellen und T-Lymphozyten zur zellvermittelten Immunreaktion. Von basal nach apikal setzt sich die Epidermis aus fünf Schichten zusammen:

1. Stratum basale
2. Stratum spinosum
3. Stratum granulosum
4. Stratum lucidum
5. Stratum corneum

### 1.3.2 Die Dermis

Die Dermis enthält Gefäße und Nerven zur Versorgung der Epidermis und ist durch ihre reißfesten und elastischen Eigenschaften für die mechanische Festigkeit der Haut verantwortlich.

Die Dermis gliedert sich in zwei Schichten:

1. Stratum papillare
2. Stratum reticulare

## Einleitung

Das subepidermale Stratum papillare besteht aus einem lockeren Geflecht dünner Kollagenfasern und ist sowohl zell- als auch gefäßreich, während das Stratum reticulare ein zellarmes, scherengitterartiges Netz aus Kollagenfaserbündeln mit elastischen Fasern darstellt.

### 1.3.3 Die Subkutis

Die Subkutis ist regional unterschiedlich stark ausgebildet. Sie dient vorwiegend als Wärmeisolation, mechanisches Schutzpolster und Energiespeicher. Zudem befestigt sie die Haut auf ihrer Unterlage. Die Subkutis enthält Fettgewebsläppchen, welche durch Bindegewebssepten voneinander getrennt sind. Diese Septen bilden das straffe Grundgerüst und stellen die Kommunikation mit der Dermis sicher. In ihnen finden sich Nerven und Gefäße.

### 1.3.4 Kollagen

Biochemische Analysen haben gezeigt, dass in der Dermis zwei verschiedene Kollagentypen (Typ I und III) vorherrschen. Das Verhältnis dieser beiden Typen ändert sich im Laufe des Lebens. So weist embryonale Haut 60 % an Kollagen Typ III auf, während die Haut erwachsener Individuen lediglich zu 20 % aus Kollagen Typ III besteht [Epstein, 1974]. 80 % der in der erwachsenen Haut vorkommenden Kollagenfibrillen werden aus Kollagen Typ I gebildet.

Zudem können zwei morphologisch unterschiedliche Schichten in der Haut erwachsener Individuen charakterisiert werden:

Zum einen das feine Geflecht der retikulären Fasern, welche typisch für das Stratum papillare sind, zum anderen die dicken, groben Kollagenbündel, welche vorwiegend in tieferen Schichten gefunden werden [Pinkus and Mehregan, 1981; Lever and Schaumburg-Lever, 1983].

Histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten nachweisen, dass retikuläre Fasern dünne Kollagen Typ III-Fibrillen enthalten, während Kollagenfasern aus dicken Kollagen Typ I-Fibrillen zusammengesetzt sind [Montes et al., 1980].

Bei einer ausgeprägten Sklerosierung des Bindegewebes durch eine Überexpression von Kollagen durch Fibroblasten, wie es typisch für die SSc ist, kommt es vorwiegend zu einer Überexpression von Kollagen Typ I. Hierdurch kommt es zu einer Verschiebung des Verhältnisses von Kollagen Typ I zu Kollagen Typ III [Ogbuihi and Zink, 1988]. Somit kann das Verhältnis dieser beiden Kollagene als Index zur Beurteilung fibrosierender Vorgänge in verschiedenen Organen verwendet werden.

### **1.4 Das Renin-Angiotensin-System in der Haut**

Neben dem in 1.2 beschriebenen systemischen RAS wurden in den letzten Jahren eine Reihe sogenannter „lokaler“ RAS's beschrieben. Dies bedeutet, dass ein Gewebe in der Lage ist, alle Komponenten des Systems selbständig zu exprimieren, also unabhängig von der Versorgung mit Komponenten aus dem systemischen Kreislauf ist und Ang II unter Einfluss lokaler Regulationsmechanismen bilden kann. Diese „lokalen“ Systeme wurden bereits für verschiedene Organe - wie Herz, Niere, Gehirn und Leber - beschrieben [Lavoie and Sigmund, 2003]. Während das systemische RAS vorwiegend für den Wasser- und Elektrolythaushalt zuständig ist [Edling et al., 1995], sind die lokalen RAS's für lokal begrenzte, gewebespezifische Effekte, wie Narbenbildung nach einem Herzinfarkt [Weber et al., 1997] oder Regeneration von verletzten Nerven [Lucius et al., 1998], verantwortlich. Kürzlich konnte ein komplettes „lokales“ RAS auch in der Haut nachgewiesen werden, d.h. in der Haut können alle Komponenten des RAS unabhängig vom großen Kreislauf exprimiert werden: Angiotensinogen, Renin und ACE, sowie die wichtigsten Angiotensin II Rezeptor-Subtypen AT<sub>1</sub> und AT<sub>2</sub> [Takeda and Kondo, 2001; Steckelings et al., 2004]. Das bedeutet, dass die Haut sowohl Quelle als auch Zielorgan für Ang II ist. Dieses lokale RAS ist von der Zirkulation von Renin und ACE unabhängig und löst lokal begrenzte Effekte aus, welche in verschiedenster Weise in die Hautphysiologie und -pathophysiologie eingreifen [Urata et al., 1990; Urata et al., 1996; Karlsson et al., 1998; Marshall et al., 2000; Richard et al., 2001; Nishimoto et al., 2001].

So konnte sowohl die Kollagensynthese als auch die IL-6-Expression in humanen dermalen Fibroblasten durch Stimulation des AT<sub>1</sub>-Rezeptors induziert werden [Steckelings et al., 2004].

### **1.5 Das Renin-Angiotensin-System und Sklerodermie**

Bereits heutzutage werden zahlreiche Inhibitoren des RAS erfolgreich zur symptomatischen Therapie der Sklerodermie eingesetzt. So konnten ACE-Hemmer die Prognose der SSc durch eine mögliche Behandlung der renalen Krise deutlich verbessern [Steen et al., 1990].

Ebenso wird zur Therapie des Raynaud-Phänomens häufig ein AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonist eingesetzt, welcher durch eine Hemmung der Vasokonstriktion die bei diesem Phänomen auftretenden Vasospasmen deutlich reduzieren kann. Zudem senken AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten die Serumlevel von N-terminalem Prokollagen-Propeptid, welches als Indikator für eine Fibrose bei SSc dient [Dziadzio et al., 1999].

Ein weiterer Indikator für eine Beteiligung des RAS in der Pathogenese der SSc konnte erst kürzlich gezeigt werden. So weisen SSc-Patienten erhöhte Serumspiegel an Ang II auf [Kawaguchi et al., 2004].

## Einleitung

In in vitro-Versuchen verlangsamten ACE-Hemmer das Wachstum von Myofibroblasten, wahrscheinlich über eine reduzierte Ang II-Produktion [Venkatesan et al., 1997; Ali et al., 1998] und reduzierten die Fibroblasten-Proliferation [Uhal et al., 1998].

Mithilfe von spezifischen Antagonisten sowohl gegen AT<sub>1</sub>- als auch gegen AT<sub>2</sub>-Rezeptoren konnte eine AT<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelte Hemmung der Prokollagen-Synthese in Fibroblasten von SSc-Patienten erreicht werden [Kawaguchi et al., 2004].

Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung des kutanen RAS an der Pathogenese der SSc hin. Obwohl ein pro-fibrotischer und pro-inflammatorischer Effekt des AT<sub>1</sub>-Rezeptors gezeigt werden konnte, fehlt bisher noch immer ein schlüssiger, direkter Beweis für die Beteiligung von Ang II an der für die Sklerodermie charakteristischen erhöhten EZM-Synthese und den inflammatorischen Prozessen. Sowohl im Rahmen des Raynaud-Phänomens als auch des Nierenbefalls bei Sklerodermie hat sich bereits eine Hemmung des RAS als therapeutisches Prinzip bewährt (siehe 1.1.6 Therapie und Prognose). Ebenso konnte im Tierversuch ein therapeutisch günstiger Effekt auf fibrotische Prozesse durch pharmakologische Hemmung des RAS bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose gezeigt werden [Otsuka et al., 2004].

### 1.6 Versuchsmodell

Zur Untersuchung der Frage, ob eine pharmakologische Interferenz mit dem RAS einen möglichen therapeutischen Ansatz zur Behandlung der SSc darstellen könnte, testeten wir das therapeutische Potential eines AT<sub>1</sub>-Antagonisten und eines AT<sub>2</sub>-Agonisten in einem experimentellen Modell der SSc. Bei diesem Modell, das von Yamamoto und anderen 1999 etabliert wurde, führen lokale, subkutane Injektionen von Bleomycin zu Sklerodermie-ähnlichen Veränderungen der Haut [Yamamoto et al., 1999]. Dieses Modell ist zur Erforschung der SSc allgemein anerkannt [Takagawa et al. 2003; Murota et al., 2003; Yamamoto and Nishioka, 2003].

#### 1.6.1 Bleomycin

Bleomycin ist ein zytostatisch wirksames Antibiotikum, das aus dem grampositiven, obligat aeroben Mikroorganismus *Streptomyces verticillus* gewonnen wird. Im Jahre 1965 konnte dieses aus einer Gruppe basischer Glykopeptide bestehende Chemotherapeutikum erstmalig aus *Streptomyces*kulturen isoliert werden [Umezawa, 1965]. Der zytostatische Wirkmechanismus von Bleomycin besteht in einer Hemmung der Zellteilung, welche durch Blockierung der Nukleinsäuresynthese verursacht wird. Als klinische Hauptindikationen für Bleomycin gelten insbesondere epitheliale Tumoren wie Plattenepithelkarzinome sowie maligne Lymphome,

## Einleitung

Hodentumoren und lokaltherapeutisch maligne Effusionen, wie Pleuraergüsse. Unerwünschte Nebenwirkungen der Therapie mit Bleomycin betreffen vorwiegend Haut und Lunge [Mountz et al., 1983], da diese Organe das Zytostatikum selektiv anreichern bzw. vermindert metabolisieren. Kutane wie auch pulmonale Gewebe weisen eine reduzierte Konzentration an Bleomycin-Hydrolyse auf, welche das Peptid enzymatisch inaktiviert.

Neben der gefürchteten, meist erst bei hohen Dosen auftretenden, u.U. lebensbedrohlichen interstitiellen Lungenfibrose finden sich an Haut bzw. Schleimhaut v.a. Hyperpigmentierungen, Hyperkeratosen, Exantheme, Alopezien, Ulzerationen oder Stomatitiden, selten infiltrierte Plaques oder Knoten bis hin zu sklerodermiformen Indurationen der Haut [Finch et al., 1980].

Bleomycin gilt heute neben Vinylchlorid, Kunstharzen, Lösungsmitteln, Kokainabusus, Silikon (Adjuvanskrankheit), verunreinigtem Rapssamenöl („*Toxic-oil-syndrome*“), Tryptophan (Eosinophilie-Myalgie-Syndrom) und diversen Medikamenten wie D-Penicillamin als eine der Substanzen, die Sklerodermie-artige Krankheitsbilder (Pseudosklerodermien) auslösen oder eine progressive systemische Sklerodermie (PSS) selbst induzieren können [Haustein et al., 1992].

### 1.7 Fragestellung und Zielsetzung

Zielsetzung dieser Arbeit war die Gewinnung erster Erkenntnisse über eine mögliche therapeutische Wirksamkeit von einer Hemmung des AT<sub>1</sub> bzw. Aktivierung des AT<sub>2</sub> für die Behandlung der SSc.

Es gibt einige Indizien für die Beteiligung des RAS an der Pathogenese der SSc, so

- konnte das Vorhandensein eines lokalen RAS in der Haut nachgewiesen werden [Takeda and Kondo, 2001; Steckelings et al., 2004],
- konnte ein pro-fibrotischer und pro-inflammatorischer Effekt des AT<sub>1</sub>-Rezeptors gezeigt werden [De Gasparo et al., 2000],
- konnte eine AT<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelte Hemmung der Prokollagen-Synthese in Fibroblasten von SSc-Patienten erreicht werden [Kawaguchi et al., 2004],
- finden sich erhöhte Serumspiegel an Ang II bei SSc-Patienten [Kawaguchi et al., 2004].

Bisher existiert kein befriedigendes Therapiekonzept zur Behandlung der SSc. Obwohl deutliche Hinweise auf eine pathogenetische Rolle des RAS bei der SSc bestehen und eine RAS-Blockade bei Teilaspekten der SSc (renale Krise, Raynaud-Phänomen) therapeutisch eingesetzt wird, ist die pharmakologische Interferenz mit dem RAS als generelles Therapiekonzept bei der SSc noch nicht getestet worden. Ziel dieser Arbeit ist daher mithilfe von in vivo-Experimenten sowohl eine AT<sub>1</sub>-Blockade als auch eine AT<sub>2</sub>-Stimulation als therapeutischen Ansatz im Sklerodermie-Modell zu überprüfen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verwendete Chemikalien und Farbstoffe

Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Acrylamide-Bis Solution	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aqua ad injectabile	Braun, Melsungen, Deutschland
BCA Protein Assay Reagent A	Pierce, Bonn, Germany
BCA Protein Assay Reagent B	Pierce, Bonn, Germany
Bleomycin sulfate from <i>Streptomyces verticillus</i> crystalline, 1.5-2.0 units/mg solid	Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
BSA (Bovine Serum Albumin)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Candesartan	Takeda Pharmaceutical Company, Osaka, Japan
Chloroform reinst	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Compound 21	Vicore Pharma, Göteborg, Schweden
DAPI, dilactate ≥98% (HPLC)	Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
Direct Red 80	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Donkey serum	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham, München, Deutschland
Entellan	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin-Lösung	Chroma-Gesellschaft mbH&Co.KG, Münster, Deutschland
Ethanol absolut	J.T. BAKER, Deventer, Holland
Ethanol 96% (MEK)	Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl-Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe Deutschland

## Material und Methoden

Formalinlösung 4% gepuffert	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Guanidin Hydrochlorid	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Isopropanol	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Mayers Hämalaun-Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid-Lösung	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Orange G	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS pH 7.2)	GIBCO invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Picric acid Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Power SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Primers	Operon Biotechnologies, Köln, Deutschland
RNase Zap	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salzsäure	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS) 10%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sucrose 30%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tissue Freezing Medium	Leica Microsystems, Nussloh, Deutschland
Tissue Tek Kryomedium	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande

## Material und Methoden

Tris Acetate-EDTA (TAE) Buffer	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trizma base	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trizma hydrochloride	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trizol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ultra pure water	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Xylol	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.2 Verwendete Geräte

#### Elektrophorese-Apparatur

Power PAC 300 Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

#### Entwicklermaschine

CURIX 60 Agfa Graphics Germany GmbH & Co. KG,  
Düsseldorf, Deutschland

#### Homogenisator

Polytron Bachofer GmbH, Reutlingen, Deutschland

#### Kryostat

LEICA CM 1900 Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch,  
Deutschland

#### Magnetrührer

Magnetrührer mit Heizplatte Kika-Werke, Staufen, Deutschland

#### Mikroskope

Lichtmikroskop Leica/DML Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar,  
Deutschland

Mikroskop LEICA DM IRE2 Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar,  
Deutschland

#### Mikrowelle

## Material und Methoden

HMT72G420

Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe,  
Deutschland

### Ofen

DUO Therm Hybridization Oven OV5

Biometra, Göttingen, Deutschland

### PCR-Gerät

Stratagen Mx3000P

Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.  
KG, Waldbronn, Germany

### pH-Meter

pH-Meter

HANNA Instruments GmbH, Kehl am Rhein,  
Deutschland

### Scanner

UMAX PowerLook 2100XL

Umax Systems GmbH, Willich, Deutschland

### Schüttler

Unimax 1010

Heidolph, Schwabach, Deutschland

### Spectrophotometer

NanoDrop ND-1000

PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

### Thermocycler

T3 Thermocycler

Biometra, Göttingen, Deutschland

### Vortexer

Vortex-Genie2

Scientific Industries, Inc., New York, USA

### Waagen

Präzisionswaage TE

Sartorius, Göttingen, Deutschland

Analysenwaage TW

Sartorius, Göttingen, Deutschland

## Material und Methoden

### Zentrifugen

Kühlzentrifuge Mikro 22R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Mini-Zentrifuge	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### **2.1.3 Verbrauchsmaterialien**

Amersham Hybond-C extra	GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, England
Deckgläser	Menzel GmbH+Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Spitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Filterpapier	Munktell Filter AB, Falun, Schweden
High performance chemiluminescence film	GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, England
Kanülen	Braun, Melsungen, Deutschland
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Liquid Blocker Super PAPPen	Daido Sangyo Co. Ltd., Tokyo, Japan
Parafilm	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Röhren	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Disposable Scalpel	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrinck Labor- u. Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Tissue Tek Kryogefäß	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
96 Well Multiply-PCR Plate	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

## **2.2 Methoden**

### 2.2.1 Tiere

Die Versuche wurden an weiblichen C3/HeJ Mäusen von Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland mit einem Ausgangsalter von 6 Wochen und einem Körpergewicht von 14-17 g durchgeführt.

Die Tiere wurden in Käfigen zu jeweils fünf Tieren bei kontrollierter, konstanter Temperatur ( $22\pm 1$  °C) und Luftfeuchtigkeit ( $55\pm 5$  %) im 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus untergebracht. Sie hatten freien Zugang zu Trinkwasser und standardisiertem Futter. Die Haltung erfolgte in keimarmen („*special pathogen free*“ [SPF]-) Umgebung mit Genehmigung und unter Aufsicht des Landesamtes für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) Berlin (G-0194/08) in der tierexperimentellen Einrichtung des „*Center for Cardiovascular Research*“ (CCR) der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte.

Die operativen Tätigkeiten erfolgten durch die Arbeitsgruppe Unger unter Supervision von Dr. Steckelings, CCR, Campus Charité Mitte.

### 2.2.2 Versuchsaufbau

Jeweils 6 Tiere wurden einer der folgenden Gruppen zugeordnet:

- Kontrolle
- Bleomycin
- Bleomycin + Compound 21
- Bleomycin + Candesartan (3 verschiedene Dosierungen)

Zur Induktion sklerodermie-ähnlicher Veränderungen der Haut wurde über einen Zeitraum von 28 Tagen jeden zweiten Tag 0,1 ml Bleomycin subkutan (s.c.) in ein mit Enthaarungscreme enthaartes Hautareal am Rücken der Tiere injiziert.

Das Gewicht wurde alle 2 Tage kontrolliert. Die Hautveränderungen wurden mittels Ultraschall beobachtet. Es wurden jeweils 3 Messungen pro Tier durchgeführt. Hierzu wurde eine Narkose mit Isofluran eingeleitet und 0,1 ml Aqua ad injectabile s.c. injiziert, um die Subkutis von der Epidermis zu trennen und deren Dicke vermessen zu können.

Die Kontroll-Tiere erhielten einmal täglich 0,1 ml NaCl 0,9 %, da dies als Lösemittel für Bleomycin dient.

## Material und Methoden

Zur Untersuchung des therapeutischen Potentials einer pharmakologischen Beeinflussung des RAS durch Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors oder Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors wurde den mit Bleomycin behandelten Tieren zusätzlich der AT<sub>1</sub>R-Antagonist Candesartan oder der AT<sub>2</sub>R-Agonist Compound 21 s.c. injiziert.

Für die Behandlung mit Candesartan wurden 3 verschiedene Dosierungen eingesetzt (Behandlungsschema und Dosierungen siehe Abbildung 5).

Am Tag nach der letzten Behandlung wurden die Tiere getötet, die Haut um die Injektionsstellen entnommen und für weitere Untersuchungen aufbereitet (siehe 2.2.3).

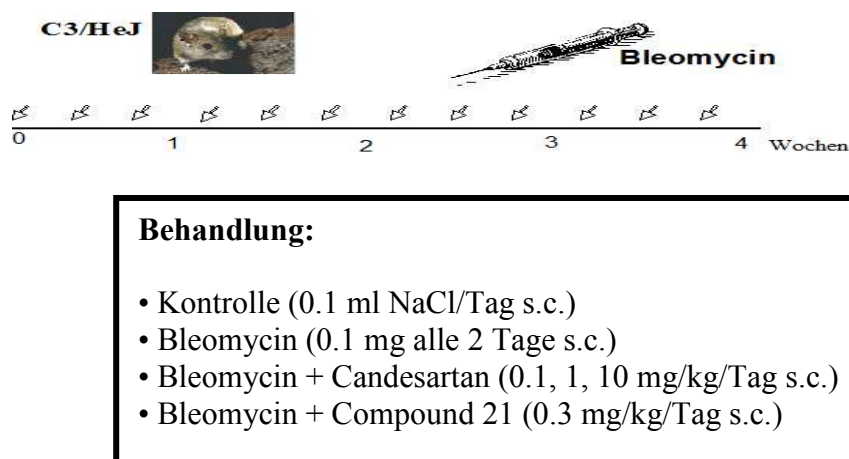


Abbildung 5: Behandlungsschema

### Verwendete Lösungen für Tierversuch

Bleomycin	15 mg Bleomycin in 15 ml NaCl 0,9 % aufgelöst
Candesartan	240 mg Candesartan ( $440.45 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) in 12 ml $\text{NaHCO}_3$ aufgelöst
Compound21	0,15 mg Compound 21 ( $497,6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) in 2,5 ml Aqua ad injectabile aufgelöst

### 2.2.3 Aufbereitung der Geweblöcke

Die 10 mm messenden Geweblöcke wurden jeweils in vier Proben geteilt. Anschließend wurden zwei der Geweblöcke für die (Immun-) Histologie für 10 Minuten in 4 %-igem neutralgepufferten Formalin immersionsfixiert. Nach der Fixierung wurden die Proben über Nacht in 30 %-iger Sucrose inkubiert, in Tissue Tek Kryogefäßen mit Freezing Medium eingebettet und bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die anderen 2 Geweblöcke für RNA- und Proteinisolierung wurden direkt nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff ebenfalls bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.2.4 Histologische Untersuchungen

Mithilfe eines Kryostaten wurden bei -20 °C 5 (für Immunhistologie) bzw. 7 µm dicke histologische Gefrier-Serienschnitte angefertigt (etwa 5 Schnitte pro Präparat). Die gefrorenen Präparate wurden hierzu aus dem Kryogefäß gelöst und mit Tissue-Tek auf dem Präparatteller befestigt. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger (4-6 Schnitte pro Objektträger) übertragen, 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und 10 Minuten in Aceton fixiert. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin (siehe 2.2.4.1) oder Picrosirius-Rot (siehe 2.2.4.2) gefärbt.

Zudem wurden immunhistologische Untersuchungen durchgeführt (siehe 2.2.4.3). Die Schnitte wurden mit 5x-Vergrößerung unter dem Mikroskop beurteilt.

#### 2.2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Färbung erfolgte an Gefrierschnitten der Haut der Mäuse.

Verwendetes Protokoll:

15 Sekunden	ddH <sub>2</sub> O
30 Sekunden	Hämalaun nach Mayer
30 Sekunden	ddH <sub>2</sub> O
30 Sekunden	ddH <sub>2</sub> O
15 Sekunden	70% Ethanol
5 Sekunden	Eosin
15 Sekunden	95% Ethanol
15 Sekunden	95% Ethanol
15 Sekunden	100% Ethanol
1 Minute	Xylol

Anschließend wurden die Schnitte mit Entellan auf dem Objektträger fixiert.

Das Ergebnis dieser Färbung ist lichtmikroskopisch zu bewerten und ergibt eine blaue Färbung der basophilen Zellkerne, sowie eine Rotfärbung des Zytoplasmas und der Kollagenfasern.

#### 2.2.4.2 Picrosirius-Rot-Färbung

Zur Charakterisierung des Kollagens der Extrazellulärmatrix in der Haut wurde die Picrosirius-Rot-Färbung nach John A. Kiernan angewandt.

Diese Methode beruht auf der doppelbrechenden Eigenschaft von Kollagen unter polarisiertem Licht. Die Färbung resultiert aus der Interaktion von Sirius Rot mit Kollagen bei einem niedrigen



pH-Wert (pH 2). Die anionischen Sulfonsäure-Gruppen des Farbstoffes reagieren hierbei mit kationischen Gruppen des Kollagens und es resultiert eine Bindung von Sirius Rot an Kollagen unter paralleler Ausrichtung der Längsachsen der Farb- und Kollagenmoleküle. Dies führt zu einer verstärkten Doppelbrechung der Kollagenmoleküle unter polarisiertem Licht. Diese sichtbare Doppelbrechung ist spezifisch für Kollagen [Junqueira et al., 1979].

Die Färbung erfolgte an Gefrierschnitten der Haut der Mäuse.

Zunächst wurden die Schnitte 1 Minute in 70 %-igem Ethanol inkubiert und anschließend für 10 Minuten unter laufendem Wasser gewaschen bevor sie mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 0.1 %-iger Sirius Rot Lösung gefärbt wurden. Im Anschluss wurden sie zweimalig in 0.01 N Salzsäure gewaschen. Die Dehydrierung erfolgte in dreimaligem Schwenken in 100 %-igem Ethanol. Nach einer kurzen Inkubation mit Xylol erfolgte die Einbettung in Entellan auf dem Objektträger.

In der Auflichtmikroskopie zeigt Kollagen nun eine rote Färbung auf gelbem Hintergrund, während unter polarisiertem Licht eine Differenzierung zwischen dicken und dünneren Kollagenfibrillen möglich ist. Durch die Doppelbrechung der Fasern weist so Kollagen I eine rot-gelbe Leuchtkraft auf, wohingegen Kollagen III grün-gelb erscheint.

### Verwendete Lösungen für Picosirius-Rot-Färbung

1,2 % Pikrinsäure-Lösung	12 g Pikrinsäure in 1000 ml ddH <sub>2</sub> O, mit 10 N NaOH auf pH 2
0.1 % Picosirius-Rot-Färbelösung	0,5 g Sirius Rot in 500 ml 1,2 % Pikrinsäure – Lösung
0,01 N Salzsäure	5 ml 0,1 N Salzsäure ad 1 l dd H <sub>2</sub> O

### 2.2.4.3 Immunhistologie

Zur spezifischen Darstellung von Kollagen Typ I in den Hautschnitten wurden zudem immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt.

Hierzu wurde ein spezifischer Antikörper gegen Kollagen Typ I verwendet. Die Färbung wurde in Feuchtkammern durchgeführt, um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden.

Zunächst wurden die Schnitte dreimalig in PBS gewaschen (1 min – 5 min – 5 min). Mit einem Liquid Blocker Stift wurden die Schnitte auf den Objektträgern umrandet. Dies verhinderte das Auslaufen der Reagenzien auf den Schnitten. Um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden, wurden unspezifische Bindungsstellen eine Stunde mit 10 %-igem Esel-Serum

## Material und Methoden

geblockt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit 75 µl des 1:100 verdünnten Primärantikörpers für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimalig wie oben beschrieben mit PBS gewaschen und anschließend mit dem 1:200 verdünnten Sekundärantikörper 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem, wie oben beschriebenem Waschen mit PBS wurden die Schnitte zur Darstellung der Zellkerne für 10 Minuten in 4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) inkubiert. Diese Färbung erfasst hoch sensitiv einzelne Nukleinsäure-Moleküle und stellt selbst kleinste DNA-Fragmente dar. Zum Schluss wurden die Schnitte erneut gewaschen, die Objektträger mit Deckgläsern abgedeckt und die Schnitte vor Licht geschützt aufbewahrt.

### Verwendete Antikörper für Immunhistologie

Anti Col1A1 (goat anti-mouse polyclonal antibody)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP	Chemicon, Schwalbach, Deutschland

### Verwendete Lösungen für Immunhistologie

5 % Donkey Serum	0,75 ml Donkey Serum ad 15 ml PBS
Anti Col1A1 1:100	30 µl Antikörper in 3 ml 5 % Donkey serum
Rabbit Anti-Goat IgG 1:200	15 µl Antikörper in 3 ml 5 % Donkey serum
DAPI	10 ng DAPI in 1 ml 5 % Donkey serum

## 2.2.5 Molekularbiologie

### 2.2.5.1 RNA-Isolation aus Gewebeproben

Die RNA-Isolation erfolgte nach dem Standardprotokoll der Firma Invitrogen.

Hierzu wurden die bei -80 °C gelagerten Hautproben unter flüssigem Stickstoff mit einem vorgekühlten Mörser zu feinem Pulver zermahlen und in Glasröhren gegeben.

Mörser und Homogenisator wurden zwischen den einzelnen Proben mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, mit 96%-igem Ethanol desinfiziert und mit Rnase Zap gereinigt.

### **Protokoll der mRNA-Isolation (nach Invitrogen)**

- Zugabe von 1 ml TRIZOL-Reagenz zum Gewebe
- Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur, um komplette Dissoziation der nukleären Proteinkomplexe zu erreichen
- Homogenisierung für 5 Minuten mit Polytron
- Zugabe von 0,2 ml Chloroform und kräftiges Schütteln für 15 Sekunden
- Inkubation für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur
- Zentrifugation bei 12.000 x g für 15 Minuten bei 4 °C
- Separation des Gemisches in untere Phenol-Chloroform-Phase (Proteine), Interphase (DNA) und obere wässrige Phase (RNA)
- Abnahme der wässrigen Phase und Überführung in ein neues Reaktionsgefäß
- Aufbewahrung der unteren Phenol-Chloroform-Phase für Proteinisolation bei -80 °C (s.2.2.5.4)
- Präzipitation der RNA aus der wässrigen Phase durch Schütteln mit 0,5 ml Isopropanol
- Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur und Zentrifugation bei 12.000 x g für 10 Minuten bei 4 °C
- Bildung eines gelartigen, weißlichen Pellets am unteren Rand des Reaktionsgefäßes
- Verwerfen des Überstandes und Waschen des Pellets mit 75 % Ethanol
- Vortexen und Zentrifugation bei 7500 x g für 5 Minuten bei 4 °C
- Trocknen des RNA-Pellets und Aufnahme in 20 µl ddH<sub>2</sub>O

Die Konzentration der RNA wurde mithilfe eines Spektrophotometers gemessen.

Die Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Absorptionsmaximum der aromatischen Pyridin- und Pyrimidinringe der Nukleotide bei 260 nm.

Da Proteine aufgrund ihrer aromatischen Aminosäurereste ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen, kann anhand des Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm (Ratio) die Qualität der RNA ermittelt werden. Bei einer kontaminationsfreien RNA-Lösung sollte die Ratio zwischen 1,6 und 2,0 liegen. Werte darunter weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Salzrückständen hin.

### **2.2.5.2 cDNA-Synthese (reverse Transkription)**

Die Synthese der cDNA erfolgte nach dem Standardprotokoll für SuperScript II von Invitrogen. Hierzu wurde die gewonnene RNA auf eine Konzentration von 500 ng in 8 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und ein vorausgehender DNase-Verdau durchgeführt.

## Material und Methoden

Zur Kontrolle der Reinheit der entstandenen Produkte wurde für jede dritte, zufällig gewählte Probe eine RT- durchgeführt.

Bei diesen RT- wurde der letzte Schritt, die Zugabe der Reversen Transkriptase ausgelassen und so die Bildung von cDNA vermieden.

### **Protokoll der cDNA-Synthese (nach Invitrogen)**

- Dnase-Verdau mit 1 µl Dnase und 1 µl Dnase-Puffer
- Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C
- Zugabe von 1 µl STOP-Lösung
- Inkubation für 10 Minuten bei 65 °C
- Zugabe von 0,5 µl Random Primer (500µg/ml) und 1 µl dNTP-Mix (je 10mM)
- Inkubation für 5 Minuten bei 65 °C
- Abkühlung für 1 Minute auf Eis und kurze Zentrifugation zum Sammeln des Ansatzes
- Zugabe von 4 µl 5 x - Puffer  
2 µl 0,1 M DTT  
1 µl Rnasin
- Inkubation für 2 Minuten bei 25 °C
- Zugabe von 1 µl SuperScript II RT
- Gesamtansatz von 20 µl
- Auf- und Abpipettieren zum Mischen des Ansatzes
- Inkubation für 10 Minuten bei 25 °C
- Inkubation für 50 Minuten bei 42 °C
- Inkubation für 15 Minuten bei 70 °C zur Inaktivierung der Reaktion
- Aufbewahrung der cDNA bei -20 °C

### **Verwendete Materialien für cDNA-Synthese**

Set of dATP,dGTP,dCTP,dTTP (je 100 mM)	Promega, Mannheim, Deutschland
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SuperScript II RT (200 U/µl)	
5 x First-Strand Buffer	
0,1 M DTT	
RQ1 RNase-free Dnase	Promega, Mannheim, Deutschland
Dnase	
Dnase-Puffer	
STOP-Lösung	
Rand.-Hex.-Primer	Promega, Mannheim, Deutschland
Rnasin Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)	Promega, Mannheim, Deutschland

### 2.2.5.3 Quantitative Real-Time PCR

Die hier genutzte Real-Time RT-PCR ist eine spezielle Form der PCR. Sie stellt eine Vervielfältigungsmethode von DNA bekannter Nukleotidsequenz dar und bietet zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung mittels Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus (daher auch „*Real-Time*“).

Eine PCR-Reaktion besteht aus vier kinetischen Stufen:

- In der lag-Phase findet eine Amplifikation des PCR-Produktes ohne messbares Fluoreszenzsignal statt.
- Ihr folgt die log-Phase mit exponentieller Zunahme des PCR-Produktes, in welcher sich das Produkt von Zyklus zu Zyklus verdoppelt.
- In der sich anschließenden Verzögerungsphase verlangsamt sich die Reaktion aufgrund der Ansammlung von PCR-Produkten und einem Substrat- und Enzymmangel.
- In der stationären Phase findet keine weitere Bildung von PCR-Produkten statt.

Um die Zunahme der PCR-Produkte während der PCR in Echtzeit verfolgen zu können, wird dem PCR-Ansatz der Farbstoff SYBR Green<sup>®</sup> zugesetzt, der nach Einlagerung in doppelsträngige DNA fluoresziert. Die Zunahme des PCR-Produktes korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Der „*Threshold-Cycle*“ (= Schwellenwert-Zyklus,  $C_T$ ) beschreibt denjenigen PCR-Zyklus, in welchem das Fluoreszenzsignal erstmalig signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Diese Schwelle liegt in der exponentiellen Amplifikationsphase. In welchem Zyklus diese Schwelle erreicht wird, ist abhängig von der initialen Menge an Ziel-DNA im Reaktionsansatz. Über den  $C_T$ -Wert der einzelnen Proben lassen sich so vergleichende quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge der Ziel-DNA treffen.

Der interkalierende Farbstoff SYBR Green<sup>®</sup> ermöglicht jedoch keine Unterscheidung zwischen Produkt und eventuell auftretenden Nebenprodukten, wie Primerdimeren oder unspezifischen Amplifikationsprodukten. Aus diesem Grund wird eine Schmelzkurvenanalyse nach abgelaufener PCR durchgeführt. Dabei werden die farbstoffmarkierten doppelsträngigen DNA-Fragmente bei langsam und kontinuierlich ansteigender Temperatur in Abhängigkeit vom spezifischen Schmelzpunkt voneinander getrennt. Durch die Trennung der Fragmente wird der Farbstoff freigesetzt und es kommt zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die erste Ableitung der Fluoreszenzabnahme ( $\Delta R_n$ ) über der Temperatur aufgetragen. Bei spezifischen Primern tritt ein Maximum (Peak) bei vollständiger Trennung der beiden Stränge auf, weitere Maxima für unspezifische Nebenprodukte sollten nicht auftreten.

### 2.2.5.3.1 Primer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden von Operon erworben.

**Verwendete Primer für quantitative Real-Time PCR, alle Primersequenzen von 5'-3' aufgelistet**

Gen	sense	antisense	Annealingtemperatur [°C]
18S	ACCTGGTTGATCCTGCCAG	TTAATGAGCCATTCGCAGT	60
rRNA	TAG	TTC	
IL-6	TAGTCCTTCCTACCCCAAT TTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCT TC	60
MMP-9	GACAGGCACTTCACCGGCT A	CCCGACACACAGTAAGCA TTCTG	60

### 2.2.5.3.2 Durchführung der Real-Time PCR

Pro „well“ wurden 15 µl PCR-Mastermix (siehe 2.2.5.3.3) auf eine 96 Well-Platte pipettiert und 10 µl der auf 2 ng/µl verdünnten cDNA zugegeben. Anschließend wurde die Platte mit einer durchsichtigen Folie beklebt und für 1 Minuten bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Positionieren der Wellplatte in dem PCR-Gerät, wurden das PCR-Programm gestartet und die C<sub>T</sub>-Werte automatisch mit einer Software detektiert.

**Komponenten des Real-Time PCR Mastermix mit kommerziellem Power SYBR Green® Mastermix**

Komponente	je Probe [µl]
Power SYBR <sup>®</sup> Green Mastermix	12,5
Primer foreward (10 µM)	0,6
Primer reverse (10 µM)	0,6
ddH <sub>2</sub> O	1,3
cDNA (2 ng/µl)	10

**Temperaturprofil der Real-Time PCR**

Schritt	Zeit	Temperatur
Aktivierung der Polymerase	10 Minuten	95 °C
Denaturierung*	15 Sekunden	95 °C
Annealing*	1 Minute	Primerabhängig (s. 2.2.5.3.1)
Elongation*	15 Sekunden	72 °C
Dissoziationskurve	30 Sekunden	55 °C
	30 Sekunden	95 °C

\* 40 Zyklen

### 2.2.5.3.3 Auswertung der Real-Time PCR mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode

Die geläufigsten Methoden zur Analyse von Real-Time PCR-Daten stellen die absolute und die relative Quantifizierung dar.

Die absolute Quantifizierung bestimmt die eingesetzte Kopienzahl an Molekülen durch Vergleich des PCR-Signals mit einer Standardkurve.

Die relative Quantifizierung benötigt eine interne Kontrolle. Die  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode stellt eine effektive relative Quantifizierung der Real-Time PCR-Daten dar. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode nach Livak und Schmittgen herangezogen [Livak and Schmittgen, 2001]:

$$C_{T, \text{Probe}} - C_{T, 18S \text{ rRNA}} = \Delta C_T$$

Als Referenzgen wurde 18S rRNA verwendet und die Differenz aus den  $C_T$ -Werten von Probe und Referenz gebildet.

Als Standard  $\Delta C_T$ -Wert wurde ein charakteristischer  $\Delta C_T$ -Wert der Kontroll-Gruppe herangezogen

$$\Delta C_T - \text{Standard } \Delta C_{T, \text{Kontrolle}} = \Delta\Delta C_T$$

Der Betrag des Zielgens wurde  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  gesetzt.

Aus diesen Beträgen wurde für jedes Tier ein Mittelwert gebildet.

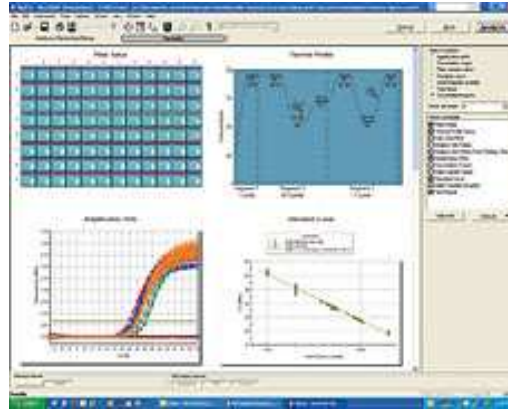
Der Mittelwert der Beträge eines Tieres wurde durch den Mittelwert der charakteristischen Kontrolle (= Standard-Mittelwert) dividiert und somit ein normalisierter Mittelwert der Proben ermittelt.

$$MW_{2^{-\Delta\Delta C_T, \text{Probe}}} / MW_{\text{Standard}} * 100 = \text{normalisierter MW}$$

Aus diesen normalisierten Mittelwerten jedes Tieres wurde ein Mittelwert für jede Gruppe gebildet und die Standardabweichung errechnet.

Die Ermittlung der  $C_T$ -Werte erfolgte in einer Dreifachbestimmung. Das Expressionsniveau wurde jeweils relativ zur Kontrolle angegeben.

**Abbildung 6: Beispiel für  
charakteristisches Temperaturprofil  
und Amplifikationskurve  
einer Real-Time PCR**  
[modifiziert nach  
<http://agilenttechnologies.gene-quantification.info/>]



#### 2.2.5.4 Semiquantitative RT-PCR

Da MCP-1 nur in der Bleomycin-Gruppe nachweisbar war, konnte in diesem Fall keine Analyse der durchgeführten quantitativen RT-PCR vorgenommen werden. Daher wurde hier eine semiquantitative RT-PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Durchführung der semiquantitativen PCR wurde das Standardprotokoll von Invitrogen verwendet. Das Protokoll wurde weitestgehend dem der quantitativen RT-PCR angepasst.

**Komponenten für sPCR**

Komponente	je Probe [ $\mu$ l]
10x Buffer	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.75
dNTP (10mM)	0.5
Primer forward (10 $\mu$ M)	0,25
Primer reverse (10 $\mu$ M)	0,25
Platinum Taq	0.2
ddH <sub>2</sub> O	1
cDNA (2 ng/ $\mu$ l)	10



## Material und Methoden

### Verwendete Primer für sPCR, alle Primersequenzen von 5' - 3' aufgelistet

Gen	sense	antisense	Annealingtemperatur [°C]
18S	ACCTGGTTGATCCTGCCAG	TTAATGAGCCATTCGCAGT	55
rRNA	TAG	TTC	
MCP-1	TCTCTCTTCCTCCACCACCA	GCTTCTTTGGGACACCTGC	55
		T	

### Temperaturprofil der Real-Time PCR

Schritt	Zeit	Temperatur
Aktivierung der Polymerase	2 Minuten	94 °C
Denaturierung*	30 Sekunden	94 °C
Annealing*	30 Sekunden	Primerabhängig (s. 2.2.5.3.1)
Elongation*	1 Minute	72 °C

\* 34 Zyklen

Zur Detektion der entstandenen PCR-Produkte wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Aufgrund des negativ geladenen Phosphat-Rückgrates ist die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Hilfe eines elektrischen Feldes möglich. Hierbei ist die Laufgeschwindigkeit der DNA im Wesentlichen von der Fragmentgröße abhängig. Größere Fragmente bewegen sich langsamer als kleinere, bedingt durch die Siebstruktur der Agarose, deren Poren kleineren Fragmenten weniger Widerstand bieten. Durch das Versetzen der Gellösung mit Ethidiumbromid - einem Farbstoff, der in die doppelsträngige DNA interkaliert - wird die nachfolgende Detektion der DNA-Fragmente durch Bestrahlung mit UV-Licht ermöglicht. Die DNA-Proben werden mit einem 10x Ladepuffer versetzt und in die im Gel vorhandenen Taschen pipettiert. Zur Größenbestimmung des zu analysierenden Fragmentes wird ein Größenmarker mit aufgetrennt. Der Gelelektrophoreselauf wurde in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer bei einer Spannung von 100 V in 1x TAE-Puffer für 25 Minuten durchgeführt.

### Verwendete Lösungen für sPCR

1,5 % Gel	0,75 g Agarose + 50 µl TAE-Puffer + 0,5 µl EtBr
-----------	---

### 2.2.5.5 Protein-Isolation

Die Protein-Isolation erfolgte nach dem Standard-Protokoll von Invitrogen.

Hierzu wurden die unter 2.2.5.1 beschriebenen, bei -80 °C aufbewahrten Proben aufgetaut und wie untenstehend weiter aufbereitet.

#### **Protokoll der Protein-Isolation (nach Invitrogen)**

- Präzipitation der DNA in der Interphase durch Zugabe von 0,4 ml 100 % Ethanol und Mischen durch Schwenken
- Inkubation für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur
- Zentrifugation bei 2000 x g für 10 Minuten bei 4 °C
- Überführung des Phenol-Ethanol-Überstandes in neues Reaktionsgefäß
- Präzipitation der Proteine durch Zugabe von 2 ml Isopropanol und Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- Zentrifugation bei 12.000 x g für 10 Minuten bei 4 °C
- Bildung eines Pellets am unteren Rand des Reaktionsgefäßes
- Verwerfen des Überstandes
- Dreimaliges Waschen des Proteinpellets mit 2 ml 0,3 M Guanidinhydrochlorid, Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur, Zentrifugation bei 7500 x g für 5 Minuten bei 4 °C und Verwerfen des Überstandes
- Nach dem letzten Waschen Vortexen des Proteinpellets in 2 ml 100 % Ethanol und Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur
- Zentrifugation bei 7500 x g für 5 Minuten bei 4 °C
- Trocknen des Proteinpellets für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur
- Lösen des Pellets in 0,5 ml 1 % SDS, hierzu Inkubation in Thermoschüttler bei 50 °C über Nacht, Auf- und Abpipettieren und Vortexen zum vollständigen Lösen
- Zentrifugation bei 10.000 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur um unlösliche Bestandteile abzusetzen
- Überführung des Überstandes in neues Reaktionsgefäß und Aufbewahrung bei -20 °C

### 2.2.5.6 Proteinmessung

Die Proteinkonzentration wurde mittels Spektrophotometer und BCA (Bicinchoninsäure) gemessen. BCA enthält zweiwertiges Kupfer, welches in alkalischem Milieu mit Proteinen zu einwertigem Kupfer reagiert (Biuret-Reaktion) [Smith et al., 1985]. Eine Komplexbildung mit 2 BCA-Molekülen führt zu einem sichtbaren Farbumschlag von grün zu violett und zu einer photometrisch messbaren Absorption bei 562 nm, welche sich linear zur ansteigenden Proteinkonzentration verhält. Im Unterschied zur Proteinbestimmung mithilfe von Coomassie-Blau weist diese Methode eine relativ geringe Störanfälligkeit sowie eine hohe Sensitivität auf.

## Material und Methoden

Zunächst wurde eine Kalibriergerade mit BSA als Standard erstellt. Diese wurde mithilfe einer BSA-Verdünnungsreihe (lineare Verdünnungsreihe von 20 µg/ml - 0 µg/ml) angefertigt. Der Protein-Standard wurde in absteigender Konzentration in einer 96 Well-Platte pipettiert. Daneben wurde je 1 µl der Proben unbekannter Konzentration gegeben und jeweils 20 µl BCA-Reagenz hinzugefügt. Die Platte wurde mit einer durchsichtigen Folie beklebt, vorsichtig gevortext und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die Platte für exakt 30 Minuten bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert und danach auf Eis gekühlt. Nun konnte die Konzentration bei 562 nm bestimmt werden.

Bei einer 1:20-Verdünnung ist bei dieser Methode die Detektion einer Konzentration von 0,2 mg/ml bis 8,0 mg/ml möglich.

Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte in einer Dreifachbestimmung. Proben von 5 der 6 Tiere enthielten ausreichend Protein zur Durchführung des Western Blots.

### Verwendete Lösungen für Protein-Isolation

0,3 M Guanidinhydrochlorid	1142,8 mg gelöst in 40 ml 96 % Ethanol
1 % SDS	0,5 g gelöst in 50 ml ddH <sub>2</sub> O
BCA-Reagenz	1 ml BCA-Reagenz A + 20 µl BCA-Reagenz B

### 2.2.5.7 Western Blot

Die Durchführung des Western Blots erfolgte in Anlehnung an die Methode nach Laemmli [Laemmli, 1970].

#### 2.2.5.7.1 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE („*sodium dodecyl polyacrylamid gel electrophoresis*“) erfolgt eine Auftrennung der aufgetragenen Proteine nach ihrem jeweiligen molekularen Gewicht.

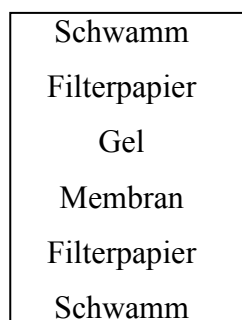
Hierzu wurden die Proben mit 6 x Probenpuffer und Wasser bis zu einer Protein-Gesamtkonzentration von 20 µg/µl verdünnt und bei 95 °C für 10 Minuten denaturiert. Durch das im Probenpuffer enthaltene SDS (Natriumdodecylsulfat) werden die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts negativ geladen und eine Auftrennung im elektrischen Feld ist somit möglich. Nach der Zentrifugation bei 1000 x g für 1 Minute wurden die Proben bis zum Beladen des Gels auf Eis gekühlt.

Für die Auftrennung wurde 4 %-iges Sammelgel und 12 %-iges Trenngel verwendet. Hierzu wurden zwischen zwei mit Ethanol gereinigten Glasplatten zwei Abstandshalter (1 mm Tiefe)

eingefügt. Diese wurden in einem Gelhalter fixiert und in einen Gelgießstand eingespannt. Das Trenngel wurde bis 2 cm unterhalb des Randes der Glasplatten gefüllt. Zum Glätten und zum Luftabschluss erfolgte eine Überschichtung mit Isopropanol. Nach der Polymerisation (etwa 30 Minuten) wurde die Isopropanolschicht vorsichtig wieder abgenommen, die Gelkante mit ddH<sub>2</sub>O gespült und vorsichtig mit einer Filterpapierkante getrocknet. Anschließend erfolgte die Überschichtung mit dem vorher angemischtem Sammelgel und dem sofortigen Einfügen des Kammes. Nach der Polymerisation (etwa 15-20 Minuten) wurden die Kämmen entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer geklemmt und die Innenkammer (Kathodenkammer) mit 1 x Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Die Taschen wurden mit 5 µl eines vorher bei 40 °C für eine Minute aktivierten Längenstandards und je 36 µl Probe beladen. Anschließend wurde auch die Außenkammer (Anodenkammer) mit 1 x Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 80 V für 30 Minuten (Auffangen der Proteine im Sammelgel) und anschließend für etwa 90 Minuten bei 120 V (Wandern der Proteine durch das Trenngel). Nach der Auftrennung wurden die Gele aus der Halterung gelöst, das Sammelgel vorsichtig abgetrennt und das Trenngel für weitere Analysen in Blotting-Puffer aufbewahrt.

### 2.2.5.7.2 Immunoblot

Die Proteine auf dem Gel wurden mittels Nassblotverfahren auf eine Nitrocellulose-Membran überführt. Zum Schutz vor Verunreinigung wurde diese nur mit Pinzetten angefasst. Die Membran wurde kurz in Methanol aktiviert und anschließend in Blotting-Puffer geschwenkt. Die Blotting-Kassette wurde wie folgt nach dem „Sandwich-Prinzip“ vorbereitet:



Hierbei war darauf zu achten, dass keine Luftblasen entstehen.

Aufgrund der Wanderung der negativ geladenen Proteine in Richtung Anode war die Ausrichtung der Gelseite zur Kathode und der Membranseite zur Anode in der Blotting-Apparatur wichtig. Diese wurde mit einem Kühlaggregat in eine Blotting-Kammer gegeben und

mit Blotting-Puffer aufgefüllt. Nach dem Proteintransfer bei 100 V für 1 Stunde wurde das Gel verworfen und die Membran zum Schutz vor Austrocknung in 1 x TBST aufbewahrt.

### 2.2.5.7.3 Immundetektion

Die Immundetektion der Proteine erfolgte mithilfe von enzymgekoppelten Antikörpern und ECL-Reagenz (siehe Abbildung 7).

Hierbei bindet ein Primärantikörper spezifisch an ein Protein auf der Membran. An dessen Fc-Region bindet wiederum ein polyklonaler Sekundärantikörper, welcher an das Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) gekoppelt ist. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von in ECL-Reagenz befindlichem Luminol in seine oxidierte Form, dessen Chemilumineszenz als Schwärzung auf einem Röntgenfilm detektierbar ist. Proteinbanden werden sichtbar.

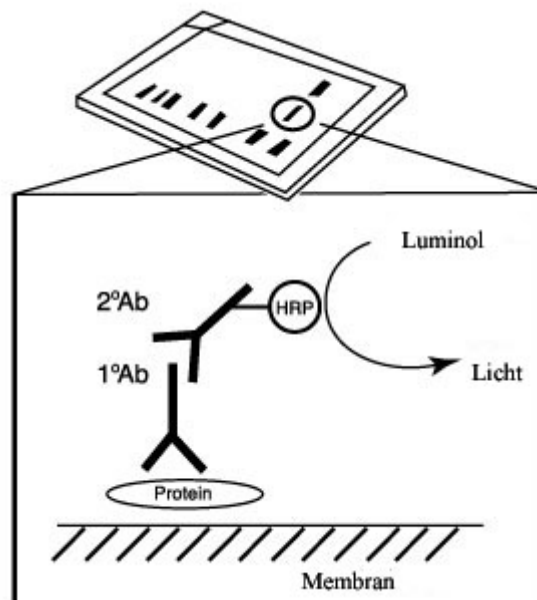


Abbildung 7: Funktionsweise der Immundetektion

### Blocken

Nach der Übertragung wurden die Membranen 1 Stunde bei Raumtemperatur in 5 %-iger Milchlösung unter leichtem Schwenken inkubiert. Hierdurch werden unspezifische Bindungsstellen der Antigene blockiert und somit eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers vermieden.

### 1. Waschen

Anschließend wurde die Membran viermalig mit 1 x TBST für jeweils 10 Minuten unter leichtem Schwenken gewaschen.

### **Inkubation mit Primärantikörper**

Nach dem Waschen wurde die Membran über Nacht auf einem Schüttler bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert. Hierzu wurden jeweils 10 ml der unterschiedlich verdünnten Antikörper in 5 %-iger Milchlösung auf die Membranen gegeben (Anti-Col1A1 1:10000, Anti-TGF- $\beta$  1:500, Anti-IL-6 1:500, Anti- $\beta$ -Actin 1:1000 in 5 %-iger Milchlösung).

### 2. Waschen

Erneut wurde die Membran viermalig mit 1 x TBST für jeweils 10 Minuten unter leichtem Schwenken gewaschen.

### **Inkubation mit Sekundärantikörper**

Die Membran wurde eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Hierzu wurden jeweils 15 ml der verdünnten Antikörper in 2 %-iger Milchlösung auf die Membran gegeben (1:1000).

Da dieser Antikörper lichtempfindlich ist, war besondere Vorsicht im Hinblick auf den Schutz der Membran vor Licht geboten.

### 3. Waschen

Die Membran wurde erneut viermalig mit 1 x TBST für jeweils 10 Minuten unter leichtem Schwenken gewaschen und anschließend entwickelt.

### **Entwicklung**

In einer Dunkelkammer wurde die Membran eine Minute mit 2 ml ECL-Reagenz inkubiert und nach vorsichtigem Entfernen der Lösung in einer Kassette mit Folie wasserdicht fixiert. Die Membran belichtete in der Fotokassette einen Röntgenfilm, welcher nach einer bestimmten Belichtungszeit entwickelt und für weitere Analysen im Computer eingescannt wurde.

### **Stripping**

Nach dem Entwickeln konnte die Membran erneut verwendet werden. Hierzu wurde die Membran wie oben beschrieben mit 1 x TBST gewaschen und anschließend mit 10 ml Stripping-Puffer für 15 Minuten bei 55 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Nach erneutem Waschen mit 1 x TBST konnte die Membran wie oben beschrieben geblockt und mit den Antikörpern inkubiert werden.

Dieser Vorgang konnte bis zu drei Mal an einer Membran durchgeführt werden, doch nimmt die Hintergrundfärbung mit der Anzahl der Anwendungen zu.

### **Densitometrische Auswertung**

Die Filme mit den einzelnen Blots wurden eingescannt und als tiff-Datei gespeichert. Die 265 Grau-Skalen wurden mittels NIH ImageJ 1.41 (National Institute of Health, USA) analysiert. Aus den Unterschieden in der Intensität der Pixel entstanden Histogramme und die Fläche unterhalb dieser wurde kalkuliert (AUC). Die Werte wurden gegen  $\beta$ -Actin gemessen.

## Material und Methoden

### Verwendete Antikörper für Western Blot

Anti Coll1A1 (rabbit anti-mouse polyclonal antibody) (200 µg/ml)	Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland
Anti IL-6 (goat anti-mouse polyclonal IgG) (200 µg/ml)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Anti TGFβ-1 (rabbit anti-mouse polyclonal IgG) (200 µg/ml)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Anti β-Actin (rabbit anti-mouse polyclonal antibody) (100 µg/ml)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP	Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland
Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland

### Verwendete Puffer und Lösungen für Western Blot

ECL-Reagenz	1 ml Detection Reagent 1 + 1 ml Detection Reagent 2
5 % Milchlösung	1 g Milchpulver in 20 ml 1 x TBST
2 % Milchlösung	0,6 g Milchpulver in 30 ml 1 x TBST
4 x Trenngel	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
4 x Sammelgel-Puffer	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
<b>Blockpuffer 5 %</b>	
Milchpulver	2 g
1 x TBST	40 ml
<b>Blotting-Puffer</b>	
Tris-Base	3.03 g
Glycin	14.4 g
Methanol	200 ml
10 % SDS	5 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

## Material und Methoden

<b>1x Elektrophoresepuffer</b>	
Tris Base	3.03 g
Glycin	14.4 g
10 % SDS	10 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
<b>Probenpuffer</b>	
Tris Base	1,514 g
10 % SDS	4 g
Glycerin	20 ml
1 % Bromphenolblau	200 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 80 ml
<b>Sammelgel</b>	
ddH <sub>2</sub> O	6.1 ml
4 x Sammelgel-Puffer	2.5 ml
10 % SDS	100 µl
Acrylamid-Bis	1.3 ml
10 % APS	100 µl
TEMED	12 µl
Insgesamt	10 ml
<b>Stripping-Puffer</b>	
Tris Hcl	4,9 g
10 % SDS	50g
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml
β-Mercaptoethanol	3,6 ml
Mit HCl	pH 6,7
<b>10 x TBS</b>	pH 7.6
Tris Base	24.2 g
NaCl	80 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
<b>1 x TBST</b>	
10 x TBS	100 ml
Tween 20	1 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml



<b>Trenngel 12%</b>	
ddH <sub>2</sub> O	5.0 ml
4 x Trenngel	3.75 ml
10 % SDS	150 µl
Acrylamid-Bis	6.0 ml
10 % APS (Ammoniumpersulfat)	75 µl
TEMED	7.5 µl
Insgesamt	15 ml

### 2.2.6 Statistik

Bei den angegebenen Werten handelt es sich um arithmetische Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Die gewonnenen Ergebnisse wurden in mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten verifiziert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) mittels einfaktorieller ANOVA („**A**nalysis **o**f **V**ariance“) mit Post Hoc Test (Bonferroni) ermittelt, gefolgt von Student's t-Test für unverbundene Stichproben. Das Ergebnis eines statistischen Tests wurde als signifikant erachtet, sofern die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % lag ( $p < 0,05$ ). Bei  $p < 0,01$  wurde das Ergebnis als hochsignifikant erachtet. Die Normalverteilung der Stichprobenmenge und die Varianzhomogenität der Daten sind notwendige Bedingungen sowohl für ANOVA als auch für den Student's t-Test. Für diese Untersuchung wurden der Kolmogorov-Smirnov-Test und nach Transformation der Werte der Bartlett-Test herangezogen.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Histologische Untersuchungen der Hautpräparate**

Durch die wiederholte subkutane Injektion von Bleomycin konnten im Mausmodell eine Fibrosierung der Haut sowie eine inflammatorische Reaktion induziert werden. Dieses Modell ist bereits gut etabliert und wird zur Erforschung der SSc erfolgreich eingesetzt. Die hierdurch hervorgerufenen pathologischen Veränderungen sind den Veränderungen bei Vorhandensein einer SSc sehr ähnlich und erlauben daher wertvolle Schlussfolgerungen bei der Erforschung der Pathogenese der SSc als auch Aussagen über mögliche neue therapeutische Ansätze zur Behandlung dieser Erkrankung [Yamamoto et al., 1999].

Nach der Induktion Sklerodermie-ähnlicher Veränderungen in der Haut durch wiederholte subkutane Injektionen mit Bleomycin wurden die aufgearbeiteten Hautabschnitte sowohl von Kontroll- als auch von behandelten Tieren für weitere histologische Untersuchungen aufbereitet, zugeschnitten und aufbewahrt. Zur Ermittlung des Ausmaßes der induzierten Fibrose wurden sowohl histologische als auch immunhistochemische Untersuchungen an den Hautschnitten durchgeführt.

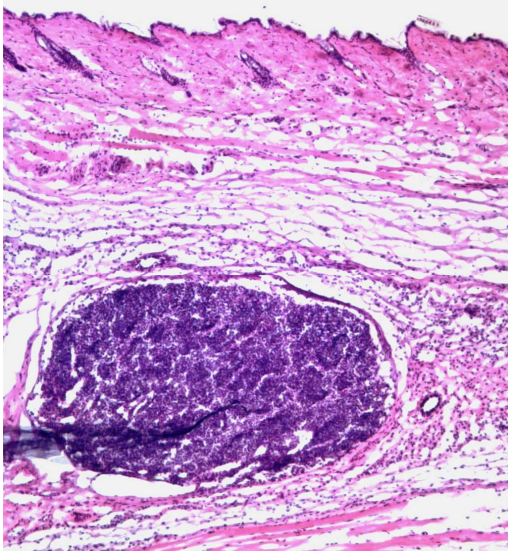
#### **3.1.1 Feststellung der Fibrosierung und Hautbeschaffenheit mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung dient der Darstellung und Unterscheidung von Zellkernen mit blauer Färbung und Zytoplasma mit Kollagenfasern, welche sich rot anfärben.

Diese Färbung erlaubt einen ersten Überblick über die Beschaffenheit der Haut und mögliche stattgefundenen Zellproliferationen, Fibrosierungen oder die Bildung entzündlicher Infiltrate.

In der Gruppe der mit hoher Candesartan-Dosis (10 mg/kg) behandelten Tiere kam es zu spezifischen Veränderungen in der Haut (siehe Abbildung 8). Es handelt sich um eine von einer Kapsel umhüllte Ansammlung von Zellen oder organisches Material mit umgebender massiver Infiltration und Fibrose. Dies kann als eine Fremdkörperreaktion als Folge einer Akkumulation von Candesartan in der Haut gedeutet werden. Auch die Tiergruppe, welche mit einer Candesartan-Dosis von 1 mg/kg behandelt wurde, zeigte ähnliche Hauterscheinungen, so dass diese beiden Gruppen von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden. Weitere Bezeichnungen der Gruppe Bleomycin + Candesartan beziehen sich ausschließlich auf die mit einer Candesartan-Dosis von 0.1 mg/kg behandelte Gruppe.

## Ergebnisse

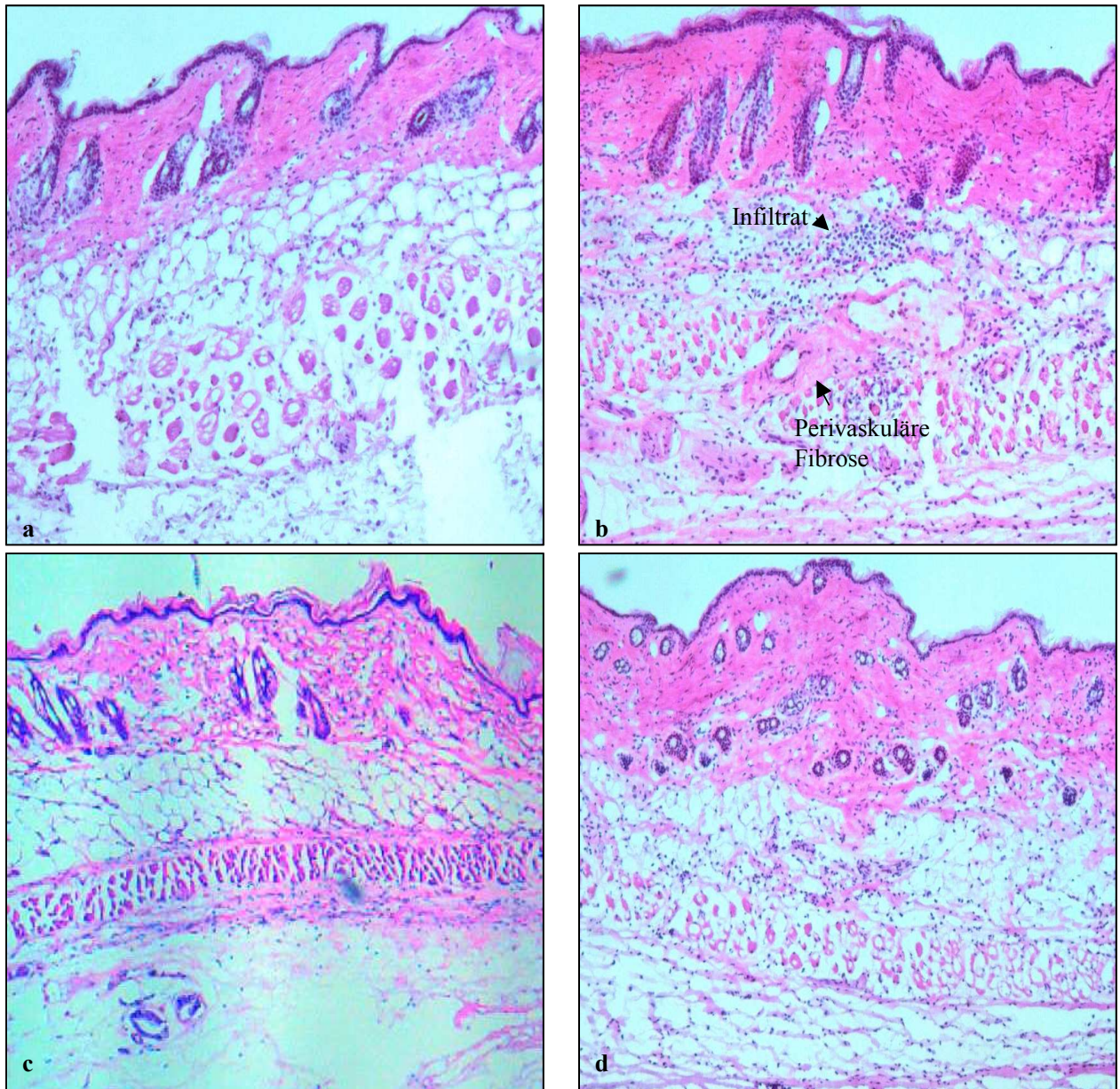


**Abbildung 8: HE-Färbung 7 µm dicker Hautschnitte der mit Bleomycin und Candesartan 10 mg/kg behandelten Gruppe. Gezeigt ist eine repräsentative Erscheinung in der Haut mit kapsulär abgegrenzter Veränderung mit umgebender Infiltration und Fibrose im subkutanen Gewebe.**

In der durchgeführten HE-Färbung der Hautschnitte der anderen vier Gruppen zeigte sich eine deutliche Zunahme der Extrazellulärmatrix (EZM) in der allein mit Bleomycin behandelten Gruppe sowohl in der Dermis als auch in der Subkutis im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (siehe Abbildung 9). Dies wurde an der intensiven Rotfärbung der Präparate deutlich. Die Dermis erscheint in der mit Bleomycin behandelten Gruppe sehr viel kompakter und dichter, die Subkutis ist vermehrt von Bindegewebssepten durchsetzt und reicher an EZM. Zudem wird hier ein deutliches inflammatorisches Infiltrat in der Subkutis sichtbar und auch eine perivaskuläre Fibrose tritt deutlich hervor. Diese Veränderungen sind in den Präparaten der Kontroll-Gruppe nicht sichtbar.

Diese Zunahme an EZM ist sowohl in der zusätzlich mit Candesartan als auch in der mit Compound 21 behandelten Gruppe deutlich reduziert. In der mit Candesartan behandelten Gruppe ist eine deutliche Verringerung der EZM sowohl in der Dermis als auch in der Subkutis sichtbar. Die Dermis erscheint hier sehr viel aufgelockerter im Vergleich mit der Bleomycin-Gruppe. Auch die Subkutis ist weniger dicht an EZM und frei von Infiltraten. Perivaskuläre Fibrosen sind in der mit Candesartan behandelten Gruppe nicht sichtbar. Auch die mit Compound 21 behandelte Gruppe zeigt eine weniger dicht gepackte und aufgelockerte Dermis im Vergleich zur mit Bleomycin behandelten Gruppe. Obwohl auch hier die Subkutis weit weniger reich an EZM als in der mit Bleomycin behandelten Gruppe ist, ist hier ein kleines Restinfiltrat sichtbar. Perivaskuläre Fibrosen zeigen sich in der mit Compound 21 behandelten Gruppe nicht.

## Ergebnisse



**Abbildung 9:** HE-Färbung 7  $\mu\text{m}$  dicker Hautschnitte: a) Kontrolle, b) Bleomycin, c) Bleomycin + Candesartan, d) Bleomycin + Compound 21. Gezeigt sind repräsentative Schnitte für jede Behandlungsgruppe von je  $n = 6$  Tieren. Deutliche Zunahme der Extrazellulärmatrix, sichtbare Infiltration und perivaskuläre Fibrose in Bleomycin-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Deutliche Reduktion dieser pathologischen Veränderungen in der Candesartan- und Compound 21-Gruppe, in Candesartan- deutlicher als in Compound 21-Gruppe. In Compound 21-Gruppe ist ein kleines Rest-Infiltrat in der Subkutis sichtbar.

### **3.1.2 Spezifische Darstellung von Kollagen mittels Picosirius-Rot-Färbung**

Zur spezifischen Darstellung von Kollagen in der Haut wurde eine Picosirius-Rot-Färbung durchgeführt. Diese Methode färbt spezifisch Kollagenfibrillen durch Bindung an dessen Sulfatgruppen.

Anschließend wurden die gefärbten Hautschnitte sowohl mittels Lichtmikroskopie (siehe Abbildung 10), unter welchem Kollagen rot auf gelbem Hintergrund erscheint, als auch - zur genauen Bestimmung des Kollagens - unter polarisiertem Licht ausgewertet (siehe Abbildung 11). Kollagen besteht aus doppelbrechenden Fasern, so dass unter polarisiertem Licht dicke Kollagenfibrillen, wie Kollagen I, eine rot-gelbe Leuchtkraft aufweisen, während dünnere, weniger stark verknüpfte Kollagenfibrillen, wie Kollagen III, grünlich-gelb leuchten.

In diesem Versuch zeigte sich unter dem Lichtmikroskop in den mit Picosirius-Rot gefärbten Hautschnitten eine deutliche Zunahme von Kollagen in der mit Bleomycin behandelten Gruppe im Vergleich zur Vehikel-behandelten Kontroll-Gruppe. Sowohl in Dermis und Subkutis als auch perivaskulär findet sich hier eine deutlich verstärkte Rotfärbung des Präparates, d.h. hier wurde vermehrt Kollagen gebildet. Somit bestätigt die Picosirius-Rot-Färbung die in der HE-Färbung sichtbare vermehrte Kollagenbildung in der Haut in der mit Bleomycin behandelten Gruppe. In den zusätzlich mit Candesartan bzw. mit Compound 21 behandelten Gruppen wird auch hier eine deutliche Reduktion des Kollagens sichtbar. In der mit Candesartan behandelten Gruppe stellen sich sowohl Dermis als auch Subkutis nur schwach rosa dar, so dass hier von einer stark reduzierten Bildung von Kollagen ausgegangen werden kann. Die in der mit Compound 21 behandelten Gruppe sichtbare deutlich reduzierte Rotfärbung im Vergleich zur mit Bleomycin behandelten Gruppe ist weniger stark ausgeprägt als in der mit Candesartan behandelten Gruppe. Die Subkutis erscheint auch in dieser Gruppe aufgelockert.

## Ergebnisse

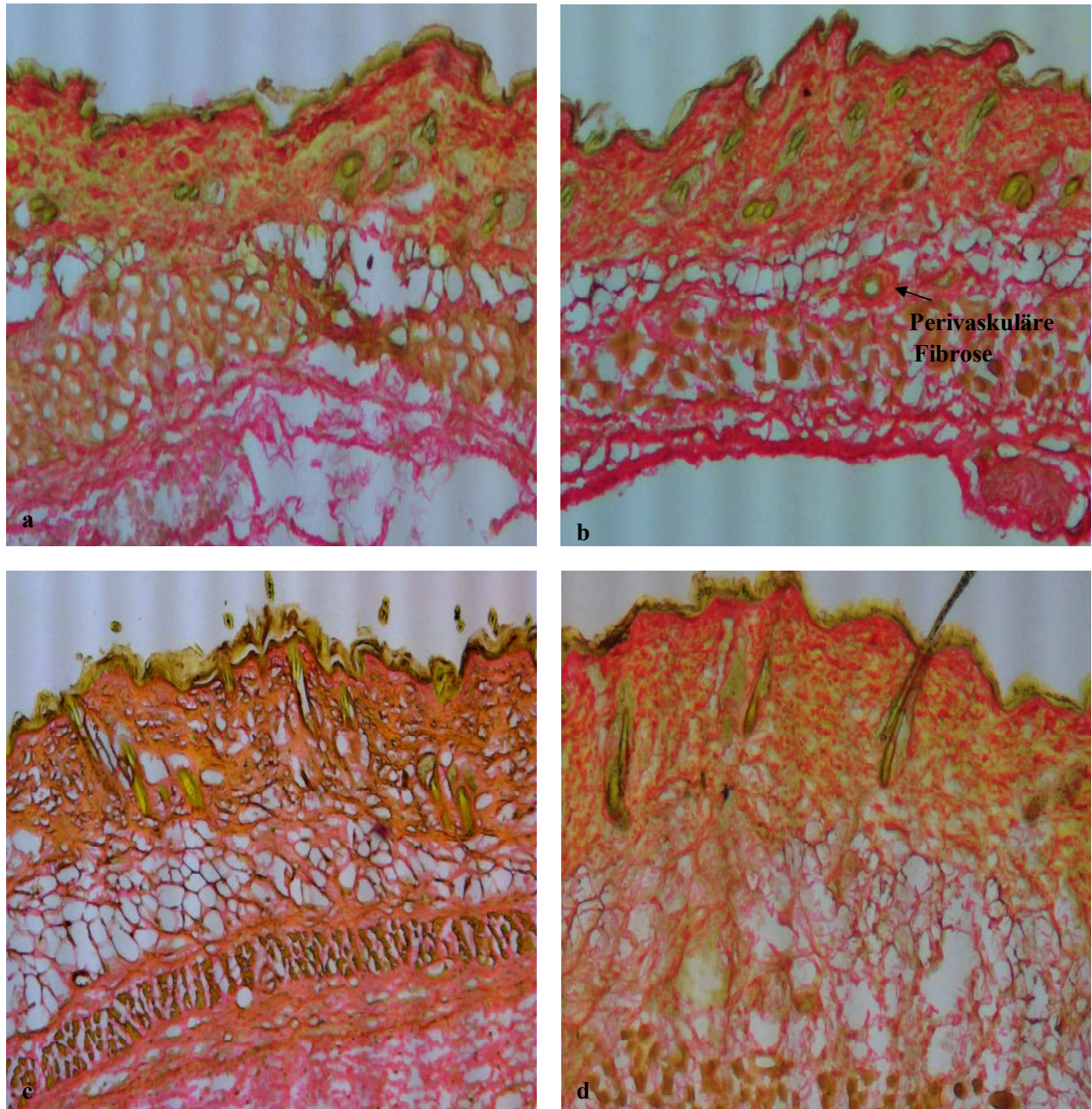
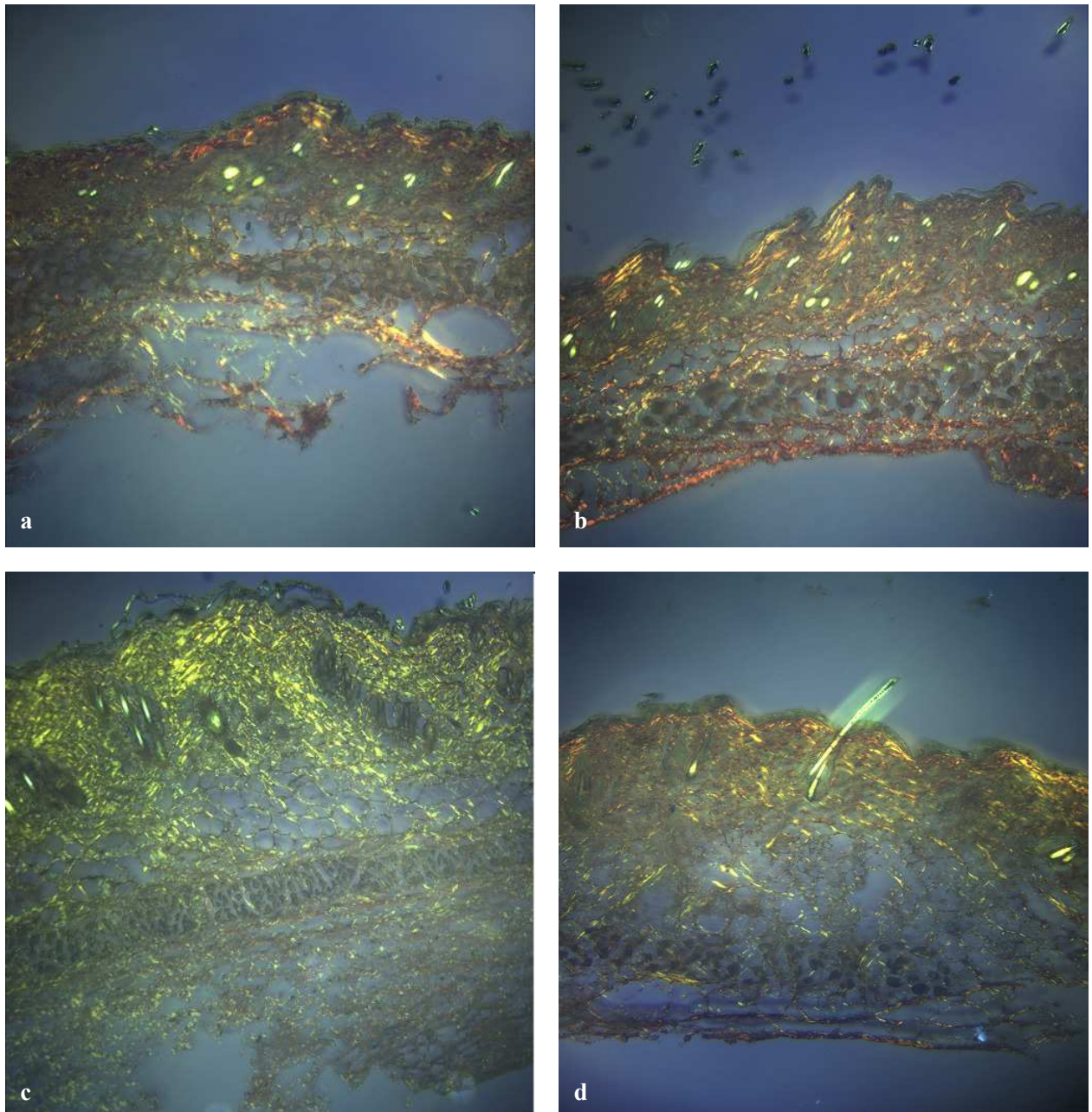


Abbildung 10: Picrosirius-Rot-Färbung 7  $\mu\text{m}$  dicker Hautschnitte unter Lichtmikroskopie: a) Kontrolle, b) Bleomycin, c) Bleomycin + Candesartan, d) Bleomycin + Compound 21. Gezeigt sind repräsentative Schnitte für jede Behandlungsgruppe von je  $n = 6$  Tieren. Deutliche Zunahme des Kollagens sowohl in Dermis als auch in Subkutis in der Bleomycin-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, deutliche Reduktion des Kollagens sowohl in der Candesartan- als auch in der Compound 21-Gruppe.

## Ergebnisse

Unter polarisiertem Licht ist die erhöhte Leuchtkraft des Kollagens in der mit Bleomycin behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe deutlich sichtbar. In dieser Gruppe ist somit eine erhöhte Konzentration an Kollagen vorhanden. Die Dermis ist in der mit Bleomycin behandelten Gruppe dichter gepackt und weist eine erhöhte Konzentration an Kollagen auf. Da es sich hierbei überwiegend um eine Zunahme von Kollagen mit rot-gelber Leuchtkraft handelt, kann man in der mit Bleomycin behandelten Gruppe auf eine erhöhte Konzentration von Kollagen Typ I schließen. In der zusätzlich mit Candesartan behandelten Gruppe überwiegt Kollagen mit vorwiegend grünlich-gelber Leuchtkraft. In diesen Präparaten werden vorwiegend dünne, nicht dicht gepackte Kollagenfibrillen, wie Kollagen Typ III, sichtbar. Kollagen mit rot-gelber Leuchtkraft ist in dieser Gruppe deutlich reduziert. In der zusätzlich mit Compound 21 behandelten Gruppe überwiegt wieder Kollagen mit rot-gelber Leuchtkraft. Im Vergleich zur mit Bleomycin behandelten Gruppe besitzt das Kollagen in dieser Gruppe jedoch deutlich sichtbar weniger Leuchtkraft. Die Dermis weist hier weit weniger Kollagen I auf als in der mit Bleomycin behandelten Gruppe und auch die Subkutis ist im Vergleich deutlich aufgelockert.

## Ergebnisse



**Abbildung 11: Picosirius-Rot-Färbung 7  $\mu$ m dicker Hautschnitte unter polarisiertem Licht: a) Kontrolle, b) Bleomycin, c) Bleomycin + Candesartan, d) Bleomycin + Compound 21. Gezeigt sind repräsentative Schnitte für jede Behandlungsgruppe von je n = 6 Tieren. Deutliche Zunahme an Kollagen Typ I (rot-gelb) in Dermis und Subkutis in der Bleomycin-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Deutliche Reduktion von Kollagen Typ I in der Compound 21-Gruppe im Vergleich zur Bleomycin-Gruppe. In der Candesartan-Gruppe kaum rot-gelb leuchtendes Kollagen Typ I nachweisbar, hier vorwiegend grünlich-gelb leuchtendes Kollagen Typ III sichtbar.**



### **3.1.3 Spezifische Darstellung von Kollagen mittels Immunfluoreszenz**

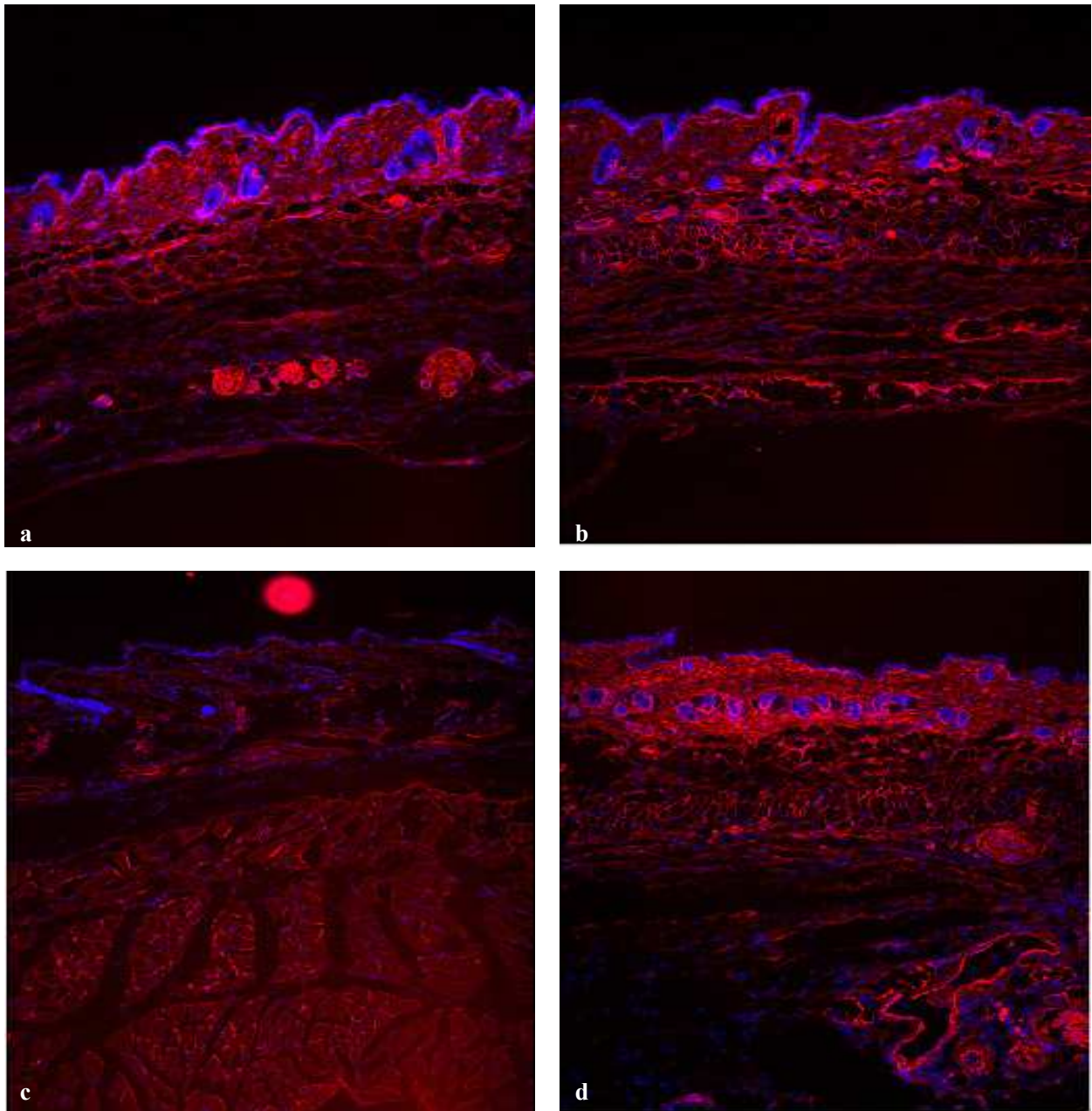
Zur Durchführung der Immunfluoreszenz wurden spezifische Antikörper gegen Kollagen Typ I und zur Darstellung der Zellkerne DAPI-Färbung verwendet (siehe Abbildung 12).

Das Signal des Antikörpers, welcher spezifisch an Kollagen Typ I gebunden hatte, wurde durch Verwendung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers rot dargestellt, das Signal der Färbung der Zellkerne wurde blau hinterlegt. Je mehr Antikörper spezifisch binden, desto intensiver ist das abgegebene Signal und desto intensiver ist die rote Leuchtkraft des Präparates.

Mithilfe von Negativkontrollen konnte eine unspezifische Bindung und somit ein unspezifisches Signal des zweiten Antikörpers ausgeschlossen werden.

In der mit Bleomycin behandelten Gruppe ist sowohl in der Dermis als auch in der Subkutis ein deutlich stärkeres rot-leuchtendes Signal im Vergleich zur Kontroll-Gruppe sichtbar. Die Dermis scheint dichter gepackt und die Subkutis weist vermehrt Bindegewebssepten auf. In der mit Bleomycin behandelten Gruppe ist also vermehrt Kollagen Typ I nachweisbar. In der zusätzlich mit Candesartan behandelten Gruppe ist sowohl in der Dermis als auch in der Subkutis nur ein äußerst schwaches rotes Signal zu erkennen, während die Färbung der Zellkerne deutlich sichtbar ist. In dieser Gruppe ist Kollagen Typ I nur sehr schwach nachweisbar. In der mit Compound 21 behandelten Gruppe ist das Signal in der Subkutis im Vergleich zur mit Bleomycin behandelten Gruppe deutlich schwächer. Die Konzentration an Kollagen Typ I ist hier deutlich reduziert.

## Ergebnisse



**Abbildung 12: Kollagen Typ I Immunhistologie 5  $\mu$ m dicker Hautschnitte: Kollagen Typ I-Expression wurde mithilfe von polyklonalen anti-Kollagen I-Antikörpern dargestellt: a) Kontrolle, b) Bleomycin, c) Bleomycin + Candesartan, d) Bleomycin + Compound 21. Gezeigt sind repräsentative Schnitte für jede Behandlungsgruppe von je n = 6 Tieren. Deutliche Zunahme von Kollagen Typ I in der Subkutis in der Bleomycin- Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Nur sehr schwaches Signal von Kollagen Typ I sowohl in Dermis als auch in Subkutis in der Candesartan-Gruppe. Deutliche Reduktion von Kollagen Typ I in der Compound 21-Gruppe im Vergleich zur Bleomycin-Gruppe.**

### 3.2 Expression von Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein pro-inflammatorisch und pro-fibrotisch wirkendes Zytokin. Bei SSC-Patienten sind die IL-6-Serum-Levels im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich erhöht und korrelieren mit dem Schweregrad der Erkrankung. Zur Bestimmung der IL-6-Expression wurden sowohl eine quantitative RT-PCR als auch ein Immunoblot durchgeführt.

Die 4-wöchige lokale Behandlung mit Bleomycin führte im Vergleich zur Kontroll-Gruppe zu einem hochsignifikanten Anstieg der Expression von IL-6-mRNA (siehe Abbildung 13).

Die gleichzeitige Therapie mit Candesartan oder Compound 21 führte zu einer hochsignifikanten Senkung dieser erhöhten IL-6-Expression im Vergleich zur Bleomycin-Gruppe ( $p < 0.01$ ).

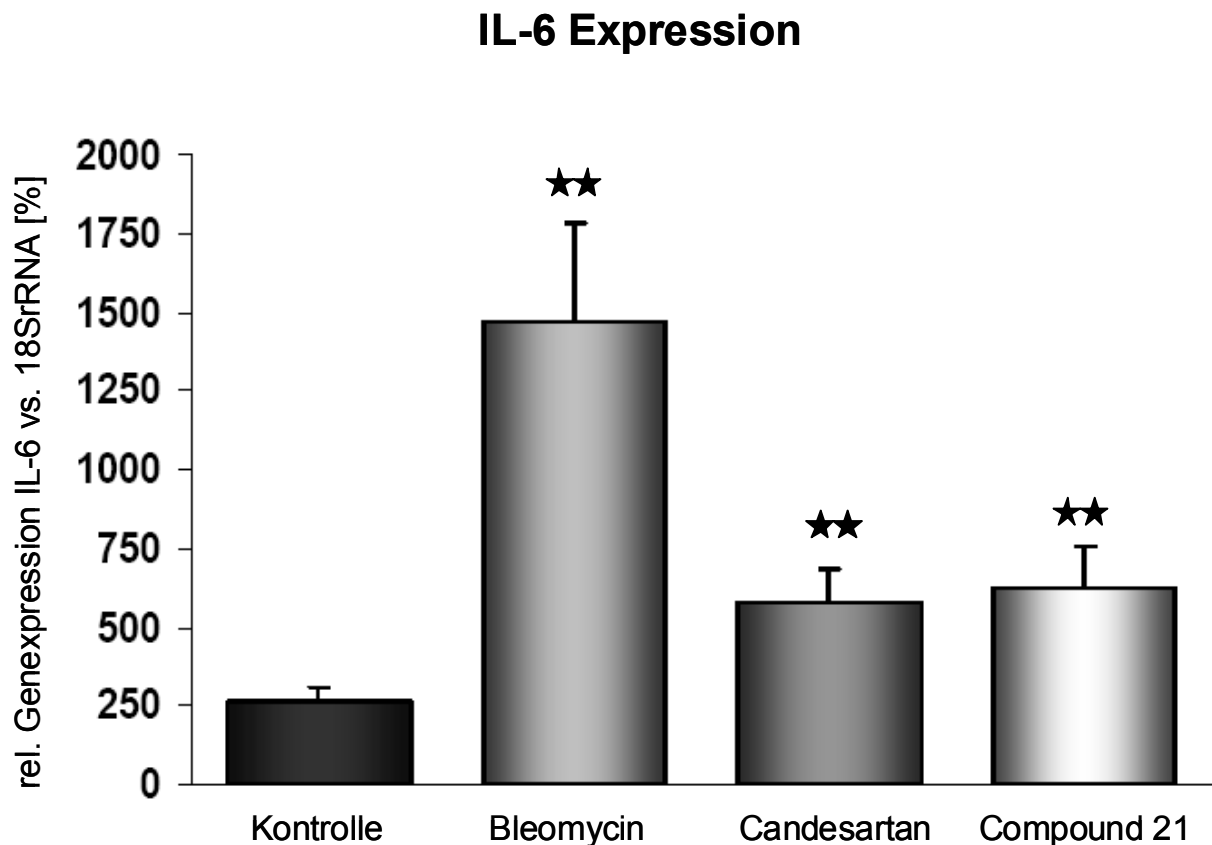


Abbildung 13: Vergleich der IL-6-mRNA-Expression (n=6): Kontrolle, Bleomycin, Bleomycin + Candesartan und Bleomycin + Compound 21: Gezeigt ist 1 repräsentativer von 3 unabhängigen Versuchen mit  $MW \pm SEM$  der relativen IL-6-mRNA-Expression gemessen gegen 18SrRNA in %. Die Bleomycin-Gruppe zeigt einen hochsignifikanten Anstieg von IL-6 im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Sowohl in der Candesartan- als auch in der Compound 21-Gruppe konnte die IL-6-Expression hoch signifikant gesenkt werden (\*  $p < 0.01$ ).

## Ergebnisse

Auch der durchgeführte Immunoblot konnte eine gesteigerte Expression von IL-6 in der mit Bleomycin behandelten Gruppe zeigen (siehe Abbildung 14).

Gezeigt sind sowohl IL-6-Dimere mit einem spezifischen Gewicht von 43 kDa als auch IL-6-Monomere mit 21-28 kDa Gewicht. IL-6-Monomere lagern sich häufig zusammen und bilden so Polymere. In der mit Bleomycin behandelten Gruppe sind deutlich stärkere Banden bei 43 kDa als in der Kontroll-Gruppe sichtbar. Auch IL-6-Monomere zeigen in der allein mit Bleomycin behandelten Gruppe ein stärkeres Signal als in der Kontroll-Gruppe. Sowohl in der zusätzlich mit Candesartan als auch in der mit Compound 21 behandelten Gruppe zeigt sich eine deutliche Reduktion dieser übermäßigen Expression von IL-6. In der mit Candesartan behandelten Gruppe sind deutlich schwächere Banden der IL-6-Dimere und -Monomere im Vergleich zur mit Bleomycin behandelten Gruppe sichtbar. In der mit Compound 21 behandelten Gruppe sind die Banden sowohl der IL-6-Dimere als auch der -Monomere nur sehr schwach sichtbar. Die IL-6-Expression wurde im Vergleich zur allein mit Bleomycin behandelten Gruppe deutlich gesenkt, hier sogar unter das Niveau der Kontroll-Gruppe.

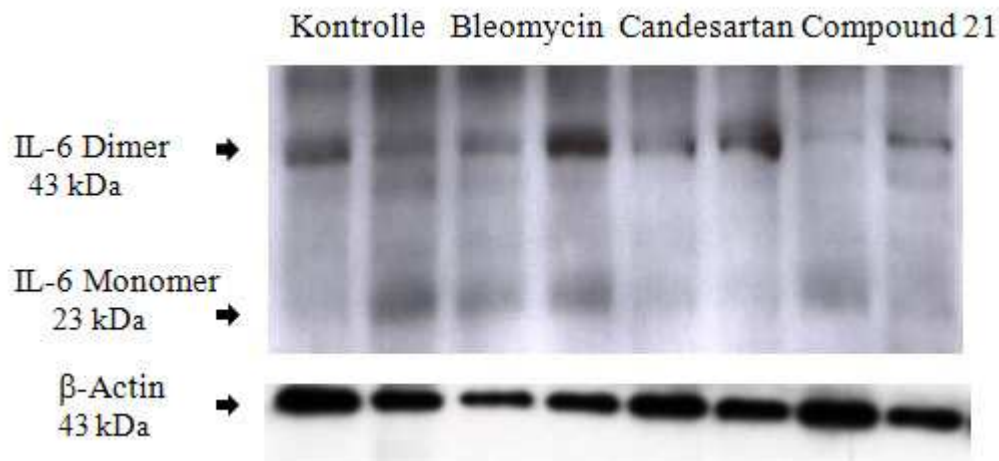


Abbildung 14: Vergleich der IL-6-Expression mittels Immunoblot (gezeigt ist 1 repräsentativer von 3 unabhängigen Versuchen): Kontrolle, Bleomycin, Bleomycin + Candesartan, Bleomycin + Compound 21: Gezeigt sind sowohl IL-6-Dimere von 43 kDa als auch IL-6-Monomere von 23 kDa Größe. Deutliche Zunahme der IL-6-Expression in der Bleomycin-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Senkung der übermäßigen IL-6-Expression sowohl in der Candesartan- als auch in der Compound 21-Gruppe. In der zusätzlich mit Candesartan behandelten Gruppe ist bei der rechten Probe die sehr intensive Anfärbung am rechten Rand der IL-6-Dimer-Bande als Artefakt zu betrachten.

### 3.3 Expression von Monocyte chemoattractant protein (MCP) -1

MCP-1 ist ebenfalls ein pro-inflammatorisch und pro-fibrotisch wirkendes Chemokin. Es beeinflusst sowohl indirekt als auch direkt die Funktion der Fibroblasten z.B. im Hinblick auf die Kollagen Typ I-Synthese. Für fibrotische Prozesse ist eine erhöhte MCP-1-Expression typisch. Zur Bestimmung der MCP-1-mRNA-Expression wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. In der ermittelten Schmelzkurve wurde ersichtlich, dass MCP-1-mRNA nur in der mit Bleomycin behandelten Gruppe exprimiert wurde. In den anderen Gruppen war kein oder nur ein sehr niedriger Produktpeak sichtbar. Da für die Auswertung der RT-qPCR aber eine Kontrolle als Referenz notwendig ist, war in diesem Fall eine Analyse der quantitativen PCR nicht möglich. Aufgrund dieser Tatsache wurde hier eine semiquantitative PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt.

In Abbildung 14 wird die alleinige Expression von MCP-1 in der Bleomycin-Gruppe deutlich. Sowohl die Kontrolle als auch Candesartan- und Compound 21 zeigen bei einem spezifischen Gewicht von 207 bp keine Bande (siehe Abbildung 15). Dies wurde durch die Bestimmung der relativen optischen Dichte mittels ImageJ bestätigt.

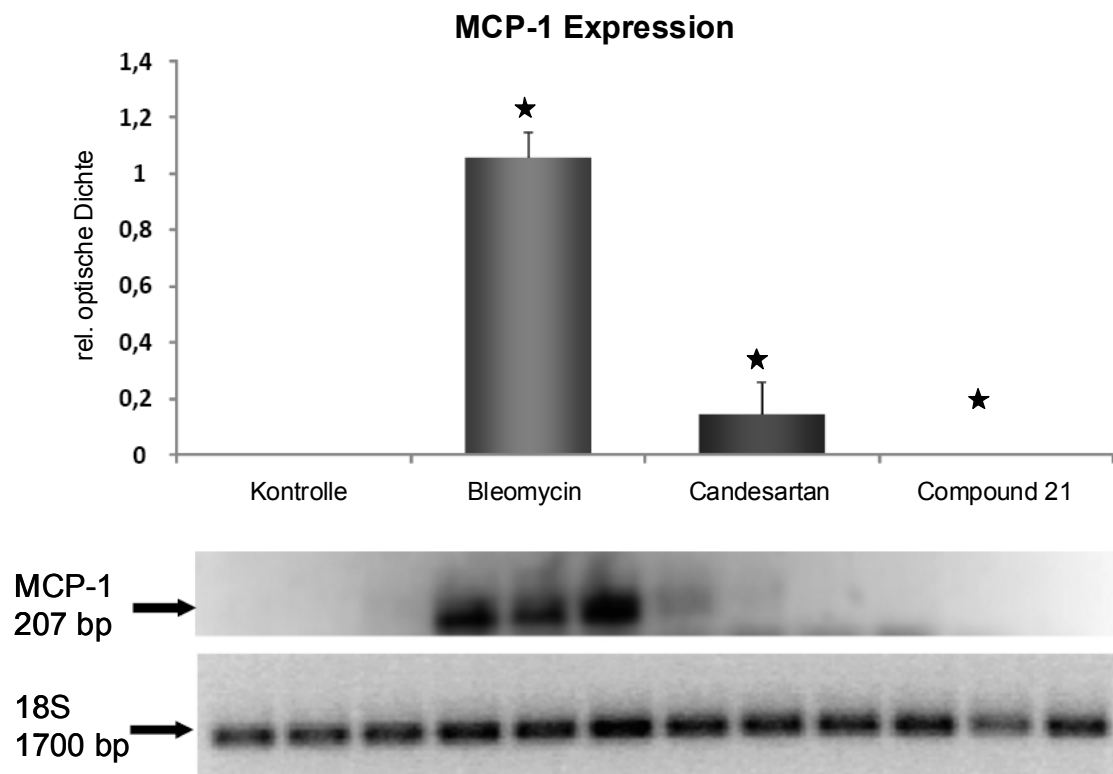


Abbildung 15: Vergleich der MCP-1-mRNA-Expression (n=3): Kontrolle, Bleomycin, Bleomycin + Candesartan und Bleomycin + Compound 21: Gezeigt ist 1 repräsentativer von 3 unabhängigen Versuchen mit  $MW \pm SEM$  der relativen MCP-1-mRNA-Expression gemessen gegen 18SrRNA. MCP-1 ist allein in der Bleomycin-Gruppe nachweisbar, während Kontroll- und Compound 21-Gruppe kein Signal zeigen. In der Candesartan-Gruppe ist eine geringe MCP-1-Expression detektierbar. (\*  $p < 0,05$ ).

### 3.4 Expression von TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Sklerodermie.

Durch seine chemotaktische Wirkung auf Fibroblasten und die Induktion der Kollagen Typ I- und III-Bildung führt TGF- $\beta$  zu einer erhöhten Ablagerung von Extrazellulärmatrix und damit zur Fibrose.

Es wird angenommen, dass die fibrotische Wirkung von Bleomycin auf der Induktion der TGF- $\beta$ -Expression beruht.

Zur Detektion der Expression von TGF- $\beta$  in den einzelnen Gruppen wurden Immunoblots mit spezifischen anti-TGF- $\beta$ 1-Antikörpern durchgeführt (siehe Abbildung 16).

Gezeigt ist TGF- $\beta$ 1 mit einem spezifischen Gewicht von 26 kDa im Vergleich zur  $\beta$ -Actin-Expression.

Es konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  lediglich in der mit Bleomycin behandelten Gruppe nachweisbar ist. Sowohl Kontroll-Gruppe, als auch zusätzlich mit Candesartan und mit Compound 21 behandelte Gruppen weisen kein spezifisches Signal von TGF- $\beta$  bei 26 kDa auf, wohingegen  $\beta$ -Actin in allen Gruppen gleichmäßig exprimiert wurde.

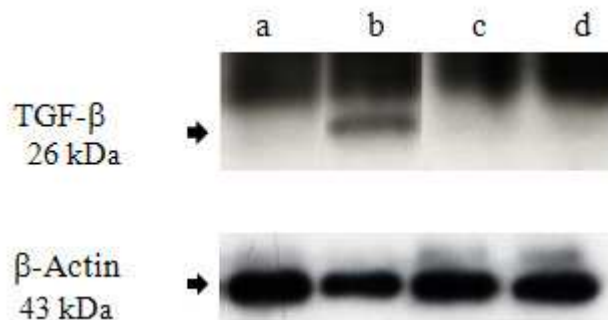


Abbildung 16: Vergleich der TGF- $\beta$ -Expression (gezeigt ist 1 repräsentativer von 3 unabhängigen Versuchen): TGF- $\beta$ -Expression wurde mithilfe von anti-TGF- $\beta$ 1-Antikörpern dargestellt: a) Kontrolle, b) Bleomycin, c) Bleomycin + Candesartan, d) Bleomycin + Compound 21. Gezeigt ist die Expression von TGF- $\beta$  relativ zu  $\beta$ -Actin. Nachweis von TGF- $\beta$ -Expression nur in der Bleomycin-Gruppe, aber nicht in der Haut der Kontroll- bzw. der Candesartan- oder Compound 21-Gruppe.

### 3.5 Expression von Kollagen Typ I

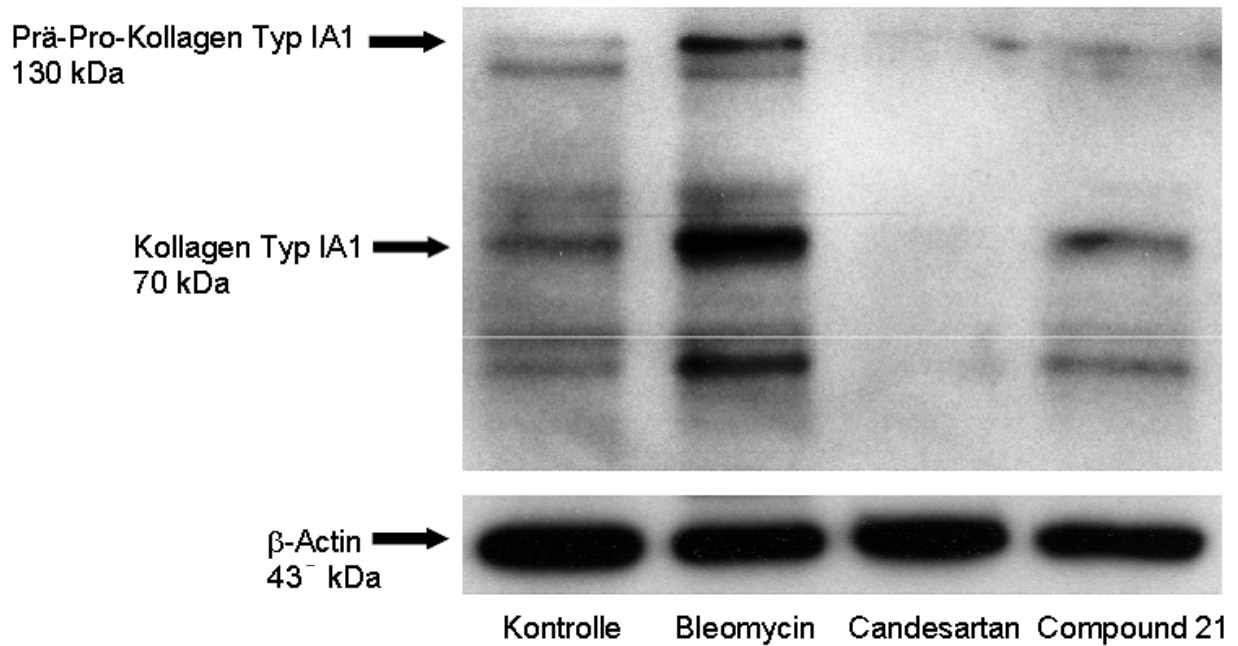
Desweiteren wurde die Expression von Kollagen Typ I im Immunoblot mithilfe von anti-Kollagen Typ I-Antikörpern untersucht (siehe Abbildung 17).

Gezeigt sind sowohl das Prä-Pro-Kollagen mit einem spezifischen Gewicht von 130-140 kDa als auch das verknüpfte Kollagen Typ I mit einem spezifischen Gewicht von 70-90 kDa im Vergleich zur  $\beta$ -Actin-Expression. Die gleichmäßige Beladung des Gels wurde durch Färbung des „housekeeping“-Gens  $\beta$ -Actin nachgewiesen.

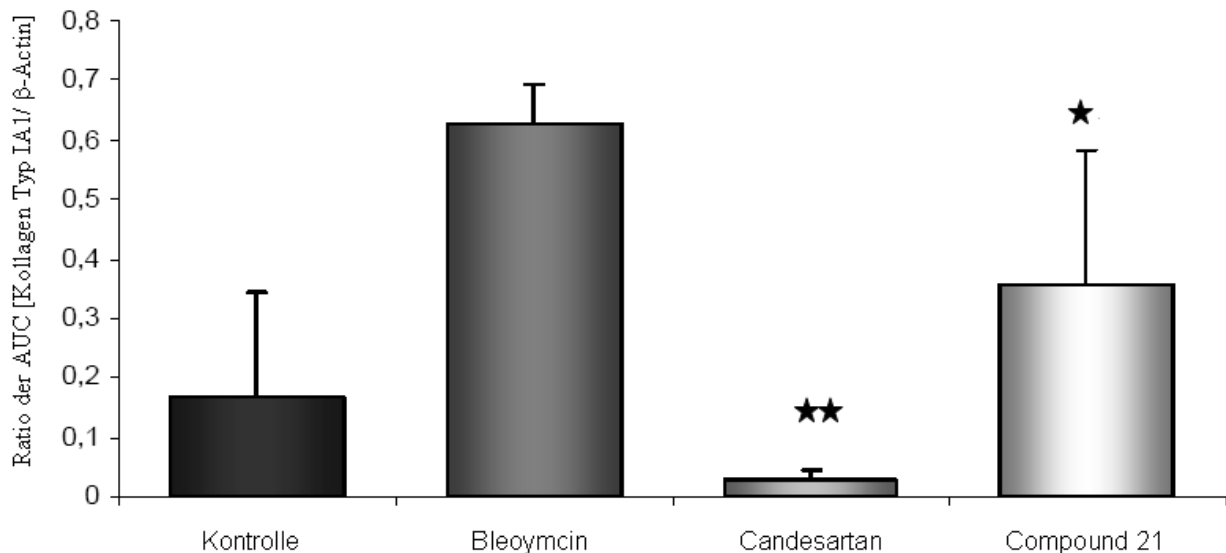
Die lokale Behandlung mit Bleomycin führte zu einer deutlich gesteigerten Expression von Kollagen Typ I im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. So sind in der mit Bleomycin behandelten Gruppe deutlich stärker gefärbte Banden sowohl des Prä-Pro-Kollagens als auch des verknüpften Kollagen Typ I sichtbar. Die zusätzlich mit Candesartan behandelte Gruppe zeigt nur eine sehr geringe Expression von Kollagen Typ I. Es sind nur äußerst schwache Banden des Prä-Pro-Kollagens und des verknüpften Kollagen Typ I sichtbar. Die Expression von Kollagen Typ I liegt hier sogar unter dem Niveau der Kontroll-Gruppe. In der zusätzlich mit Compound 21 behandelten Gruppe kam es ebenfalls zu einer Reduktion der übermäßigen Kollagen Typ I-Expression im Vergleich zur mit Bleomycin behandelten Gruppe, jedoch in geringerem Maße als mit Candesartan.

Dies wird in der densitometrischen Auswertung des Western Blots bestätigt (siehe Abbildung 18). Unter der Behandlung mit Candesartan kam es zu einer hochsignifikanten Reduktion der Bleomycin-induzierten Überexpression von Kollagen Typ I. Während die Behandlung mit Compound 21 zu einer signifikanten Reduktion von Kollagen Typ I führte.

## Ergebnisse



**Abbildung 17:** Vergleich der Kollagen Typ I-Expression (gezeigt ist 1 repräsentativer von 3 unabhängigen Versuchen): Kollagen Typ I-Expression wurde mithilfe von anti-Kollagen Type I-Antikörpern dargestellt: Kontrolle, Bleomycin, Bleomycin + Candesartan und Bleomycin + Compound 21. Gezeigt ist die Expression von Prä-Pro-Kollagen und verknüpftem Kollagen Typ I. In der Bleomycin-Gruppe ist eine deutlich gesteigerte Expression von Kollagen Typ I im Vergleich zur Kontroll-Gruppe sichtbar. In der Candesartan-Gruppe ist nur ein äußerst schwaches Signal von Kollagen Typ I sichtbar. Die Expression wurde unter das Niveau der Kontroll-Gruppe reguliert. In der Compound 21-Gruppe kam es zu einer deutlichen Reduktion der Kollagen Typ I-Expression im Vergleich zur Bleomycin-Gruppe.



**Abbildung 18:** Densitometrische Auswertung des in Abbildung 16 dargestellten Western Blots mittels Analyse durch ImageJ: gezeigt ist der Quotient der Signale von Kollagen Typ IA1 gegen β-Actin: Kontrolle, Bleomycin, Bleomycin + Candesartan und Bleomycin + Compound 21. In der Bleomycin-Gruppe ist eine deutlich gesteigerte Expression von Kollagen Typ I im Vergleich zur Kontroll-Gruppe sichtbar. In der Candesartan-Gruppe kommt es zu einer hochsignifikanten Reduktion von Kollagen Typ I. In der Compound 21-Gruppe kam es zu einer signifikanten Reduktion der Kollagen Typ I-Expression im Vergleich zur Bleomycin-Gruppe (\* p<0,05, \*\* p<0,01).



### 3.6 Expression von MMP-9

Matrixmetalloproteinasen (MMP) können das Kollagen der Extrazellulärmatrix degradieren. Zur Bestimmung der MMP-9-mRNA-Expression wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt (s. Abbildung 19).

Die 4-wöchige lokale Behandlung mit Bleomycin führte zu einem tendenziellen Anstieg der MMP-9-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, was als Folge eines insgesamt erhöhten Turnovers der extrazellulären Matrix betrachtet werden kann. In der zusätzlich mit Candesartan behandelten Gruppe kam es zu einer hochsignifikant erhöhten Expression von MMP-9-mRNA im Vergleich zur allein mit Bleomycin behandelten Gruppe ( $p < 0.01$ ) und auch im Vergleich zu der mit Compound 21 behandelten Gruppe ( $p < 0.05$ ).

Die mit Compound 21 behandelte Gruppe zeigt eine tendenziell erhöhte MMP-9-mRNA-Expression im Vergleich zur mit Bleomycin behandelten Gruppe, welche jedoch nicht als signifikant zu werten ist.

### MMP-9 Expression

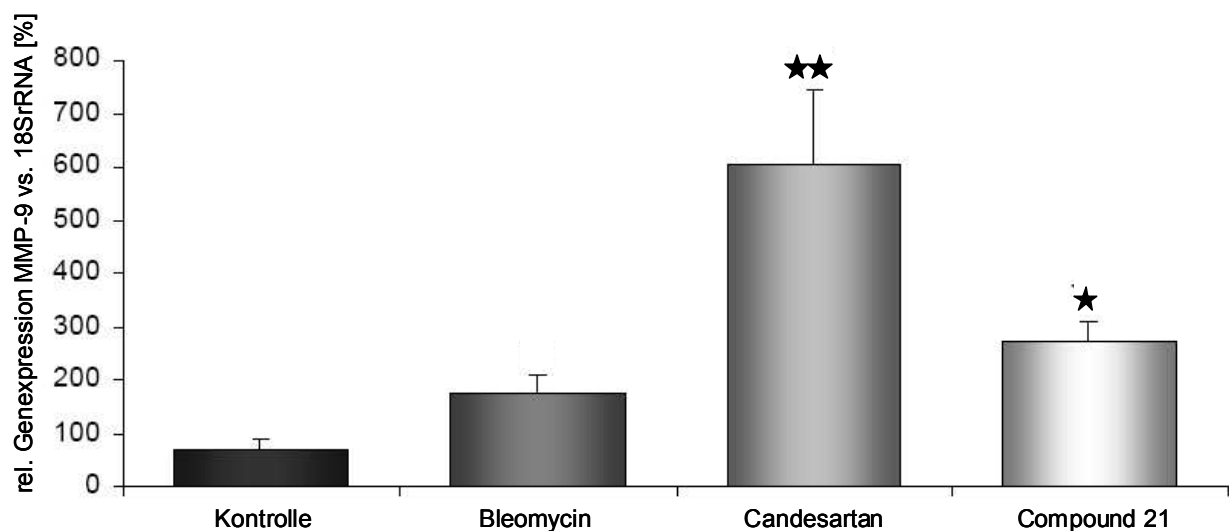


Abbildung 19: Vergleich der MMP-9-mRNA-Expression (n=5-6): Kontrolle, Bleomycin, Bleomycin + Candesartan und Bleomycin + Compound 21 (n=5): Gezeigt ist 1 repräsentativer von 3 unabhängigen Versuchen mit  $MW \pm SEM$  der relativen MMP-9-mRNA-Expression gemessen gegen 18SrRNA in %. Die Bleomycin-Gruppe zeigt einen Anstieg der MMP-9-Expression im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. In der Candesartan-Gruppe kommt es erneut zu einem hochsignifikanten Anstieg der MMP-9-Expression im Vergleich zur Bleomycin-Gruppe ( $*p < 0.01$ ). Die Compound 21-Gruppe zeigt eine nicht-signifikante Erhöhung der MMP-9-Expression im Vergleich zur Bleomycin-Gruppe.

## 4 Diskussion

Die systemische Sklerodermie (SSc) ist eine zu den Kollagenosen gehörende chronisch-progrediente Multisystemerkrankung mit noch ungeklärter Ätiologie. Gekennzeichnet ist diese Erkrankung durch eine Aktivierung der Fibroblasten und damit einhergehender überschießender Synthese von Kollagen. Die Hauptmanifestation dieser Erkrankung stellt eine zunehmende Fibrosierung der Haut dar, welche zu einer deutlichen Bewegungseinschränkung der betroffenen Akren führt. Häufig sind jedoch auch andere Organsysteme - wie Niere, Herz und Lunge - betroffen. Obwohl diese Erkrankung eine relativ geringe Prävalenz aufweist (19-75/100.000 Einwohnern), stellt sie aufgrund der unzureichenden Therapiemöglichkeiten ein großes medizinisches Problem dar. So existiert bis heute kein befriedigendes Therapiekonzept zur Inhibierung der Fibrose. Die Mortalität der systemischen Sklerodermie beträgt 4,3 – 12,2 %, abhängig vom Subtyp der Erkrankung [Hügler et al., 2010].

Neben zahlreichen anderen Faktoren scheint auch das Renin-Angiotensin-System (RAS) bei der SSc eine pathogenetische Rolle zu spielen. So werden AT<sub>1</sub>-Blocker bei einigen Manifestationen der SSc therapeutisch eingesetzt, wie beispielsweise bei der renalen Krise oder beim Raynaud-Phänomen. Kawaguchi et al. konnten zudem erhöhte Level an Angiotensin II (Ang II) im Serum von Patienten mit SSc nachweisen [Kawaguchi et al., 2004].

Jedoch ist eine pharmakologische Interferenz mit dem RAS als generelles Therapiekonzept bei der SSc noch nicht getestet worden.

2004 konnte ein lokales Renin-Angiotensin-System in der Haut nachgewiesen werden [Steckelings et al., 2004], nachdem bereits seit 1987 sogenannte lokale RAS in anderen Organen bekannt waren [Campbell, 1987]. Während das schon lange bekannte systemische RAS schnelle Effekte vorwiegend auf Blutdruck und Elektrolythaushalt zeigt, sind lokale RAS zuständig für langsame, zunächst regional begrenzte, gewebespezifische Effekte, wie beispielsweise Remodelling nach Myokardinfarkt [Weber et al., 1997].

Dermale Zellen, wie Melanozyten, Keratinozyten und Fibroblasten, exprimieren alle Komponenten des RAS, einschließlich der Angiotensin-Rezeptoren Typ 1 (AT<sub>1</sub>) und Typ 2 (AT<sub>2</sub>). So ist die Haut unabhängig von einer Versorgung mit RAS-Komponenten aus dem systemischen Kreislauf in der Lage Ang II zu synthetisieren. Gleichzeitig stellt die Haut auch ein Zielorgan für Ang II dar.

In anderen Organen konnte für Ang II über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor ein pro-fibrotischer und pro-inflammatorischer Effekt mit einer Zunahme der Synthese von extrazellulärer Matrix

nachgewiesen werden, während eine Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors gegenteilige Effekte zeigt [Stoll et al., 1995; Nakajima et al., 1995; Huang et al., 1996; De Gasparo et al., 2000; Fujiyama et al., 2001]. Erst kürzlich konnte auch in der Haut eine AT<sub>1</sub>-vermittelte erhöhte Kollagen-Synthese nach Stimulation mit Ang II nachgewiesen werden [Min et al., 2004].

In vitro-Versuche bestätigten den anti-entzündlichen und anti-fibrotischen Effekt des AT<sub>2</sub>-Rezeptors in dermalen Fibroblasten [Min et al., 2004; Rompe et al., 2010].

Da es also Hinweise auf eine pathogenetische Rolle des kutanen RAS bei Entzündung und Fibrose im Rahmen einer SSc gibt, sollte in der vorliegenden Arbeit eine pharmakologische Interferenz mit dem RAS sowohl mittels AT<sub>1</sub>-Blockade als auch mittels AT<sub>2</sub>-Stimulation als generelles Therapiekonzept bei der SSc im Tiermodell getestet werden.

Hierfür kam ein 1999 etabliertes Modell, in welchem wiederholte, lokale, subkutane Injektionen von Bleomycin zu Sklerodermie-ähnlichen Veränderungen in der Haut führen, zur Anwendung [Yamamoto et al. 1999]. Bleomycin wurde über einen Zeitraum von 4 Wochen subkutan injiziert. Als Kontrolle dienten Injektionen von physiologischer Kochsalzlösung (NaCl), da in diesen Versuchen Bleomycin in NaCl gelöst wurde. Die Studie umfasste zwei Behandlungsgruppen, wovon eine mit dem AT<sub>1</sub>-Antagonisten Candesartan (0,1, 1, 10 mg/kg s.c.) und die zweite mit dem neu entwickelten selektiven AT<sub>2</sub>-Agonisten Compound 21 (0,3 mg/kg s.c.) behandelt wurde.

### **4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse**

In der vorliegenden Arbeit konnte das aus der Literatur bekannte Modell einer Induktion Sklerodermie-ähnlicher Hautveränderungen (inklusive einer Fibrose und einer begleitenden entzündlichen Reaktion) in der Maus durch subkutane Injektionen von Bleomycin erfolgreich durchgeführt werden (siehe Abbildung 20).

So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Bleomycin in der Haut zu einer vermehrten Produktion von Extrazellulärmatrix, insbesondere von Kollagen Typ I, zu einem gesteigerten Turnover mit erhöhter Expression von MMP-9 und zu einer Überexpression von pro-fibrotischen und pro-entzündlichen Markern, wie IL-6, MCP-1 und TGF- $\beta$ , führte.

Die Arbeitshypothese dieser Arbeit, die besagte, dass Sklerodermie-ähnliche Hautveränderungen mittels einer pharmakologischen Interferenz mit dem RAS günstig beeinflusst werden können, konnte sowohl für die Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors als auch für die Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors bestätigt werden. Sowohl der AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonist Candesartan als auch der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist Compound 21 zeigten einen deutlichen anti-fibrotischen und anti-entzündlichen Effekt. So wurde sowohl durch AT<sub>1</sub>-Blockade als auch durch AT<sub>2</sub>-

## Diskussion

Stimulation die durch Bleomycin induzierte übermäßige Produktion an Extrazellulärmatrix deutlich reduziert, die Konzentration an Kollagen Typ I in der Haut verringert, die Degradierung von Kollagen durch MMP-9 stimuliert und somit die Akkumulation von Kollagen verhindert. Zudem führte die Interaktion mit dem RAS in beiden Behandlungsansätzen zu einer deutlichen Reduktion der für die SSc wichtigsten pro-fibrotischen und pro-inflammatorischen Marker IL-6, MCP-1 und TGF- $\beta$ .

Hierzu wurden sowohl histologische als auch molekularbiologische Untersuchungen der gewonnenen Hautschnitte durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente werden im Folgenden interpretiert und mit der Literatur verglichen.

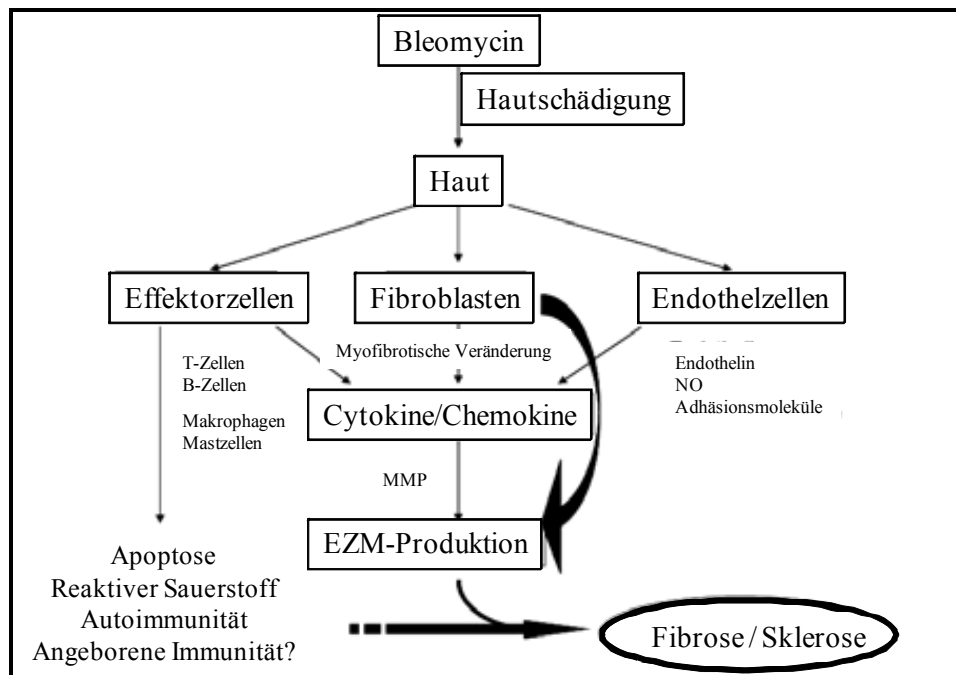


Abbildung 20: Schematische Darstellung der möglichen Pathogenese der Bleomycin-induzierten Sklerodermie [modifiziert nach Yamamoto, 2010]

### **4.2 Interpretation der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur**

#### **4.2.1 Fibrose und Inflammation in der HE-Färbung**

In der durchgeführten HE-Färbung fielen in der Gruppe der mit hoher Candesartan-Dosis behandelten Tiere (1 mg/kg/d und 10 mg/kg/d) spezifische Veränderungen in der Haut auf. Es handelte sich um eine von einer Kapsel umhüllte Ansammlung von Zellen oder organischen Materials mit umgebender massiver Infiltration und Fibrose. Dies kann als eine Fremdkörperreaktion als Folge einer Akkumulation von Candesartan in der Haut gedeutet werden. Diese beiden Candesartan-Gruppen wurden daraufhin von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Die Bezeichnung „Candesartan-Gruppe“ bezieht sich im Folgenden auf die Dosierung von 0.1 mg/kg/d.

Die wiederholten Bleomycin-Injektionen in die Haut der Mäuse führten zu einer deutlichen Fibrosierung sowohl in der Dermis als auch in der Subkutis. Ebenso traten eine inflammatorische Reaktion und eine perivaskuläre Fibrose, welche typisch für die SSc ist, in Erscheinung.

Diese Veränderungen wurden durch eine gleichzeitige Behandlung sowohl mit Candesartan (AT<sub>1</sub>-Blocker) als auch mit Compound 21 (AT<sub>2</sub>-Agonist) deutlich reduziert.

Histologisch auffällig war ein besonders deutlicher Rückgang der Bleomycin-induzierten Extrazellulärmatrix in der mit Candesartan behandelten Gruppe. Dieser Effekt war auch in mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Färbungen gut reproduzierbar. Da es technisch nicht möglich war, alle Schnitte in einem einzigen Arbeitsgang aufzuarbeiten und zu untersuchen, wurde auf eine äußerst exakte Arbeitsweise und möglichst konstante äußere Bedingungen geachtet um reproduzierbare Resultate zu erhalten. Um Unterschiede zwischen einzelnen Arbeitsgängen auszuschließen, wurden für jeden Arbeitsgang Schnitte der verschiedenen Versuchsgruppen zusammengestellt, gefärbt und untersucht.

#### **4.2.2 Fibrose und Kollagentypisierung in der Picosirius-Rot-Färbung**

Die in der HE-Färbung festgestellten Veränderungen konnten mittels Picosirius-Rot-Färbung bestätigt werden. Diese Färbung stellt Kollagen spezifisch dar. Darüberhinaus kann unter polarisiertem Licht zwischen Kollagen Typ I und Typ III bzw. zwischen dickeren, dicht gepackten und dünneren, weniger dicht gepackten Kollagenfibrillen unterschieden werden.

Hier zeigte sich in der mit Bleomycin behandelten Gruppe eine deutliche Zunahme an Kollagen Typ I in Dermis und Subkutis im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Unter polarisiertem Licht dominierte ein vorwiegend rot leuchtendes Kollagen Typ I. Dies steht im Einklang mit

Erkenntnissen von Yamamoto und anderen, welche eine erhöhte Bildung von Kollagen Typ I nach Stimulation mit Bleomycin zeigten [Yamamoto et al., 2000]. Eine übermäßige Produktion von Kollagen Typ I ist typisch für fibrotische Vorgänge.

Auch in der Picrosirius-Färbung konnte die durch Bleomycin hervorgerufene Fibrosierung durch gleichzeitige Behandlung sowohl mit Candesartan als auch mit Compound 21 deutlich reduziert werden. Beide Gruppen zeigten ein deutlich aufgelockertes Interstitium. Wie in der HE-Färbung fiel auch hier in der Auflichtmikroskopie ein deutlich geringerer Gehalt an Kollagen vor allem in den Schnitten der Candesartan-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen auf. Unter polarisiertem Licht zeigte die Compound 21-Gruppe einen deutlich geringeren Kollagengehalt in der Haut im Vergleich zur Bleomycin-Gruppe. Wie in den anderen Gruppen dominierte hier ebenfalls das vorwiegend rot-leuchtende Kollagen Typ I. In der Candesartan-Gruppe dagegen fiel eine überwiegende Grünfärbung der untersuchten Hautschnitte auf. Hier könnte es sich um vorwiegend dünnere und weniger dicht gepackte Kollagenfibrillen, wie Kollagen Typ III, handeln. Junqueira et al. fanden heraus, dass mit zunehmender Dicke der zu untersuchenden Schnitte nicht nur die Intensität der Leuchtkraft zunimmt, sondern die Schnitte auch zunehmend von grün über gelb bis rot erscheinen [Junqueira et al., 1982]. Diese mögliche Erklärung für die Unterschiede in der dominierenden Färbung der Schnitte wurde durch ein exaktes Arbeiten und eine einheitliche Dicke der Hautschnitte von 7 µm ausgeschlossen.

### **4.2.3 Fibrose und Kollagentypisierung in der Immunhistologie**

Die vermehrte Kollagen Typ I-Bildung unter der Behandlung mit Bleomycin konnte ebenfalls durch immunhistologische Verfahren unter Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen Kollagen1A1 bestätigt werden. Auch hier war eine sichtbare Fibrosierung mit vermehrtem Kollagen Typ I-Gehalt sowohl in der Dermis als auch in der Subkutis der Bleomycin-Gruppe nachweisbar. Ebenso ließ sich der in den histologischen Untersuchungen gezeigte anti-fibrotische Effekt einer Behandlung mit Candesartan und Compound 21 bestätigen. In der Candesartan-Gruppe war auch hier das Signal für Kollagen Typ I äußerst schwach, wohingegen die Färbung der Zellkerne die gleiche Intensität aufwies wie in den anderen Gruppen. Dies spricht für einen geringen Kollagen Typ I-Gehalt in den Schnitten der Candesartan-Gruppe.

Um die in der Immunhistologie häufig auftretenden Hintergrundfärbungen möglichst gering zu halten, wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Dies wurde durch Inkubation der Schnitte in 5 %-igem Esel-Serum in Pufferlösung erreicht. Zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung des sekundären Antikörpers wurden – unter Auslassung der Inkubation mit dem primären Antikörper - in jedem Arbeitsgang Negativkontrollen angefertigt. Da diese Färbung der

Schnitte sehr labil ist, wurde auf einen ausreichenden Lichtschutz der behandelten Präparate geachtet sowie eine zeitnahe Untersuchung der Schnitte angestrebt. Auch hier wurden mehrere Schnitte verschiedener Gruppen jeweils in einem Arbeitsgang aufbereitet, um vermeidbare Fehler durch unterschiedliche Bedingungen zwischen den einzelnen Arbeitsgängen auszuschließen.

### **4.2.4 Expression von IL-6**

IL-6 ist ein Zytokin mit sowohl pro-inflammatorischer als auch pro-fibrotischer Wirkung. Frühere Studien konnten zeigen, dass SSc-Patienten erhöhte Serumlevel an IL-6 aufweisen. Die Titer dieses Markers korrelieren mit dem Schweregrad der Erkrankung. Zudem produzieren Fibroblasten von SSc-Patienten vermehrt IL-6 [Feghali et al., 1994].

In der vorliegenden Arbeit kam es durch die Behandlung mit Bleomycin im Vergleich zur Kontroll-Gruppe zu einer hochsignifikanten Steigerung der IL-6-mRNA-Expression in den betroffenen Hautarealen. Dies spricht für eine entzündliche Reaktion in der Haut als Reaktion auf die Bleomycin-Behandlung.

Sowohl eine Behandlung mit Candesartan als auch mit Compound 21 konnte der Bleomycin-induzierten Steigerung der IL-6-mRNA-Expression entgegenwirken und zeigte somit eine anti-inflammatorische und anti-fibrotische Wirkung.

Diese Beobachtungen auf RNA-Ebene wurden im Immunoblot auf Proteinebene bestätigt. In der Bleomycin-Gruppe war eine deutlich höhere Proteinkonzentration von IL-6 in den Hautpräparaten nachweisbar als in der Kontroll-Gruppe.

Auch die hemmenden Wirkungen von Candesartan und Compound 21 auf die IL-6-mRNA-Synthese konnten auf Proteinebene bestätigt werden. Hier zeigte die AT<sub>2</sub>-Stimulation mit Compound 21 eine stärkere Wirkung als Candesartan; die IL-6-Expression wurde hier sogar unter das Niveau der Kontroll-Gruppe reguliert.

Dies steht im Einklang mit erst kürzlich durchgeführten Studien, in welchen sowohl Candesartan als auch Compound 21 im Herzinfarktmodell erfolgreich die IL-6-Expressionslevels senkten [Kaschina et al., 2008]. Auch in einem Bleomycin-Modell – allerdings mit deutlich kürzerer Versuchsdauer als in der hier vorgestellten Studie (1 statt 4 Wochen) - konnte die Überexpression von IL-6 mittels AT<sub>2</sub>-Stimulation gesenkt werden [Rompe et al., 2010].

### 4.2.5 Expression von MCP-1

MCP-1 gehört zur Familie der Chemokine und ist ein pro-inflammatorischer und pro-fibrotischer Marker. MCP-1 aktiviert Monozyten und Makrophagen und führt zu einer erhöhten Expression von TGF- $\beta$  und Kollagen [Yamamoto and Nishioka, 2003].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass MCP-1 ausschließlich in der Haut der mit Bleomycin behandelten Tiere nachweisbar war.

Bei der zunächst durchgeführten quantitativen RT-PCR war ein deutliches Signal von MCP-1 in der Bleomycin-Gruppe sichtbar, während die anderen Gruppen kein Signal oder nur sehr niedrige Produkt-Peaks zeigten. Da aber die Kontrolle für die Analyse der quantitativen RT-PCR als Referenz notwendig ist, konnte eine Analyse in diesem Fall nicht durchgeführt werden.

Aufgrund dieser Tatsache wurde eine semiquantitative RT-PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt, in welcher die Expression von MCP-1 ausschließlich in der Bleomycin-Gruppe bestätigt werden konnte. Sowohl die Kontroll-Gruppe als auch die mit Candesartan oder mit Compound 21 behandelten Tiere zeigten keine oder nur sehr schwache Banden. AT<sub>1</sub>-Blockade sowie AT<sub>2</sub>-Stimulation hemmten also wirksam die Bleomycin-induzierte Expression von MCP-1.

Da MCP-1 die Expression von Kollagen induziert [Gharaee-Kermani et al., 1996], könnte die Reduktion von MCP-1 ein Mechanismus sein, der für die in der Histologie nachgewiesenen niedrigeren Konzentrationen an Kollagen in den beiden Behandlungsgruppen verantwortlich ist.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer Publikation von Yamamoto et al., in welcher eine Bleomycin-induzierte Überexpression von MCP-1 nach 3 Wochen Behandlung mit Bleomycin gezeigt werden konnte [Yamamoto and Nishioka, 2003]. Auch hier war in der Kontroll-Gruppe kein spezifisches Signal von MCP-1 nachweisbar. Mithilfe von neutralisierenden Antikörpern gegen MCP-1 konnte die Bleomycin-induzierte Fibrose wirksam gehemmt werden. Darüberhinaus zeigten MCP-1-Knock-out-Mäuse eine fehlende pathologische Veränderung der Kollagenfibrillen mit einer deutlich geringeren Hautdicke nach Behandlung mit Bleomycin im Vergleich zu Wild-Typ-Mäusen [Ferreira et al., 2006].

So scheint MCP-1 eine entscheidende Rolle in der Bleomycin-induzierten Fibrose und Inflammation zu spielen.

In der Haut von Patienten mit SSc konnte ebenfalls eine Überexpression von MCP-1 nachgewiesen werden, wohingegen in der Haut von gesunden Probanden dieses Chemokin nicht nachweisbar war [Hasegawa et al., 1999].



### 4.2.6 Expression von TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  ist ein pro-fibrotischer und pro-inflammatorischer Faktor, welcher die Fibroblastenproliferation und die Synthese von Kollagen und anderen Bestandteilen der Extrazellulärmatrix stimuliert [Kawakami et al., 1998].

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Immunoblot eine erhöhte Produktion von TGF- $\beta$  durch die Behandlung mit Bleomycin nachgewiesen werden. Mehr noch, dieser Marker war ausschließlich in der Bleomycin-Gruppe nachweisbar. Sowohl die Behandlung mit Candesartan als auch mit Compound 21 konnten die Bleomycin-induzierte Überexpression von TGF- $\beta$  somit wirksam hemmen.

Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Bleomycin sowohl die TGF- $\beta$ -mRNA-Expression als auch die Proteinproduktion in der Haut stimuliert [Yamamoto et al., 2000].

So stellt TGF- $\beta$  einen der wichtigsten Mediatoren des fibrotischen Effektes von Bleomycin dar. Es ist bekannt, dass TGF- $\beta$  als Transkriptionsfaktor wirkt. Auf dem Gen für pro- $\alpha$ 1(I) Kollagen konnte ein Promotor-Bindungsprotein für TGF- $\beta$  identifiziert werden, welches verantwortlich ist für die Aktivierung des pro- $\alpha$ 1(I) Kollagen-Promotors durch Bleomycin. Bei Fehlen oder Fehlerhaftigkeit dieses Elementes zeigt eine Behandlung mit Bleomycin keinen fibrotischen Effekt. Somit beruht der fibrotische Effekt von Bleomycin auf der Aktivierung dieses spezifischen TGF- $\beta$ -Promotor-Bindungsproteins [King et al., 1994]. Dies wird gestützt durch den Nachweis einer zeitlichen Korrelation der TGF- $\beta$ -Synthese mit der Kollagen-Produktion: die Überexpression von TGF- $\beta$ -mRNA nach Behandlung mit Bleomycin erfolgt zeitlich vor einer Erhöhung der Prokollagen Typ I- und III-mRNA-Expression [Westergren-Thorsson et al., 1993]. Eine Behandlung mit neutralisierenden Antikörpern gegen TGF- $\beta$  verhindert die Entwicklung einer Fibrose in der Haut [McCormick et al., 1999; Zhang et al., 2003]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass auch Ang II ein Aktivator dieser TGF- $\beta$ -vermittelten Fibrose sein kann. So erhöhte die Stimulation mit Ang II in in vitro-Versuchen an Fibroblasten sowohl von SSc-Patienten als auch von gesunden Spendern die Expression von Prokollagen Typ I und TGF- $\beta$  [Kawaguchi et al., 2004].

Dabei aktiviert Ang II nicht nur die TGF- $\beta$ -Expression selbst, sondern stimuliert auch – unabhängig von TGF- $\beta$  – die Expression von TGF- $\beta$ -Rezeptoren auf RNA-Ebene [Siegert et al., 1999]. Zudem konnte im Rattenmodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose die Überexpression von TGF- $\beta$  durch eine orale Behandlung mit den AT<sub>1</sub>-Antagonisten Candesartan bzw. Losartan wirksam gehemmt werden [Otsuka et al., 2004; Yao et al., 2006].

### **4.2.7 Expression von Kollagen Typ I**

Bei der SSc findet eine Überexpression von Kollagen in der Haut statt. Hierbei handelt es sich vorwiegend um Kollagen Typ I.

In der vorliegenden Arbeit konnten mittels Immunoblot und Immunhistochemie die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen bestätigt werden. So führte die Behandlung mit Bleomycin in der Haut der Mäuse zu einer deutlich erhöhten Expression von Kollagen Typ I und seinen Vorläufermolekülen wie Pro-Kollagen.

Dies ist eine bekannte Wirkung von subkutan verabreichtem Bleomycin und spiegelt die Veränderungen in der Haut von SSc-Patienten wider [Yamamoto et al., 2000].

Auch hier konnte der anti-fibrotische Effekt sowohl von Candesartan als auch von Compound 21 gezeigt werden. In der Candesartan-Gruppe wurde die Kollagen-Expression sogar unter das Niveau der Kontroll-Gruppe reguliert. Auch eine Behandlung mit Compound 21 zeigte einen deutlichen anti-fibrotischen Effekt. Dieser lag allerdings unter der Wirkung von Candesartan.

Der anti-fibrotische Effekt von AT<sub>1</sub>-Antagonisten konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden. Die vorliegende Arbeit steht im Einklang mit mehreren Studien, in welchen bei Mäusen die orale Gabe (3, 9, 27 mg/kg/d) und bei Ratten die subkutane Injektion (20 mg/kg) des AT<sub>1</sub>-Antagonisten Losartan eine Reduktion der Pro-Kollagen und Kollagen-Synthese sowie eine Hemmung der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose bewirkten [Marshall et al., 2004; Yao et al., 2006].

Im Gegensatz dazu steht eine weitere Studie, welche im Mausmodell eine unzureichende Hemmung der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose durch den mit dem Trinkwasser verabreichten AT<sub>1</sub>-Antagonisten Losartan (40-50 mg/kg/d oral) zeigte [Keogh et al., 2005].

Die Ursache für diese widersprüchliche Datenlage ist noch nicht geklärt, kann aber möglicherweise auf Unterschiede zwischen einzelnen Mausstämmen, unterschiedliche genetische Hintergründe und die verschiedenen Applikationsarten und Dosierungen der AT<sub>1</sub>-Antagonisten zurückgeführt werden.

### **4.2.8 Expression von Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9)**

Matrixmetalloproteinasen gehören der Familie der Endopeptidasen an und sind wesentlich am Ab- bzw. Umbau von extrazellulärer Matrix beteiligt. Die Aktivität der MMPs wird durch ihre Inhibitoren (TIMP: *tissue inhibitor of metalloproteinases*) kontrolliert. Änderungen in der Komposition der extrazellulären Matrix bzw. der Kollagen-Dichte sind daher also nicht nur durch eine veränderte Kollagen-Syntheserate möglich, sondern auch durch eine Modifikation des Kollagen-Abbaus über Änderungen der Expression bzw. Aktivität von MMPs und TIMPs.

## Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass SSc-Patienten im Vergleich zu Gesunden höhere MMP-9-Serumspiegel aufweisen [Kim et al., 2005; Montagnana et al., 2007]. Bei Sklerodermie-Patienten korrelieren die Serum-Konzentrationen von MMP-9 mit dem Grad der Hautmanifestation der Erkrankung. Eine erhöhte Expression von MMP-9 und TIMP-1 sind typisch für einen fibrotischen Prozess und Zeichen des kontinuierlichen, erhöhten Turnovers. Auch in der Haut von Mäusen stellt MMP-9 eine wichtige Gelatinase dar.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von MMP-9-mRNA in der Bleomycin-Gruppe tendenziell über dem Wert der Kontrolle liegt. Dies könnte als Zeichen eines kontinuierlich erhöhten Turnovers in den untersuchten Hautarealen gedeutet werden.

Die Candesartan-Gruppe zeigte eine hochsignifikant höhere Expression von MMP-9 im Vergleich zur Bleomycin-Gruppe, während eine Behandlung mit Compound 21 ebenfalls zu einer Erhöhung dieses Markers führte, die jedoch statistisch nicht signifikant war. Das Expressionsniveau der Candesartan-Gruppe lag signifikant über dem der mit Compound 21 behandelten Gruppe. Die Überexpression von MMP-9 in den beiden Behandlungsgruppen spricht für eine erhöhte Degradierung von Kollagen in den untersuchten Hautpräparaten. Die Ergebnisse bestätigen die morphologisch sichtbaren Veränderungen der Picrosirius-Rot-Färbung sowie die Immunhistologie und den Western Blot für Kollagen Typ I: Mit allen drei Analysemethoden war eine Reduktion von Kollagen Typ I in den mit Candesartan und den mit Compound 21 behandelten Gruppen erkennbar. Die Candesartan-Gruppe, in welcher die MMP-9-Expression am stärksten erhöht war, fiel besonders auf durch vorwiegend dünne, locker verknüpfte Kollagenfibrillen.

Während für die Haut keine Daten vorliegen, konnte bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose bereits eine erhöhte Expression von MMP-2 und MMP-9 nachgewiesen werden [Bakowska and Adamson, 1998, Corbel et al., 2001].

Fibrosierende Erkrankungen anderer Organsysteme, wie Lunge und Leber, gehen ebenfalls mit erhöhten MMP-9-Levels einher [Fukuda et al., 1998; Kossakowska et al., 1998; Hoshino et al., 1999].

Die Ergebnisse dieser und vorhergehender Studien legen die Vermutung nahe, dass eine erhöhte MMP-9-Expression eng verknüpft ist mit fibrotischem Remodelling.

Für den Einfluss einer RAS-Blockade auf Serum-MMPs bzw. TIMP existieren ebenfalls widersprüchliche Daten, die allerdings alle nicht an SSc-Patienten erhoben wurden. So konnten durch orale Gabe von ACE-Hemmern oder AT<sub>1</sub>-Antagonisten die Serumlevels von MMP-9 bei Patienten mit Hypertonie deutlich gesenkt und die Konzentration des MMP-9-Inhibitors TIMP-1 erhöht werden [Schieffer et al., 2004; Kassiri et al., 2009; Onal et al., 2009]. Im Gegensatz dazu

stehen Studien, welche unter der Therapie mit ACE-Hemmern eine erhöhte Expression von MMP-1 und eine erniedrigte Expression von TIMP-1 im Serum von Patienten mit Hypertonie zeigten [Laviades et al., 1998]. Allerdings existiert bisher keine Studie, welche den Einfluss einer RAS-Blockade auf die MMP- oder TIMP-Expression in Geweben von Patienten untersucht hat.

Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Akkumulation von Kollagen in der Bleomycin-Gruppe trotz erhöhter MMP-9-Konzentration wäre die gleichzeitige Überexpression von TIMP-1, dem Inhibitor der enzymatischen Aktivität von MMP-9. Eine erhöhte Expression von TIMP-1 sowohl bei SSc-Patienten als auch bei einer Behandlung mit Bleomycin konnte durch andere Gruppen bereits gezeigt werden [Kikuchi et al., 2002; Yamamoto and Nishioka, 2005]. Diese Erhöhung an TIMP-1 führt durch Hemmung des Kollagen-Abbaus durch MMP-9 zu einer verstärkten Akkumulation von Kollagen und somit zur Fibrose.

### **4.3 RAS, Inflammation und Fibrose**

Inflammatorische und fibrotische Prozesse sind eng miteinander verknüpft. So wird beispielsweise MCP-1 von Zellen des Immunsystems gebildet und stimuliert die Produktion von Kollagen [Gharaee-Kermani et al., 1996]. Desweiteren werden auch MMPs von inflammatorischen Zellen gebildet. Pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-6 oder MCP-1, stimulieren Fibroblasten zur Synthese von MMPs, wobei MMPs selbst wiederum zu einer inflammatorischen Reaktion führen können [Van den Steen et al., 2002; Kim et al., 2005]. Einer der wichtigsten Mediatoren in diesem Regelkreis aus Inflammation und Fibrose ist, wie bereits dargestellt, TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  wird vorwiegend von inflammatorischen Zellen, aber auch von Fibroblasten selbst gebildet, wirkt chemotaktisch auf Fibroblasten und stimuliert die Synthese von Kollagen [Westergren-Thorsson et al., 1993].

Es konnte gezeigt werden, dass AT<sub>1</sub>-Antagonisten im Bleomycin-Modell der Lungenfibrose die Expression von TGF- $\beta$  hemmen [Otsuka et al., 2004].

Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung des RAS bei inflammatorischen und fibrotischen Vorgängen konnte durch den Nachweis einer erhöhten AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Expression in Alveolarzellen nach intratrachealer Verabreichung von Bleomycin erbracht werden [Otsuka et al., 2004].

Bei der Chemotaxis inflammatorischer Zellen scheint Ang II ebenfalls eine entscheidende Rolle zu spielen. So konnte für Candesartan ein hemmender Effekt auf die Akkumulation inflammatorischer Zellen im Bleomycin-Modell der pulmonalen Fibrose nachgewiesen werden

[Otsuka et al., 2004]. Auch in unserem Modell wurde sowohl durch Candesartan als auch durch Compound 21 das inflammatorische Infiltrat in den Hautläsionen reduziert.

Bezüglich einer Reduktion der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose konnte bereits eine gute Wirksamkeit des AT<sub>1</sub>-Antagonisten Candesartan und anderer AT<sub>1</sub>-Antagonisten, wie Losartan, gezeigt werden [Otsuka et al., 2004; Marshall et al., 2004].

In dermalen Fibroblasten bewirkt Ang II über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor eine erhöhte Expression von Kollagen Typ I und III [Min et al., 2004]. Diese Angiotensin-induzierte Überexpression von Kollagen konnte mittels AT<sub>1</sub>-Antagonisten gehemmt werden. In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors in Fibroblasten von AT<sub>1</sub>-Knock-out-Mäusen zu einer verminderten Expression von Kollagen führt.

So konnte bereits mehrfach ein wirksamer Effekt der Therapie mit AT<sub>1</sub>-Antagonisten bei inflammatorischen und fibrotischen Vorgängen in anderen Organsystemen nachgewiesen werden. Die Wirksamkeit von AT<sub>1</sub>-Antagonisten und AT<sub>2</sub>-Agonisten wurde jedoch noch nie in einem Modell der Sklerodermie getestet.

#### **4.4 Wirksamkeit der pharmakologischen Interferenz mit dem RAS**

Die vorliegende Studie konnte eine deutliche Reduktion der durch Bleomycin induzierten, sklerodermieähnlichen, kutanen Inflammation und Fibrose durch eine pharmakologische Interferenz mit dem RAS zeigen. Bezüglich des anti-fibrotischen Effekts war die Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors wirksamer als die Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors.

Ob allerdings generell eine AT<sub>1</sub>-Blockade bessere Wirksamkeit aufweist als eine AT<sub>2</sub>-Stimulation bleibt fraglich, da bis heute noch nicht bekannt ist, welche Dosis von Compound 21 äquivalent zu der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Dosis von Candesartan ist. Hierfür sind weitere Untersuchungen notwendig.

Zudem wäre es denkbar, dass die Bleomycin-Injektionen eine übermäßige Aktivierung des RAS in der Haut induzierten und in dieser Situation eine Hemmung der Ang II-vermittelten Effekte via AT<sub>1</sub>-Rezeptor eine stärkere Wirkung zeigt als die Stimulation seines Gegenspielers, des AT<sub>2</sub>-Rezeptors. Eine Bleomycin-induzierte Aktivierung des kutanen RAS wäre nachweisbar durch Messung des intrakutanen Ang II.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Bestimmung der Ang II-Level in der Haut der behandelten Tiere verzichtet, da die Bestimmung von Ang II technisch äußerst anspruchsvoll ist. Aber aufgrund der bereits mehrfach nachgewiesenen Wirksamkeit von AT<sub>1</sub>-Blockern bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose [Otsuka et al., 2004; Marshall et al., 2004] und der Tatsache, dass in in vitro-Versuchen an Alveolarzellen eine zeitabhängige, Bleomycin-induzierte

Überexpression von Angiotensinogen nachgewiesen werden konnte [Li et al., 2003], kann davon ausgegangen werden, dass die Ang II-Level in den betroffenen Hautarealen erhöht waren.

Dies unterstreicht die Vermutung, dass die scheinbar bessere anti-fibrotische Wirksamkeit einer AT<sub>1</sub>-Blockade in der vorliegenden Arbeit auf eine Hemmung des übermäßig aktivierten RAS und des somit übermäßig stimulierten AT<sub>1</sub>-Rezeptors zurückzuführen ist. Bei dieser übermäßigen Aktivierung des RAS könnte außerdem eine AT<sub>1</sub>-Blockade zusätzlich zu einer Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors führen: Durch das Überangebot an Ang II und die Hemmung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors bindet Ang II vermehrt an den AT<sub>2</sub>-Rezeptor und aktiviert diesen. So wäre es denkbar, dass eine AT<sub>1</sub>-Blockade gleich zwei Effekte hat: einerseits die Hemmung der weiteren Stimulation des pro-fibrotisch und pro-inflammatorisch wirkenden AT<sub>1</sub>-Rezeptors und andererseits eine vermehrte Aktivierung des AT<sub>2</sub>-Rezeptors, welcher anti-fibrotische und anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt. Hierfür spricht ebenfalls, dass bei SSc-assoziiertem Raynaud-Phänomen eine AT<sub>1</sub>-Blockade eine scheinbar bessere Wirksamkeit im Vergleich zu ACE-Hemmern (bei welchen keine indirekte AT<sub>2</sub>-Stimulation erfolgt) besitzt. So reduzierte eine 15-wöchige Behandlung mit Losartan bei SSc-Patienten und bei Patienten mit Raynaud-Phänomen die Häufigkeit der Attacken und den Schweregrad der Erkrankung, während eine Langzeit-Behandlung mit dem ACE-Hemmer Quinapril keinen Effekt zeigte [Dziedzic et al., 1999; Gliddon et al., 2007].

Trotz der in dieser Arbeit gezeigten therapeutischen Wirksamkeit einer pharmakologischen Interferenz mit dem RAS im Modell der Sklerodermie, welche sowohl eine Hemmung der Inflammation als auch der Fibrose umfasst, kann anhand der vorliegenden Arbeit nicht entschieden werden, ob eine Aktivierung des kutanen RAS eine primäre Ursache der SSc ist oder ob dies nur ein sekundäres Phänomen der Erkrankung darstellt.

### **4.5 Übertragbarkeit des Modells**

Eine weitere Frage ist die Übertragbarkeit des angewandten Modells auf den Menschen. So stellt dieses Sklerodermie-Modell nur eine Vereinfachung der sehr komplexen und teilweise noch nicht verstandenen Pathomechanismen der SSc beim Menschen dar. Das Bleomycin-Modell ist allerdings trotzdem eines der wenigen anerkannten Modelle einer experimentellen Sklerodermie und ein Standardmodell zur Testung neuer Therapieansätze [Yamamoto et al., 1999; Murota et al., 2003; Christner und Jimenez, 2004; Ferreira et al., 2006]

Auch zur Klärung der Frage einer Übertragbarkeit dieses auf die Haut beschränkten Modells auf die systemische SSc sind noch weitere Untersuchungen notwendig.

### 4.6 Ausblick

Obwohl die hier vorgelegte Arbeit also noch einige Fragen offen lässt, so zeigt sie doch erstmals einen eindeutigen therapeutischen Effekt der pharmakologischen Interferenz mit dem RAS durch AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blockade und durch AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation im Modell der SSc. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten unterstützen also die Hypothese, dass eine pharmakologische Interferenz mit dem RAS eine mögliche Therapieoption bei der SSc darstellen könnte. Dies gilt insbesondere für die bereits seit vielen Jahren in der kardiovaskulären Therapie eingesetzten AT<sub>1</sub>-Antagonisten, die sich durch ein sehr günstiges Risikoprofil auszeichnen und daher eine gute Ergänzung oder Alternative zu den bisher häufig bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises eingesetzten Pharmaka mit immunsuppressiver Wirkung darstellen könnten. Ob AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten tatsächlich bei der SSc des Menschen wirksam sind, müsste natürlich erst noch in klinischen Studien überprüft werden.

AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten befinden sich zurzeit noch in der präklinischen Entwicklung und bieten sich daher als eine therapeutische Überlegung erst für die Zukunft an.

Mithilfe der vorliegenden Arbeit konnten so erste Erkenntnisse über eine mögliche therapeutische Wirksamkeit einer Hemmung des AT<sub>1</sub>- bzw. einer Aktivierung des AT<sub>2</sub>-Rezeptors für die Behandlung der SSc gewonnen und mögliche neue Therapieansätze der SSc aufgezeigt werden.

## 5 Zusammenfassung

Die systemische Sklerodermie (SSc) ist eine generalisierte Erkrankung noch ungeklärter Ätiologie. Gekennzeichnet ist diese zu den Kollagenosen gehörende Multisystemerkrankung durch eine Überproduktion von Kollagen und damit einhergehender Fibrosierung. Hauptmanifestationsort ist die Haut. Darüberhinaus sind aber auch Affektionen innerer Organe, wie Gastrointestinaltrakt, Lunge, Niere und Herz, zu finden. Aufgrund der bisher unzureichenden Therapiemöglichkeiten dieser seltenen Erkrankung stellt die SSc noch heute ein großes medizinisches Problem dar. Obwohl AT<sub>1</sub>-Blocker und ACE-Hemmer als Therapie der ersten Wahl bei renaler Krise im Rahmen der SSc bereits heute therapeutisch eingesetzt werden, ist eine pharmakologische Interferenz mit dem Renin-Angiotensin-System (RAS) als generelles Therapiekonzept bei der SSc noch nicht getestet worden. Doch gibt es Hinweise, dass das RAS sowohl an der fibrotischen als auch an der inflammatorischen Komponente dieser Erkrankung beteiligt ist. Hierzu gehört die Erkenntnis, dass in der Haut ein lokales RAS existiert, welches unabhängig von systemischen Einflüssen ist. Während Angiotensin II (Ang II) über seinen am besten charakterisierten Rezeptor, AT<sub>1</sub>, pro-inflammatorisch und pro-fibrotisch wirkt, zeigt eine Aktivierung des AT<sub>2</sub>-Rezeptors gegenteilige Effekte.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob eine pharmakologische Interferenz mit dem RAS, entweder durch Blockade des AT<sub>1</sub>- oder durch Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors, als generelles Therapiekonzept der SSc wirksam ist und ob hierdurch die bei der SSc charakteristische Fibrose und Inflammation effektiv gehemmt werden können.

Hierzu kam ein etabliertes Modell zur Anwendung, in welchem wiederholte, lokale, subkutane Injektionen von Bleomycin zu Sklerodermie-ähnlichen Veränderungen in der Haut führen. Bleomycin (0.1 mg) wurde weiblichen C3/HeJ Mäusen über einen Zeitraum von 4 Wochen jeden 2. Tag subkutan (s.c.) injiziert, Kontrolltiere erhielten Injektionen des Vehikels (NaCl 0.1 ml). Die Behandlung der Tiere erfolgte täglich entweder mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten Candesartan (0.1 mg/kg Körpergewicht s.c.) oder mit dem AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten Compound 21 (0.3 mg/kg Körpergewicht s.c.).

Compound 21 ist ein neuer, selektiver, nicht-peptidischer AT<sub>2</sub>-Agonist, welcher sich derzeit in der präklinischen Entwicklung befindet.



## Zusammenfassung

Nach 28 Tagen Behandlung wurden die Hautareale im Bereich der Injektionen entnommen und für weitere Untersuchungen aufbereitet. Ultradünne Kryoschnitte der Hautproben wurden (immun-) histologisch untersucht, die fibrotischen und inflammatorischen Marker per RT-PCR und Western Blot analysiert.

Die nach 4 Wochen Behandlung mit Bleomycin aufgetretenen fibrotischen und inflammatorischen Veränderungen zeigten sich in den histologischen Analysen der HE-Färbung durch eine deutliche Zunahme der Extrazellulärmatrix mit begleitenden entzündlichen Infiltraten. Auch die für die Sklerodermie typische perivaskuläre Fibrose konnte nachgewiesen werden. Mithilfe der Picosirius-Rot-Färbung und der Immunhistologie konnte insbesondere eine Zunahme an Kollagen Typ I in der Bleomycin-Gruppe gezeigt werden. In der Candesartan- bzw. Compound 21-Gruppe zeigte sich eine deutliche Reduktion an Extrazellulärmatrix, insbesondere an Kollagen Typ I; inflammatorische Infiltrate waren hier nicht nachweisbar. Die Behandlung mit AT<sub>1</sub>-Antagonist bzw. AT<sub>2</sub>-Agonist zeigte also in den histologischen Untersuchungen einen anti-fibrotischen und anti-inflammatorischen Effekt.

Die in den histologischen Untersuchungen nachweisbare anti-inflammatorische Wirkung einer AT<sub>1</sub>-Blockade bzw. AT<sub>2</sub>-Stimulation konnte auf mRNA- und Proteinebene bestätigt werden. So zeigte Interleukin-6 (IL-6) in der Bleomycin-Gruppe ein gesteigertes Expressionsniveau und eine erhöhte Proteinkonzentration im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Candesartan bzw. Compound 21 führten zu einer signifikanten Hemmung der Bleomycin-induzierten Überexpression und vermehrten Proteinsynthese dieses in der Pathogenese der SSc so wichtigen Markers.

Der mittels semiquantitativer RT-PCR detektierte pro-fibrotische und pro-inflammatorische Marker *Monocyte-chemoattractant protein-1* (MCP-1) war allein in der Bleomycin-Gruppe nachweisbar. Die Behandlung mit Candesartan bzw. Compound 21 konnte die Bleomycin-induzierte Expression von MCP-1 komplett hemmen.

TGF- $\beta$ , einer der wichtigsten pro-fibrotischen Mediatoren, war auf Proteinebene ebenfalls allein in der Bleomycin-Gruppe nachweisbar, nicht jedoch in der mit Candesartan bzw. Compound 21 behandelten Gruppe. Auch hier konnte der anti-fibrotische Effekt einer AT<sub>1</sub>-Blockade bzw. AT<sub>2</sub>-Stimulation bestätigt werden.

Desweiteren konnte die in den histologischen Untersuchungen nachgewiesene Überexpression von Kollagen Typ I in der Bleomycin-Gruppe sowie der anti-fibrotische Effekt sowohl von Candesartan als auch von Compound 21 auf Proteinebene unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Kollagen Typ I bestätigt werden. In den beiden Behandlungsgruppen zeigte sich eine deutliche Reduktion der Kollagen Typ I-Proteinkonzentration.

## Zusammenfassung

Da die reduzierte Expression von Kollagen Typ I sowohl auf einer reduzierten Syntheserate als auch auf einem vermehrten Abbau beruhen kann, wurde neben der Expression von Kollagen I und dem die Kollagen-Synthese fördernden TGF- $\beta$  auch die Expression von Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) untersucht, einem Enzym, das für den Kollagen-Abbau maßgeblich verantwortlich ist. In der Bleomycin-Gruppe war eine tendenziell erhöhte Expression von MMP-9-mRNA im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nachweisbar, während die Behandlung mit Candesartan bzw. Compound 21 zu einer weiteren, bei Candesartan signifikanten, Erhöhung der MMP-9-Expression führte.

Die erhöhte Degradierung in der Candesartan-Gruppe konnte in den histologischen Schnitten nachvollzogen werden; die Präparate dieser Gruppe fielen durch überwiegend dünnere, weniger stark vernetzte Kollagenfibrillen, wie sie Kollagen Typ III aufweist, auf.

In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl durch Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors als auch durch Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors eine deutliche anti-fibrotische und anti-inflammatorische Wirkung im Rahmen Sklerodermie-ähnlicher Hautveränderungen erzielt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten neue Wege in der Therapie fibrotischer Erkrankungen, im Besonderen der Sklerodermie, aufzeigen. So könnte eine pharmakologische Interferenz mit dem kutanen RAS, entweder mittels AT<sub>1</sub>-Blockade oder mittels AT<sub>2</sub>-Stimulation, einen neuen Therapieansatz zur Inhibierung der Fibrose und der Inflammation bei SSc darstellen. Möglicherweise kann dieser Therapieansatz auch darüber hinausgehend bei anderen Erkrankungen mit ähnlichen Pathomechanismen Verwendung finden.

## 6 Literaturübersicht

- Adams** KM and Nelson JL (2004) Microchimerism: an investigative frontier in autoimmunity and transplantation. *JAMA* 291(9):1127–1131.
- Ali** SM, Laping NJ, Fredrickson TA et al. (1998) Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates proteinuria and renal TGF-beta 1 mRNA expression in rats with chronic renal disease. *Pharmacology* 57:20–27.
- American Rheumatism Association (ARA)** (1981) Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Bull Rheum Dis* 31(1):1-6.
- Bakowska** J and Adamson IYR (1998) Collagenase and Gelatinase activities in bronchoalveolar lavage fluids during Bleomycin-induced injury. *Journal of Pathology* 185:319-323.
- Campbell** DJ (1987) Circulating versus local renin–angiotensin systems. *J Clin Invest* 79:1-6.
- Chaturvedi** N, Porta M, Klein R et al. (2008) Effect of candesartan on prevention (DIRECT-Prevent 1) and progression (DIRECT-Protect 1) of retinopathy in type 1 diabetes: randomised, placebo-controlled trials. *The Lancet* 372 (9647):1394-1402.
- Christner** PJ, Jimenez SA (2004) Animal models of systemic sclerosis: insights into systemic sclerosis pathogenesis and potential therapeutic approaches. *Curr Opin Rheumatol* 16: 746-52.
- Corbel** M, Caulet-Maugendrez S, Germain N, Molet S, Lagente V, Boichot E (2001) Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat. *J Pathol* 193:538-545.
- Cuntai** Z, Shinji Y, Koichiro K et al. (2006) Blockade of Angiotensin II Type 1 Receptor Improves the Arrhythmia Morbidity in Mice With Left Ventricular Hypertrophy. *Circ J* 2006; 70:335-341.
- De Gasparo** M, Catt KJ, Inagami T, Wright W, Unger T (2000) International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacological Reviews* 52(3):415-472.
- Dziadzio** M, Denton CP, Smith R et al. (1999) Losartan therapy for Raynaud’s phenomenon and scleroderma. *Arthritis Rheum* 42:2646-55.
- Edling** O, Gohlke P, Paul P et al. (1995) Physiology of the renin–angiotensin-system. In: Schachter M, ed. *ACE inhibitors: current use and future prospects*. London: Martin Dunitz Ltd,:3–19.
- Epstein** EH (1974) [ctI(III)]a human skin collagen. *J Biol Chem* 249:3225-3231.

- Feghali CA**, Bost KL, Boulware DW, Levy LS (1994) Control of IL-6 expression and response in fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Autoimmune* 17:309-318.
- Ferreira AM**, Takagawa S, Fresco R, Zhu X, Varga J, DiPietro LA (2006) Diminished Induction of Skin Fibrosis in Mice with MCP-1 Deficiency. *Journal of Investigative Dermatology* 126:1900-1908.
- Finch WR**, Rodnan GP, Buckingham RB, Prince RK, Winkelstein A (1980) Bleomycin-induced scleroderma. *J Rheumatol* 7:651-659.
- Fujiyama S**, Matsubara H, Nozawa Y et al. (2001) Angiotensin AT1 and AT2 receptors differentially regulate angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis by modulating heparin binding epidermal growth factor (EGF)-mediated EGF receptor transactivation. *Circ Res* 88:22-9.
- Fukuda Y**, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, Yamanaka N (1998) Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest* 78:687-98.
- Gharaee-Kermani M**, Denholm EM, Phan SH (1996) Costimulation of Fibroblast Collagen and Transforming Growth Factor b1 Gene Expression by Monocyte Chemoattractant Protein-1 via Specific Receptors. *J Biol Chem* 271(30):17779-84.
- Ghiggeri GM**, Oleggini R, Musante L, Caridi G, Gusmano R, Ravazzolo R (2000) A DNA element alpha 1 type III collagen promoter mediates a stimulatory response by angiotensin II. *Kidney Int* 58:537-48.
- Gliddon AE**, Doré CJ, Black CM et al. (2007) Prevention of Vascular Damage in Scleroderma and Autoimmune Raynaud's Phenomenon. *Arthritis Rheum* 56(11):3837-46.
- Harrisons** Innere Medizin – Deutsche Ausgabe in Zusammenarbeit mit der Charité (2005), 16. Auflage, Band 2: 2128-2138.
- Hasegawa M**, Sato S and Takehara K (1999) Augmentation of production of chemokines (monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1a (MIP-1a) and MIP-1b) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1a may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 117:159-165.
- Haustein UF**, Ziegler V, Herrmann K (1992) Chemisch induzierte Sklerodermie. *Hautarzt* 43:469-474.
- Herold G** und Mitarbeiter (2009) *Innere Medizin*: 637-639.

- Hoshino M**, Takahashi M, Takai Y, Sim J (1999) Inhaled corticosteroids decrease subepithelial collagen deposition by modulation of the balance between matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 104:356-63.
- Huang XC**, Richards EM, Summers C (1996) Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. *J Biol Chem* 271:15635-41.
- Hügler T**, Schuetz P, Daikeler T et al. (2010) Late-onset systemic sclerosis—a systematic survey of the EULAR scleroderma trials and research group database. *Rheumatology online* (Accessed November, 2, 2010, at [rheumatology.oxfordjournals.org](http://rheumatology.oxfordjournals.org)).
- Jimenez SA** and Artlett CM (2005) Microchimerism and systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 17(1):86-90.
- Junqueira LCU**, Bignolas G, Brentani RR (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochemical Journal* 11:447-455.
- Junqueira LCU**, Montes GS, Sanchez EM (1982) The Influence of Tissue Section Thickness on the Study of Collagen by the Picrosirius-Polarization Method. *Histochemistry* 74:153-156.
- Kagami S**, Border WA, Miller DE, Noble NA (1994) Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- $\beta$  expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 93:2431-7.
- Kambayashi Y**, Bardhan S, Takahashi K et al. (1993) Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem* 268(33):24543-6.
- Karlsson C**, Lindell K, Ottosson M, Sjöström L, Carlsson B, Carlsson LM (1998) Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3925-9.
- Kaschira E** and Unger T (2003). "Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function." *Blood Press* 12(2):70-88.
- Kaschira E**, Grzesiak A, Li J et al. (2008) Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation* 118(24):2523-32.

- Kassiri Z, Zhong J, Guo D et al. (2009)** Loss of Angiotensin-Converting Enzyme 2 Accelerates Maladaptive Left Ventricular Remodeling in Response to Myocardial Infarction. *Circ Heart Fail.* 2:446-455.
- Kawaguchi Y, Takagi K, Hara M et al. (2004)** Angiotensin II in the Lesional Skin of Systemic Sclerosis Patients Contributes to Tissue Fibrosis Via Angiotensin II Type 1 Receptors. *Arthritis & Rheumatism* 50(1):216-226.
- Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith E, LeRoy C, Trojanowska M (1998)** Increased Expression of TGF- $\beta$ -Receptors by Scleroderma Fibroblasts: Evidence of Contribution of Autocrine TGF- $\beta$  Signaling to Scleroderma Phenotype. *The Journal of Investigative Dermatology* 110(1):47-51.
- Keogh KA, Standing J, Kane GC, Terzic A, Limper AH (2005)** Angiotensin II antagonism fails to ameliorate bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Eur Respir J* 25:708-714.
- Kikuchi K, Kubo M, Hoashi T, Tamaki K (2002)** Decreased MMP-9 activity in the serum of patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Clinical and Experimental Dermatology* 27:301-305.
- Kim WU, Min SY, Cho ML et al. (2005)** Elevated matrix metalloproteinase-9 in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 7:71-79.
- King SL, Lichtler AC, Rowe DW et al. (1994)** Bleomycin stimulates pro $\alpha$ 1(I) collagen promoter through transforming growth factor- $\beta$  response element by intracellular and extracellular signaling. *J Biol Chem* 269:13156–13161.
- Kintscher U, Foryst-Ludwig A, Unger T (2008)** Inhibiting angiotensin type 1 receptors as a target for diabetes. *Expert Opin Ther Targets* 12(10):1257-63.
- Kossakowska AE, Edwards DR, Lee SS et al. (1998)** Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *Am J Pathol* 153:1895-902.
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Laviades C, Varo N, Fernández J et al. (1998)** Abnormalities of the Extracellular Degradation of Collagen Type I in Essential Hypertension. *Circulation* 98:535-540.
- Lavoie JL and Sigmund CD (2003)** Minireview: overview of the renin-angiotensin system - an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 144(6):2179-83.
- LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R et al. (1988)** Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 15(2):202-5.

- LeRoy** EC and Medsger TA Jr (2001) Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 28(7):1573–1576.
- Lever** WF and Schaumburg-Lever G (1983) *Histopathology of the skin*, 6th edn. JB Lippincott, Philadelphia.
- Li** X, Zhang H, Soledad-Conrad V, Zhuang J, Uhal BD (2003) Bleomycin-induced apoptosis of alveolar epithelial cells requires angiotensin synthesis de novo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(3):501-7.
- Livak** KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods* 25(4): 402-408.
- Lucius** R, Gallinat S, Rosenstiel P, Herdegen T, Sievers J, Unger T (1998) The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med* 188:661–670.
- Marshall** RP, McAnulty RJ, Laurent GJ (2000) Angiotensin II is mitogenic for human lung fibroblasts via activation of the type 1 receptor. *Am Respir Crit Care Med* 161:1999–2004.
- Marshall** RP, Gohlke P, Chambers RC et al. (2004) Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:156-164.
- Martin** MM, Su B, Elton TS (1994). "Molecular cloning of the human angiotensin II type 2 receptor cDNA." *Biochem Biophys Res Commun* 205(1):645-51.
- Masi** AT, Rodnan GP, Medsger TA et al. (1980) Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 23:581-590.
- Massagué** J (1990) The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annu Rev Cell Biol* 6:597-641.
- McCormick** LL, Zhang Y, Tootell E, Gilliam AC (1999) Anti-TGF-beta treatment prevents skin and lung fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease: A model for human scleroderma. *J Immunol* 163:5693–5699.
- Meiko** H, Masaru I, Ayumi I et al. (2006) Comparison of inhibitory action of candesartan and enalapril on brain ischemia through inhibition of oxidative stress. *Neuropharmacology* 51:822-828.
- Min** LJ, Cui TX, Yahata Y et al. (2004) Regulation of collagen synthesis in mouse skin fibroblasts by distinct angiotensin II receptor subtypes. *Endocrinology* 145:253-60.
- Montagnana** M, Volpe A, Lippi G et al. (2007) Relationship between matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of matrix metalloproteinases systems and autoantibody patterns in systemic sclerosis. *Clinical Biochemistry* 40:837-842.

- Montes GS**, Krisztán RM, Shigihara KM, Tokoro R, Mourão PA, Junqueira LC (1980) Histochemical and morphological characterization of reticular fibers. *Histochemistry* 65:131-141.
- Mountz JD**, Downs Minor MB, Turner R, Thomas MB, Richards F, Pisko E (1983) Bleomycin-induced cutaneous toxicity in the rat: analysis of histopathology and ultrastructure compared with progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Br J Dermatol* 108:679-686.
- Murota H**, Hamasaki Y, Nakashima T, Yamamoto K, Katayama I, Matsuyama T (2003) Disruption of tumor necrosis factor receptor p55 impairs collagen turnover in experimentally induced sclerodermic skin fibroblasts. *Arthritis Rheum* 48:1117-1125.
- Nakajima M**, Hutchinson HG, Fujinaga M et al. (1995) The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10663-7.
- Nishimoto M**, Takai S, Kim S et al. (2001) Significance of chymase-dependent angiotensin II-forming pathway in the development of vascular proliferation. *Circulation* 104:1274-9.
- Nouet S** and Nahmias C (2000) Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol Metab* 11:1-6.
- Ogbuihi S** and Zink P (1988) Über Veränderungen des Mengenverhältnisses von Kollagen Typ I und III im interlobulären Lungeninterstitium beim plötzlichen Kindstod - eine Pilotstudie. *Z Rechtsmed* 101:247-254.
- Onal IK**, Altun B, Onal ED, Kirkpantur A, Oz SG, Turgan C (2009) Serum levels of MMP-9 and TIMP-1 in primary hypertension and effect of antihypertensive treatment. *European Journal of Internal Medicine* 20(4):369-372.
- Otsuka M**, Takahashi H, Shiratori M, Chiba H, Abe S (2004) Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by candesartan cilexetil, an angiotensin II type 1 receptor antagonist. *Thorax* 59:31-8.
- Pfeffer MA**, Swedberg K, Granger CB et al. (2003) Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *The Lancet* 362(9386):759-766.
- Pinkus H** and Mehregan AH (1981) *A guide to dermatohistopathology*, 3rd edn. Appleton-Century-Crofts, New York.
- Richard V**, Hurel-Merle S, Scalbert E et al. (2001) Functional evidence for a role of vascular chymase in the production of angiotensin II in isolated human arteries. *Circulation* 104:750-2.



- Rompe F, Artuc M, Hallberg A et al. (2010)** Direct Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation Acts Anti-Inflammatory Through Epoxyeicosatrienoic Acid and Inhibition of Nuclear Factor B. *Hypertension*. 55:924-931.
- Schieffer B, Bunte C, Witte J et al. (2004)** Comparative effects of AT1-antagonism and angiotensin-converting enzyme inhibition on markers of inflammation and platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology* 44(2):362-368.
- Siegert A, Ritz E, Orth S, Wagner J (1999)** Differential regulation of transforming growth factor receptors by angiotensin II and transforming growth factor-beta1 in vascular smooth muscle. *J Mol Med* 77:437-445.
- Sjolie AK, Klein R, Porta M et al. (2008)** Effect of candesartan on progression and regression of retinopathy in type 2 diabetes (DIRECT-Protect 2): a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* 372(9647):1385-1393.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al. (1985)** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150(1):76-85.
- Solomon SD, Wang D, Finn P et al. (2004)** Effect of Candesartan on Cause-Specific Mortality in Heart Failure Patients. The Candesartan in Heart failure Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) Program. *Circulation* 110:2180-2183.
- Steckelings UM, Wollschlager T, Peters J, Henz BM, Hermes B, Artuc M (2004)** Human skin: source of and target organ for angiotensin II. *Exp Dermatol* 13:148-54.
- Steckelings UM, Henz BM, Wiehstutz S, Unger T, Artuc M (2005)** Differential expression of angiotensin receptors in human cutaneous wound healing. *British Journal of Dermatology* 153:887-893.
- Steen VD, Costantino JP, Shapiro AP, Medsger TA Jr (1990)** Outcome of renal crisis in systemic sclerosis: relation to availability of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Ann Intern Med* 113:352-7.
- Steen VD (2003)** Scleroderma renal crisis. *Rheum Dis Clin North Am* 29:315-33.
- Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T (1995)** The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 95: 651-7.
- Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J (2003)** Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 35:881-900.

- Takagawa S, Lakos G, Mori Y, Yamamoto T, Nishioka K, Varga J (2003)** Sustained activation of fibroblast transforming growth factor-beta/Smad signaling in a murine model of scleroderma. *J Invest Dermatol* 12:41-50.
- Takeda K, Hatamochi A, Ueki H, Nakata M, Oishi Y (1994)** Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 103(3):359-63.
- Takeda and Kondo (2001)** Differences between squamous cell carcinoma and keratoacanthoma in angiotensin type-1 receptor expression. *Am J Pathol* 158:1633-7.
- Tsuzuki S, Ichiki T, Nakakubo H et al. (1994)** Molecular cloning and expression of the gene encoding human angiotensin II type 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 200(3):1449-54.
- Uhal BD, Gidea C, Bargout R et al. (1998)** Captopril inhibits apoptosis in human lung epithelial cells: a potential antifibrotic mechanism. *Am. J. Physiol.* 275:1013-1017.
- Umezawa H (1965)** Bleomycin and other antitumor antibiotics of high molecular weight. *Antimicrob Agents Chemother* 5:1079-1085.
- Unger T, Chung O, Csikos T et al. (1996)** Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl.* 14(5): 95-103.
- Unger T (1999)** The angiotensin type 2 receptor: variations of an enigmatic theme. *J Hypertens* 17(12):1775-86.
- Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A (1990)** Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem* 265:22348-57.
- Urata H, Nishimura H, Ganten D (1996)** Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans. *Am J Hypertens* 9:277-84.
- Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA and Opdenakker G (2002)** Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37:375-536.
- Venkatesan N, Punithavathi V, Chandrakasan G (1997)** Curcumin protects bleomycin-induced lung injury in rats. *Life Sci.* 61:51-58.
- Wan Y, Wallinder C, Plouffe B et al. (2004)** Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT2 receptor agonist. *J Med Chem* 47:5995-6008.
- Weber KT, Sun Y, Katwa LC, Cleutjens JP (1997)** Tissue repair and angiotensin II generated at sites of healing. *Basic Res Cardiol* 92:75-78.
- Weber KT, Swamynathan SK, Guntaka RV, Sun Y (1999)** Angiotensin II and extracellular matrix homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 31:395-403.

- Westergren-Thorsson** G, Hermnäs J, Särnstrand B, Oldberg A, Heinegård D, Malmström A (1993) Altered expression of small proteoglycans, collagen and transforming growth factor- $\beta$ 1 in developing bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *J Clin Invest* 92:632-637.
- Wu** L, Iwai M, Nakagami H et al. (2001) Roles of angiotensin II type 2 receptor stimulation associated with selective angiotensin II type 1 receptor blockade with valsartan in the improvement of inflammation-induced vascular injury. *Circulation* 104:2716-21.
- Yamamoto** T, Takagawa S, Katayama I et al. (1999) Animal model of sclerotic skin I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J. Invest. Dermatol.* 112:456-462.
- Yamamoto** T, Eckes B, Krieg T (2000) Bleomycin increases steady-state levels of type I collagen, fibronectin and decorin mRNAs in human skin fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 292:556-561.
- Yamamoto** T and Nishioka K (2003) Role of monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor, CCR-2, in the pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma. *J Invest Dermatol* 12:510-516.
- Yamamoto** T and Nishioka K (2005) Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. *Exp Dermatol* 14:81–95.
- Yamamoto** T (2009) Scleroderma – Pathophysiology. *Eur J Dermatol* 19(1):14-24.
- Yamamoto** T (2010) Animal model of systemic sclerosis. *Journal of Dermatology* 37:26-41.
- Yao** HW, Zhu JP, Zhao MH, Lu Y (2006) Losartan Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats. *Respiration* 73:236-242.
- Zhang** Y, McCormick LL, Gilliam AC (2003) Latency-associated peptide prevents skin fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma. *J Invest Dermatol* 121:713-719.

**7 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1	Kutane Manifestationen an den Fingern bei SSc	Seite 10
Abbildung 2	Algorithmus für die multifaktoriellen Pathomechanismen der SSc	Seite 13
Abbildung 3	Das Renin-Angiotensin-System	Seite 17
Abbildung 4	Morphologie der Haut	Seite 19
Abbildung 5	Behandlungsschema	Seite 31
Abbildung 6	Beispiel für charakteristisches Temperaturprofil und Amplifikationskurve einer Real-Time PCR	Seite 40
Abbildung 7	Funktionsweise der Immundetektion	Seite 45
Abbildung 8	HE-Färbung 7 µm dicker Hautschnitte der mit Bleomycin und Candesartan 10 mg/kg behandelten Gruppe	Seite 51
Abbildung 9	HE-Färbung 7 µm dicker Hautschnitte	Seite 52
Abbildung 10	Picrosirius-Rot-Färbung 7 µm dicker Hautschnitte unter Lichtmikroskopie	Seite 54
Abbildung 11	Picrosirius-Rot-Färbung 7 µm dicker Hautschnitte unter polarisiertem Licht	Seite 56
Abbildung 12	Kollagen Typ I Immunhistologie 7 µm dicker Hautschnitte	Seite 58
Abbildung 13	Vergleich der IL-6-mRNA-Expression	Seite 59
Abbildung 14	Vergleich der IL-6-Expression mittels Immunoblot	Seite 60
Abbildung 15	Vergleich der MCP-1-mRNA-Expression	Seite 61
Abbildung 16	Vergleich der TGF-β-Expression	Seite 62
Abbildung 17	Vergleich der Kollagen Typ I-Expression	Seite 64
Abbildung 18	Densitometrische Auswertung des in Abbildung 16 dargestellten Western Blots mittels Analyse durch ImageJ	Seite 64
Abbildung 19	Vergleich der MMP-9-mRNA-Expression	Seite 65
Abbildung 20	Schematische Darstellung der möglichen Pathogenese der Bleomycin-induzierten Sklerodermie	Seite 68

## **8 Publikationsliste**

Eingereicht in Journal of Investigative Dermatology am 24.01.2012.

“Angiotensin AT1-receptor blockade or AT2-receptor stimulation ameliorates inflammation and fibrosis in a mouse model of scleroderma”

Santi F, Wieland A, Ströder K et al. (2012)

### 9 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Thomas Unger für die Überlassung dieses interessanten Themas, die Bereitstellung der räumlichen Mittel und Materialien zur Durchführung der Versuche, die kritische Durchsicht des Manuskripts sowie seine konstruktiven Vorschläge.

Frau Dr. Ulrike Steckelings danke ich für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, die kritische Durchsicht des Manuskripts und ihre konstruktiven Vorschläge, für ihre Hilfsbereitschaft, gute Ideen, die stetige Offenheit zur Diskussion und die konstante Begleitung während der gesamten Arbeit.

Franziska Rompe möchte ich besonders für die gute Einarbeitung und ihre immerwährende und nie versiegende Hilfsbereitschaft danken.

Mein Dank gilt außerdem Francesca Santi, Katja Ströder, Marie Horlbeck, Katja Schwengel, Kristin Lucht, Anne Reichenbach, Maxi Kummert und allen anderen Mitarbeitern des CCR für ihre Kollegialität und große Hilfe.

Pawel Namsolleck danke ich für seine ständige Hilfsbereitschaft und die geduldige Beantwortung meiner immer wieder aufkommenden Fragen.

Dr. Ludovit Paulis danke ich für die Hilfe bei statistischen Fragestellungen.

Bei Herrn Dr. Metin Artuc bedanke ich mich für seine Hilfe gerade bei schwierigen Fragestellungen.

Frau Sprang möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und die Bereitstellung der notwendigen Utensilien danken.

Frau Miranda Schröder danke ich für ihre Fröhlichkeit und die Selbstverständlichkeit mit welcher sie mir immer bei administrativen Problemen geholfen hat.

Als Letztes möchte noch Kristin Lucht für ihre Organisation der wunderbaren Feste des CCR danken.

Außerdem geht ein besonderer Dank an meine Familie und Maximilian für ihre immerwährende Geduld, ihre Unterstützung und ihren Rückhalt.

## Erklärung

### 10 Erklärung

Ich, Anja Wieland erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Das therapeutische Potential der pharmakologischen Interferenz mit dem Renin-Angiotensin-System im Modell der Sklerodermie“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift