

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie  
der Medizinischen Fakultät Charite - Universitätsmedizin  
Berlin

DISSERTATION

# Untersuchungen zur Fibrose bei Peritonealer Dialyse

Beeinflussung der  $TGF\beta_1$  - Expression und der  
Kollagensynthese Humaner Peritonealer Fibroblasten durch  
Glukose, mechanischen Stress, Endothelin1 und  $PDGF_{BB}$

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

vorgelegt an der Medizinischen Fakultät  
Charite - Universitätsmedizin Berlin

von  
Ruth Knorr, geb. Große  
aus Berlin

Gutachter:

1. Priv.-Doz. Dr. med. Stanislao Morgera
2. Prof. Dr. med. Friedrich W. Kemmer
3. Priv.-Doz. Dr. med. Lars Rothermund

Datum der Promotion: 29.02.2008

## Abstract

Peritoneal fibrosis is a common problem in peritoneal dialysis. Some of the main reasons for the induction of peritoneal fibrosis are relapsing peritonitis or non-physiological dialysis fluids. Commercially available, standard peritoneal dialysis fluids are characterized by a high glucose and lactate concentrations as well as a low pH.

In this study in vitro Human Peritoneal Fibroblasts (HPF) were exposed to high glucose and glycerol in order to examine specific glucose mediated effects as well as non-specific hyperosmotic effects. We also analyzed the impact of mechanical stress (fluid shear stress and cellular stretch) on the induction of fibrosis. Last but not least the effects of Platelet-derived Growth Factor (PDGF) and Endothelin on HPF function were studied.

The evaluation of the profibrotic effects occurred by measurement of Transforming Growth Factor  $\beta$  1 ( $TGF\beta_1$ ) and Procollagen-I-N-terminal Propeptid (PINP), which is a split piece of procollagen I. In addition the intracellular actin was stained and the cells were morphologically evaluated in order to note potential changes in cellular shape or cell interaction.

The HPF-cell cultures were taken from different donors. We observed a high variance of  $TGF\beta_1$  and collagen levels. High glucose had a strong profibrotic effect and went along with a high HPF  $TGF\beta_1$  synthesis as well as collagen I protein production. The osmotic glycerol stress and cyclic cellular stretch showed an elevation of collagen synthesis but  $TGF\beta_1$  levels were only moderately increased. PDGF increased  $TGF\beta_1$  and collagen I synthesis. Endothelin had no effect on HPF in regard to profibrotic effects. Mechanical stress caused disaggregation of actin filaments and induced lamellipodia and filopodia.

Fibrotic processes are multifactorial. It could be shown that high glucose but also hyperosmolarity and physical stress is a trigger for fibrosis. The exact mechanism for the induction of fibrosis still remain to be elucidated.

### Keywords:

collagen, glucose, peritoneal fibrosis, TGF-beta, physical stress

## Zusammenfassung

Die Funktion der Peritonealdialyse wird häufig durch die Entstehung einer peritonealen Fibrose begrenzt. Als Hauptursache werden rezidivierende Peritonitiden und die unphysiologische Dialyseflüssigkeit mit ihrem niedrigen pH, hohem Laktat- und Glukosegehalt gesehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde an einem In-vitro-Modell mit humanen peritonealen Fibroblasten (HPF) die spezifische Glukosewirkung im Gegensatz zu unspezifischen hyperosmolaren Glyceroleffekten untersucht. Außerdem wurde die Auswirkung mechanischer Belastung in Form von Scherstress und Dehnung auf die HPF untersucht, sowie die Wirkung von Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und Endothelin.

Die Beurteilung der profibrotischen Effekte erfolgte durch die Messung von Transforming Growth Factor  $\beta$  1 ( $TGF\beta_1$ ) und von Prokollagen-I N-terminales Propeptid (PINP), einem Spaltprodukt von Prokollagen I. Zusätzlich erfolgte eine morphologische Einschätzung der Zellen mittels Anfärbung von intrazellulärem Aktin, um mögliche direkte Zellveränderungen oder Zellinteraktionen zu erfassen.

Die HPF-Spenderlinien zeigten große interindividuelle Varianz der  $TGF\beta_1$  - und Kollagenproduktion. Der profibrotische Effekt von Glukose auf HPF in vitro bestätigte sich auf Proteinebene für  $TGF\beta_1$  und Kollagen. Der osmotische Stress durch Glycerol zeigte eine weitgehend von  $TGF\beta_1$  unabhängige Kollagenerhöhung, ebenso die zyklische Dehnung der Zellen. PDGF steigerte  $TGF\beta_1$  und Kollagen I. Endothelin zeigte keinen profibrotischen Einfluß auf die HPF. Morphologisch zeigte sich unter mechanischem Stress eine aufgelockerte Aktinfilamentanordnung sowie vermehrte Lamellipodien und Filopodien der HPF.

Fibrotische Prozesse sind multifaktoriell. Es konnte gezeigt werden, dass Glukose, sowie hyperosmolarer und mechanischer Stress fibrotische Effekte bei HPF auslösen. Die genauen Wege der Fibroseinduktion bleiben weiterhin offen.

### Schlagwörter:

Kollagen, Glukose, Peritoneale Fibrose, TGF-beta, physikalischer Stress

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Peritonealdialyse und Fibroseformen . . . . .	1
1.2	Transforming Growth Factor und Fibrosierung . . . . .	3
1.3	Endothelin - Vasokonstriktion . . . . .	6
1.4	PDGF - ein Wachstumsfaktor . . . . .	7
1.5	Ziele . . . . .	8
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>9</b>
2.1	Die Humanen Peritonealen Fibroblasten . . . . .	9
2.1.1	Zellisolierung . . . . .	9
2.1.2	Zellkultur . . . . .	10
2.1.3	Kulturmedien . . . . .	11
2.1.4	Mechanischer Zellstress . . . . .	12
2.1.5	Charakterisierung . . . . .	13
2.2	Fluoreszenzfärbung des Aktins . . . . .	15
2.3	Messung von TGF $\beta_1$ im Überstand . . . . .	16
2.3.1	TGF $\beta_1$ ELISA . . . . .	16
2.4	Kollagenbestimmung . . . . .	17

2.4.1	PINP-Radioimmunoassay . . . . .	18
2.4.2	Kollagenmessung mittels <sup>3</sup> [H]-Prolineinbau . . . . .	18
2.5	Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	19
2.6	Proliferationsrate mit <sup>3</sup> [H]-Thymidineinbau . . . . .	19
2.7	Messung von Endothelin im Überstand . . . . .	20
2.8	Endothelin mRNA und ET-Rezeptor mRNA . . . . .	21
2.8.1	Isolierung der mRNA . . . . .	21
2.8.2	Umschreibung in cDNA . . . . .	21
2.8.3	PCR der cDNA . . . . .	22
2.9	Statistische Analysen . . . . .	25
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
3.1	Charakterisierung der HPF . . . . .	28
3.2	Morphologische Veränderungen . . . . .	30
3.3	TGFβ <sub>1</sub> -Konzentration im Überstand . . . . .	34
3.3.1	Glukose und Glycerol . . . . .	35
3.3.2	Endothelin und PDGF . . . . .	37
3.3.3	Schüttelstress . . . . .	38
3.3.4	Dehnungsstress . . . . .	38
3.4	Kollagensynthese . . . . .	41
3.4.1	Glukose und Glycerol . . . . .	41
3.4.2	Endothelin und PDGF . . . . .	41
3.4.3	Schüttelstress . . . . .	43
3.4.4	Dehnungsstress . . . . .	44
3.4.5	Kollagenmessung über Prolineinbau . . . . .	46

3.5	Proteinmengenveränderung . . . . .	48
3.6	Proliferationsrate der Fibroblasten . . . . .	52
3.7	Endothelinexpression und RNA Analyse . . . . .	52
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
4.1	Morphologie und Zytoskelett der HPF . . . . .	56
4.2	Aktivierung der Fibroblasten . . . . .	58
4.3	Glukose . . . . .	62
4.4	TGF $\beta_1$ -Produktion unter erhöhter Glukose . . . . .	63
4.5	TGF $\beta_1$ und Kollagen . . . . .	66
4.6	Endothelin . . . . .	68
4.7	Die Wirkung von PDGF und Endothelin 1 . . . . .	69
4.8	Kollagen und mechanischer Stress . . . . .	72
4.8.1	Der Einfluß von Schüttelstress . . . . .	74
4.8.2	Der Einfluß von Dehnungsstress . . . . .	77
4.9	Ausblick und Therapeutische Ansätze . . . . .	79
4.10	Zusammenfassung . . . . .	82
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>99</b>
A.1	Labormaterialien . . . . .	99
A.2	Geräte . . . . .	100
A.3	Chemikalien . . . . .	101
A.4	Software . . . . .	105
A.5	Abkürzungen . . . . .	106

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Nierenersatztherapie in Deutschland . . . . .	2
2.1	Dehnungsbeanspruchung . . . . .	13
2.2	Boxplotdarstellung . . . . .	26
3.1	Lichtmikroskopische Aufnahme von Fibroblasten mit spezifischer Antikörperfärbung . . . . .	29
3.2	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Aktinfilamenten in Fibroblastenkulturen nach Behandlung mit verschiedenen Medien . . . . .	31
3.3	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Aktinfilamenten in Fibroblastenkulturen nach mechanischem Stress . . .	33
3.4	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Aktinfilamenten in einzelnen Fibroblasten nach mechanischem Stress . .	34
3.5	Änderung von $TGF\beta_1$ durch Glukose und Glycerol . . . . .	36
3.6	Änderung von $TGF\beta_1$ durch Endothelin und PDGF . . . . .	37
3.7	Auswirkung von Schüttelstress auf $TGF\beta_1$ . . . . .	39
3.8	Änderung von $TGF\beta_1$ durch Dehnungsstress . . . . .	40
3.9	Änderung der PINP Konzentration nach 72-stündiger Glukosebehandlung . . . . .	42

3.10	Einfluß von Endothelin und PDGF auf die PINP Konzentration	43
3.11	Änderung der PINP Konzentration nach 72h Schüttelstress .	44
3.12	Änderung von PINP durch zyklische Dehnung. . . . .	45
3.13	Einfluß auf die Prolinmenge . . . . .	47
3.14	Einfluß vom Medium auf die Proteinmenge . . . . .	49
3.15	Einfluß von Schüttelstress auf die Proteinkonzentration . . .	50
3.16	Einfluß von Dehnung auf die Proteinmenge . . . . .	51
3.17	Einfluß auf die Thymidinmenge . . . . .	53
3.18	Endothelinrezeptor A positive HPF . . . . .	55
3.19	Endothelinrezeptor B positive HPF . . . . .	55
3.20	Endothelin Converting Enzyme positive HPF. . . . .	55
3.21	Endothelin 1 Expression in HPF . . . . .	55

# Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Kulturmedien . . . . .	11
2.2	Substanzen für die APAAP-Charakterisierung . . . . .	14
2.3	RNA-Mastermix . . . . .	22
2.4	PCR-Mastermix . . . . .	24
2.5	PCR-Programme . . . . .	24
2.6	Primersequenzen . . . . .	25
3.1	Zusammenhang von Endothelin-RNA, Endothelin-Protein und TGF $\beta_1$ im Überstand . . . . .	54

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Peritonealdialyse und Fibroseformen

Weltweit gibt es schätzungsweise 1,5 Millionen Dialysepatienten im Jahr 2006. Ein großer Anteil davon leben in den USA: 288 000 Hämodialysepatienten und 20 700 Peritonealdialysepatienten [United States Renal Data System, 2002]. In Deutschland wuchs die Zahl der Patienten, die auf Nierenersatztherapie angewiesen waren weiter an (Abb. 1.1). Im Jahr 2005 waren 60 400 Patienten auf Hämodialyse und 3 000 auf Peritonealdialyse angewiesen [Jahresbericht QuaSi-Niere, Stand 31.12.2005]. Im Vergleich zu anderen Ländern hat Deutschland mit 4,8% einen sehr geringen Anteil an Peritonealdialysepatienten. In Spanien, Türkei und Polen liegt der Anteil um die 10%. In Schweden, Großbritannien, den Niederlanden um 25%, und in Neuseeland sogar über 30%. Die Peritonealdialyse bietet, wenn sie für die Patienten in Frage kommt, vor allem eine größere Unabhängigkeit im alltäglichen Leben. Leider ist die Peritonealdialyse auch mit Komplikationen und Risiken behaftet, an erster Stelle Infektionen und Fibrose der peritonealen Strukturen.

Bei der Peritonealdialyse kommt es nach Monaten bis Jahren zu einer Fibrosierung des Peritoneums. Die Zeit bis zum Eintritt einer Fibrosierung

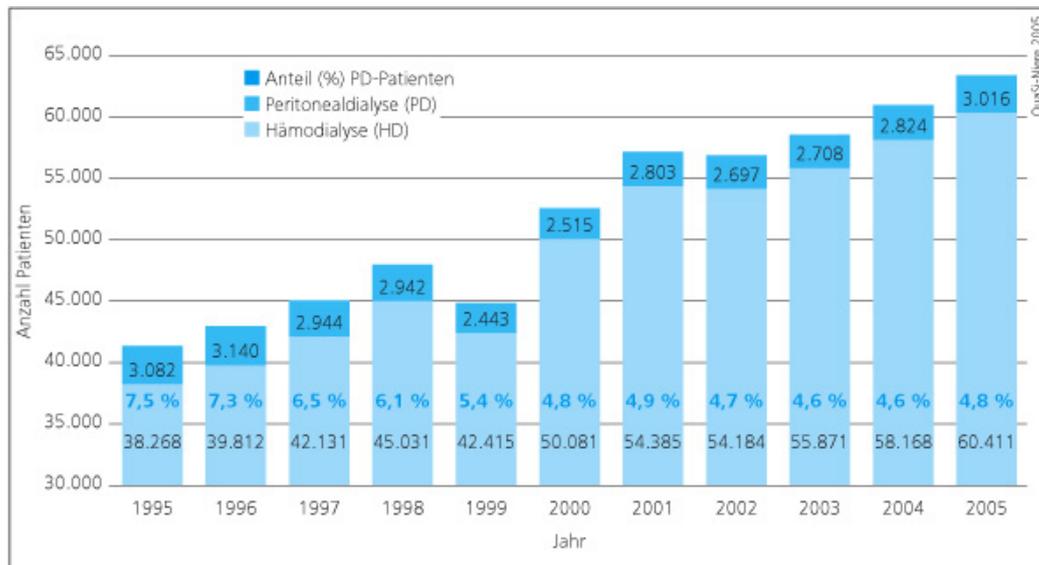


Abbildung 1.1: Entwicklung der Hämodialyse- und Peritonealdialysepatienten 1995-2005 in Deutschland. *Quelle: QuaSi-Niere 2005/2006.*

des parietalen und des organnahen viszeralen Peritoneums ist individuell sehr unterschiedlich. Einerseits leisten Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus, chirurgische Eingriffe im Abdomen, gynäkologische entzündliche Erkrankungen, Karzinome im abdominalen Bereich, chronische ebenso wie akute Peritonitiden einen wesentlichen Beitrag zur Fibrose, zum anderen besteht eine individuell verschiedene Disposition zur Fibrosierung. Im Übergangsbereich von der einfachen Fibrose des Peritoneums bis zu der schwersten Form der sklerosierenden verkapselnden Peritonitis gibt es alle Schweregrade der Erkrankung. Die Zahl der Patienten, die unter Peritonealdialyse eine Fibrose des Peritoneums aufweisen, liegt nach zwei Jahren kontinuierlicher Peritonealdialyse (CAPD) bei 80%, die Prävalenz von sklerosierender Peritonitis liegt bei ca. 4 Fällen pro Tausend Patientenjahre [Di Paolo und Garosi, 1999; Garosi und Di Paolo, 1999].

Die pathologischen Veränderungen beginnen mit Mesothelmodifikationen, nachfolgend einem teilweisen Verlust des Mesothels und einer Verdickung des submesothelialen Bindegewebes. Es zeigen sich chronische

Entzündungsherde, die zum Teil kalzifizieren. An den Gefäßen erkennt man dickere Basalmembranen und eine fibrosierende, sich verdickende Tunica media.

Der Hauptgrund für die Sklerosierung wird in der mangelhaften Biokompatibilität der Dialyseflüssigkeit und einer dadurch bedingten chronischen Irritation der Mesenterien gesehen. Auch in Tiermodellen konnte die Sklerosierung des Peritoneums unter experimentellen Bedingungen nachvollzogen werden [Garosi et al., 1998]. Es ergibt sich die Frage, welche Faktoren dafür verantwortlich sind, dass zum einen der Status einer leichten Sklerosierung des Peritoneums sehr lange erhalten bleibt und zum anderen schwerste Formen der Sklerosierung innerhalb kurzer Zeit entstehen. Bekannt ist, dass  $TGF\beta_1$  die Kollagensynthese in vielen Zellen stimuliert [Iglesias-de la Cruz et al., 2002]. Es ist allerdings nicht für alle Zellen des Peritoneums untersucht, wodurch es zu der verstärkten Ausschüttung von  $TGF\beta_1$  kommt, wie insbesondere mechanischer Stress auf die verschiedenen Zellen des Peritoneums wirkt und welche Zytokine sich im Peritoneum gegenseitig triggern. Diese Fragen sind nicht für alle histologisch zu unterscheidenden Zellen des Peritoneums geklärt. In der Aszitesflüssigkeit von Patienten mit sklerosierender verkapselnder Peritonitis sind Zytokine wie  $TGF\beta_1$ , Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-8, Interleukin-6, Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) und PDGF's erhöht [Masunaga et al., 2003]. Die Wirkung der einzelnen Zytokine und ihre gegenseitige Beeinflussung sind dabei nur zum Teil erforscht.

## **1.2 Transforming Growth Factor und Fibrosierung - ein wichtiges regulierendes Zytokin**

In unseren Untersuchungen an humanen peritonealen Fibroblasten (HPF) haben wir uns einem der entscheidenden profibrotischen Faktoren, dem  $TGF\beta_1$  zugewandt. Wir haben Bedingungen, die zum Anstieg von  $TGF\beta_1$  in

den HPF führen, dargestellt und seine Wirkung auf die Kollagenexpression und die Zellzahl untersucht. Die schon bekannten Fakten zum TGF $\beta_1$  sollen im folgenden kurz dargestellt werden.

Der Transforming Growth Factor beta 1 (TGF $\beta_1$ ) ist ein Zytokin, das von den meisten Zellen exprimiert wird. TGF $\beta$  wirkt autokrin und parakrin. Es ist für die Kontrolle der Zellproliferation von mesenchymalen und epithelialen Zellen, sowie für die Entstehung und die Menge der extrazellulären Matrix verantwortlich. Die Antwort einer Zelle auf TGF $\beta$  ist abhängig von ihrem histogenetischen Typ und ihrem spezifischen Hormon- und Wachstumsfaktormikromilieu. So kann TGF $\beta$  als Wachstumsstimulator oder -hemmer auf die Proliferation und als Regulator von differenzierten Zellfunktionen fungieren. TGF $\beta$  kann den Phänotyp einer Fibroblastensubpopulation in Richtung Myofibroblasten verändern, die vermehrt Kollagen produzieren können [Atamas und White, 2003]. TGF $\beta_1$ , TGF $\beta_2$ , TGF $\beta_3$  sind die bisher bekanntesten Isoformen, die von Mammalier- und Hühnerzellen exprimiert werden. Außerdem wurden weitere Isoformen TGF- $\beta_4$  ebenfalls in Hühnerzellen und TGF- $\beta_5$  in Froschoozyten nachgewiesen [DeGroot, 1995]. Die Gene für TGF $\beta_{1,2,3}$  sind beim Menschen auf den Chromosomen 19, 1 und 14 lokalisiert [Barnard et al., 1990].

TGF $\beta$  wird in den Extrazellularraum als hochmolekularer bioinaktiver Komplex zusammen mit zwei weiteren Proteinen abgegeben, dem latenten TGF $\beta$ -Bindungsprotein (LTBP) und dem TGF $\beta$ -Propeptid. TGF $\beta$  wird aktiviert, wenn extrazellulär LTBP und TGF $\beta$ -Propeptid proteolytisch abgespalten werden. TGF $\beta$  wirkt nicht nur proliferativ begrenzend, sondern auch auf die Differenzierung der Zellen und ihren programmierten apoptotischen Zelluntergang. TGF $\beta$  ist evolutionär hoch konserviert und hat seine wesentlichen Funktionen sowohl bei Fliegen und Würmern als auch bei Mammaliern zu erfüllen. Es kommt im embryonalen und im voll differenzierten Gewebe vor. So wird TGF $\beta$  außer von Fibroblasten auch von Mesothelzellen des Peritoneums [Naiki et al., 2003], glomerulären Mesangiumzellen [Ziyadeh et al., 1994; Hoffman et al., 1998], glatten

Muskelzellen [Chegini et al., 1994] und Makrophagen [Jun et al., 1995] synthetisiert. Die bioaktive Form von TGF $\beta$  ist ein Dimer, das durch hydrophobe Interaktionen zusammen gehalten wird, außerdem hat das Dimer mehrere Disulfidbrücken. Durch die Dimerstruktur von TGF $\beta$  wird eine Komplexbildung mit je zwei TGF $\beta$ -Rezeptoren I und II ermöglicht. Der erst kürzlich entdeckte TGF $\beta$ -Rezeptor III fördert die Bindung von TGF $\beta$  an den TGF $\beta$ -Rezeptor II [Schrijvers et al., 2004].

Die TGF $\beta$ -Rezeptoren I und II sind Transmembranproteine, die Serin-Threonin-Kinasen darstellen, die die Smad-Proteine Smad2 und Smad3 mittels des oben genannten Rezeptorkomplexes phosphorylieren und damit aktivieren und dann das Signal über Smad4 in den Nucleus transduzieren. Hier erfolgt die transkriptionale Antwort, die u.a. zur erhöhten mRNA für extrazelluläre Matrixprodukte führt [Massague, 1998; Shi und Massague, 2003]. In Smad3  $-/-$  knockout Mäusen kann TGF $\beta$  keine Transkription induzieren. Smad3 ist also unerlässlich für eine TGF $\beta$  induzierte Genexpression für Kollagen [Yang et al., 2003]. Smad3 ist aber nicht Voraussetzung für eine Erhöhung von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) wie Schnabl et al. 2001 an Kulturen hepatischer Sternzellen von Smad3  $-/-$  knockout Mäusen zeigen konnte [Schnabl et al., 2001].

Smad6 und Smad7 hemmen die rezeptorvermittelte Smad2 und 3 Phosphorylierung und damit die Translokation in den Nucleus. In die TGF $\beta$ -Signalkaskaden sind auch andere als die bisher erwähnten Proteine eingeschlossen, wie z.B. die p38 mitogen-activated Protein Kinase (MAPK), die für die TGF $\beta$  induzierte Kollagensynthese unerlässlich ist, denn die biochemische Blockade von p38 inhibiert die Kollagenerhöhung [Rodriguez-Barbero et al., 2002]. TGF $\beta$  hat einen negativen oder begrenzenden Effekt auf das Zellwachstum, aber schon eine fehlerhafte Mutation in dieser Signalkaskade kann zur Tumorbildung führen mit stark erhöhter Sekretion von TGF $\beta$ . Das können sowohl Mutationen der TGF $\beta$ - Rezeptoren als auch die der Smad-proteine betreffen. Dann ist der normalerweise proliferativ begrenzende Effekt von TGF $\beta$  aufgehoben und es kommt zu erhöhter

Invasion und Metastasierung des Tumors mit starker TGF $\beta_1$  Expression [Akhurst und Derynck, 2001].

### **1.3 Endothelin - Vasokonstriktion**

Endothelin ist ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptid. Es ist ebenfalls evolutionär hoch konserviert. Es sind bisher drei Isoformen, Endothelin 1, 2 und 3, nachgewiesen. Endothelzellen produzieren fast ausschließlich Endothelin 1. Das durch die Translation der entsprechenden mRNA synthetisierte Preproendothelin wird durch Endothelin-converting Enzym in die vasoaktive Form von Endothelin umgewandelt, was ein hochpotenter Vasokonstriktor und Modulator des Vasotonus ist. Endothelin 1 mRNA wird vermehrt von Endothelzellen nach mechanischem [Yoshizumi et al., 1989] und chemischem Stress und auch nach TGF $\beta_1$ -Gabe [Kurihara et al., 1989; Ohta et al., 1990] gebildet. Herzmuskelzellen, glatte Muskelzellen, Mesothelzellen, renale epitheliale Zellen und glomeruläre Mesangiumzellen, Gliazellen, Makrophagen und Megakaryozyten exprimieren ebenfalls eines der Endotheline [Miyachi und Masaki, 1999; Mathieu et al., 1997; Morgera et al., 2003]. In Fibrozyten, dem Hauptanteil der vorhandenen Zellen im Bindegewebe, wurde kein Endothelin nachgewiesen [Korth et al., 1999]. Der Effekt des Endothelins wird über ET-A, ET-B und ET-C Rezeptoren vermittelt. Diese Rezeptoren sind ubiquitär in zahlreichen Zellen, so auch in Fibroblasten verteilt. Die Wirkung von TGF $\beta$  bezüglich Endothelin scheint je nach Zelltyp zu variieren. Bei Endothelzellen kommt es nach Gabe von TGF $\beta$  zu einer erhöhten ET-1 mRNA Expression [Miyachi und Masaki, 1999; Kurihara et al., 1989].

## 1.4 PDGF - ein Wachstumsfaktor

Die häufigste Form von Platelet-derived Growth Factor (PDGF), der von menschlichen Zellen exprimiert wird, ist ein AB-Heterodimer. Makrophagen, glatte Muskelzellen, Fibrozyten, Endothelzellen, Mesangiumzellen, Neurone und Gliazellen produzieren PDGFs. BB-Homodimere werden von den genannten menschlichen Zellen exprimiert, aber auch in anderen Spezies gefunden. AA-Homodimere werden hauptsächlich von Tumoren (Melanom, Osteosarkom, Glioblastom) exprimiert. Menschliche Thrombozyten exprimieren alle drei Isoformen AA, AB, BB [Hart et al., 1990]. Kürzlich wurden zwei weitere Familienmitglieder der PDGFs, PDGF-CC und PDGF-DD in der Plazenta, in embryonalem Gewebe, in der Niere und in Tumoren gefunden [Changsirikulchai et al., 2002; Gilbertson et al., 2001; Cao et al., 2002]. Es gibt  $\alpha$ - und  $\beta$ -PDGF-Rezeptoren, wobei an die  $\alpha$ -Rezeptoren vier Isoformen von PDGF (AA, AB, BB, CC) binden und an die  $\beta$ -PDGF-Rezeptoren hoch spezifisch nur PDGF-BB und PDGF-DD binden [Becker, 2001; Cao et al., 2002; Li et al., 2005]. PDGF-Rezeptoren werden von der glatten Muskulatur der Gefäße, von Fibroblasten und Gliazellen exprimiert, aber nicht von epithelialen oder endothelialen Zellen [Phillips et al., 1995; Soma und Grotendorst, 1989; Ishikawa et al., 1990; Battegay et al., 1990; Haberstroh et al., 1993]. PDGF fördert die Proliferation von fast allen mesenchymalen Zellen und PDGF-CC vor allem die Angiogenese [Cao et al., 2002; Li et al., 2005]. PDGF wirkt außerdem auf Zellproliferation und Matrixproduktion in humanen proximalen Tubulusepithelien der Niere. Dies geschieht über einen unabhängigen Weg, der nicht durch erhöhte Glukose und den dadurch initiierten TGF $\beta$ -Signalkaskaden beruht [Fraser et al., 2002, 2003].

## 1.5 Ziele

Das Ziel der Arbeit besteht darin, in einem In-vitro-Modell von humanen peritonealen Fibroblasten (HPF) die Wirkung der Dialyseflüssigkeit mit ihrem hohen Glukosegehalt (540 mOsm/kg) auszuwerten. Die spezifische Glukosewirkung soll gegenüber unspezifischen hyperosmolaren Effekten abgegrenzt werden. Außerdem sollen die Auswirkungen von mechanischer Belastung in Form von Scherstress und Dehnung auf die HPF-Zellkulturen untersucht werden. Die Faktoren PDGF und ET-1 sollen in ihrer Wirkung auf die  $TGF\beta_1$ -Synthese und die Kollagensynthese untersucht werden.

Die Beurteilung der profibrotischen Effekte soll durch Messung von  $TGF\beta_1$  und Messung von PINP, einem Spaltprodukt von Prokollagen I erfolgen. Zum anderen soll eine morphologische Einschätzung der verschiedenen Faktoren auf die Zellen selbst und den Aufbau ihres intrazellulären Aktin-gerüsts erfolgen, um mögliche direkte Zellveränderungen oder Zellinteraktionen auf mögliche profibrotische Faktoren zu beobachten.

Im einzelnen soll untersucht werden:

- Welchen Einfluß hat Glukose auf  $TGF\beta_1$  und PINP, d.h. Kollagen I Synthese der HPF?
- Gibt es Unterschiede zwischen Hyperosmolaritätseffekt und Glukoseeffekt?
- Welchen Einfluß haben Endothelin 1 und  $PDGF_{BB}$  einzeln und gemeinsam auf  $TGF\beta_1$  und Kollagen I Synthese der HPF?
- Welchen Einfluß hat mechanischer Scher- und Dehnungsstress auf  $TGF\beta_1$  und Kollagen I Synthese der HPF?
- Gibt es inter- oder intrazellulär morphologische Effekte durch Glukose, Glycerol oder mechanischen Stress?

# Kapitel 2

## Methoden

### 2.1 Die Humanen Peritonealen Fibroblasten

#### 2.1.1 Zellisolierung

Die Isolierung der Humanen Peritonealen Fibroblasten (HPF) erfolgte aus einem ca. 5 cm<sup>3</sup> großen Stück Omentum majus. Dieses wurde während elektiver Operationen des Abdomens entnommen. Die schriftliche Einverständniserklärung der Patienten lag entsprechend dem IRB der Charite vor. Das Gewebe wurde innerhalb von 6 Stunden nach der Operation verarbeitet.

Es kamen zwei verschiedene Methoden zur Anwendung. Zum einen wurden die Fibroblasten mit Trypsin aus dem Gewebe herausgelöst, zum anderen konnte man die Fibroblasten aus kleinen Gewebestücken auswachsen lassen. Bei der zweiten Methode ist zu beachten, dass die Gewebestücke nicht im Medium schwimmen, sondern an einer Stelle der Kulturflasche anhaften.

Bei Anwendung der ersten Methode wurde das Gewebestück zunächst in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurde es

mit 12 bis 20 ml 0,25% Trypsin-EDTA in 50 ml Einmalröhrchen bei 37 °C für 20 min unter ständiger Bewegung inkubiert, um die Mesothelzellen zu entfernen. Da die Zielstellung war, möglichst reine Fibroblastenkulturen zu erhalten, wurde nochmals mit neuem Trypsin-EDTA inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe mit einer sterilen Schere mehrfach eingeschnitten, um die Zellausbeute zu erhöhen. Das so vorbehandelte und eingeschnittene Omentum majus wurde unter Zugabe von 12 ml 0,25% Trypsin-EDTA in ein neues Röhrchen überführt. Die Inkubationszeit betrug 10 min bei 37 °C. In einem weiteren Röhrchen wurde noch einmal mit frischem Trypsin-EDTA inkubiert. Das Gewebestück wurde mit einer sterilen Pinzette aus dem Röhrchen entfernt. Sofort wurden mindestens 10 ml Vollmedium zugegeben, um die Andauung der abgelösten Zellen durch Trypsin gering zu halten. Fetales Kälberserum (FCS) ist dabei der entscheidende Trypsin-inhibitor. Als Vollmedium wurde Dulbecco's MEM Glukose 1 g/l, 10% FCS, 20 mM Glutamin, Penicillin/Streptomycin 1 000 U/1 000 µg/ml verwendet. Das Abzentrifugieren des Trypsins erfolgte bei 500 g bei 5 °C für 5 min. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in Vollmedium durch mehrfaches Pipettieren resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen je nach Größe des Pellets in einer 25 cm<sup>2</sup> bzw. 75 cm<sup>2</sup> großen Kulturflasche ausgesät.

### 2.1.2 Zellkultur

Die Inkubation der Zellen erfolgte in 5% CO<sub>2</sub> angereicherter, feuchter Atmosphäre bei 37 °C. Das Medium wurde nach den ersten 2 Tagen ausgewechselt, im weiteren Verlauf erfolgte ein Mediumswechsel alle 4 bis 5 Tage. Nach erreichter Konfluenz der Fibroblasten wurde passagiert. Dazu wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 5 min bei 37 °C mit 0,05% Trypsin-EDTA abgelöst. Die Ablösung konnte durch leichtes Klopfen der Flaschen gegen eine feste Unterlage beschleunigt werden. Das Trypsin wurde durch Zusetzen von Vollmedium inhibiert und zum

Abzentrifugieren in ein 50 ml Röhrchen gegeben. Das Pellet wurde mit Vollmedium resuspendiert und auf einer dreimal so großen Fläche wieder ausgesät.

Für die Experimente wurden die Passagen 3 bis 5 verwendet. Die Zellen wurden je nach Versuchsziel in 6-Lochplatten oder in 96-Lochplatten ausgesät. Die Vorbereitung der Zellen auf die Experimente erfolgte über 24 Stunden mit Hungermedium ohne FCS, sobald fast vollständige Konfluenz erreicht war. Die Konfluenz wurde mikroskopisch bestimmt und entsprach ca.  $6 \times 10^5$  Zellen pro 6-Loch bzw.  $1 \times 10^4$  Zellen pro 96-Loch. Die Bestimmung der Zellanzahl erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer. Danach begannen die 72 -stündigen Experimente.

### 2.1.3 Kulturmedien

Tabelle 2.1: Verwendete Kulturmedien

	Kontrollmedium	Glukosemedium	Glycerolmedium
Zusammen- setzung	Dulbecco's MEM 20 mM Glutamin; 1 000 U/ml Peni- cillin; 1 000 µg/ml Streptomycin	40 ml Kontroll- medium; 10 ml Glukose20	40 ml Kontroll- medium; 0,6 g Glycerol
Glukose			
[g/l]	1	40,8	1
[mM]	5,6	226,8	5,6
Osmolarität			
[mOsmol/kg]	340	540	540

Als Kontrollmedium diente serumfreies Dulbecco's MEM, welches 1 g/l Glukose enthält, unter Zusatz von Glutamin (20 mM) und Penicillin/Streptomycin. In einigen Dialyseaustauschflüssigkeiten ist Glukose bis zu 40,8 g/l enthalten, was eine unphysiologisch hohe Osmolarität zur Fol-

ge hat. Für die Zellkulturen wurde das hochprozentige Glukosemedium durch Zugabe von 10 ml 20%-iger Glukoselösung zu 40 ml des Kontrollmediums hergestellt. Das glycerolhaltige Medium wurde mit 0,6 g Glycerol je 40 ml so eingestellt, dass es die gleiche Osmolarität von 540 mOsmol wie das glukosereiche Medium besaß. Den verschiedenen Medien wurden für einige Experimente Fetales Kälberserum (FCS, 1%), TGF $\beta_1$  (2 ng/ml), Endothelin1(10 nM) oder PDGF $_{BB}$  (5 ng/ml) zugesetzt. Dabei dient FCS mit seinen vielfältigen Inhaltsstoffen als eine Art Positivkontrolle. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass laut der Literatur ggf. eine Wirkung, aber keine Toxizität zu erwarten ist: TGF $\beta_1$  [Duncan et al., 1999; Grotendorst, 1997], Endothelin [Dube et al., 2000; Kernochan et al., 2002], PDGF $_{BB}$  [Yang et al., 1999].

#### 2.1.4 Mechanischer Zellstress

Auf einem rotierenden Schüttler wurde die Bewegung der Dialyselösung im Abdomen bei Peritonealdialyse experimentell nachgestellt. Der Schüttler rotierte mit einer Geschwindigkeit von 140 U/min und einem Radius von  $r=5$  mm). Die konfluenten Polyethylenschalen wurden erst zu Beginn der 72-stündigen Experimente auf dem Schüttler platziert und gegen ruhende Kulturen verglichen.

Für die Dehnungsexperimente wurden die Fibroblasten auf speziellen 6-Lochplatten ausgesät, die eine elastische Membran als Unterlage haben. Nachdem die Fibroblasten sich an dem elastischen Boden angehaftet hatten, erfolgte für 72 Stunden die alternierende Dehnung der Membran mittels einer Pumpe, die unter den Zellkulturplatten zyklisch eine Luftdruck-erhöhung hervorrief, siehe Abbildung 2.1. Die Dehnungsphase nahm ca. 1 Sekunde und die ungedehnte Phase ca. 2 Sekunden in Anspruch. Die Dehnung der Membran hat eine Zunahme der Membranoberfläche um ca. 20% bewirkt, um einen effektiven Zelldehnungsstress zu erzielen.

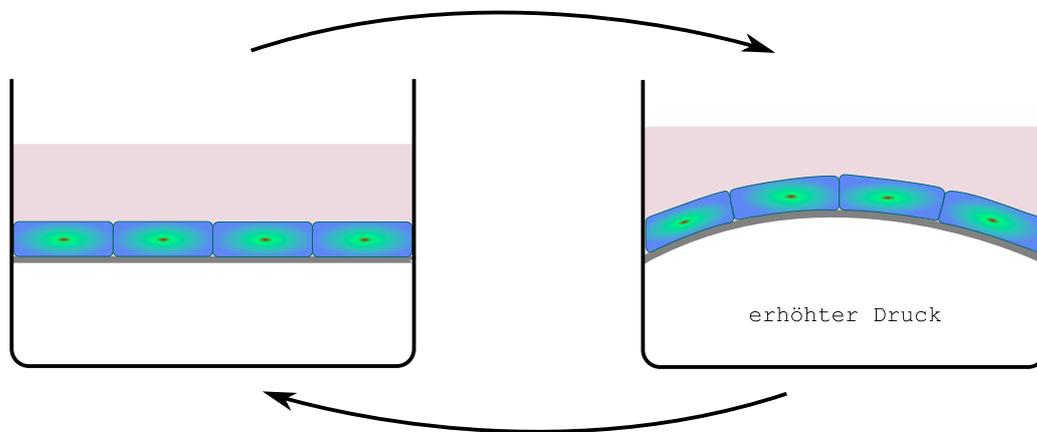


Abbildung 2.1: Zyklische Dehnungsbeanspruchung der Zellen auf einer elastischen Membran durch einseitigen Überdruck.

### 2.1.5 Charakterisierung

Die Charakterisierung der Fibroblasten erfolgte mit einer spezifischen Antikörperfärbung sowie im Phasenkontrastmikroskop.

Morphologisch besitzen Fibroblasten im Gegensatz zu den runden Mesothelzellen einen schlanken, spindelförmigen Zellkörper. Sie bilden in der Wachstumsphase ein typisches fischgrätenartiges Muster aus, welches eine gute Abgrenzung zu physiologisch benachbarten Zellen erlaubt. Konfluente Mesothelzellen und Endothelzellen stellen sich in der Regel als große rundliche Zellen dar, die ein kopfsteinplasterähnliches Aussehen haben.

Mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen humane Fibroblasten von DAKO wurde eine APAAP-Färbung (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase) durchgeführt. Dieser Antikörper bindet an die Beta-Untereinheit der Propyl-4-Hydroxylase und an die Disulfidisomerase. Es färben sich nur humane Fibroblasten an, die aktiv Kollagen synthetisieren, sodass eine Abgrenzung zu anderen Zellen, wie z.B. Mesothelzellen und Endothelzellen, gegeben ist. Gelegentlich färben sich azidophile Granulozyten und Plasmazellen an, welche aber morphologisch im Lichtmikroskop leicht von Fibroblasten zu unterscheiden wären. Für

diese Färbung wurden konfluente Zellen in einer 96-Lochplatte mit eiskaltem Methanol (4 °C) 10 min lang fixiert. Dann wurden die luftgetrockneten Zellen 1 – 2 min mit TBS gewaschen und 20 min mit Kaninchenserum geblockt, um eine eventuelle unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren. Alle folgenden Inkubationsschritte wurden durch Waschen mit TBS unterbrochen: 2 Stunden Inkubation mit dem monoklonalen Maus Anti-Humane Fibroblasten Antikörper, 30 min Inkubation mit Kaninchen Anti-Mausimmunglobulin als Brückenantikörper, 30 min Inkubation mit APAAP-Komplex und schließlich 25 min Anfärbung mit Neufuchsin. Abschließend wurden die angefärbten Fibroblasten luftgetrocknet. Die Böden der 96-Lochplatten wurden ausgebohrt und in Kaisers Glyceringelatine auf Objektgläsern eingedeckt. Die Fotos wurden digital mit einer Spotkamera von Leica aufgenommen.

Tabelle 2.2: Zusammenstellung der Substanzen für die APAAP-Charakterisierung der Fibroblasten

	Substanz	Verd. mit TBS
Blocken unspezifischer Hintergrundfärbung	Kaninchenserum	1:5
Primärantikörper	monoklonaler Maus Anti-Human Fibroblasten Antikörper	1:50
Brückenantikörper	Kaninchen Anti-Mausimmunglobuline	1:25
Farbstoff umsetzendes Enzym	APAAP-Komplex	1:50
Farbstoffsubstrat	Neufuchsin	1:1

## 2.2 Fluoreszenzfärbung des Aktins

Die Fluoreszenzfärbung des Aktins wurde mit Phalloidin, einem Pilzgift von *Amanita phalloides* durchgeführt. Phalloidin hat einen Durchmesser von 12 – 15 Å und ein Molekulargewicht von <2 000 Da. Die LD<sub>50</sub> liegt bei der Maus bei 2 mg/kg, wobei die hauptsächlich lebertoxischen Wirkungen denen des strukturverwandten *Amatoxin* ähneln. Sie beruhen auf der festen Bindung an polymerisiertes Aktin. Phalloidin bindet an polymerisiertes F-Aktin und stabilisiert diese Form gegenüber der monomeren Form.

Die mit PBS gewaschenen Zellen wurden mit 4%-igem Paraformaldehyd 10 min fixiert. Die Zellmembran wurde 3 – 5 min lang mit 0,1% TritonX-100 permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte für 20 min die Inkubation mit Alexa Fluor 488 Phalloidin. Auf 200 µl PBS wurde 5 µl methanolische Stocklösung und 1% BSA gegeben, um die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren. Für die Fotos wurden die Böden der 24-Lochplatte ausgebohrt und mit Immu-Mount eingedeckt. Die Fotos wurden mit einer digitalen Spotkamera von Leica aufgenommen.

Die quantitative Bestimmung der Aktinmenge erfolgte im Gemini Spektromax (Molecular Devices). Angeregt wurde bei 488 nm und die Emission wurde bei 515 nm gemessen. Die Messung wurde mit PBS-Bedeckung durchgeführt. Die Leerwerte lagen im Mittel bei 6,3 gemessene Lichtintensität (Standardabweichung 2,2). Die Werte der mit Fibroblasten bewachsenen 96-Lochplatten lagen 6 bis 8 mal so hoch.

## 2.3 Messung von TGF $\beta_1$ im Überstand

Im ELISA werden die Proteine durch hochspezifische Antikörper gebunden, die auf der Platte anhaften. Über einen weiteren Antikörper wird ein farbstoffumsetzendes Enzym angekoppelt. Die Menge des umgesetzten Farbstoffs wird photometrisch bestimmt. Sie entspricht der Menge des vorhandenen Proteins.

### 2.3.1 TGF $\beta_1$ ELISA

Für die Messung des neu synthetisierten TGF $\beta_1$  wurden Zellkulturüberstände abpipettiert. Dies erfolgte nach 24, 48 und 72 Stunden je aus einem 6-Loch der drei parallelen Ansätze. Die Proben wurden bis zur Messung bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Für die Messung kam ein DouSet ELISA Development System von R&D Systems zur Anwendung. Dieser ist spezifisch für TGF $\beta_1$  und hat  $<1\%$  Kreuzreaktivität für TGF $\beta_2$  und TGF $\beta_3$ . Die Verdünnung der Komponenten bis zu ihrer Arbeitskonzentration erfolgte mit Ausnahme des Capture Antikörpers mit dem mitgelieferten Verdünnungsreagenz (Reagent Diluent).

Die Probenaktivierung wurde mit  $25\ \mu\text{l}$   $1\ \text{N}$  HCl pro  $100\ \mu\text{l}$  Probe für 10 min durchgeführt. Neutralisiert wurde mit  $25\ \mu\text{l}$   $1,2\ \text{N}$  NaOH in  $0,5\ \text{M}$  HEPES. 96-Lochplatten wurden über Nacht mit  $100\ \mu\text{l}$  Capture Antikörper ( $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$  PBS) beschichtet. Nach diesem und allen folgenden Schritten wurde die Flüssigkeit aus der Platte dekantiert, dreimal gewaschen und verbleibende Reste auf trockenem Papier abgeklopft. Für mindestens 1 Stunde wurde mit  $200\ \mu\text{l}$  Block Puffer pro Loch inkubiert. Dann wurden  $100\ \mu\text{l}$  aktivierte Probe bzw. Standard auf die Platte gegeben und 2 Stunden inkubiert, danach gewaschen und 2 Stunden mit  $100\ \mu\text{l}$  Detection Antikörper ( $300\ \text{ng}/\text{ml}$ ) inkubiert. Die Inkubation mit  $100\ \mu\text{l}$  Streptavidin-HRP (Arbeitskonzentration 1:200) erfolgte 20 min im Dunkeln, ebenso die folgende Inkubation mit  $100\ \mu\text{l}$  TMB-Microwell Peroxidase Substrat. Nach

Zugabe von 50 µl Stopplösung wurde im ELISAreader bei 450 nm gegen 570 nm gemessen.

## 2.4 Kollagenbestimmung

Das neu synthetisierte Kollagen wurde mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt.

Eine Methode ist die Messung von radioaktiv markiertem  $^3\text{[H]}$ -Prolin, welches von den Zellen in neu synthetisierte Proteine eingebaut wird. Da der Prolinanteil im Kollagen sehr hoch ist, liegt eine Korrelation zwischen Prolineinbau und Kollagensynthese vor.

Bei der zweiten Methode wird quantitativ das von den Fibroblasten synthetisierte Kollagen I mit einem PINP Radioimmunoassay (RIA) bestimmt.

Bei der Bildung von Kollagen aus Prokollagen wird am aminoterminalen Ende PINP (Intaktes N-terminales Propeptid von Typ I Prokollagen) und am carboxyterminalen Ende PICP (Intaktes C-terminales Propeptid von Typ I Prokollagen) abgespalten. Die Menge des PINP ist direkt proportional zur Kollagen I Synthese. PINP und PICP zirkulieren für kurze Zeit im Serum, bevor sie über die Leber abgebaut werden. Die durchschnittliche Serumkonzentration gesunder Personen liegt für PINP bei 45 mg/l (20 – 90 mg/l). Variationen ergeben sich aus unterschiedlichem Alter, ethnischer Zugehörigkeit und Ernährung. [Orion Diagnostica UniQ]

Der verwendete RIA findet in der Diagnostik von Erkrankungen des Knochenstoffwechsels Anwendung. Er zeigt z.B. einen Anstieg des Kollagen I Metabolismus bei MORBUS Paget an. Ebenso eignet er sich für die Überwachung von antiresorptiven Therapien bei osteoporotischen Patienten.

Das Testprinzip beruht auf einer kompetitiven Bindung von  $^{125}\text{I}$ -markiertem PINP und unmarkiertem PINP an einen Antikörper. Das gebundene PINP präzipitiert an einen Antikörper, der an der Unterlage anhaftet. Das

freie PINP wird entfernt. Die Menge von präzipitiertem  $^{125}\text{I}$ -markiertem PINP wird gemessen. Die Konzentration von PINP in der Probe kann nun berechnet werden.

### 2.4.1 PINP-Radioimmunoassay

Für die Messung der PINP-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen wurde dem Herstellerprotokoll von Orion Diagnostica gefolgt. Als Proben wurde Medium verwendet, welches nach 72 Stunden Behandlung dem Zellkulturüberstand abgenommen wurde und anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt wurde. Die Proben wurden aufgetaut und mögliche Zelltrümmer abzentrifugiert. Dann wurden in einem RIA-Röhrchen  $50\ \mu\text{l}$  Überstand bzw. Standard,  $200\ \mu\text{l}$  Tracer ( $^{125}\text{I}$ -PINP) und  $200\ \mu\text{l}$  Antiserum (Kaninchen gegen PINP) 2 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Für die anschließenden 30 min wurde  $500\ \mu\text{l}$  des an BSA-gekoppelten Zweitantikörpers dazugegeben. Das gebildete Präzipitat wurde 15 min bei  $2\ 000\ g$  und  $4^\circ\text{C}$  herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in den Gamma-Zähler gegeben und die Zerfallsrate gemessen. Die Messungen wurden mit einem 1470 Wizard Automatic Gamma Counter von Wallac Distribution GmbH, (über PerkinElmer life science) Freiburg durchgeführt. Die Bestimmung der PINP-Konzentration erfolgte aus der aufgenommenen Standardkurve. Die Sensitivität des Elisas liegt bei  $2\ \mu\text{g/l}$ , die Intraassayvariabilität bei 5-8%, die Interassayvariabilität um 4,5%.

### 2.4.2 Kollagenmessung mittels $^3\text{[H]}$ -Prolineinbau

Zur Bestimmung des  $^3\text{[H]}$ -Prolineinbaus wurden die Fibroblasten mit einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen in 6-Lochplatten ausgesät. Die Behandlung erfolgte für 72 Stunden mit Glukosemedium und Kontrollmedium jeweils entweder mit  $2\ \text{ng/ml TGF}\beta_1$ , mit 10% FCS oder ohne FCS. Für die letzten 16 Stunden wurde pro Loch  $5\ \mu\text{Ci } ^3\text{[H]}$ -Prolin dazugegeben. Vor dem

Messen wurden die Zellen auf der Platte zweimal mit PBS gewaschen, 30 min mit 0,5 ml 0,5M NaOH und 0,1% Triton lysiert, und mit 0,5 ml 0,5 M HCl neutralisiert. Davon wurden 400 µl der Probe und 3 ml Szintillationscocktail für wässrige Proben gemischt. Die vom  $^3\text{[H]}$ -Prolin ausgesandte Strahlung regt im Szintillationscocktail die Aussendung von Lichtquanten an. Über diese Fluoreszenz werden im Mikro- $\beta$ -Counter die Zerfälle pro Minute gemessen. Damit kann die Menge von eingebautem  $^3\text{[H]}$ -Prolin bestimmt werden. Obwohl  $^3\text{[H]}$ -Prolin in verschiedene Proteine eingebaut wird, ist eine gute Korrelation mit der Kollagensynthese zu verzeichnen, da dort besonders viel  $^3\text{[H]}$ -Prolin eingebaut wird.

## 2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte photometrisch. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, 30 min mit 0,5 M NaOH und 0,1% Triton lysiert, und mit der gleichen Menge 0,5 M HCl neutralisiert. Davon wurden 25 µl Probe bzw. 25 µl BSA-Standard auf einer unbeschichteten 96-Lochplatte 30 min mit 200 µl Reaktionslösung (1:50 UP 95425A-50Teile : UP95424A-1Teil) aus dem BSA Protein Assay Kit von Pierce inkubiert. Die Extinktion wurde bei 562 nm gemessen.

## 2.6 Proliferationsrate mit $^3\text{[H]}$ -Thymidineinbau

$^3\text{[H]}$ -Thymidineinbau eignet sich als Marker für die Proliferationsrate von Zellen. Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^4$  in 96-Lochplatten ausgesät und behandelt. Die letzten 16 Stunden wurde pro Loch 0,5 µCi  $^3\text{[H]}$ -Thymidin zugegeben. Danach wurde das Medium dekantiert und die Zellen 30 min bei Raumtemperatur mit 200 µl 10% TCA fixiert. Erneut wurde die Flüssigkeit dekantiert und 30 min mit 50 µl 0,2 M NaOH lysiert und im Anschluß mit 50 µl 0,8 M HCl

neutralisiert. Die Zellen wurden mit dem CellHarvester geerntet und auf Glasfaserpapier übertragen. Dieses wurde getrocknet und mit 5 ml Szintillationscocktail für nicht wässrige Lösungen in Folie eingeschweißt. Die vom  $^3\text{[H]}$ -Thymidin ausgesandte Strahlung regt im Szintillationscocktail die Aussendung von Lichtquanten an. Über diese Fluoreszenz werden im Mikro- $\beta$ -Counter die Zerfälle pro Minute gemessen, und damit die Menge von eingebautem  $^3\text{[H]}$ -Thymidin bestimmt.

## 2.7 Messung von Endothelin im Überstand

Die Bestimmung der Konzentration von Endothelin 1 im Zellkulturüberstand erfolgte mit einem ELISA-Kit der Firma Biomedica, Wien. Die Nachweisgrenze des Elisas liegt bei 0,05 fmol/ml. Im humanen EDTA-Plasma liegen die Normalwerte zwischen 0,2 und 0,7 fmol/ml. Einige Zellkulturen können bis zu 1000 fmol/ml im Überstand produzieren. Zu beachten ist die biologische Halbwertszeit im Plasma von kleiner einer Minute. Die Intraassayvariabilität liegt bei 4,5%, die Interassayvariabilität um 7%.

Die Kulturüberstände wurden bis zur Messung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die einzelnen Schritte des ELISAs folgten genau den Anweisungen des Herstellers aus dem beiliegenden Protokoll. Da es sich um Zellkulturüberstände handelt, wurden zuerst eventuell vorhandene Zellen und Zellrückstände abzentrifugiert. Der gelöste Standard wurde in Zellkulturmedium gelöst. Dann wurde auf der beschichteten Immuno-sorbant Microtiter Platte 200  $\mu\text{l}$  Standard, Kontrolle bzw. Probe und je 50  $\mu\text{l}$  Detektionsantikörper pipettiert und über 20 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5-maligem Waschen wurde für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  auf einem Schüttler mit 200  $\mu\text{l}$  Konjugat inkubiert. Dann wurde 5 Mal gewaschen und mit 200  $\mu\text{l}$  Substrat 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 50  $\mu\text{l}$  Stopp-lösung hinzugegeben und sofort bei 450 gegen 620 nm die Extinktion im Photometer gemessen.

## 2.8 Endothelin mRNA und ET-Rezeptor mRNA

### 2.8.1 Isolierung der mRNA

Die RNA wurde aus 3 identisch behandelten Löchern einer 6-Lochplatte gewonnen. Zuerst wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Dann wurden 2 ml Trizol auf die 3 Löcher verteilt. Nach dem vollständigen Ablösen wurden die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Um nicht gesprengte Zellmembranen zu zerstören, wurde alles dreimal durch eine Insulinspritze gezogen. Pro 1 ml Trizol wurden 200  $\mu\text{l}$  Chloroform dazugegeben, gut geschüttelt und 2 – 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei 10 000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  wurde 15 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und mit 0,5 ml Isopropanol 10 min bei  $30^{\circ}\text{C}$  gefällt. Dann wurde wieder 10 min bei 10 000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 1 ml 70%-igem Ethanol gewaschen. Dann wurde 5 min bei 6 000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Das Ethanol wurde dekantiert und das Pellet luftgetrocknet, um es dann in 20  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  aufzunehmen. Damit sich die isolierte RNA gleichmäßig löst, wurde 10 min bei  $60^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die so isolierte RNA wurde auf Eis gekühlt, um die Wirkung von RNAasen zu vermindern.

Die Konzentration wurde über die Extinktion mit einem Photometer bei 260 nm gegen 280 nm bestimmt.

### 2.8.2 Umschreibung in cDNA

Die Reaktionsmischung zum Umschreiben von 1  $\mu\text{g}$  mRNA in cDNA setzte sich wie folgt zusammen:

Die Lösung wurde in luftdicht abschließende PCR-Tubes gegeben und in einen Cycler gestellt. Es wurde für 45 Minuten bei  $42^{\circ}\text{C}$  die optimale Arbeitstemperatur der reversen Transkriptase eingestellt, was den Ablesevor-

Tabelle 2.3: Zusammensetzung des RNA-Mastermix zum Umschreiben von RNA in DNA.

	Volumen [ $\mu$ l]	Konzentration [mM]
Puffer 10 x	4	1
MgCl 25 mM	8	5
dNTP's 100 mM	1,6	4
Random Hexamers	2	
reverse Transkriptase	2	
RNase Inhibitor	2	
1 $\mu$ g mRNA		25
DEPC-H <sub>2</sub> O	<i>add40</i>	

gang und die Umschreibung in DNA ermöglicht. Anschließend wurde für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Zur Kontrolle der erfolgreichen Umschreibung wurde mit einem Primerpaar, was für GAPDH codiert, eine PCR durchgeführt. Die verwendeten Primersequenzen für die PCR sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

### 2.8.3 PCR der cDNA

Die umgeschriebene cDNA wurde zu dem jeweils neu angesetzten Mastermix zugegeben (siehe Tabelle 2.4). Dabei variierten die Konzentrationen der einzelnen Substanzen je nach Sequenz leicht, folgen aber einem üblichen Protokoll. Die einzelnen Schritte der PCR sind in Tabelle 2.5 im Anhang dargestellt. Die Zyklen im PCR-Cycler lagen mit 28 bis 34 Wiederholungen der Anlagerungs- und Synthesephase im üblichen Rahmen. Die Annealingtemperatur der verschiedenen Sequenzen lagen bei 54 °C (Kollagen 1), 55 °C (Endothelin-converting Enzyme), 57 °C (Endothelin Rezeptor A und B), 60 °C (Glycerolaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) und 64 °C (Endothelin 1). Die optimale Arbeitstemperatur der Taq-Gold-Polymerase bei 72 °C wurde während der Synthesephasen eingestellt. Die

Produkte wurden mit bromphenolhaltiger Sucroslösung in die Slots eines 1,5%-igen Agarosegels gegeben, welches Ethidiumbromid zur Sichtbarmachen der DNA im UV-Sicht enthielt.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung der PCR-Lösungen

	GapDH		Collagen1		Endothelin1		ETA/B-Rezeptor		ECE	
Puffer 10 x	2 µl	1 mM	2 µl	1 mM	2 µl	1 mM	2 µl	1 mM	2 µl	1 mM
MgCl 25 mM	2 µl	2,5 mM	2 µl	2,5 mM	1,6 µl	2 mM	1,2 µl	1,5 mM	1,2 µl	1,5 mM
dNTP's 40 mM	0,1 µl	0,2 mM	2 µl	0,4 mM	0,13 µl	0,26 mM	0,5 µl	1 mM	0,5 µl	1 mM
5'-Primer 1,3 – 13 µM	1,53 µl	1 µM	1,48 µl	1 µM	0,4 µl	25 nM	1,5 µl	975 nM	1,5 µl	1 µM
3'-Primer 1,3 – 13 µM	1,53 µl	1 µM	1,49 µl	1 µM	0,4 µl	25 nM	1,5 µl	982 nM	1,5 µl	1 µM
Taq-Gold 5 U/l	0,15 µl	0,75 µU	0,1 µl	0,5 µU	0,5 µl	2,5 µU	0,2 µl	1 µU	0,5 µl	2,5 µU
HPLC-H <sub>2</sub> O	10,23 µl		10,19 µl		12,97 µl		11,1 µl		10,8 µl	
cDNA	2 µl		2 µl		2 µl		2 µl		2 µl	
Wildtyp DNA	0,5 µl		0,5 µl		-		-		-	

Tabelle 2.5: Ablauf der PCR-Programme

Primer	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4	Schritt 5	Zyklen	Schritt 6	Ende
GapDH	95°C [10min]	94°C [30sec]	60°C [45sec]	72°C [2min]		×27 Schritt 2-4	72°C [7min]	4°C
Collagen1	94°C [10min]	94°C [30sec]	54°C [45sec]	72°C [1min]		×28 Schritt 2-4	72°C [7min]	4°C
ET1	94°C [5min]	64°C [5min]	72°C [3min]	94°C [1min]	64°C [1min]	×30 Schritt 3-5	72°C [5min]	4°C
ETA/B-Rez.	94°C [12min]	94°C [30sec]	57°C [45sec]	72°C [2min]		×34 Schritt 2-4	72°C [7min]	4°C
ECE	94°C [12min]	94°C [30sec]	55°C [45sec]	72°C [2min]		×30 Schritt 2-4	72°C [7min]	4°C

Tabelle 2.6: Verwendete Primersequenzen für die PCR

Primer	Sequenz	erste Nukleotidlänge bp	PCR Produkt bp
<b>GapDH</b>			
<i>Sense</i>	5'- Cg TCT TCA CCA CCA Tgg AgA A-3'	375	390
<i>Antisense</i>	5'-CCA gTg AgC TTC CCg TTC AgC TC-3'	742	
<b>Collagen 1</b>			
<i>Sense</i>	5'- Cg CAC ATg CCg TgA CTT gAg ACT CA-3'	606	572
<i>Antisense</i>	5'-CCA CCg ATg TCC AAA ggT gCA AT-3'	1155	
<b>ET 1</b>			
<i>Sense</i>	5'-TCg TCC CTg ATg gAT AAA gAg TgT gTC-3'	267	458
<i>Antisense</i>	5'-ggT CAC ATA ACg CTC TCT ggA ggg CTT-3'		
<b>ETA rez</b>			
<i>Sense</i>	5'-gCA gAA gTC CTC ggT ggg gAT CA-3'	976	570
<i>Antisense</i>	5'-CCg ATg TAA TCC ATg AgC AgT AAg-3'		
<b>ETB rez</b>			
<i>Sense</i>	5'-ggA CCC ATC gAg ATC AAg gAg ACT-3'	511	504
<i>Antisense</i>	5'-ggg ATg AAg CAA gCA gAT TCg CAg A-3'		
<b>ECE</b>			
<i>Sense</i>	5'-CCC gCC ATC AAC Tgg Tgg CCT TT-3'	1055	779
<i>Antisense</i>	5'-CAg CTC ATg gCC CAC gAC gAC AC-3'		

## 2.9 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit SPSS durchgeführt. Signifikanz wurde angenommen mit  $p < 0,05$  unter Verwendung des Wilcoxon-Tests.

Zur statistischen Auswertung der Daten wurden aufgrund erheblicher Varianz zwischen den Zelllinien zuerst die Kontrollen normiert. Die Kontrollen wurden dazu gleich 1 gesetzt, was einem Ausgangswert von 100%

entspricht. Die übrigen Werte wurden als relative Änderung bezogen auf die jeweilige Kontrolle berechnet. Die graphische Darstellung der Werte erfolgte mit Boxplots. Mit der Darstellung von Median und Boxplot wird die allgemeine Tendenz der nicht normalverteilten Daten besser charakterisiert. Eine große Diskrepanz von Median und Mittelwert bestätigt das Vorhandensein von Ausreißern.

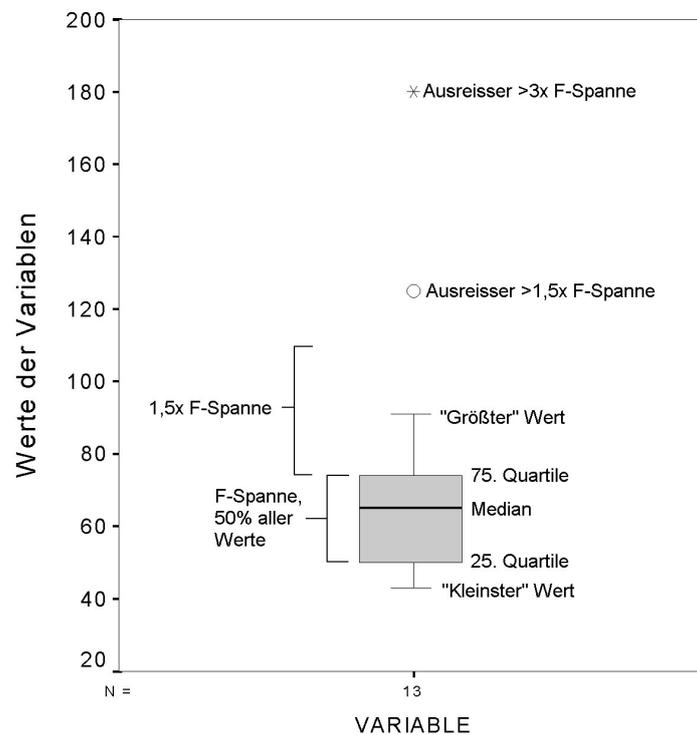


Abbildung 2.2: **Boxplot**. Beispielhafte Darstellung eines Boxplot mit Median, F-Spanne und Ausreißern.

Der Median gibt den Wert an, den die Hälfte der Fälle überschreiten, und die andere Hälfte der Fälle unterschreiten, ohne Berücksichtigung wie weit sie vom Median entfernt sind. Die F-Spanne oder Interquartildistanz beschreibt die mittlere Spannweite der Daten. Im sogenannten Boxplot ist die F-Spanne als grau unterlegter Kasten um den Median herum dargestellt. Sie wird ermittelt, indem die 25. Perzentile (d.h. 25% aller Werte sind

kleiner als diese) von der 75. Perzentile (d.h. 75% aller Werte sind kleiner als diese) abgezogen wird. Der Median und die zugehörige F-Spanne sind im Gegensatz zu Mittelwert und Standardabweichung unempfindlich gegenüber Ausreißern, d.h. extremen Werten. Als Regel zur Bestimmung von Ausreißern wird die von Tukey 1970 vorgeschlagene Berechnung herangezogen. Die Ausreißer sind hiernach die Werte, die weiter als die 1,5-fache F-Spanne von der 25. bzw. 75. Perzentile entfernt liegen. Im Boxplot sind sie mit einem  $\circ$  gekennzeichnet. Liegen die Werte weiter als 3 F-Spannen von der 25. bzw. 75. Perzentile entfernt, so werden sie als weit außerhalb liegend mit \* gekennzeichnet. Der letzte Wert innerhalb der 1,5-fachen F-Spanne ist durch die dünne Linie mit der grauunterlegten Box verbunden.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung der Humanen Peritonealen Fibroblasten

Die morphologische Typisierung der Fibroblasten erfolgte in der Regel mit einem inversen Phasenkontrastmikroskop. Um eine Mischkultur von Fibroblasten und Mesothelzellen weitestgehend auszuschließen, wurde vor jedem Experiment die typische spindelförmige Zellform der Fibroblasten kontrolliert. In mehreren Experimenten erfolgte zusätzlich zur Phasenkontrastmikroskopie eine Aktinfärbung oder eine immunzytochemische Anfärbung der Zellen mit einem humanen Fibroblastenantikörper, der hochspezifisch für humane Fibroblasten ist.

Nach dem Herauslösen der Fibroblasten aus dem Biopsiematerial mit Trypsin sind sie zunächst völlig abgerundet. Erst wenn sich die Zellen auf dem Boden der Kulturschale anheften, nehmen die Zellkörper wieder ihre längliche, spindelförmige Gestalt an. Die Fibroblasten nehmen diese Form nur in einer Ausnahmesituation nicht an, und zwar wenn sie so dicht ausgesät werden, dass sie sich von Anfang an gegenseitig berühren und sich deshalb nicht entfalten können. Unter diesen Umständen ähneln sie



Abbildung 3.1: Lichtmikroskopische Aufnahme von Fibroblasten mit spezifischer Antikörperfärbung. Darstellung von passagierten humanen peritonealen Fibroblasten (3. Passage) drei Tage nach Zellaussaat mit einem humanen Fibroblasten-Antikörper angefärbt. In der Abbildung A erkennt man die fischzugartige Anordnung der Fibroblasten. Die Abbildung B zeigt einen Ausschnitt (markiertes Rechteck) aus der Abbildung A und lässt die einzelnen langgestreckten Fibroblasten erkennen. In der Abbildung C sieht man die ubiquitäre Verteilung des Antigen-Antikörper-Komplexes im gesamten Zytoplasma der Fibroblasten unter Aussparung des Zellkernes. Der Maßstab gegeben in C zeigt 300  $\mu\text{m}$  für A, 100  $\mu\text{m}$  für B und 30  $\mu\text{m}$  für C.

dem kopfsteinartigen Muster der stets runden Mesothelzellen. Nach einer weiteren Passage dieser Fibroblasten mit geringerer Zelldichte bilden sich die typischen schlanken Zellkörper der Fibroblasten wieder aus.

Mit einem monoklonalen humanen Fibroblasten - Antikörper wurden die Zellen immunzytochemisch charakterisiert, um sicher zu gehen, dass während der Experimente reine Fibroblastenkulturen verwandt wurden. Die Kopplung an den Antikörper erfolgte über APAAP (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase) und in einem weiteren Schritt wurde der Antikörper visualisiert durch die Anlagerung des Farbstoffes Neurofuchsin. Auf den Bildern der Abbildung 3.1 ist sowohl das charakteristische fischzugartige Wachstumsmuster der Fibroblasten (A), als auch der für Fibroblasten typische spindelförmige Zellkörper einzelner Zellen zu erkennen (B), Ausschnittsvergrößerung aus (A). Andere Zellen als Fibroblasten färben sich mit diesem spezifischen Antikörper nicht an. In der Abbildung 3.1 (C) erkennt man bei stärkerer Vergrößerung die ubiquitäre punktförmige Verteilung des Antigen-Antikörper-Komplexes im gesamten Zytoplasma unter Aussparung des Zellkerns.

### **3.2 Morphologische Veränderungen unter verschiedenen Kulturbedingungen**

Die Fibroblasten sind auch mit einer Aktinfilamentfärbung unter dem Fluoreszenzmikroskop gut zu erkennen. Besonders deutlich sieht man hier die intrazelluläre fast parallele Sortierung der einzelnen polymerisierten Aktinfilamente. Vergleicht man in der Abbildung 3.2 die Ausbildung der polymerisierten Aktinfilamente unter Kontrollbedingungen (A) mit der Kultursituation unter erhöhter Glukosegabe (B) und mit der unter zusätzlicher Gabe von 1% fetalem Kälberserum in das Glukosemedium (C), so lassen sich keine morphologisch qualitativen Unterschiede erkennen. Unter allen Bedingungen sind die Aktinfilamente im Zellkörper seiner

Längsachse entsprechend ausgerichtet. Es sind also rein morphologisch keine Unterschiede zwischen den verschieden behandelten Fibroblasten zu erkennen.

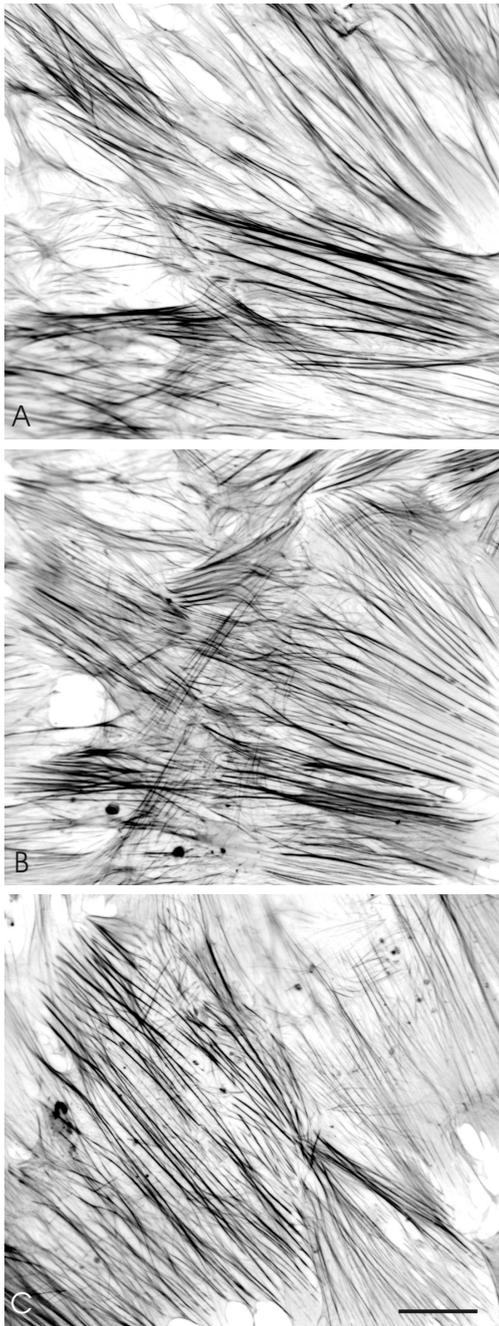


Abbildung 3.2: **Aktinfilamente in HPF-Kulturen.** Aktinfilamente in passagierten Fibroblastenkulturen ( 3. Passage) dargestellt mit Alexa Fluor 488 Phalloidin drei Tage nach Zellaussaat unter Kontrollbedingungen (A) (Hungermedium 340 mOsmol/kg), mit Glukose 540 mOsmol/kg (B), und unter Zugabe von Gukose und 1% fetalem Kälberserum (C). Die Ausbildung der Aktinfilamente sowie ihre parallele Anordnung in den Fibroblasten unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Mediumvarianten nicht. Der Maßstab beträgt 50  $\mu\text{m}$  für A, B und C.

Im Gegensatz zu den unveränderten Aktingerüststrukturen bei verschiedenen Medienzusätzen, treten Veränderungen in der Ausbildung der Aktinfilamente und der gesamten Zelloberfläche bei mechanischem Stress durch Schütteln und Dehnen der Kulturen auf. In der Abbildung 3.3 sind Fibroblastenkulturen nach 3-tägigem Schütteln (B) und nach 3-tägigen Dehnungsexperimenten (C) im Gegensatz zu Kontrollen (A) dargestellt. Zuerst fällt die geringere Aktinfilamentausbildung in den geschüttelten Kulturen (B) und noch deutlicher in den gedehnten Kulturen (C) auf. Außerdem erkennt man in den geschüttelten Kulturen eine gewisse Lockerung des strengen Wachstumsmusters der Fibroblasten, während in den gedehnten Kulturen die parallele Anordnung der einzelnen Fibroblasten völlig aufgehoben ist. Es fällt weiterhin auf, daß die Kulturschale, die den Fibroblasten als Anheftungsfläche dient, unter den Stressbedingungen nicht mehr einheitlich bewachsen ist, wie die Kontrolle es zeigt. Es sind große, rundliche, nicht bewachsene Areale in den geschüttelten und zunehmend in den gedehnten Kulturen zu erkennen (Pfeile in (B) und (C)). Besonders deutlich wird in den gedehnten Kulturen die irreguläre Form der Fibroblasten, die uneinheitlich strukturierte Fortsätze aufweisen, wie die Pfeilspitzen in der Abbildung 3.3 (C) zeigen.

Betrachtet man die Wirkung von mechanischem Stress auf einzelne Fibroblasten, so erkennt man in der Abbildung 3.4 bei stärkerer Vergrößerung, daß die Fibroblasten beim Schüttelversuch viele feine Filopodien ausbilden (Pfeile in 4 (B)), die in der Kontrolle (Abbildung 3.4 (A)) nicht zu sehen sind. Außerdem bilden die Fibrozyten bedingt durch das Schütteln Lamellipodien (Pfeilspitzen) aus, die in der Kontrolle auch nicht vorkommen. Die Aktinfilamente sind weniger zahlreich in den geschüttelten Kulturen und es sind stressbedingte Aktinkondensationspunkte zu erkennen.

Quantitativ wurde durch Fluoreszenzmessung gezeigt, dass der Gehalt an polymerisiertem filamentösem Aktin (F-Aktin) erhöht werden konnte durch 1% FCS (+21,4%,  $p=0,043$ ) und 5 ng/ml PDGF (+17,2%,  $n=5$ ,  $p=0,043$ ), jedoch weder durch Glukose (40 g/l) noch durch Endothelin

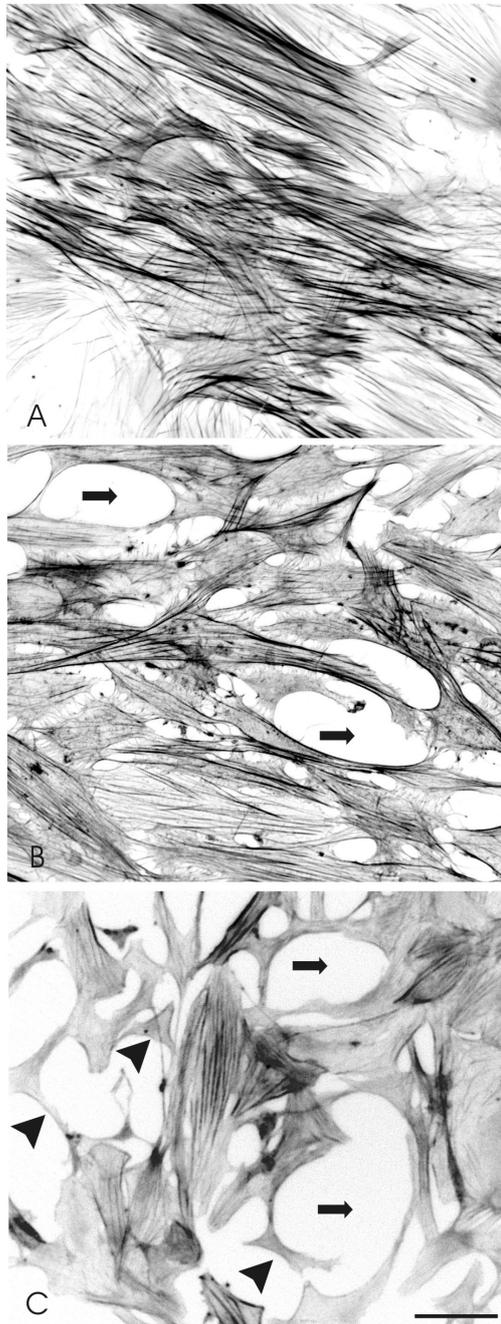


Abbildung 3.3: Aktinfilamente in statisch gewachsenen Kulturen (A), nach Schüttelstress (B), nach Dehnungsstress (C). Aktinfilamente in passagierten Fibroblastenkulturen ( 3. Passage) dargestellt mit Alexa Fluor 488 Phalloidin drei Tage nach Zellaussaat unter Kontrollbedingungen (A), im Schüttelexperiment (B) und im Dehnungsexperiment (C). Die Ausdünnung des Aktingerüstes zeigt sich zunehmend von den geschüttelten zu den gedehnten Kulturen. Die Pfeile zeigen in B und C die durch den mechanischen Stress nicht bewachsenen Kulturflächen. Die Pfeilspitzen in C zeigen auf die irregulär geformten Fortsätze der Fibroblasten. Der Maßstab beträgt 50  $\mu\text{m}$  für A, B und C.

(10 nM) ein signifikanter F-Aktin Anstieg zu verzeichnen war. Endothelin und PDGF gemeinsam bewirkten weniger Anstieg als PDGF allein (ohne Abbildung).

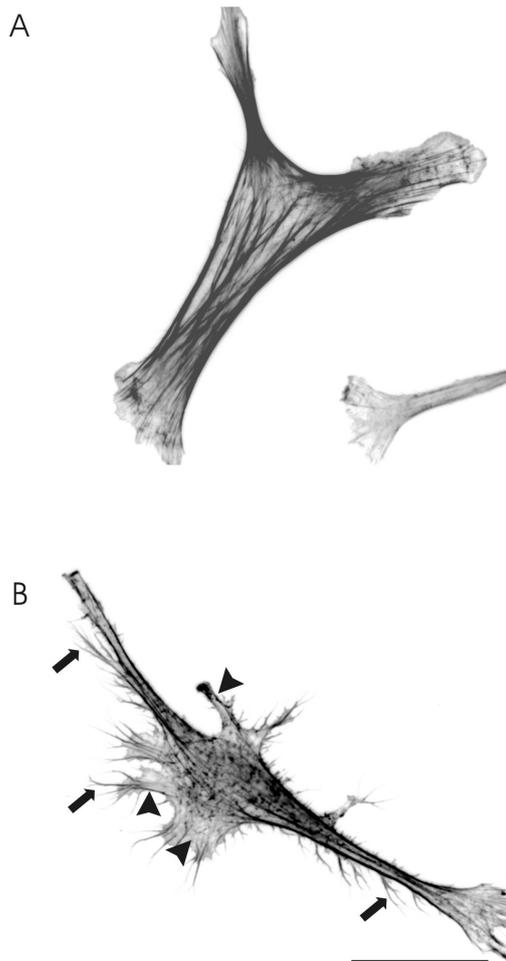


Abbildung 3.4: Aktinfilamente in einer statisch gewachsenen Zelle (A) und nach Schüttelstress (B). Aktinfilamente in passagierten Fibroblastenkulturen (3. Passage) dargestellt mit Alexa Fluor 488 Phalloidin drei Tage nach Zellaussaat unter Kontrollbedingungen (A), und in geschüttelten Kulturen (B). Es wurden vereinzelt liegende Zellen ausgesucht, um die morphologischen Unterschiede zu erkennen. Im Gegensatz zur Kontrolle zeigen die Fibroblasten im Schüttelexperiment viele feine Filopodien (Pfeile) und mehrere Lamellipodien (Pfeilspitzen). Die Aktinfilamente sind deutlich weniger als in der Kontrolle. Der Maßstab beträgt 12 µm.

### 3.3 TGF $\beta_1$ -Konzentration im Überstand

Zur Bestimmung der TGF $\beta_1$  Produktion der Humanen Peritonealen Fibroblasten wurde nach 24h, nach 48h und nach 72h Überstand des Kulturmediums asserviert und mit einem ELISA analysiert. Als Kontrollmedium diente serumfreies Dulbecco's MEM mit verschiedenen Zusätzen, wie in

Material und Methoden angegeben. Dieses enthielt keine messbaren Mengen von TGF $\beta_1$ . Im Medium, welches 1% FCS enthielt, ließ sich TGF $\beta_1$  in geringen Mengen nachweisen, wie es von der Herstellerfirma des ELISA-Systems beschrieben wurde. Der Anteil von TGF $\beta_1$  in 1% FCS Medium betrug durchschnittlich ca. 40 pg/ml, das entspricht ungefähr der Menge, die von HPF in serumfreiem Kontrollmedium bereits nach 24h produziert wurde. Aus dem kontinuierlichen Anstieg der TGF $\beta_1$  Konzentration ist ersichtlich, dass die gemessenen Zuwächse von TGF $\beta_1$  tatsächlich von den HPF neu synthetisiert wurden und mit dem im Serum bereits vorhandenen TGF $\beta_1$  nur in geringem Maße interferieren.

Die Variabilität der einzelnen HPF Zelllinien war groß. Dies zeigte die basale TGF $\beta_1$  Produktion der Kontrollen, die in Abhängigkeit von der Zelllinie nach 72h zwischen 22 pg/ml und 1785 pg/ml schwankte (n=12).

Als erster Versuch wurde dem Medium 1% FCS zugegeben, was einen bekannten Stimulus der TGF $\beta_1$  -Ausschüttung darstellt. Darunter zeigte sich eine mediane Erhöhung von TGF $\beta_1$  um 104% (n=5, p=0,043), mit 1% FCS und 40 g/l Glukose um 255% (n=5, p=0,043, ohne Abbildung). Den folgenden Experimenten wurde kein FCS zugesetzt, soweit nicht anders angegeben.

### **3.3.1 Der Einfluß von Glukose und Glycerol auf die TGF $\beta_1$ Produktion**

In der Abbildung 3.5 ist die durchschnittliche Änderung der TGF $\beta_1$  Konzentration im Zellkulturüberstand dargestellt. Die TGF $\beta_1$  Konzentration ist als relative Änderung bezogen auf die entsprechende Kontrolle dargestellt. Das Glukosemedium und das Glycerolmedium besitzen eine Osmolarität von 540 mOsm/kg, was der Osmolarität von 340 mOsm/kg im Kontrollmedium gegenübersteht. Glukose erhöht die TGF $\beta_1$  Produktion gegenüber der Kontrolle im Median um 79,8%. Die Anzahl der einzelnen Experimen-

te beträgt hierfür  $n=12$  mit einer Signifikanz von  $p=0,005$ . Glycerol zeigt ebenfalls einen Anstieg, der aber viel geringer ist und mit  $p=0,083$  nicht signifikant ist ( $n=10$ ). Glukose zeigt somit eine signifikant höhere Konzentration von TGF $\beta_1$  als die Kontrolle und als Glycerol ( $p=0,005$ ,  $n=10$ ).

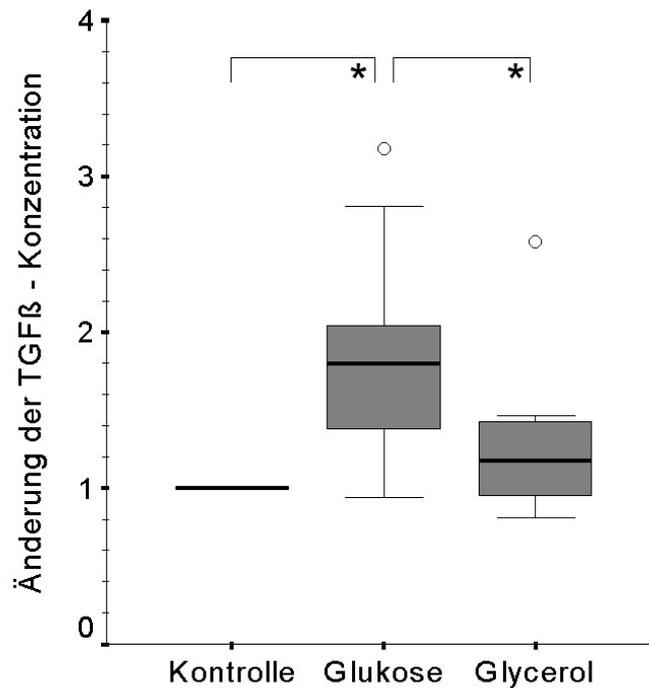


Abbildung 3.5: **Änderung von TGF $\beta_1$  durch Glukose und Glycerol nach 72h.** Die Bestimmung von TGF $\beta_1$  erfolgte aus Kulturmedium mittels eines ELISA. Der Median der TGF $\beta_1$  Konzentration liegt im Glukosemediums 1,8fach über der Kontrolle ( $n=12$ ,  $p=0,005$ (\*)), im Glycerolmedium ca. 1,2fach über der Kontrolle ( $n=10$ ,  $p=0,083$ ). Glukose und Glycerol je 540mosm/kg, Kontrolle 340mosm/kg. Die Werte sind als Änderung bezogen auf die Kontrolle in einem Box-Plot (Median, 1. und 3. Quartile und innere Eingrenzung) dargestellt.

### 3.3.2 Einfluß von Endothelin und PDGF auf die TGF $\beta_1$ Produktion

Endothelin allein bewirkt keinen signifikanten Anstieg von TGF $\beta_1$ . PDGF allein bewirkt im Median einen Anstieg von 106,2%. Durch Endothelin und PDGF gelang bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen ebenfalls die Induktion von TGF $\beta_1$  (s. Abb.3.6). Der Zuwachs gegenüber der unstimulierten Kontrolle lag im Median bei 157,2%. Der Hauptanteil ist auf die Wirkung von PDGF zurückzuführen.

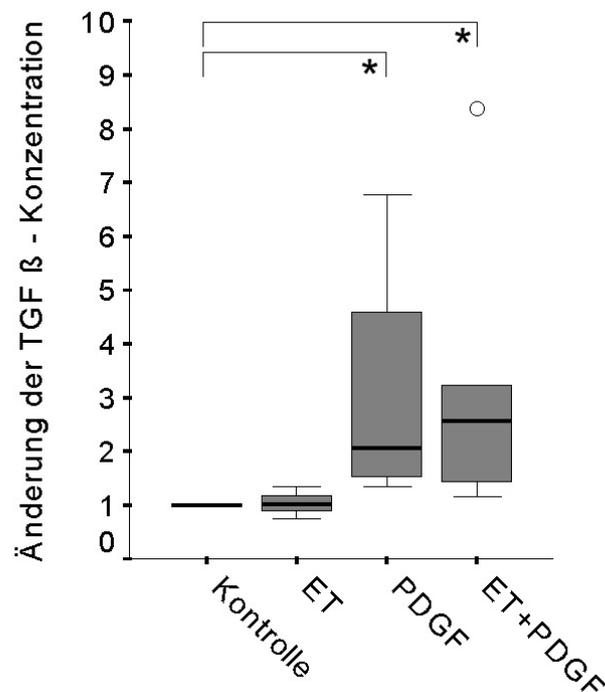


Abbildung 3.6: Änderung von TGF $\beta_1$  durch Endothelin und PDGF bezogen auf die Kontrolle. Es wurde mit Endothelin (ET) 10 nM und/oder PDGF 5ng/ml stimuliert. Endothelin allein zeigte keinen signifikanten Anstieg ( n=4, p=0,068), jedoch bewirkt PDGF, sowie Endothelin und PDGF gemeinsam einen Anstieg. n=6, p=0,028(\*).

### 3.3.3 Einfluß von Schüttelstress auf die TGF $\beta_1$ Produktion

Mehrere Kulturmedien wurden nach 72h Schüttelstress der jeweiligen ungeschüttelten Kontrolle gegenübergestellt (s. Abb.3.7). Es konnte kein Einfluss auf die TGF $\beta_1$  Produktion durch Schüttelstress festgestellt werden. Die mit dem Wilcoxon-Test ermittelten p-Werte liegen bei  $p=1,00$ ,  $p=0,929$ ,  $p=0,328$ ,  $p=0,893$  und  $p=0,686$ . Trotz der z.T. kleinen Fallzahlen von  $n=5$  und der relativ großen interindividuellen Schwankungsbreite zeigt dieses Ergebnis, dass Schüttelstress keinen Einfluß auf die TGF $\beta_1$  Produktion hat. In der Abbildung 3.7 sind nebeneinander für das jeweilige Medium die ungeschüttelten (dunkle Box) Kulturen und die geschüttelten (helle Box) Kulturen dargestellt.

### 3.3.4 Einfluß von Dehnung auf die TGF $\beta_1$ Produktion

Die TGF $\beta_1$  Konzentration in den zyklisch gedehnten Kulturen zeigte bei großer Varianz der Zelllinien keine signifikanten Ergebnisse, sondern nur eine Tendenz in Richtung einer verminderten TGF $\beta_1$  Ausschüttung. Der deutliche Anstieg von TGF $\beta_1$  unter Glukose gegenüber der Kontrolle war in den Kulturen, die auf den flexiblen Membranunterlagen wuchsen, kaum ausgeprägt.

Um eine mögliche Beeinflussung der TGF $\beta_1$  Konzentration durch unterschiedliche Zellmenge oder fehlender Proliferation zu betrachten, wurde die Menge an TGF $\beta_1$  zusätzlich auf die Proteinmenge der Zellen bezogen. Auch dann zeigte sich nur eine tendenziell reduzierte TGF $\beta_1$  -Konzentration unter Dehnung ( $p=0,144$  bzw.  $p=0,068$  für Dehnung und Glukosemedium), trotz der leichten Erhöhung der Proteinmenge in den gedehnten Kulturen (siehe auch Abb. 3.16).

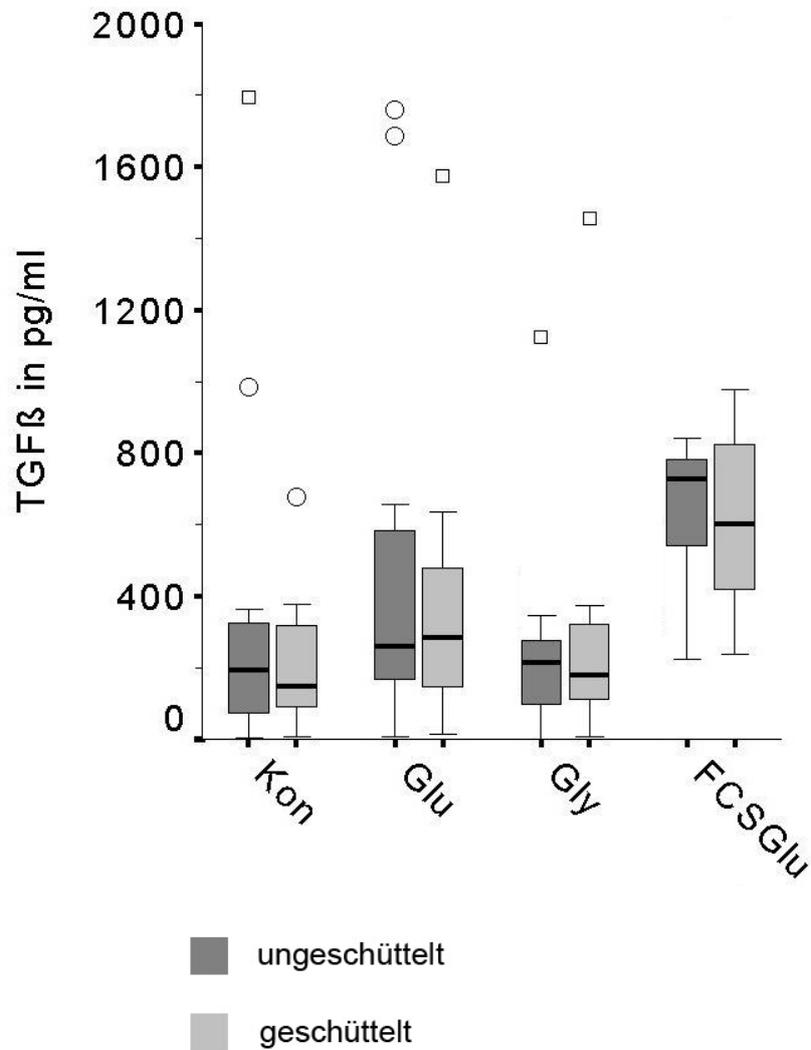


Abbildung 3.7: Auswirkung von Schüttelstress auf TGF $\beta_1$  in pg/ml nach 72h. Die Box-Plots stellen immer im Wechsel die Konzentration von TGF $\beta_1$  im ungeschüttelten (dunkel) und im geschüttelten (hell) Medium dar. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied von ungeschüttelten und geschüttelten Kulturen, die Effekte der verschiedenen Mediumzusätze bleiben aber auch unter Schüttelstress der Zellen erhalten. n=5 bis n=12, p=1 bis p=0,68.

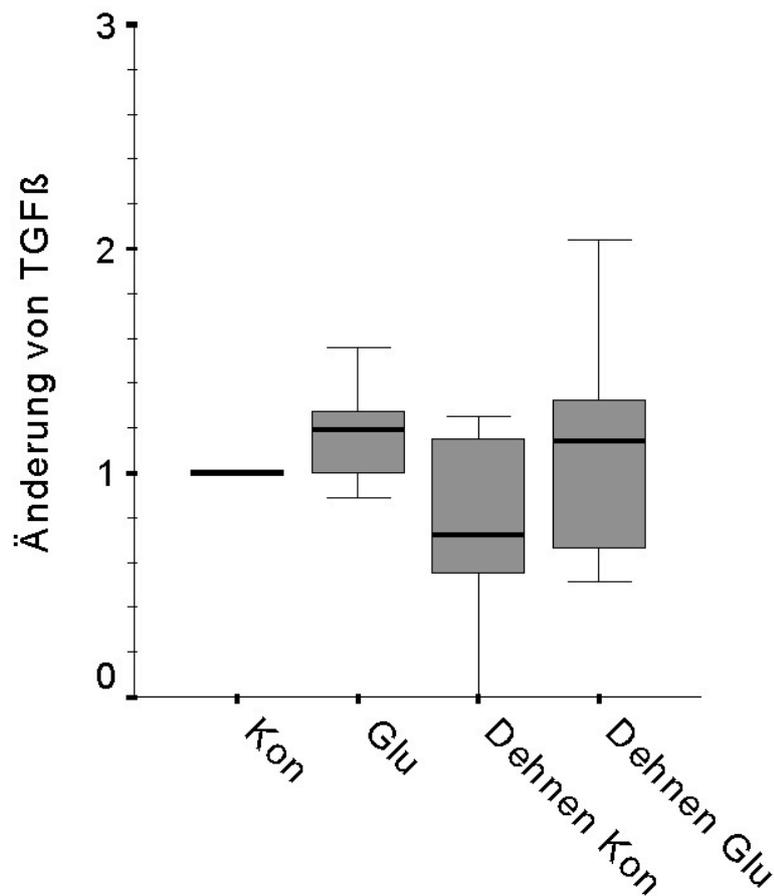


Abbildung 3.8: **Änderung von TGF $\beta_1$  durch Dehnungsstress.** TGF $\beta_1$  wurde auf die TGF $\beta_1$  -Menge der Kontrolle bezogen. Es zeigt sich durch Dehnung keine signifikante Änderung von TGF $\beta_1$  . n=8.

## 3.4 Kollagensynthese

Die Messung des neu produzierten Kollagen 1 erfolgte über einen Radioimmunoassay, der die Menge des vorhandenen PINP mißt. PINP ist das n-terminale Ende des Prokollagens, das bei der Bildung des Kollagens abgespalten wird.

Wie bei  $TGF\beta_1$  fand sich eine von der Zelllinie abhängige Konzentration der PINP-Produktion.

Es erfolgte ein Versuch mit 1% FCS im Medium, was erwartungsgemäß eine Erhöhung der PINP-Konzentration zur Folge hatte. Die mediane Erhöhung von PINP durch 1% FCS lag bei 35%, mit 1% FCS und 40 g/l Glukose bei 65,6% Erhöhung ( $n=5$ ,  $p=0,043$ , ohne Abbildung). Den folgenden Experimenten wurde kein FCS zugesetzt, soweit nicht anders angegeben.

### 3.4.1 Der Effekt von Glukose und Glycerol auf die Kollagensynthese

Die basale Produktion von PINP betrug im Überstand der Kontrolle je nach Zelllinie zwischen 15 ng/ml und 58 ng/ml (Abb. 3.9). Die Konzentration von PINP wurde nach 72 h gemessen. Glukose hebt die PINP-Konzentration im Median um 41%, Glycerol nur um 33%, wobei die Reaktion auf Glukose eine wesentlich größere interindividuelle Varianz zeigt. Die Signifikanz gegenüber der Kontrolle liegt für Glukose mit  $n=10$  bei  $p=0,037$  und für Glycerol bei  $p=0,015$ .

### 3.4.2 Endothelin und PDGF

Der Effekt von Endothelin und PDGF auf die Kollagensynthese ist dem Effekt auf die  $TGF\beta_1$  Produktion ähnlich. Endothelin allein hat tendenziell nur eine sehr geringe Wirkung (Abb. 3.10). PDGF hat eine signifikant stei-

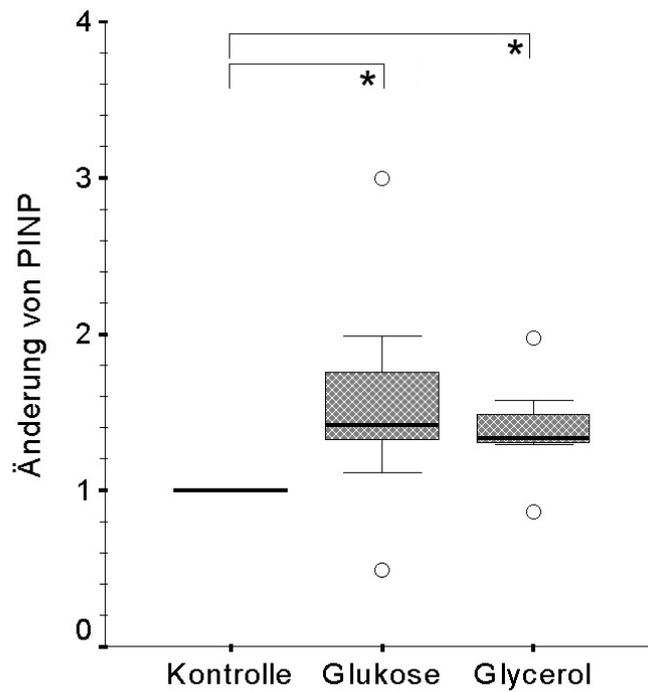


Abbildung 3.9: Änderung der PINP Konzentration nach 72-stündiger Glukosebehandlung bzw. Glycerolbehandlung. Die PINP Konzentration liegt im Glukosemedium 41% (540mosm/kg) und im Glycerolmedium 33% (540mosm/kg) über der Kontrolle (340mosm/kg), n=10, Glukose p=0,037(\*), Glycerol p=0,015(\*)

gernde Wirkung auf die Zunahme von PINP. Der Median liegt bei stimulation mit PDGF um 46,3% über der Kontrolle. Beide Faktoren zusammen bewirken erst einen signifikanten Anstieg des Medians um 78,4%.

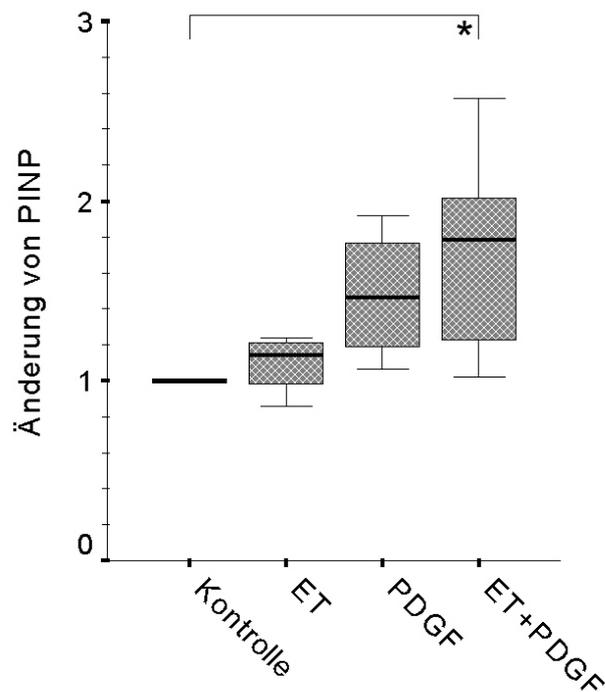


Abbildung 3.10: Einfluß von Endothelin und PDGF auf die PINP Konzentration. Anstieg von PINP bezogen auf die Kontrolle. Es wurde mit Endothelin (ET) 10 nM,  $p=0,144$ ,  $n=4$ , und Plateled Derived Growth Factor (PDGF) 5ng/ml,  $n=4$ ,  $p=0,068$ , stimuliert. Endothelin und PDGF  $n=6$ ,  $p=0,028(*)$ .

### 3.4.3 Schüttelstress

Durch Schüttelstress alleine konnte keine signifikanter Anstieg der PINP Konzentration erreicht werden (s. Abb.3.11). Der Anstieg von PINP der durch Glukose oder Glukose in Kombination mit Endothelin und PDGF erreicht wurde, war in den geschüttelten Kulturen geringer als in den ungeschüttelten. Wurden z.B. die mit Glukose behandelten Kulturen zusätzlich

geschüttelt, so fiel PINP gegenüber der alleinigen Glukosebehandlung um 17% ab (n=9, p=0,038).

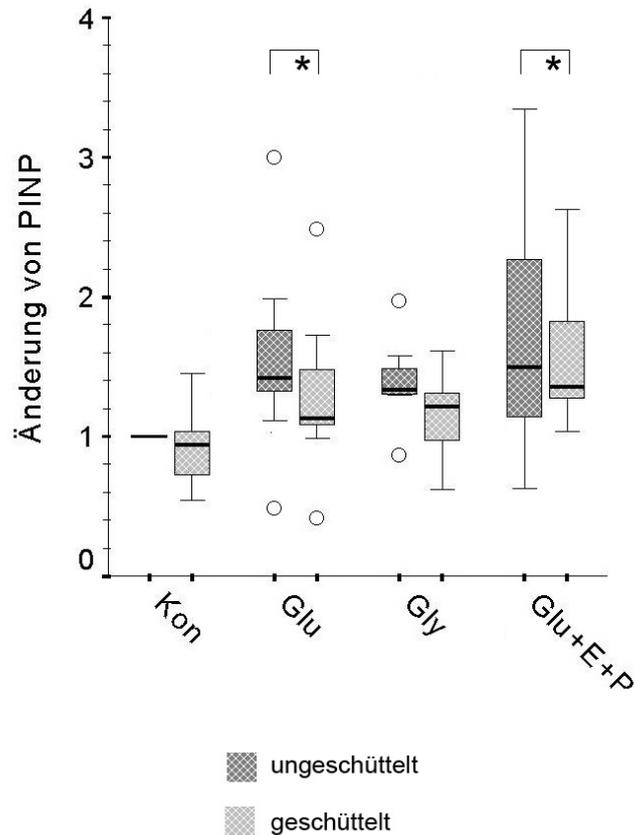


Abbildung 3.11: **Änderung der PINP Konzentration nach 72-stündigem Schüttelstress.** Dargestellt sind alternierend die relativen Konzentrationen der jeweiligen Medien ungeschüttelter (dunkle Boxen) und geschüttelter (helle Boxen) Kulturen. Unter allen Kulturmedien sinkt die PINP-Konzentration der geschüttelten Kulturen leicht ab: unter Glukose, 1% FCS, ET und PDGF. Schütteln: Kontrolle n=9, p=0,374, Glukose n=9, p=0,038(\*), Glycerol n=9, p=0,066, Glukose mit ET und PDGF n=5, p=0,043(\*)

### 3.4.4 Dehnungsstress

Die Ergebnisse des RIA zur Untersuchung der PINP-Konzentration unter zyklischem Dehnungsstress sind in Abbildung 3.12 zusammengefasst.

Die Veränderungen sind auf die ungedehnten Kulturen in Kontrollmedium bezogen, welche ebenfalls auf den flexiblen Membranen wuchsen. Die gedehnten Kulturen zeigten nach 72-stündigem Dehnungsstress einen signifikanten Anstieg von PINP ( $n=6$ ,  $p=0,028$ ). In den statischen Kulturen, welche auf flexiblen Membranen wuchsen, war der typische Anstieg von PINP durch Glukose nicht ausgeprägt (ohne Abb.). Wurden die Kulturen in Glukosemedium zusätzlich gedehnt, zeigten sie einen Abfall von PINP (ohne Abb.).

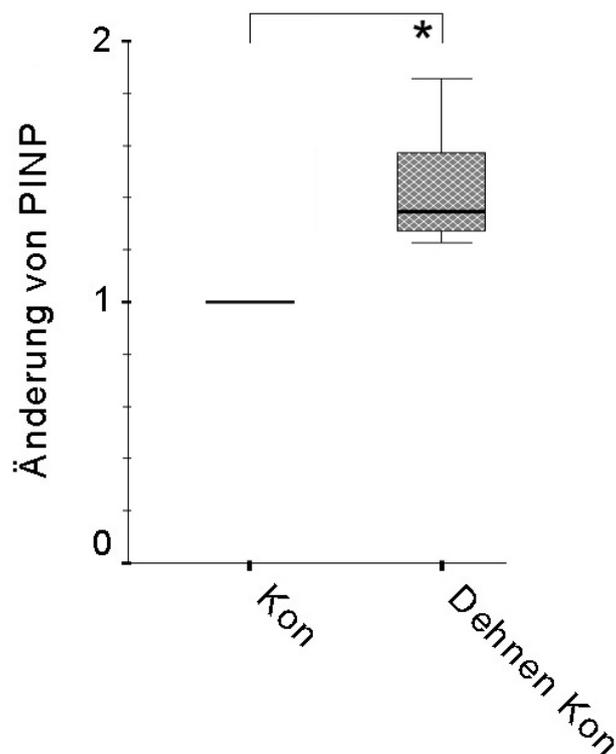


Abbildung 3.12: **Änderung von PINP durch Dehnen nach 72h.** Die Bestimmung von PINP erfolgte aus Kulturmedium mittels eines RIA. Der Median der PINP Konzentration liegt in der gedehnten Kultur 30% über der Kontrolle.  $n=6$ ,  $p=0,028$ (\*).

### 3.4.5 Kollagenmessung über Prolineinbau

Neben der sehr spezifischen Messung der Kollagenmenge über die PINP-Konzentration wurde die Prolinmenge gemessen. Diese Aminosäure kommt in verschiedenen Proteinen vor, aber hauptsächlich in Kollagen, wo sie über die Hälfte der Aminosäuren stellen kann. Während der Experimente wurde  $^3\text{[H]}$ -Prolin zugefügt, welches mit schwerem Wasserstoff markiertes ist. Nach Aufbereitung der Proben wurden mit einem Betastrahler-Counter die radioaktiven Zerfälle gemessen. Daraus lassen sich Rückschlüsse auf die in die Zellen und ihre Matrix eingebaute Kollagenmenge ziehen.

Die Abbildung 3.13 zeigt die relative Prolinmenge auf die jeweilige Kontrolle bezogen. Nach den 72 Stunden Glukosebehandlung wird Prolin während der letzten 16 Stunden nicht verstärkt in die Zellen eingebaut. Aber die Behandlung mit  $\text{TGF}\beta_1$  und FCS zeigt einen deutlichen Anstieg des Prolineinbaus. Die Zellen, denen 2 ng/ml  $\text{TGF}\beta_1$  zugesetzt wurde, bauten 57% mehr Prolin ein als die Kontrolle ( $n=5$ ,  $p=0,043$ ). Wenn dem Medium 10% FCS zugesetzt waren, so bauten die Fibroblasten 91% mehr Prolin in ihre Proteine ein ( $n=5$ ,  $p=0,043$ , ohne Abb.). Wurde dem Glukosemedium  $\text{TGF}\beta_1$  oder FCS zugesetzt, so stieg die eingebaute Prolinmenge signifikant um 80% bzw. um 141%.

Auch im direkten Vergleich von Glukosemedium mit  $\text{TGF}\beta_1$  oder FCS gegenüber Glukosemedium ohne weitere Zusätze sieht man diesen deutlich verstärkten Prolineinbau durch  $\text{TGF}\beta_1$  und FCS. Bei erhöhter Glukose und  $\text{TGF}\beta_1$  Zugabe ist der Einbau gegenüber Glukose um 58% höher und bei erhöhter Glukose und 10% FCS sogar um 152% ( $n=5$ ,  $p=0,043$ ). Der um 19% höhere Prolineinbau im Glukosemedium mit FCS im Vergleich zu dem Kontrollmedium mit FCS ist mit  $p=0,08$  nur in der Tendenz zu erfassen, zeigt aber, dass Glukose zusammen mit anderen Faktoren doch eine Rolle für den verstärkten Prolineinbau spielen könnte.

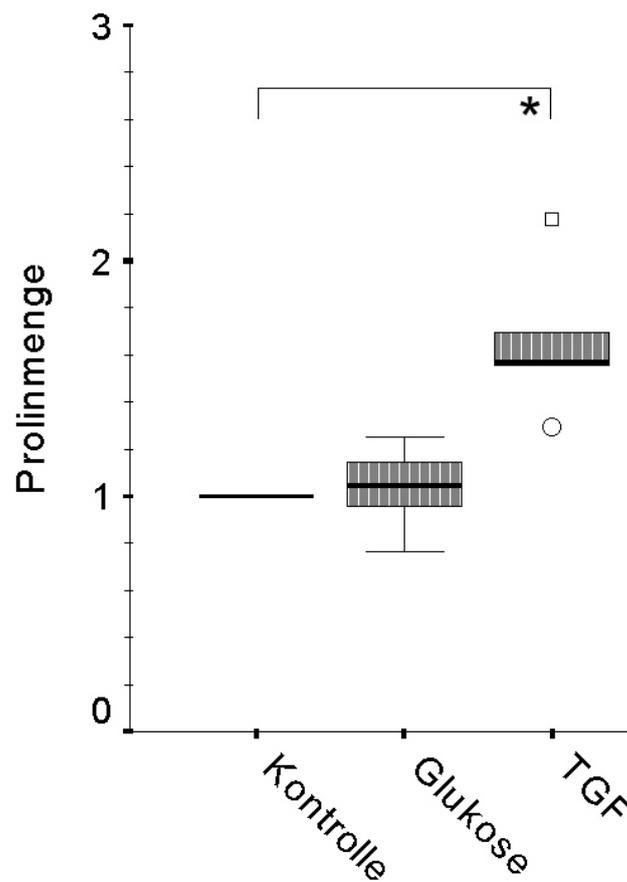


Abbildung 3.13: Einfluß von Glukose,  $TGF\beta_1$  und 10% FCS auf den Prolineinbau. Mit Glukose zeigt sich keine Änderung der Prolinmenge. ( $n=5$ ,  $p=0,5$ ), Kontrolle=1. Der Anstieg von Prolin mit  $TGF\beta_1$  2 ng/ml ist mit  $n=5$ ,  $p=0,043$ (\*) signifikant.

### 3.5 Proteinmengenveränderung

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge erfolgte mit einem BCA Protein Assay Kit von Pierce, welches die in den Proben enthaltene Proteinmenge photometrisch quantitativ erfasst. Die Abbildung 3.14 zeigt die Veränderung der Gesamtproteinmenge unter verschiedenen Bedingungen. Die Proteinmenge steigerte sich unter der Gabe von Glukose um 33% ( $p=0,043$ ,  $n=5$ ). Ebenso steigerte die gemeinsame Zugabe von Endothelin und PDGF die Gesamtproteinmenge um 44% ( $p=0,043$ ,  $n=5$ ). Auch  $TGF\beta_1$  steigerte die Proteinmenge um 24%. Das viele Faktoren enthaltende 10%-ige FCS Medium erhöhte die Proteinmenge um 75%. Der durch die verschiedenen Faktoren ausgelöste Proteinanstieg wird durch Schüttelstress gemindert. Dies entspricht der Veränderung, die durch Schüttelstress auf die PINP-Menge zu beobachten ist (s. Abb.3.15). Schüttelstress verändert die Proteinmenge im Kontrollmedium nicht.

Bei den gedehnten Kulturen findet sich ein Anstieg um 12% gegenüber den ungedehnten Kontrollen, wobei sich aus dem p-Wert mit 0,068,  $n=4$ , nur eine Tendenz und keine Signifikanz ableiten lässt (Abb. 3.16).

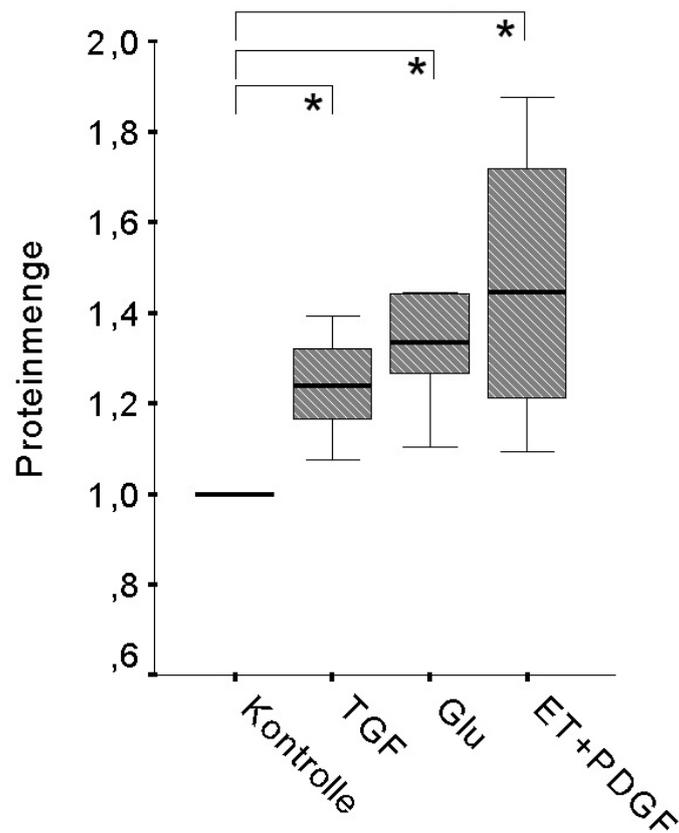


Abbildung 3.14: **Einfluß vom Medium auf die Proteinmenge.** Anstieg von Gesamtproteinmenge bezogen auf die Kontrolle (Kontrolle=1). Es wurde mit Endothelin (ET) 10 nM, und Plateled Derived Growth Factor (PDGF) 5ng/ml, TGF $\beta_1$  2ng/ml, und Glukose 3,8g/l stimuliert. n=5, p=0,043(\*).

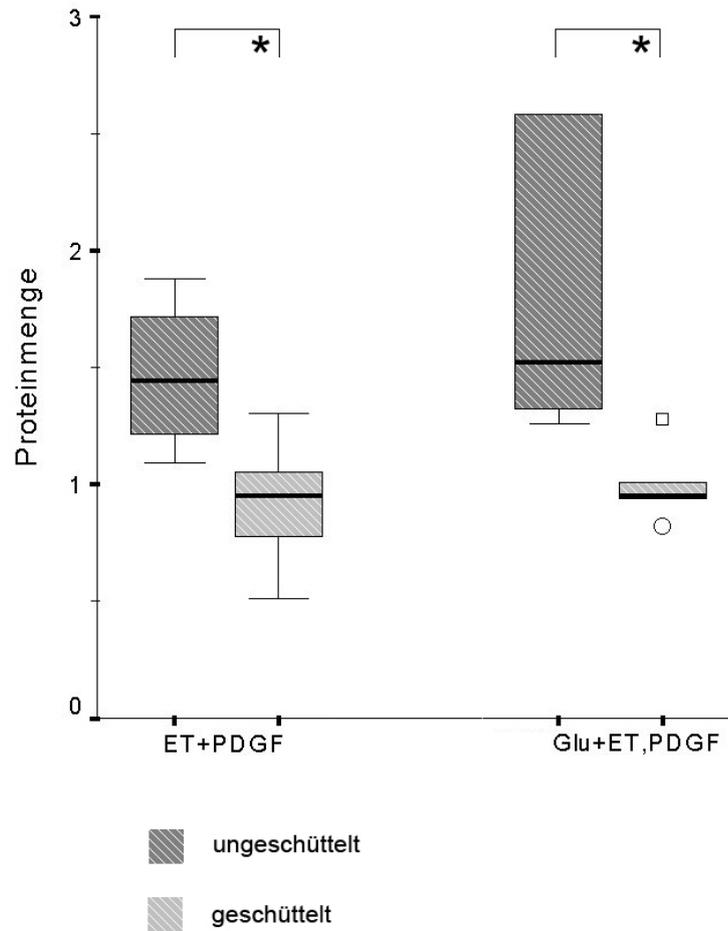


Abbildung 3.15: Einfluß von Schüttelstress auf die Proteinkonzentration. Änderung der Proteinmenge von ungeschüttelten (dunkle Boxen) und geschüttelten (helle Boxen) Kulturen, bezogen auf die jeweilige ungeschüttelte Kultur. Es wurde mit Endothelin (ET) 10 nM, und Plateled Derived Growth Factor (PDGF) 5ng/ml, Glukose 3,8g/l stimuliert.  $p=0,043^*$ ,  $n=5$

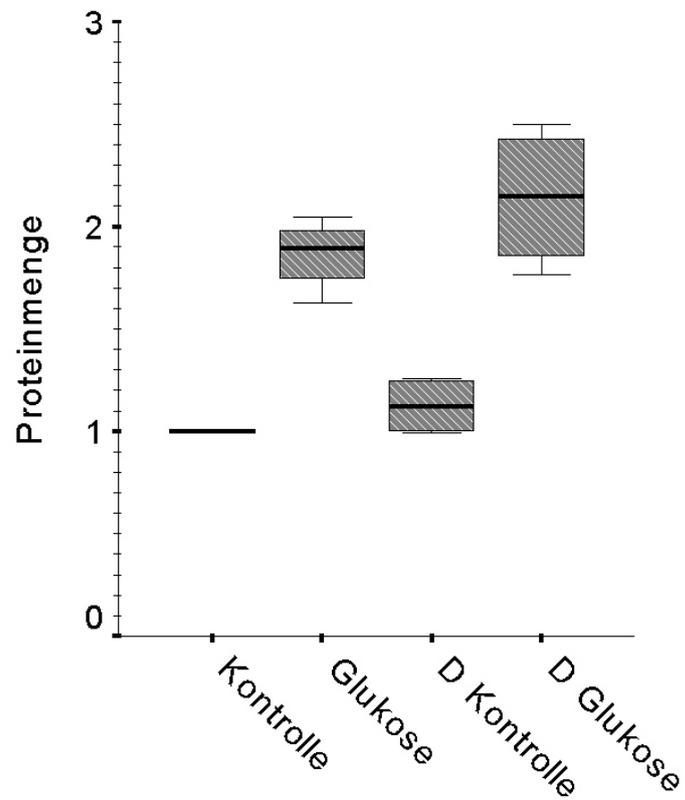


Abbildung 3.16: **Einfluß von Dehnung auf die Proteinmenge.** Anstieg von Protein bei gedehnten Kulturen bezogen auf die ungedehnte Kontrolle. Der Anstieg durch Dehnungsstress ist mit  $p=0,068$ ,  $n=4$  nicht signifikant.

### 3.6 Proliferationsrate der Fibroblasten

Die Thymidinmenge in den Zellen ist unter gleichzeitigem Einfluß von Glukose und 10% FCS am größten. Die so stimulierten Zellen sind hinsichtlich der DNA-Synthese am aktivsten. Die Thymidinmenge der Zellen ist gegenüber der Kontrolle um 165% gesteigert ( $n=10$ ,  $p=0,005$ ). Die Stimulation mit FCS erreicht schon einen Thymidingehalt, der 78% über der Kontrolle liegt ( $n=10$ ,  $p=0,005$ ). TGF $\beta_1$  allein bewirkt einen Abfall der Thymidinmenge um 64% ( $n=10$ ,  $p=0,005$ ), und Glukose führt zu einem Abfall von 43% ( $n=10$ ,  $p=0,017$ ). TGF $\beta_1$  und Glukose zusammen ergeben aber keinen noch stärkeren Abfall der Thymidinmenge. Der Median liegt bei 0,928 und ändert sich somit um nur 7% gegenüber der Kontrolle.

Die Thymidinmenge unter Glukose und TGF $\beta_1$  liegen also ungefähr so hoch wie in den Kontrollen. Dennoch gibt es signifikante Unterschiede der mit TGF $\beta_1$  behandelten Zellen. Die Thymidinmenge unter Glukose und TGF $\beta_1$  ist signifikant höher als unter alleinigem Einfluß von TGF $\beta_1$  ( $n=10$ ,  $p=0,005$ ). Auch ist die Thymidinmenge bei Glukose und TGF $\beta_1$  höher als bei Glukosebehandlung allein ( $n=10$ ,  $p=0,028$ ).

### 3.7 Endothelinexpression und RNA Analyse

Die mRNA der Fibroblasten wurde auf die Expression von Endothelin 1, Endothelinrezeptoren A und B, Endothelin-converting Enzyme, sowie Kollagen 1 untersucht. Die isolierten Humanen Peritonealen Fibroblasten waren alle positiv für die Endothelinrezeptoren A und B, ebenso für das Endothelin Converting Enzyme. Die RNA für Endothelin 1 wurde nicht in allen Fibroblastenlinien exprimiert. Für einzelne Zelllinien zeigte sich in der PCR keine oder eine nur hauchdünne Bande, während andere Zelllinien eine der GapDH-Bande vergleichbare Produktmenge zeigten.

In der Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse aus dem Endothelin-ELISA, dem

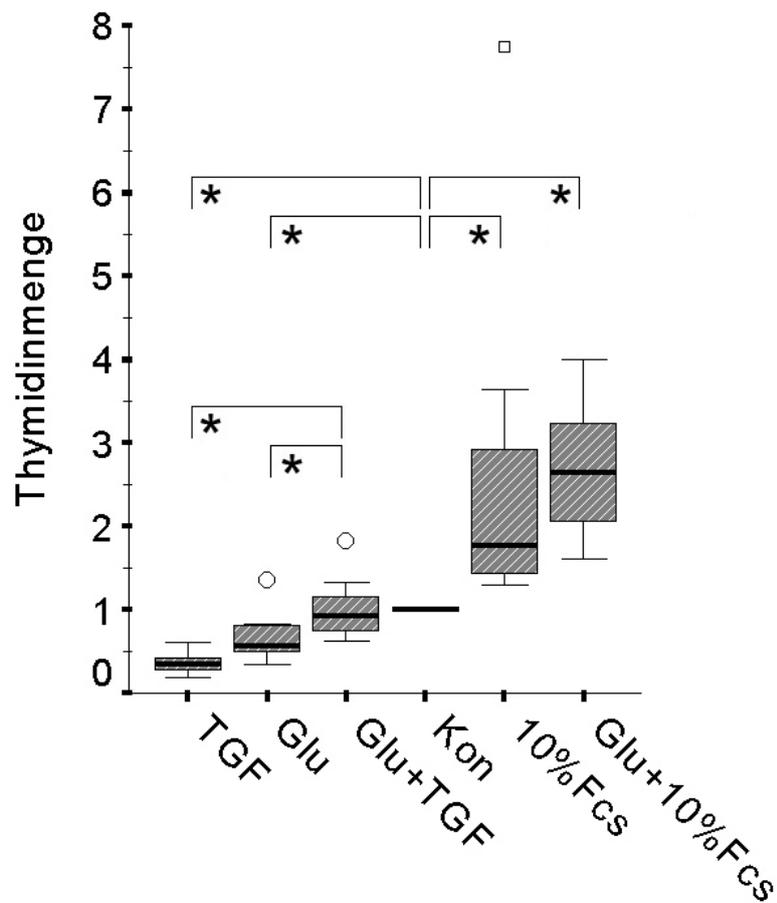


Abbildung 3.17: Einfluß von Glukose, TGF $\beta_1$  (2 ng/ml) und 10% FCS auf den Thymidineinbau. Abfall des Thymidineinbaus unter Glukose und TGF $\beta_1$ , Anstieg bei FCS-behandelten Kulturen bezogen auf die Kontrolle (Kontrolle=1). n=10, p<0,03(\*)

TGF $\beta_1$  -ELISA und der PCR zusammengefasst. Bei drei HPF-Linien lassen sich dicke Endothelin-1 Banden in der PCR erkennen. Im ELISA konnte bei diesen Linien Endothelin in einer Konzentration von 3,2 – 5,2 fmol/ml im Überstand nachgewiesen werden. Die basale TGF $\beta_1$  Konzentration ist mit 180 – 982 pg/ml in diesen Zelllinien eher hoch. In drei anderen HPF-Linien zeigten sich nur sehr dünne Endothelin-1 Banden in der PCR und keine meßbare Werte von Endothelin-1 im Überstand. In diesen drei HPF-Linien konnte nur eine sehr niedrige basale TGF $\beta_1$  -Produktion von 34 – 73 pg/ml nachgewiesen werden.

In den Abbildungen 3.18 bis 3.21 sind die Fibroblastenlinien 1-4 auf ihre mRNA untersucht worden. Die beiden oberen Gele in Abbildung 3.18 und Abbildung 3.19 zeigen die Banden für Endothelinrezeptor A und B positive Zellen. Das Gel der Abbildung 3.20 zeigt ECE positive Zellen. Im Gel der Abbildung 3.21 sind für Endothelin 1 positive und negative Fibroblastenlinien zu sehen.

Tabelle 3.1: Zusammenhang von Endothelin-RNA, Endothelin-Protein und TGF $\beta_1$  im Überstand

HPF-Linie	ET-1 PCR	ET-1 ELISA [fmol/ml]	TGF $\beta_1$ [pg/ml]
21	dicke Bande	3,5	328
13	dicke Bande	5,2	982
17	dicke Bande	3,2	180
11	dünne Bande	<0,05	73
25	dünne Bande	<0,05	43
29	dünne Bande	<0,05	34

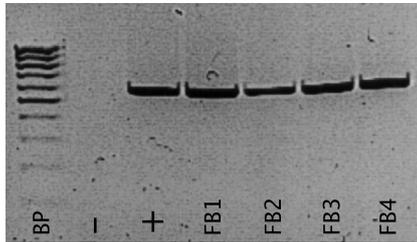


Abbildung 3.18: **Endothelinrezeptor A positive HPF**. Es wurde cDNA nach 35 PCR Zyklen mit einem spezifischen Primerpaar aufgetragen. Links ist die DNA-Leiter mit 100 bis 1000 Basenpaaren aufgetragen, daneben eine Negativkontrolle ohne cDNA und eine Positivkontrolle mit Mesothelzell-DNA. Die vier rechten Banden sind von vier verschiedenen HPF-Zelllinien.

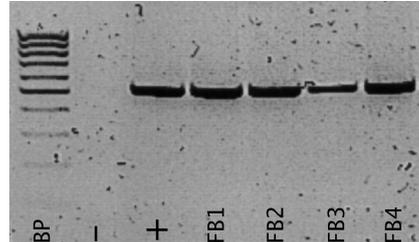


Abbildung 3.19: **Endothelinrezeptor B positive HPF**. Es wurde cDNA nach 35 PCR Zyklen mit einem spezifischen Primerpaar aufgetragen. Links ist die DNA-Leiter mit 100 bis 1000 Basenpaaren aufgetragen, daneben eine Negativkontrolle ohne cDNA und eine Positivkontrolle mit Mesothelzell-DNA. Die vier rechten Banden sind von vier verschiedenen HPF-Zelllinien.

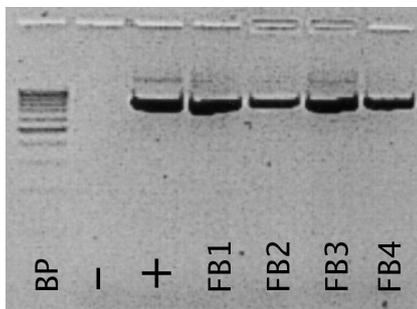


Abbildung 3.20: **Endothelin Converting Enzyme positive HPF**. Es wurde cDNA nach 35 PCR Zyklen mit einem spezifischen Primerpaar aufgetragen. Links ist die DNA-Leiter mit 100 bis 1000 Basenpaaren aufgetragen, daneben eine Negativkontrolle ohne cDNA und eine Positivkontrolle mit Mesothelzell-DNA. Die vier rechten Banden sind von vier verschiedenen HPF-Zelllinien.

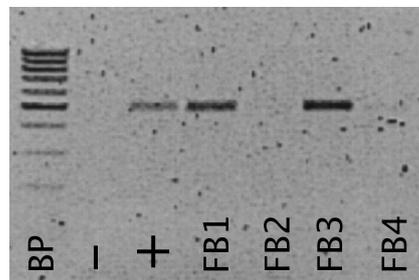


Abbildung 3.21: **Für Endothelin 1 positive und negative humane HPF**. Es wurde cDNA nach 29 PCR Zyklen aufgetragen. Links die DNA-Leiter mit 100 bis 1000 Basenpaaren, daneben eine Negativkontrolle ohne cDNA und eine Positivkontrolle mit Mesothelzell-DNA. Die vier rechten Banden sind von vier verschiedenen HPF-Zelllinien: zwei positive und zwei negative.

# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Morphologie und Zytoskelett der HPF

Die von uns isolierten Humanen Peritonealen Fibroblasten konnten morphologisch im Lichtmikroskop und mittels eines spezifischen monoklonalen Antikörpers eindeutig als humane Fibroblasten identifiziert werden (siehe Abb.3.1).

Die Anfärbung mit dem monoklonalen Maus-Anti-Humane-Fibroblasten Antikörper zeigte eine intrazelluläre Anfärbung der isolierten Zellen. Der Antikörper bindet hochspezifisch an die Beta-Untereinheit der Propyl-4-Hydroxylase und Disulphidisomerase. Somit färben sich nur aktiv kollagen synthetisierende Fibroblasten, azidophile Granulozyten oder Plasmazellen an. Letztere sind aber aufgrund ihrer deutlich anderen Morphologie leicht von Fibrozyten abzugrenzen.

Bereits im Lichtmikroskop sind die Fibroblasten aufgrund ihrer typischen Zellform und Zellanordnung zu erkennen. In vitro auf Polyethylen-Kulturböden bilden sie die typischen länglichen Zellkörper aus, die sich fischzugartig anordnen (siehe Abbildung 3.1). Dieses spezifische Wachstumsmuster ist lange bekannt. Auffallend war, dass die von uns isolierten

Fibroblasten nach Trypsineinwirkung und nachfolgender Ablösung von den Kulturschalen eine völlig runde Form annahmen. Wells et al. [Wells, 2005] beschreibt ebenfalls die morphologischen Veränderungen hepatischer Sternzellen, welche aus neonatalen Ratten isoliert wurden. Direkt nach der Isolierung sind die Zellen abgerundet. In den ersten Tagen *in vitro* werden die Zellen als ruhend betrachtet, etwa ab dem siebten Tag als aktivierte Hepatische Sternzellen. Sie besitzen zu diesem Zeitpunkt die äußeren Merkmale von Myofibroblasten. Sie haben ihre Lipidtröpfchen verstoffwechselt, proliferieren zunehmend, synthetisieren Fibrogen und exprimieren  $\alpha$ -Smooth Muscle Aktin wie in der glatten Muskulatur [Wells, 2005; Powell et al., 1999a]. Diese Transdifferenzierung vollzieht sich *in vivo* insbesondere unter der Wirkung von  $TGF\beta_1$ , PDGF, CTGF, Endothelin-1 und  $TNF\alpha$  [Shephard et al., 2004; Garrett et al., 2004]. Einige dieser Faktoren -  $TGF\beta_1$ , PDGF und Endothelin - ihre Expression und Wirkung konnten wir an HPF *in vitro* untersuchen.

Die Fibroblasten sind auch in der Aktinfärbung unter dem Fluoreszenzmikroskop gut zu erkennen. Besonders interessant sind hier die intrazellulären Verzweigungen des Aktingerüsts. Zunächst fällt auf, dass die Zellen ohne 1% FCS im Medium deutlich weniger angefärbtes polymerisiertes F-Aktin enthalten. Auch die gedehnten Zellen besitzen weniger polymerisiertes Aktin (siehe Abb.3.3). Endothelin 1 und PDGF erhöhen, wenn auch in geringem Ausmaß, die Gesamtmenge von polymerisiertem Aktin. Hochmolares Glukosemedium veränderte die Menge polymerisierten Aktins in unserem Versuchsaufbau nicht. Weder bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung noch bei der Messung der emittierten Photonen konnten Unterschiede nachgewiesen werden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Campbell, die an vaskulären glatten Muskelzellen vom Schwein einen glukoseinduzierten Anstieg von F-Aktin fanden [Campbell et al., 2003]. Bezüglich der Anzahl der Filopodien fanden sie eine Zunahme im Glukosemedium. Wir konnten keine höhere Filopodienanzahl unter Glukoseeinwirkung finden, dafür fanden wir unter mecha-

nischem Schüttelstress eine Zunahme der Filopodien und der größeren, blattartigen Lamellipodien (siehe Abb.3.4). Filopodien sind Membranausstülpungen, die sehr wechselhaft sind. Sie können sich innerhalb weniger Stunden ausbilden, und haben nachgewiesenermaßen eine große Bedeutung für chemotaktische Vorgänge [Allen et al., 1998]. Die Filopodien sind wichtige Strukturen der Zellen, um ihre Umgebung zu erkunden, mögliche Adhaesionsziele auf der Oberfläche anderer Zellen ausfindig zu machen und dann an der Bildung dieser auch teilzuhaben [Wood und Martin, 2002]. Adhaesionen sind Rho-Kinase abhängig, aber auch PDGF hat einen wichtigen Einfluß auf die Membranzugänglichkeit von  $\beta$ 1-Integrinen, die ein Bestandteil von Adhaesionen sind [Ahlen et al., 2004; Amano et al., 1997; Zamir und Geiger, 2001; Hinz, 2006]. Insgesamt konnten wir eine zunehmende Auflockerung der zunächst dicht und geordnet von den Fibroblasten bewachsenen Kulturschale zeigen, die von der Kontrolle über die geschüttelten zu den gedehnten Fibroblasten zunahm. Die streng parallele intrazelluläre Anordnung der F-Aktinfilamente lockerte sich, der Gesamtgehalt an F-Aktin nahm ab. Die Anzahl der Filopodien und Lamellipodien nahm zu, so dass zum Teil Löcher im Zellrasen entstanden (siehe Abb.3.3).

## 4.2 Aktivierung und Differenzierung der Fibroblasten

Unsere Kulturen wuchsen in einem zweidimensionalen System. Damit haben sie andere Voraussetzungen extrazelluläre Matrix zu bilden, als Kulturen in dreidimensionalen Systemen oder als *in vivo*. Ein wichtiger Unterschied ist die spannungsabhängige myofibroblastische Differenzierung von Fibroblasten auf Polyethylenschalen. Im folgenden sollen einige Modelle dazu vorgestellt werden.

Ruhende Fibroblasten *in vitro* kommen übereinstimmend nach Hinz, Garosi und Tomasek nur in unfixierten 3-dimensionalen Kulturen vor. Die Fi-

broblasten wachsen in diesem Modell in einem 3-dimensionalen flexiblen Kollagengel. Auf normalen unflexiblen Kulturschalen, z.B. aus Polyethylen, entsteht eine Spannung, die die Zellen zwischen ihren Anhaftungspunkten an der Kulturschale entwickeln. Damit beginnt bereits eine Aktivierung und Umwandlung in Protomyofibroblasten [Hinz und Gabbiani, 2003; Tomasek et al., 2002; Powell et al., 1999a]. Hinz zeigte, wie  $\alpha$ -Smooth Muscle Aktin exprimierende Myofibroblasten auf einem unflexiblen Untergrund faltige Strukturen bilden [Hinz und Gabbiani, 2003]. Protomyofibroblasten, die nur filamentöses Aktin besitzen, haften jedoch glatt dem Untergrund an. Adhaesionen sind zelluläre Strukturen, die das Aktingerüst der Zelle über Integrine mit der extrazellulären Matrix verbinden. Über die Adhaesionen können die Zellen erstaunliche Kräfte entwickeln, nach Tomasek bis zu  $5,5 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$  [Tomasek et al., 2002].

Chiquet stellt in seinem Artikel dar, wie nach aktuellem Wissen die mechanischen Kräfte, die auf Fibroblasten wirken, in intrazelluläre Signale übertragen werden und letztlich zu einer extrazellulären Matrixproduktion führen können [Chiquet et al., 2003]. Die Integrine und Zellmatrixadhäsionen als Mechanosensoren triggern Rho-kinase abhängig z.B. MAPK (mitogen-activated protein kinase), NF- $\kappa$ B und das Tenascin C.

Powell hat in einem Review von 1999 den Kenntnisstand über die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu aktiven Myofibroblasten dargestellt [Powell et al., 1999a,b]. In vitro können sich Fibroblasten oder stellatisch transformierte Myofibroblasten schon auf Grund der Spannung, die sie auf starren Kulturschalen entwickeln, in aktivierte Myofibroblasten umwandeln.

In vivo wird die Aktivierung z.T. unabhängig von der Proliferation hauptsächlich durch TGF $\beta_1$  [Border und Noble, 1994; Gressner, 1996; Shi et al., 1996], aber auch IL-1, TNF $\alpha$ , Endothelin, CTGF und FGF ausgelöst [Wells et al., 2004; Wells, 2005]. Aktivierte Myofibroblasten exprimieren  $\alpha$ -Smooth Muscle Aktin und sind in hohem Maße zur Kollagensynthese fähig. TGF- $\beta$

induziert bei Fibroblasten die PDGF-Rezeptoren und die PDGF-Synthese, über welche die proliferative Antwort vermittelt wird [Phillips et al., 1995; Soma und Grotendorst, 1989; Ishikawa et al., 1990; Haberstroh et al., 1993; Battegay et al., 1990]. TGF- $\beta$  selbst ist in diesem Zusammenhang eher ein zelldifferenzierender Faktor als ein proliferativer [Grotendorst, 1997]. In unseren Versuchen hat TGF $\beta_1$  eine deutlich differenzierende Wirkung auf die HPF, wie aus dem verminderten Thymidineinbau ersichtlich ist. Obwohl in vivo TGF $\beta_1$  für die Transdifferenzierung notwendig ist, kann myofibroblastische Differenzierung in vitro auch bei TGF $\beta_1$  negativen und Smad3 negativen Mäusezellen beobachtet werden [Schnabl et al., 2001; Hellerbrand et al., 1999; George et al., 1999]. Demzufolge muß es andere, ebenso effektive Auslöser für eine myofibroblastische Differenzierung geben. Dies könnten auch downstream Mediatoren des TGF $\beta_1$  sein. Schnabl zeigte an hepatischen Sternzellen der Maus, das Smad3 zur Kollagenexpression als Antwort auf TGF $\beta_1$  notwendig ist, aber die Aktivierung von Sternzellen mit  $\alpha$ -SMA auch ohne Smad3 ablaufen kann.

Hinz und Gabbiani charakterisieren Myofibroblasten als Zellen, die  $\alpha$ -Smooth Muscle Aktin und Fibronexus bilden, sowie in unterschiedlichem Ausmaß Tensin, Desmin, Myosin, Vinculin, Paxillin, Talin und Integrine exprimieren [Hinz und Gabbiani, 2003; Gabbiani, 2003]. Sie haben eine durch Lamellipodien gekennzeichnete Morphologie und synthetisieren viel Kollagen. In ihrem Modell differenzieren sich Fibroblasten unter Zugkräften, TGF- $\beta$  und PDGF zu Protomyofibroblasten, und dann weiter zu reifen aktiven Myofibroblasten. Protomyofibroblasten besitzen bereits einige Stressfasern, kondensierte intrazytoplasmatische Aktinstränge. Sie produzieren autokrin TGF $\beta_1$ , Serum Response Factor zur Bildung von  $\alpha$ -Smooth Muscle Aktin und Fibronektin zur Bildung von reifen Fibronexus. Fibronexus sind transmembranöse Integrine, die Zellen durch Adhaesion miteinander und besonders mit der extrazellulären Matrix verbinden. Tomasek beobachtete, dass  $\alpha$ -Smooth Muscle Aktin nur durch das Zusammenspiel von TGF- $\beta$  und mechanischer Spannung entsteht, wohingegen sich die

Transdifferenzierung durch PDGF auslösen ließ [Tomasek et al., 2002]. Die Untersuchungen von Garrett bestätigen die Wirkung des  $TGF\beta_1$  bezüglich  $\alpha$ -Smooth Muscle Aktin [Garrett et al., 2004]. Garrett verwendete als dreidimensionales Kontraktionsmodell ein Kollagengerüst auf dem Corneafibroblasten ausgesät waren. Mechanischer Stress durch Berühren des Kollagengerüsts wurde gemessen und festgestellt, dass  $TGF\beta_1$  notwendig ist für die Differenzierung zu Myofibroblasten über den downstream-Mediator CTGF (Connective Tissue Growth Factor). CTGF alleine bewirkt keine Myofibroblastendifferenzierung [Garrett et al., 2004].

Bonner fand durch PDGF eher einen mitogenen Effekt und durch  $TGF\beta_1$  einen Kollagenanstieg [Bonner, 2004].  $TGF\beta_1$  potenzierte aber auch den Effekt von PDGF bezüglich der Kollagensynthese, so dass PDGF eventuell ein upstream mediator des  $TGF\beta_1$  ist, welches dann über CTGF auf die Kollagensynthese wirkt.

Grotendorst ist es gelungen, eine Ursache für diese widersprüchlichen Wirkungen von  $TGF\beta_1$  zu finden [Grotendorst und Duncan, 2005].  $TGF\beta$  erhöht CTGF. Viele der Wirkungen von  $TGF\beta$  entfalten sich über CTGF als sogenanntem downstream Mediator [Garrett et al., 2004; Bonner, 2004; Grotendorst und Duncan, 2005]. Über die Erhöhung von CTGF entfalten sich im Zusammenspiel mit IGF-2 (Insulin like growth factor-2) und EGF (Epidermal Growth Factor) jeweils andere Wirkungen. Der N-terminale Anteil von CTGF bewirkt zusammen mit IGF-2 eine myofibroblastische Differenzierung und Aktivierung der Kollagensynthese. Der C-terminale Anteil und EGF steigern die Zellproliferation und DNA-Synthese. Damit lassen sich die einerseits proliferativen Effekte von  $TGF\beta_1$  und andererseits die differenzierende Wirkung erklären. Um eine bestimmte Wirkung zu erzielen sind somit weitere Kofaktoren im Mikromilieu der Zelle bedeutsam.

Die von uns gedehnten Zellen bilden mehr Fortsätze aus, die aber kürzer als die Fortsätze der ungedehnten Zellen sind. Der Zellverband wirkt daher löchriger als bei der Kontrolle. Auch sind in diesen eher plum-

pen Zellfortsätzen Aktinansammlungen vorhanden. Schon die morphologische Betrachtung gibt damit Hinweise auf die sehr aktive und vielfältige Antwort der Fibroblasten auf mechanische und humorale Reize.

### 4.3 Glukose

In einer prospektiven und randomisierten einjährigen Studie wurden bei neuen Peritonealdialysepatienten die Auswirkungen von hoher und niedriger Konzentration an Glukosedegenerationprodukten (GDP) in der Peritonealdialyseflüssigkeit untersucht [Do et al., 2005]. Nach einem Jahr wuchsen aus dem Dialysat mehr mesenchymal transformierte Zellen als epitheliale Zellen, wenn die GDP-Konzentration höher war. Dieser Effekt war unabhängig von der Anzahl von Peritonitisepisoden oder der Dauer von ACE-Hemmer-Behandlung. Niedrigere GDP-Konzentrationen störten die Reepithelialisierung weniger und verursachten weniger Transformation von epithelialen zu mesenchymalen Zellen [Do et al., 2005].

Hohe Glukosekonzentrationen, wie sie bei der Peritonealdialyse für das osmotische Gefälle benutzt werden, stellen einen profibrotischen Faktor dar. Über eine Erhöhung der  $TGF\beta_1$ -Expression kommt es zu einer Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten mit einer Zunahme von  $\alpha$ -SMA [Vaughan et al., 2000]. Weiterhin kommt es zu einem Anstieg der extrazellulären Matrix [Iglesias-de la Cruz et al., 2002; Heldin, 2004]. Andere Zytokine wie PDGF und Endothelin sind in die Signalkaskaden, die letztlich durch einen erhöhten Glukosespiegel ausgelöst werden, eingeschlossen [Grotendorst und Duncan, 2005; Leask und Abraham, 2004]. Die enge Verflechtung vieler Zytokine und Faktoren in vivo erschwert die Aufdeckung von Ursache und Wirkung in der Fibroseentstehung beträchtlich. So sind die zum Teil gegensätzlichen Reaktionen auf  $TGF\beta_1$  lange bekannt, aber erst in letzter Zeit beginnt man, die Zusammenhänge zu verstehen und Erklärungsmodelle zu finden.

So zeigen z.B unsere Ergebnisse, dass unter Glukose und auch unter TGF $\beta_1$  -Gabe der Thymidineinbau in den HPF vermindert ist, die Proliferation also reduziert wird zugunsten differentieller Aufgaben der Zellen wie der Produktion von Zytokinen und der Kollagensynthese. Glukose und TGF $\beta_1$  vermindern den Einbau von Thymidin, d.h. sie vermindern die Proliferation, erhöhen aber die Proteinsynthese. Mit FCS, welches viele weitere Substanzen und Proteine, Hormone und Zytokine enthält, ist der Einbau von Thymidin gesteigert, d.h. die Proliferation erhöht. Mit den Erkenntnissen von Grotendorst läßt sich daraus schlußfolgern, dass EGF (Epidermal Growth Factor) in FCS enthalten ist, nicht aber in serumfreiem Kulturüberstand der HPF [Grotendorst und Duncan, 2005]. Zusammen mit EGF kann der C-terminale CTGF Anteil seine proliferative Wirkung gegenüber dem differenzierenden Anteil durchsetzen.

#### **4.4 TGF $\beta_1$ -Produktion in HPF-Kulturen unter erhöhter Glukose**

Die Ergebnisse der von uns durchgeführten Experimente passen in den Gesamtkontext der bisher in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse. Doch sind nicht alle vielfältig miteinander verzahnten Signalkaskaden, die die TGF $\beta_1$  -Produktion so signifikant erhöhen, geklärt. In unseren Experimenten stieg unter dem Einfluß von 226,4mM (540mOsm/kg) Glukose, die den üblichen Peritonealdialysekonzentrationen entspricht, schon nach 48 Stunden die TGF $\beta_1$  -Produktion der HPF-Kulturen signifikant gegenüber den Kontrollen an. Die Erhöhung von TGF $\beta_1$  wurde noch massiver nach 72 Stunden Einwirkungszeit des 226,4mM Glukosemediums. Der durchschnittliche Wert von ca. 370 pg/ml TGF $\beta_1$  in den Kontrollen stieg unter Behandlung mit 226,4mM Glukose auf ca. 650 pg/ml TGF $\beta_1$  an. Das ist ein Anstieg um etwa 80% gegenüber der Kontrolle. Diese Zunahme der TGF $\beta_1$  -Produktion ist nicht durch osmotischen Stress bedingt, denn bei

Gabe von 540mOsm Glycerol ins Medium gab es keine erhöhten TGF $\beta_1$  -Werte im Zellkulturüberstand. So zeigt sich, dass osmotischer Stress alleine keine TGF $\beta_1$  -Erhöhung hervorruft.

Bei Gabe von 1% FCS ins Medium kam es zu einem TGF $\beta_1$  -Anstieg um etwa 100%. Bei Gabe von 1% FCS und 226,4 mM Glukose kam es nicht nur zu einem additiven Effekt der TGF $\beta_1$  -erhöhung, der bei etwa 180% liegen sollte, sondern zu einem Anstieg bis zu mehr als 250%, so dass sich eine triggernde Komponente des Serums mit seinen zahlreichen Faktoren und Zytokinen annehmen lässt.

Bei erhöhter Glukosegabe kommt es wie in der Literatur beschrieben zu verstärkter Expression von TGF $\beta_1$  sowohl durch Mesothelzellen [Fujikawa et al., 2003], als auch durch Fibroblasten [Saed und Diamond, 2003]. Saed und Diamond stellten einen starken Anstieg der mRNA-Spiegel für TGF $\beta_1$  und Kollagen Typ I in Kulturen von HPF schon nach 24 Stunden fest, der abhängig vom Glukosespiegel stetig zunahm. Die Translation und Exozytose in den Kulturüberstand wurde von ihnen nicht nachgewiesen. In unseren Kulturen der HPF konnten nach 24 Stunden noch keine Zunahme des TGF $\beta_1$  -Spiegels bei erhöhter Glukosegabe im Überstand gemessen werden. Die Translation und nachfolgende vermehrte Exozytose von TGF $\beta_1$  in den Kulturüberstand war erst nach 48 Stunden signifikant nachweisbar und noch deutlicher nach 72 Stunden in vitro zu beobachten. Dieser von uns erhobene Befund des zeitlich verzögerten Nachweises von TGF $\beta_1$  im Medium kann auf die autokrine Regulation der verbesserten Translation von TGF $\beta_1$  durch PDGF zurückzuführen sein.

Nach Glukosegabe wird die DNA - Synthese von TGF $\beta_1$  erhöht, die folgende Translation ist gering aber ausreichend, um die Aktivierung der PDGF-Rezeptoren durch Phosphorylierung zu erhöhen, was zu einer Zunahme aller drei Isoformen des endogenen PDGFs im Medium führt [Ishikawa et al., 1990; Soma und Grotendorst, 1989]. Diese Zunahme des PDGF-Spiegels im Medium führt wiederum zur TGF $\beta_1$  -Erhöhung. Über

eine verbesserte Translation bei stark erhöhtem PDGF-Spiegel über einen glukoseunabhängigen Weg der TGF $\beta$ -Synthese wird ebenfalls diskutiert [Fraser et al., 2003, 2002; Phillips et al., 1995; Haberstroh et al., 1993; Battagay et al., 1990].

Die Zunahme von TGF $\beta_1$  in den von uns untersuchten HPF-Kulturen ist nicht auf eine Proliferation der Fibroblasten zurückzuführen, sondern auf eine tatsächlich erhöhte Exozytose von TGF $\beta_1$  der einzelnen Zelle, was sich durch unsere Untersuchungen des radioaktiven Thymidineinbaus als Maß für die Proliferation nachweisen ließ. Bei alleiniger Gabe von erhöhter Glukose gab es gegenüber der Kontrolle einen verminderten Thymidineinbau, während Zugabe von Glukose und 10% FCS den Thymidineinbau gegenüber der Kontrolle um 165% steigerte. Dieser höhere Thymidineinbau weist auf die deutlich höhere Mitoserate unter Glukose und 10% FCS hin. Zuvor lagen sehr niedrige Mitoseraten vor, denn die HPF waren in dem sogenannten Hungermedium in eine einheitliche, niedrige Ausgangsstoffwechsellage versetzt worden. Gabe von Glukose und TGF $\beta_1$  oder nur von TGF $\beta_1$  hatten einen gering verminderten Thymidineinbau gegenüber den Kontrollen zur Folge. Dies korreliert mit dem eher differenzierenden antiproliferativen Effekt von TGF $\beta$  an nicht onkogen entarteten Zellen [Hafizi et al., 2004]. Die Untersuchungen von Tokudome et al. 2004 an Fibroblastenkulturen aus Herzmuskelgewebe von zwei Tage alten Ratten zeigten ebenfalls erniedrigte Thymidininkorporation nach erhöhter Glukosegabe, während es zum Anstieg der Kollagensynthese und der erhöhten Expression von TGF $\beta_1$  mRNA kam [Tokudome et al., 2004].

In vivo kommt es bei erhöhten Glukosespiegeln vor allem in der Niere und im Peritonealraum zu einem Anstieg von TGF $\beta_1$ . Dies in verschiedenen Zellkulturmodellen entsprechend nachzustellen und therapeutische Ansätze zu suchen, ist das Anliegen dieser und anderer Arbeiten. So konnte in entsprechenden Zelllinien trotz hoher Glukosekonzentrationen durch TGF $\beta$ -Antikörper der TGF $\beta_1$ -Anstieg unterdrückt werden [Ziyadeh et al., 1994]. Ähnliche Versuchsansätze, die auch in vivo die Auswirkungen

durch Anti-TGF $\beta$ -Gabe zu unterdrücken versuchen, liegen nahe. Kürzlich gelang es in vivo durch Anti-TGF $\beta$ -Gabe bei Mäusen mit Typ2-Diabetes die kollagene Matrixexpression, welche eine Folge der TGF $\beta$ -Zunahme ist, zu verringern [Chen et al., 2003].

## 4.5 TGF $\beta$ und die Kollagen in HPF-Kulturen

Das Gleichgewicht zwischen den beiden Zytokinen Transforming Growth Factor  $\beta$  TGF $\beta_1$  und TNF $\alpha$  in bezug auf die extrazelluläre Matrixdeposition wird, wie in unseren Experimenten mit HPF-Kulturen zu sehen, zugunsten einer verstärkten Kollagensynthese verschoben. So nimmt TGF $\beta_1$  und die extrazelluläre Matrix unter den verschiedenen von uns untersuchten Bedingungen zu, wie erhöhter Glukosegabe ins Medium, Gabe von 1% FCS, Gabe von TGF $\beta_1$ , Gabe von PDGF oder PDGF und Endothelin zusammen. Alle diese Einzelkomponenten fördern über eine erhöhte TGF $\beta_1$ -Synthese oder die direkte TGF $\beta_1$ -Gabe die Kollagenproduktion.

Nur die mechanischen Stresseinflüsse auf die HPF, wie kontinuierliches Schütteln oder zyklisches Dehnen der Kulturböden führte zu einer unterschiedlichen Entwicklung von TGF $\beta_1$  und Kollagen. Die durch Glukose oder FCS stimulierte TGF $\beta_1$ -Konzentration blieb unter Schüttelstress unbeeinflusst erhöht, aber Schüttelstress verminderte den erhöhenden Effekt von Glukose oder FCS auf die Kollagensynthese. Für Dehnungsstress konnten wir ebenfalls verschiedene Reaktionen von Kollagen und TGF $\beta_1$  beobachten. TGF $\beta_1$  war nur in der Hälfte der gedehnten Kulturen angestiegen, in der anderen Hälfte abgefallen, obwohl die Kollagensynthese in allen Fällen durch Dehnung stimuliert wurde.

Diese Ergebnisse der erhöhten Kollagensynthese konnten von uns sowohl über den Einbau von radioaktiv markiertem Prolin in neu synthetisiertes Kollagen als auch über einen Radioimmunoassay, der die Menge des vorhandenen PINP misst, gezeigt werden. PINP ist das n-terminale Ende

des Prokollagens, das bei der extrazellulären Kollagenbildung abgespalten wird. Ein ebenfalls interessantes Ergebnis stellte sich bei Gabe von 540 mOsmol/kg Glycerol dar, hier wird die PINP-Produktion statistisch signifikant um 33% gegenüber den Kontrollen (340 mOsm/kg) angehoben. Bei den Versuchsansätzen mit Glycerol war nie eine signifikante Erhöhung von TGF $\beta_1$  festzustellen, so dass hier durch den osmotischen Stress völlig andere Wege in der Zelle beschritten werden, die zu einer Kollagensynthese führen. Auch in Mesothelzellen war bei Gabe von 540 mOsmol/kg Glycerol die Kollagensynthese etwas erhöht und bei Glukosegabe stark erhöht [Morgera et al., 2003]. Im Gegensatz zu der Kollagenerhöhung durch Glukose ließ sich dieser Effekt bei Glycerol aber nicht durch den kombinierten Endothelinrezeptorblocker LU 302872 antagonisieren [Morgera et al., 2003].

Prolininkorporation als Maß für verstärkte Kollagensynthese durch erhöhte Glukose im Medium war auch in mesangialen Zelllinien nachzuweisen [Ziyadeh et al., 1994]. Bei chemischer Reizung der peritonealen Fibroblasten, die auf pH-Wertänderungen basierten, kommt es ebenfalls zu erhöhter TGF $\beta$ -Expression und nachfolgend zur Kollagenerhöhung [Fujikawa et al., 2003].

TGF $\beta$  stimuliert die Synthese von Kollagen Typ I durch direkte Aktivierung des  $\alpha_2$  Kollagenpromoters. Der Gegenspieler im Orchester der Zytokine von TGF $\beta$  in bezug auf die extrazelluläre Kollagenbildung ist Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), der während der Wundheilung z.B. vermehrt von Makrophagen exprimiert wird [Leask und Abraham, 2004]. Der Gegenspieler, TNF $\alpha$ , ist wichtig für den Erhalt der Gewebekomöostase und der geregelten extrazellulären Matrixdeposition, zumeist über eine Smad7 Genaktivierung. Smad7 unterdrückt die Transkription von TGF $\beta$  Rezeptorsignalen, oder die Jun-N-terminale Kinase wird durch TNF $\alpha$  aktiviert und blockiert die TGF $\beta$ /Smad Signalkaskade [Verrecchia und Mauviel, 2004].

## 4.6 Endothelin

Die Endothelin-Rezeptoren sind ubiquitär in zahlreichen Zellen exprimiert, so auch in Fibroblasten. Dies konnten wir auch für alle von uns isolierten HPF Kulturen zeigen.

Die Wirkung von TGF $\beta$  bezüglich Endothelin scheint je nach Zelltyp zu variieren. Bei Endothelzellen kommt es nach Gabe von TGF $\beta$  zu einer erhöhten ET-1 mRNA Expression [Miyachi und Masaki, 1999; Kurihara et al., 1989]. Dies war in unseren HPF-Kulturen nicht zu beobachten.

In unseren HPF-Kulturen war bis auf wenige Ausnahmen kein Endothelin 1 meßbar, weder mit noch ohne Stimulation. Die untere Nachweisgrenze des ELISAs lag bei 0,05 fmol/ml. Die Normalwerte im humanen Serum liegen zwischen 0,2-0,7 fmol/ml. In der PCR zeigte sich, dass nur in einigen HPF-Linien mRNA des Endothelin-1 nachweisbar war. Diese Zelllinien zeigten auch im Mediumüberstand ET-1 bis zu 5,2 fmol/ml und eine hohe TGF $\beta_1$  -Produktion. Diese Korrelation zwischen der basalen TGF $\beta_1$  und ET-1 Produktion war sehr deutlich, während Zelllinien ohne ET-1 Expression auch nur eine sehr geringe basale TGF $\beta_1$  -Produktion in Größenordnungen von bis zu 70 pg/ml zeigten. Eine mögliche Erklärung dafür sind interindividuelle Unterschiede der Spender bezüglich der ET-1 mRNA der Fibroblasten.

Eine weitere Erklärung wäre eine geringfügige Kontamination mit anderen Zellenarten, denen die Endothelin-1 mRNA entstammen könnte. Gray weist in seiner Arbeit darauf hin, dass bei der Isolierung neonataler Kardiomyozyten und kardialer Fibroblasten häufig ein geringer Anteil der jeweils anderen Zellspezies verblieb, so dass häufig Mischkulturen vorliegen [Gray et al., 1998]. Unter diesem Gesichtspunkt sollte bei der Isolierung von Zellen aus Lebewesen die Ergebnisse an der Nachweisgrenze vorsichtig interpretiert werden. So fand Gray in seinen kardialen Myozyten und Fibroblasten Endothelin exprimiert, mit dem Wissen, dass anteilig Misch-

kulturen vorlagen. Ruwhof isolierte ebenfalls kardiale Fibroblasten und Myozyten neonataler Ratten [Ruwhof et al., 2000]. Die kardialen Fibroblasten exprimierten im ELISA Endothelin an der unteren Nachweisgrenze (0,02-0,03 ng pro  $0,5 \times 10^6$  Zellen).

## 4.7 Die Wirkung von PDGF und Endothelin 1

PDGF übertrifft in vitro Endothelin bezüglich seiner Wirkungsstärke auf die Kollagenveränderung in den HPF. Die Übertragung auf die Verhältnisse in vivo sind nicht ohne Einschränkungen möglich, da Endothelin und PDGF in vivo unterschiedliche Freisetzungsmechanismen und einen verschieden schnellen Abbau besitzen. Die beiden Zytokine beeinflussen sich gegenseitig. Bekannt ist, dass unter PDGF verstärkt Endothelinrezeptoren exprimiert werden. Hafizi konnte an Kulturen von humanen Herzfibroblasten unter PDGF-Gabe eine Erhöhung der Expression von Endothelinrezeptoren nachweisen [Hafizi et al., 1999]. Somit kann Endothelin nach vorheriger PDGF-Einwirkung eine größere Wirkung entfalten. Yang et al. fand in humanen Gefäßmuskelzellen ebenfalls keinen gesteigerten Thymidineinbau durch Endothelin, aber es potenzierte den mitogenen Effekt von PDGF-BB auf das sechsfache. Diese Wirkung wird hauptsächlich über ET-A-Rezeptoren vermittelt, jedoch weder über eine gesteigerte MAPK-Aktivierung noch über eine PDGF-Rezeptorüberexpression [Yang et al., 1999].

PDGF stimuliert die Polymerisation von Aktin über die Zunahme der Aktivität von p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) und  $TGF\beta_1$ . Dies wurde in Zellkulturen glatter Muskelzellen [Pichon et al., 2004] und Myofibroblasten nachgewiesen [Vaughan et al., 2000]. Dies stimmt mit der Zunahme von polymerisiertem F-Aktin in unseren durch PDGF stimulierten Kulturen überein. Pichon et al. zeigte den Zusammenhang von PDGF und p38 MAPK und der Aktivierung von polymerisiertem Aktin in

glatten Muskelzellen. Die Lamellipodienformation und -migration hängt wesentlich von der Wirkung von PDGF und phosphoryliertem p38 MAPK ab. Unphosphoryliertes HSP 27 (Hitzeschockprotein 27) und transientes phosphoryliertes p38 MAPK fanden sich hauptsächlich an der Spitze der Lamellipodien. Phosphoryliertes HSP 27 hingegen konnte vermehrt an der Basis von Lamellipodien gefunden werden, wo es eine stabilisierende Wirkung auf die dort vorhandenen längeren, unverzweigten Aktinfilamente hat [Pichon et al., 2004].

Die indirekte Wirkung von PDGF über  $TGF\beta_1$  zeigt sich auch in den Experimenten von Kordes et al. 2005. Die alleinige Gabe von PDGF über kurze Zeit, ohne dass die  $TGF\beta$ -Produktion hochreguliert werden kann, führt zu einer Abnahme von  $\alpha$  Smooth Muscle Aktin wie an hepatischen Sternzellen gezeigt wurde [Kordes et al., 2005].

PDGF wirkt über eine Erhöhung von  $TGF\beta$  und zusätzlich über einen davon unabhängigen Weg [Fraser et al., 2003]. PDGF fördert die Proliferation von fast allen mesenchymalen Zellen und PDGF-CC vor allem die Angiogenese [Cao et al., 2002; Li et al., 2005]. PDGF wirkt außerdem auf Zellproliferation und Matrixproduktion in humanen proximalen Tubulusepithelien der Niere über einen von erhöhter Glukose und den dadurch initiierten  $TGF\beta$ -Signalkaskaden unabhängigen Weg [Fraser et al., 2002, 2003]. Allerdings musste bei diesen Versuchen PDGF in zehnfach höheren Konzentrationen von 100 ng/ml als den in unseren Versuchen angewandten Konzentrationen zugegeben werden.

Eine deutliche Erhöhung von Kollagen bei Gabe von Endothelin und PDGF zusammen konnte von uns an HPF gegenüber der Kontrolle gezeigt werden. Die genaue intrazelluläre Signalkaskade ist jedoch bisher nicht vollständig bekannt, zudem Endothelin allein keine Erhöhung des Kollagens in den HPF-Kulturen hervorruft. Die Wirkung von PDGF auf die vermehrte Expression von Endothelinrezeptoren, gezeigt von Hafizi et al. bietet hier ein Erklärungsmodell.

PDGF bewirkt eine Erhöhung von TGF $\beta_1$  gegenüber unstimulierten Kontrollen im Median um 106,2%, Endothelin und PDGF zusammen bewirken einen Anstieg im Median von 157,2%. Die genaue intrazelluläre Signalkaskade, die zu so einem markanten Anstieg von TGF $\beta_1$  im Überstand führt, ist noch nicht bekannt. Doch lässt sich vermuten, dass ebenso wie in humanen Herzfibroblasten [Hafizi et al., 1999] unter PDGF-Gabe (10ng/ml) die Expression der Endothelinrezeptoren auch in den HPF-Kulturen stark ansteigt, und damit Endothelin erst zusammen mit PDGF seine Wirkung entfalten kann.

Neben TGF $\beta_1$  zeigte auch die Kollagenmenge eine Zunahme. Die Erhöhung der Kollagenmenge bei gemeinsamer Gabe von Endothelin und PDGF war mit ca. 80% gegenüber der Kontrolle sehr deutlich. Es scheint auch hier über eine verstärkte Expression der Endothelinrezeptoren durch PDGF die Endothelinwirkung gesteuert zu sein. Über die von uns nachgewiesene TGF $\beta_1$ -Erhöhung bei Gabe beider Zytokine könnte die erhöhte Matrixproduktion in Gang gesetzt werden [Hafizi et al., 1999].

Der Nachweis einer direkten Erhöhung von TGF $\beta_1$  nach Endothelin1-Gabe allein ließ sich nicht erbringen. Nur bei gleichzeitiger Gabe von PDGF stieg TGF $\beta_1$  an. Die Erklärung, dass Endothelin 1 allein nicht auf die TGF $\beta_1$ -Produktion wirkt, ist auch durch die erst kürzlich beobachteten zwei Signalkaskaden, die über eine TGF $\beta_1$ -Gabe zur Endothelin-1-Erhöhung an Endothelzellen führen, verständlich [Rodriguez-Pascual et al., 2003]. Die gleichzeitige transkriptionale Aktivierung von zwei unterschiedlichen DNA-Elementen führt einmal zur Expression von Aktivatorprotein-1, und zum anderen zu einer spezifischen Regulation für Smad-Transkriptionsfaktoren. Smads und Aktivatorprotein-1 kooperieren funktionell über das CREB-Bindungsprotein/p300, das zur Aktivierung des ET-1 Genortes führt. Es existiert also eine Möglichkeit der Beeinflussung von Endothelin durch TGF $\beta_1$ , aber die entgegengesetzte Beeinflussung von TGF $\beta_1$  durch Endothelin findet sich in unseren Beobachtungen nicht.

## 4.8 Kollagen und mechanischer Stress

Die in der Literatur angegebenen Wirkungen von mechanischem Stress auf Fibroblasten sind widersprüchlich. Als Hauptgründe werden die unterschiedlichen Herkunftsregionen der verwendeten Fibroblasten betrachtet. Als zweiter wichtiger Grund für unterschiedliche Ergebnisse sind voneinander abweichende Versuchsanordnungen zu berücksichtigen, welche in vitro zu mechanischem Stress führen sollen. So sind unsere auf Polyethylen-Kulturböden wachsenden Fibroblasten überwiegend myofibroblastisch differenziert und damit denen aus dreidimensionalen Fibroblastenkulturen nur bedingt vergleichbar, während in unseren Dehnungsexperimenten die flexible Lamininunterlage die Differenzierung zu Myofibroblasten erschwert.

Durch die Kultivierung auf Polyethylenkulturgefäßen werden Fibroblasten über Protomyofibroblasten in Myofibroblasten überführt und exprimieren Aktin, das auch in glatten Muskelzellen vorkommt. Diese polymerisierten Aktinfasern oder Stressfasern werden weniger oder bilden sich gar nicht aus, wenn die Fibroblasten sich auf einer flexiblen Unterlage anheften. Die Anheftung auf Kulturschalenböden aus Polyethylen ist für die Fibroblasten eine mechanische Tensionsbelastung, in deren Folge Stressfasern ausgebildet werden. Auch die Bildung und Exozytose der extrazellulären Matrix hängt von der mechanischen Belastung der Zellen ab. Vermittelt über Zytokine wie PDGF und TGF $\beta$  wird Matrix auf- oder abgebaut. Die Verbindungsstellen und damit Sensoren zwischen der extrazellulären Matrix und dem intrazellulären Zytoskelett stellen spezialisierte Adhäsionskomplexe dar, die Fibronexus. An diesen Stellen soll TGF $\beta$  als mechanosensitiver Faktor wirksam sein, denn sein hochmolekularer bioinaktiver Komplex ist an extrazelluläre Matrixproteine, besonders Fibronectin gebunden und wird durch mechanischen oder chemischen Stress proteolytisch gespalten und ist somit sehr schnell bioaktiv lokal verfügbar [Hinz und Gabbiani, 2003]. Das proteolytisch abgespaltene latente

TGF $\beta$ -Bindungsprotein (LTBP) besitzt Bindungssequenzen an die transmembranären Integrine, die ein wesentlicher Bestandteil von Fibronexus sind und die Signalkaskade zu den intrazellulären Stressfasern weiterleiten. Reife fokale Adhäsionspunkte enthalten außer Integrinen: Vinculin, Paxillin, Talin, Tensin und  $\alpha$ Smooth Actin [Hinz und Gabbiani, 2003; Chiquet et al., 2003].

Booz und Baker fanden in neonatalen myokardialen Fibroblastenkulturen von Ratten durch statischen Dehnungsreiz eine Erhöhung von [ $^3$ H]-Thymidin, der Zellzahl, des Fos-Gens und Kollagen III mRNA [Booz und Baker, 1995]. Kollagen I mRNA blieb fast unverändert. Damit stieg die Relation von Kollagen III (normalerweise ca. 10%) gegenüber Kollagen I (normalerweise ca 80%) an, wie dies auch in vivo in hypertrophiertem Myokard gefunden wird.

Unsere Ergebnisse aus den Dehnungsexperimenten der HPF zeigen eine Abnahme der Kollagensynthese bei zusätzlichem Zellstress in Form erhöhter Glukosegabe. Diese Ergebnisse lassen sich korrelieren mit den Untersuchungen von Fong et al. 2005 an Sehnenzellkulturen, die unter mechanischem Scherstress in Microarrayanalysen antifibrotische Expressionsmuster zeigten, wie Abnahme der Transkription von Kollagen I und III, Abnahme von PDGF, ILGF (Insulin-like Growth Faktor) und FGF (Fibroblast growth Faktor) [Fong et al., 2005]. Auch alle TGF $\beta$ -Isoformen außer TGF $\beta_1$  werden herunterreguliert. Allerdings werden der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A und verschiedene morphogenetische Knochenproteine (BMPs) hochreguliert, die z.B. einen komplikationslosen Sehnenheilungsprozess fördern. Andererseits konnte in unseren Dehnungsexperimenten ohne den zusätzlichen Stressfaktor erhöhter Glukose eine erhöhte Kollagensynthese nachgewiesen werden. Davon ist abzuleiten, dass die Kollagensynthese der Fibroblasten einer Feinregulation unterworfen ist, die bisher noch nicht in allen Einzelheiten erklärt werden kann. Sie kann auch völlig unabhängig von der TGF $\beta_1$ -Konzentration reguliert werden wie aus unseren Dehnungsexperimenten abzuleiten ist, die keine

TGF $\beta_1$  Erhöhung zeigten. Diese TGF $\beta_1$  unabhängige Kollagensynthese zeigen ebenfalls unsere Untersuchungen zum osmotischen Stress mit Glycerol, bei dem es zu einer Kollagenerhöhung ohne TGF $\beta_1$  -Zunahme kommt. Die Glycerolwirkung auf Mesothelzellen wurde von Morgera beschrieben [Morgera et al., 2003, 2004]. Im Gegensatz zu Glukose hatte Glycerol keine Erhöhung von TGF $\beta_1$ , Endothelin1 und Kollagen I RNA zur Folge.

Die Transdifferenzierung von TGF $\beta_1$  negativen und Smad3 negativen Mäusezellen in vitro weist ebenfalls auf eine TGF $\beta$ -unabhängige Kollagensynthese hin [Schnabl et al., 2001; Hellerbrand et al., 1999; George et al., 1999]. In vivo ist die Transdifferenzierung in aktive, matrixproduzierende Zellen noch nicht ohne die Mitwirkung von TGF $\beta_1$  gezeigt worden. Trotzdem läßt sich zusammenfassend erkennen, dass es andere effektive Auslöser myofibroblastischer Differenzierung gibt.

#### **4.8.1 Der Einfluß von mechanischem Stress: Schütteln**

Die dauernde Bewegung des Mediums über den HPF-Kulturen sollte zu einem mechanischen Stress auf die HPF führen, ebenso wie es für humane Mesothelzellen in vitro beschrieben worden ist [Morgera et al., 2003]. Entgegen unseren Vermutungen hatte der Schüttelstress keinen Einfluss auf die TGF $\beta_1$  -Produktion der HPF, aber auf die Proteinmenge und die Kollagensynthese.

Die Erhöhung von TGF $\beta_1$  durch Glukose und FCS blieb auch unter Schüttelstress erhalten. Zwischen den geschüttelten und ungeschüttelten Kulturen war bezüglich TGF $\beta_1$  kein Unterschied vorhanden.

Betrachtet man außer TGF $\beta_1$  die Proteinmenge und die Kollagensynthese, gemessen als die Konzentration des Abspaltungsproteins PINP, so fällt auf, dass TGF $\beta_1$  nicht immer mit der Proteinmenge oder Kollagensynthese korreliert.

Durch Schüttelstress alleine änderte sich die Konzentration von TGF $\beta_1$  und

PINP bei Zellen im Kontrollmedium nicht (s. Abb.3.11).

Wenn aber die mit Glukose behandelten Kulturen zusätzlich geschüttelt wurden, so war der PINP-Anstieg gegenüber der alleinigen Glukosebehandlung geringer (um 17%, n=9, p=0,038). Ebenso reagierten die geschüttelten Zellen, die mit Glukose, Endothelin und PDGF behandelt wurden mit einem um 16,1% verringerten Anstieg der Kollagenproduktion (n=5, p=0,043).

Diese gegensätzliche Entwicklung von TGF $\beta_1$  und Kollagen zeigt, dass viele Faktoren an der Kollagensynthese beteiligt sind. Durch den Schüttelstress könnten andere Faktoren freigesetzt werden, die einer vermehrten Kollagensynthese entgegen wirken. Diese unterschiedlichen Reaktionen der Fibroblasten deuten auf eine sehr komplexe Regulation der Kollagensynthese, die der Hauptfaktor der Fibrose ist, hin.

Die Fibrose wird durch vielfältige aktivierende und inhibierende Gegenspieler beeinflusst, z.B. TGF $\beta_1$ , Proteinangebot der unmittelbaren Zellumgebung, Glukose und andere Zytokine. Erschwerend für das Verständnis der genauen Entstehung einer Fibrose finden sich anscheinend vielfältige autokrine und parakrine Regulationsmechanismen in einem Fibroblastenzellverband. Die Mesothelzellen als wichtige benachbarte Zellen der Fibroblasten wurden in vitro bereits hinsichtlich ihrer Reaktion auf Schüttelstress untersucht. Die Mesothelzellen produzierten im Gegensatz zu HPF vermehrt ET-1 und Kollagen, was unter dem Einfluß von LU 302 872, ein ET-Rezeptorantagonist, verhindert wurde [Morgera et al., 2003]. Diese Reaktionen der Mesothelzellen können in vivo wiederum nicht ohne Auswirkungen auf die Kollagensynthese der Fibroblasten bleiben. Auch bei Untersuchungen an Patienten mit kontinuierlicher ambulanter Peritonealdialyse konnte eine erhöhte ET-1 Produktion bei Volumenzunahme bis 2500 ml der Dialyseflüssigkeit beobachtet werden, was auf mechanischen Stress durch auftretende Scherkräfte auf die Mesothelzellen zurück geführt wurde [Morgera et al., 1999].

Eine Erklärung der unterschiedlichen Reaktionen beider Zelltypen auf Schüttelstress bietet die unterschiedliche topographische Lage der Mesothelzellen und Fibrozyten im Peritoneum. Physiologischerweise sind die Fibrozyten unter einer Mesothelzellschicht nicht direkt mechanischen Scherkräften ausgesetzt. In vitro zeigen HPF keinen Anstieg von  $TGF\beta_1$ , ET oder Kollagen auf Schüttelstress. Ähnliches fand Schild et al. 2002 bei humanen fetalen Lungenfibroblasten in vitro.  $TGF\beta$  blieb unter mechanischem Stress unverändert. Interessanterweise fand Schild gleichzeitig eine Erhöhung von anderen Faktoren wie z.B. Bindegewebswachstumsfaktor (CTGF), Aktin und Tubulin [Schild und Trueb, 2002]. Dies bestätigt die vielfältigen molekularen Signalkaskaden zwischen Mesothelzellen und Fibrozyten bezüglich der Auswirkungen von mechanischem Stress.

Der Schüttelstress bleibt nicht ohne Auswirkung auf das Zytoskelett der HPF. Durch die Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien unter mechanischem Stress bei Schüttelexperimenten wird den dabei auftretenden Scherkräften entgegen gewirkt und die Anheftungsvoraussetzungen auf der Kultursubstratunterlage verbessert (Abb.3.4). Die Ausbildung der Filopodien und Lamellipodien wird initiiert und gefördert durch die Aktivierung der kleinen GTP-bindenden Proteine Rac1 und Cdc42 [Hall, 1998]. Durch neuere Versuche an Zellkulturen von menschlichen Brustdrüsenepithelzellen mit Überexpression von epidermalem Wachstumsfaktorrezeptor 2 wurde gezeigt, daß die Gabe von  $TGF\beta_1$  ins Kulturmedium zur Bildung von Filopodien und Lamellipodien über eine Aktivierung von Rac1 und Cdc42 führt ([Ueda et al., 2004]. Die von uns beobachteten morphologischen Veränderungen bezüglich der Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien (s. Abb.3.4) ist anscheinend unabhängig von der  $TGF\beta_1$ -Konzentration.

### 4.8.2 Der Einfluß von mechanischem Stress: Dehnen

Morphologisch wirkte die Lamininunterlage der gedehnten Zellen löchrig bewachsen und nicht mehr so konfluent wie die Kontrolle. Die polymerisierten Aktinfilamente der HPF waren deutlich vermindert.

Bei den Dehnungsversuchen der HPF-Kulturen, die nach der gleichen Versuchsanordnung wie die Versuche mit Mesothelzellen durchgeführt wurden [Morgera et al., 2003], zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der TGF $\beta_1$ -Konzentrationen in gedehnten und ungedehnten Kulturen.

Die Proteinmenge lag in den gedehnten Kulturen tendenziell etwas höher als in den ungedehnten Kulturen. Die Kollagensynthese war trotz eher niedriger TGF $\beta_1$ -Spiegel unter 72-stündigem zyklischen Dehnungsstress deutlich erhöht (s. Abb. 3.12).

Wurden die Kulturen unter zusätzlicher Glukosegabe gedehnt, zeigten sie einen Abfall von PINP (n=6, p=0.028). Allerdings war in den statischen Kulturen, welche auf flexiblen Membranen wuchsen, der typische Anstieg von PINP durch Glukose ebenfalls nicht ausgeprägt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die glukoseinduzierte myofibroblastische Aktivierung der Fibroblasten weniger ausgeprägt ist infolge verminderter intrazellulärer Spannung zwischen den Anhaftungspunkten an der flexiblen Lamininunterlage.

In den gedehnten Kulturen liegt keine direkte Korrelation zwischen TGF $\beta_1$ -Spiegel und Kollagensynthese vor. Bei sechs verschiedenen Kulturen verschiedener Spender zeigt sich jeweils eine PINP-Erhöhung der gedehnten Kulturen. Bei der einen Hälfte dieser Kulturen lag gleichzeitig ein Anstieg von TGF $\beta_1$  vor, bei der anderen Hälfte findet sich weniger TGF $\beta_1$  im Überstand der gedehnten Kulturen, obwohl PINP angestiegen ist. Es sind demzufolge auch in diesem Versuchsaufbau weitere Faktoren zur Regulation der Kollagensynthese beteiligt.

Mit humanen peritonealen Mesothelzellen lassen sich diese Dehnungsver-

suche unter gleichen Bedingungen durchführen. Dabei zeigten die Mesothelzellen weder eine ET-1-Erhöhung noch eine Zunahme von TGF $\beta_1$  oder von KollagenI RNA [Morgera et al., 2003]. Nur die Kombination aus zyklischer Dehnung und Glukosebelastung erhöhte die TGF $\beta_1$  Konzentration [Morgera et al., 2004]. Die Effekte von Glukose und mechanischem Stress triggern sich bezogen auf Mesothelzellen gegenseitig. Endothelinantagonisten hatten keine Wirkung auf die TGF $\beta_1$  Konzentration.

Im Gegensatz zu den Mesothelzellen zeigte sich aber bei den HPF eine Kollagenzunahme z.T. ohne TGF $\beta_1$  -Erhöhung nur auf Grund des Dehnungsreizes und bei zusätzlichem Zellstress durch erhöhte Glukose ein Kollagenabfall. Diese Tatsachen läßt die vielfältigen Regelgrößen vermuten, die bezüglich der Kollagenbildung bestehen. Bei Weitem nicht alle Schritte im Gleichgewicht des Kollagenauf- und abbaus sind geklärt. Bei unseren bisherigen Untersuchungen bleibt z.B. völlig unberücksichtigt, wie die Matrixmetalloproteinase und die Hemmer der Metalloproteinase in den verschiedenen gestressten Zellen exprimiert werden und eventuell zu einem verstärkten Abbau der extrazellulären Matrix oder deren Hemmung führen.

Kultivierte Sehnenzellen der Ratte reagierten auf Scherkräfte mit erhöhter Metalloproteinaseexpression und TGF $\beta_1$  -Expression, aber einer Reduzierung von TGF $\beta_2$  und TGF $\beta_3$ , verminderter TGF $\beta$ -Rezeptorzahl, sowie vermindertem Kollagen Typ I und III [Fong et al., 2005]. Dies ist wichtig für den Heilungsprozeß von Sehnen, die ohne mechanischen Stress während der Heilungsphase zu viel extrazelluläre Matrix und damit Narbengewebe bilden, das funktionell einschränkend ist. So zeigt sich, dass gerade die Antworten der Zellen auf mechanische Belastungen sehr variabel sind und allgemein gültige Aussagen auf Grund der vorhandenen Literatur nicht zu treffen sind.

## 4.9 Ausblick und Therapeutische Ansätze

Die Untersuchungen an HPF *in vitro* zeigen, dass die hohe Glukosekonzentration von 540 mOsm/kg ausschlaggebend ist für eine zunehmende peritoneale Fibrosierung. Mechanischer Schüttelstress hatte keinen Einfluss auf die TGF $\beta_1$ -Produktion von HPF im Gegensatz zu peritonealen Mesothelzellen, Dehnungsstress zeigte eine Erhöhung der KollagenI-Produktion von HPF. Es wurde weiterhin gezeigt, dass die Zytokine TGF $\beta_1$ , PDGF und Endothelin zusammen mit PDGF die Kollagensynthese stark erhöhen. Da die Signalkaskade der Kollagenerhöhung über TGF $\beta_1$  oder PDGF angeschaltet wird, erscheint es klinisch sehr sinnvoll die Rezeptoren von TGF $\beta_1$  oder PDGF zu blockieren. Allerdings muss aufgrund der vielfältigen Interaktionen und der ubiquitären Wirkung von einem reichen Nebenwirkungsspektrum ausgegangen werden. Ein möglicher PDGF Antagonist ist STI571, auch bekannt als Gleevec von Novartis Pharma (Basel, Schweiz). Es ist ein PDGF-Rezeptor-Tyrosinkinasehemmer der 2-Phenylamono-Pyrimidineine-Klasse. Die dimeren  $\alpha$ - oder  $\beta$ - Untereinheiten der Transmembranrezeptoren von PDGF besitzen eine intrinsische Protein-Tyrosinkinase Aktivität. In Versuchen an Ratten und *in vitro* an aktivierten hepatischen Sternzellen konnte die fibrotische Aktivität reduziert werden, indem die mRNA Expression von Kollagen 1 und TGF $\beta_1$  abnahm [Yoshiji et al., 2005; Heldin, 2004].

Eine weitere Möglichkeit der Unterdrückung fibrotischer Prozesse im Peritonealraum wäre die Unterdrückung von CTGF (Connective Tissue Growth Factor). CTGF ist eines von den Proteinen, über die die TGF $\beta_1$  Wirkungen erreicht werden [Duncan et al., 1999; Grotendorst, 1997]. Zarrinkalam konnte die Produktion von CTGF durch Humane Peritoneale Mesothelzellen und das Vorkommen in Peritonealdialysat nachweisen. Er fand auch eine Erhöhung der CTGF Konzentration während Peritonitisepisoden. TGF $\beta$ , aber nicht PDGF, EGF (Epidermal Growth Factor) und TNF $\alpha$  erhöhte die mRNA von CTGF [Zarrinkalam et al., 2003]. Die Induktion

der CTGF-Synthese kann durch einen erhöhten cAMP unterdrückt werden. Mit Pentoxifillin, einem Phosphodiesterasehemmer, kann über einen Anstieg des cAMP-Spiegels die Induktion der CTGF-Synthese, und damit die Kollagensynthese verhindert werden [Berman und Duncan, 1989; Preaux et al., 1997]. Den gleichen Wirkungsmechanismus über einen Anstieg des cAMP-Spiegels und eine Erniedrigung der Kollagenproduktion bietet Prostaglandin E2 [Varga et al., 1987].

Die TGF $\beta_1$ -Synthese kann reduziert werden durch TGF $\beta$ -TypI-Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasehemmer, z.B. SB-505124 [Callahan et al., 2002; DaCosta Byfield et al., 2004]. Dieser TGF $\beta$ -TypI-Rezeptorhemmer wurde in verschiedenen Zelllinien eingesetzt und verringerte deutlich das TGF $\beta$ -Signal. Der klinische Einsatz ist problematisch, denn außer dem gewollten Rückgang der Fibrosierung bei den sklerosierenden Erkrankungen, wird der ansonsten antionkogene Effekt von TGF $\beta_1$ , der Apoptose auslöst oder Differenzierung fördert, ebenfalls unterdrückt, so dass die Gefahr der Entstehung von malignen Tumoren deutlich erhöht wird [Heldin, 2004]. Auch ein direkt TGF $\beta$  neutralisierender Antikörper 1D11 wurde bei urämischen Ratten angewandt und zeigte eine Reduzierung des fibrotischen Gewebes in der Niere [Lavoie et al., 2005].

Endothelin-Rezeptor-Antagonisten lassen widersprüchliche Ergebnisse erkennen. So wird zum einen durch Bosentan, ein ET-A- und ET-B-Rezeptorantagonist, bei Ratten mit einer Lungenfibrose eine Reduktion der fibrotischen Prozesse beschrieben [Park et al., 1997]. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich auch bei Leberfibrose [Clozel und Salloukh, 2005]. Andererseits zeigen ET-Rezeptorantagonisten (BQ-485, Ro 47-0203, LU-135252) am Rattenmodell keine positiven Effekte bezüglich der Lungenfibrose [Mutsaers et al., 1998c; Nguyen et al., 2000].

Mutsaers et al. zeigte bei Versuchen mit Ratten, die eine bleomycininduzierte Lungenfibrose hatten, nach drei Tagen eine Erhöhung von Endothelin1 mit nachfolgender Kollagenerhöhung [Mutsaers et al., 1998a]. Diese

Fibrose ließ sich durch Endothelinrezeptorantagonisten nicht verhindern [Mutsaers et al., 1998c]. Das Verteilungsmuster von Endothelin ändert sich unter dem Einfluß profibrotischer Faktoren, wie z.B. Bleomycin. Bei normalen Lungen fand sich Endothelin vorrangig in der Nähe von Makrophagen und Epithelzellen der Atemwege, bei fibrotischen Lungen vermehrt perivaskulär und perialveolär [Mutsaers et al., 1998a]. Die Behandlung von humanen Lungenfibroblastenkulturen mit bronchioalveolärer Lavage (BAL) von Patienten, die asbestexponiert waren, erhöhte die Mitoserate gegenüber Behandlung der Kulturen mit BAL von Gesunden. Allerdings konnte kein Unterschied zwischen asbestexponierten und an Asbestose Erkrankten nachgewiesen werden. Antikörper gegen PDGF, TNF $\alpha$ , IGF1, and IL1 $\beta$  konnten den mitogenen Effekt nicht vermindern [Mutsaers et al., 1998b].

Da Endothelin autokrin und parakrin wirkt, ist in einem Organ wie der Lunge, Niere oder Leber die Wirkung von ET und seinen Rezeptorantagonisten nicht isoliert bezogen auf einzelne Zellen wie die Fibroblasten zu betrachten. Die Zellkultur kann nur Aussagen über die Wirkung auf einzelne Zellen ergeben, die Vorgänge in vivo sind sehr viel komplexer. So variieren die Reaktionen der Fibroblasten in Zellkultur zum Teil erheblich schon in Abhängigkeit von der Herkunft und Vorprägung und dem individuellen Spender.

In Zellkulturen von Fibroblasten menschlicher Herzen konnte eine Stimulation der Kollagensynthese durch Endothelin1-Gabe beobachtet werden, die durch den ETA-Rezeptor-Antagonist BQ 123 gehemmt werden konnte [Hafizi et al., 2004]. Diese ET1- Wirkung auf Fibroblasten ist abhängig von der topographischen Herkunft der Fibroblasten und den pathologisch veränderten Organstrukturen. So stammten die oben beschriebenen Fibroblasten von Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie oder ischämischen Herzkrankheiten, die neben anderen Zytokinen auch vermehrt Endothelin exprimieren [Katwa, 2003].

Andere Versuchsansätze zeigten an asthmatischen Mäusen mit intensiven Entzündungszeichen im Respirationstrakt und hoher  $TGF\beta_1$  - und Kollagenproduktion sowie bei anderen fibrotischen Lungenerkrankungen, dass bei Gabe von Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) der  $TGF\beta_1$  -Spiegel signifikant sank [Ito et al., 2005; Yaekashiwa et al., 1997; Dohi et al., 2000]. Ähnliche Erfolge in der Reduzierung des  $TGF\beta_1$  -Spiegels und des extrazellulären Kollagens konnten an Mäusen mit renaler Fibrose [Mizuno et al., 2001; Matsumoto et al., 2000], und bei Ratten mit Leberzirrhose durch HGF erreicht werden [Ueki et al., 1999]. Diese potentiellen therapeutischen Möglichkeiten sind bisher nur in Tierversuchen oder an Zellen in vitro eingesetzt worden, sie bieten jedoch eine reale Chance die zahlreichen fibrotischen Erkrankungen beim Menschen einschließlich der sklerosierenden Peritonitis bei weiterer intensiver Forschungsarbeit erfolgversprechend zu behandeln.

## 4.10 Zusammenfassung

Die Wirkung von profibrotischen Faktoren in humanen peritonealen Fibroblastenkulturen (HPF) wurden untersucht, um das Verständnis der Vorgänge zu erweitern, die zur Fibrose bei chronischer ambulanter Peritonealdialyse (CAPD) führen. Mehrere Einflussfaktoren wurden untersucht, und im Hinblick auf mögliche Prophylaxe der Fibrosierung bewertet.

1. Es gelang HPF-Kulturen aus Omentum majus zu kultivieren und mittels spezifischer Antikörperdarstellung sowie morphologisch als humane Fibroblasten zu identifizieren.
2. Die basale  $TGF\beta_1$  -Produktion der HPF zeigte eine große interindividuelle Varianz.
3. Eine Glukosekonzentration von 226,4 mM mit einer Osmolarität von 540 mOsmol, die der Glukosekonzentration in der Dialyseflüssigkeit

entspricht, erhöht hoch signifikant die TGF $\beta_1$  Konzentration im Mittel um 82,1% im Mediumüberstand.

4. Glycerol als osmotischer Reiz mit einer Osmolarität von ebenfalls 540 mOsmol erhöht die TGF $\beta_1$  Konzentration nicht.
5. Endothelin allein führt zu keiner Erhöhung der TGF $\beta_1$  Produktion. PDGF allein und in Kombination mit Endothelin erhöhte die TGF $\beta_1$  Produktion signifikant.
6. Schüttelstress und Dehnungsstress haben keinen Effekt auf die TGF $\beta_1$  Produktion.
7. Eine erhöhte Kollagensynthese wurde durch erhöhte Glukosegabe ausgelöst.
8. Auch unter osmotischem Stress durch Glycerol erhöhte sich die Kollagensynthese, unabhängig von der ausbleibenden TGF $\beta_1$  -Erhöhung unter Glycerol.
9. Die Gabe von ET und PDGF zusammen und TGF $\beta_1$  erhöhen die Kollagensynthese signifikant. Einzeln zeigten ET und PDGF keine vermehrte Kollagensynthese.
10. Dehnen zeigt eine Zunahme von Kollagen. Schüttelstress bewirkte eine leichte Minderung des durch Glukose hervorgerufenen Kollagenanstiegs.
11. Mittels radioaktivem Thymidineinbau konnte nachgewiesen werden, dass Glukosegabe und TGF $\beta_1$  -Gabe auf HPF antiproliferativ wirken.
12. Es konnte gezeigt werden, dass ET individuell unterschiedlich in den HPF exprimiert wird. In einigen Fibroblasten-Zelllinien konnte kein ET nachgewiesen werden, während alle Fibroblasten-Zelllinien

Endothelin Converting Enzyme und Endothelinrezeptor- A und -B hatten.

13. Mechanischer Schüttel- und Dehnungsstress der HPF bewirkte eine Auflockerung der parallelen Aktinfilamentanordnung. Es zeigten sich zunehmend Lamellipodien und die kleineren Filopodien, besonders unter Dehnungsstress. Glukose und Glycerol bewirken nach 72 Stunden keine morphologischen Veränderungen der Zellen oder der intrazellulären Aktinfilamente.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich mit vorhandener Literatur über Experimente an anderen Zellkulturlinien, besonders im Bereich der Erhöhung von  $TGF\beta_1$  und Kollagen durch Glukose, FCS, PDGF. Jedoch gerade im Bereich der mechanischen in vitro Auswirkungen auf die humanen peritonealen Fibroblasten lagen nur wenige Studien vor.

Durch die Messung des Abspaltungsproduktes PINP konnte auf einem weiteren Weg die Kollagenproduktion der Fibroblasten untersucht werden. Damit wurde die Kollagensynthese nicht nur auf der Ebene der Transkription, sondern auf der Ebene der Translation untersucht.

Eine von  $TGF\beta_1$  unabhängige Regulation von Kollagen konnte aus den Dehnungsexperimenten und den hyperosmolaren Experimenten mit Glycerol geschlußfolgert werden. Dies wurde bisher nur in wenigen Arbeiten zuvor beschrieben. Leider konnte in diesem sehr multifaktoriellen Geschehen kein weiteres wichtiges Regulationszytokin identifiziert werden.

# Literaturverzeichnis

- Ahlen, K., Ring, P., Tomasini-Johansson, B., Holmqvist, K., Magnusson, K. E. und Rubin, K.: Platelet-derived growth factor-BB modulates membrane mobility of beta1 integrins. In: *Biochem Biophys Res Commun*, Band 314(1):S. 89–96, 2004.
- Akhurst, R. J. und Derynck, R.: TGF-beta signaling in cancer—a double-edged sword. In: *Trends Cell Biol*, Band 11(11):S. S44–51, 2001.
- Allen, W. E., Zicha, D., Ridley, A. J. und Jones, G. E.: A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. In: *J Cell Biol*, Band 141(5):S. 1147–57, 1998.
- Amano, M., Chihara, K., Kimura, K., Fukata, Y., Nakamura, N., Matsuura, Y. und Kaibuchi, K.: Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. In: *Science*, Band 275(5304):S. 1308–11, 1997.
- Atamas, S. P. und White, B.: Cytokine regulation of pulmonary fibrosis in scleroderma. In: *Cytokine Growth Factor Rev*, Band 14(6):S. 537–50, 2003.
- Barnard, J. A., Lyons, R. M. und Moses, H. L.: The cell biology of transforming growth factor beta. In: *Biochim Biophys Acta*, Band 1032(1):S. 79–87, 1990.
- Battegay, E. J., Raines, E. W., Seifert, R. A., Bowen-Pope, D. F. und Ross, R.: TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. In: *Cell*, Band 63(3):S. 515–24, 1990.
- Becker, K.N.: *Principles and practice of endocrinology and metabolism*. William and Wilkins, Philadelphia, lippincott Auflage, 2001.
- Berman, B. und Duncan, M. R.: Pentoxifylline inhibits normal human dermal fibroblast in vitro proliferation, collagen, glycosaminoglycan, and fibronectin

- production, and increases collagenase activity. In: *J Invest Dermatol*, Band 92(4):S. 605–10, 1989.
- Bonner, J. C.: Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. In: *Cytokine Growth Factor Rev*, Band 15(4):S. 255–73, 2004.
- Booz, G. W. und Baker, K. M.: Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. In: *Cardiovasc Res*, Band 30(4):S. 537–43, 1995.
- Border, W.A und Noble, N.A.: Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. In: *N Engl J Med*, Band 331:S. 1286–1292, 1994.
- Callahan, J. F., Burgess, J. L., Fornwald, J. A., Gaster, L. M., Harling, J. D., Harrington, F. P., Heer, J., Kwon, C., Lehr, R., Mathur, A., Olson, B. A., Weinstock, J. und Laping, N. J.: Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) type 1 receptor (ALK5). In: *J Med Chem*, Band 45(5):S. 999–1001, 2002.
- Campbell, M., Allen, W. E., Silversides, J. A. und Trimble, E. R.: Glucose-induced phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase-dependent upregulation of the platelet-derived growth factor-beta receptor potentiates vascular smooth muscle cell chemotaxis. In: *Diabetes*, Band 52(2):S. 519–26, 2003.
- Cao, R., Brakenhielm, E., Li, X., Pietras, K., Widenfalk, J., Ostman, A., Eriksson, U. und Cao, Y.: Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR-alphaalpha and -alphabeta receptors. In: *Faseb J*, Band 16(12):S. 1575–83, 2002.
- Changsirikulchai, S., Hudkins, K. L., Goodpaster, T. A., Volpone, J., Topouzis, S., Gilbertson, D. G. und Alpers, C. E.: Platelet-derived growth factor-D expression in developing and mature human kidneys. In: *Kidney Int*, Band 62(6):S. 2043–54, 2002.
- Chegini, N., Gold, L. I. und Williams, R. S.: Localization of transforming growth factor beta isoforms TGF-beta 1, TGF-beta 2, and TGF-beta 3 in surgically induced endometriosis in the rat. In: *Obstet Gynecol*, Band 83(3):S. 455–61, 1994.

- Chen, S., Iglesias-de la Cruz, M. C., Jim, B., Hong, S. W., Isono, M. und Ziyadeh, F. N.: Reversibility of established diabetic glomerulopathy by anti-TGF-beta antibodies in db/db mice. In: *Biochem Biophys Res Commun*, Band 300(1):S. 16–22, 2003.
- Chiquet, M., Renedo, A. S., Huber, F. und Fluck, M.: How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? In: *Matrix Biol*, Band 22(1):S. 73–80, 2003.
- Clozel, M. und Salloukh, H.: Role of endothelin in fibrosis and anti-fibrotic potential of bosentan. In: *Ann Med*, Band 37(1):S. 2–12, 2005.
- DaCosta Byfield, S., Major, C., Laping, N. J. und Roberts, A. B.: SB-505124 is a selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptors ALK4, ALK5, and ALK7. In: *Mol Pharmacol*, Band 65(3):S. 744–52, 2004.
- DeGroot, L.J.: *Endocrinology.*, Band 3. , London, w.b. saunders company Auflage, 1995.
- Di Paolo, N. und Garosi, G.: Peritoneal sclerosis. In: *J Nephrol*, Band 12(6):S. 347–61, 1999.
- Do, J.Y., Kim, Y.L., Park, J.W., Cho, K.H., Kim, T.W., Yoon, K.W., Kim, C.D., Park, S.H., Han, J.H. und Song, I.H.: The effect of low glucose degradation product dialysis solution on epithelial-to-mesenchymal transition in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. In: *Perit Dial Int*, Band 25(Suppl 3):S. 22–5, 2005.
- Dohi, M., Hasegawa, T., Yamamoto, K. und Marshall, B. C.: Hepatocyte growth factor attenuates collagen accumulation in a murine model of pulmonary fibrosis. In: *Am J Respir Crit Care Med*, Band 162(6):S. 2302–7, 2000.
- Dube, J., Chakir, J., Dube, C., Grimard, Y., Laviolette, M. und Boulet, L. P.: Synergistic action of endothelin (ET)-1 on the activation of bronchial fibroblast isolated from normal and asthmatic subjects. In: *Int J Exp Pathol*, Band 81(6):S. 429–37, 2000.

- Duncan, M. R., Frazier, K. S., Abramson, S., Williams, S., Klapper, H., Huang, X. und Grotendorst, G. R.: Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. In: *Faseb J*, Band 13(13):S. 1774–86, 1999.
- Fong, K. D., Trindade, M. C., Wang, Z., Nacamuli, R. P., Pham, H., Fang, T. D., Song, H. M., Smith, R. L., Longaker, M. T. und Chang, J.: Microarray analysis of mechanical shear effects on flexor tendon cells. In: *Plast Reconstr Surg*, Band 116(5):S. 1393–404; discussion 1405–6, 2005.
- Fraser, D., Brunskill, N., Ito, T. und Phillips, A.: Long-term exposure of proximal tubular epithelial cells to glucose induces transforming growth factor-beta 1 synthesis via an autocrine PDGF loop. In: *Am J Pathol*, Band 163(6):S. 2565–74, 2003.
- Fraser, D., Wakefield, L. und Phillips, A.: Independent regulation of transforming growth factor-beta1 transcription and translation by glucose and platelet-derived growth factor. In: *Am J Pathol*, Band 161(3):S. 1039–49, 2002.
- Fujikawa, K., Takai, K., Suga, A., Naito, K., Ohata, A., Nakasone, S. und Horiuchi, T.: Expression of mRNA for growth factors and extracellular matrix proteins after injury to cultured peritoneal cells: does the healing process contribute to peritoneal ultrastructural alteration? In: *J Artif Organs*, Band 6(4):S. 253–9, 2003.
- Gabbiani, G.: The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. In: *J Pathol*, Band 200(4):S. 500–3, 2003.
- Garosi, G. und Di Paolo, N.: Peritoneal sclerosis—an overview. In: *Adv Perit Dial*, Band 15:S. 185–92, 1999.
- Garosi, G., Gaggiotti, E., Monaci, G., Brardi, S. und Di Paolo, N.: Biocompatibility of a peritoneal dialysis solution with amino acids: histological evaluation in the rabbit. In: *Perit Dial Int*, Band 18(6):S. 610–9, 1998.
- Garrett, Q., Khaw, P. T., Blalock, T. D., Schultz, G. S., Grotendorst, G. R. und Daniels, J. T.: Involvement of CTGF in TGF-beta1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci*, Band 45(4):S. 1109–16, 2004.

- George, J., Roulot, D., Koteliansky, V. E. und Bissell, D. M.: In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 96(22):S. 12719–24, 1999.
- Gilbertson, D. G., Duff, M. E., West, J. W., Kelly, J. D., Sheppard, P. O., Hofstrand, P. D., Gao, Z., Shoemaker, K., Bukowski, T. R., Moore, M., Feldhaus, A. L., Humes, J. M., Palmer, T. E. und Hart, C. E.: Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds to PDGF alpha and beta receptor. In: *J Biol Chem*, Band 276(29):S. 27406–14, 2001.
- Gray, M. O., Long, C. S., Kalinyak, J. E., Li, H. T. und Karliner, J. S.: Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. In: *Cardiovasc Res*, Band 40(2):S. 352–63, 1998.
- Gressner, A. M.: Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. In: *Kidney Int Suppl.*, Band 54:S. 39–45, 1996.
- Grotendorst, G. R.: Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. In: *Cytokine Growth Factor Rev*, Band 8(3):S. 171–9, 1997.
- Grotendorst, G. R. und Duncan, M. R.: Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. In: *Faseb J*, Band 19(7):S. 729–38, 2005.
- Haberstroh, U., Zahner, G., Disser, M., Thaiss, F., Wolf, G. und Stahl, R. A.: TGF-beta stimulates rat mesangial cell proliferation in culture: role of PDGF beta-receptor expression. In: *Am J Physiol*, Band 264(2 Pt 2):S. F199–205, 1993.
- Hafizi, S., Allen, S. P., Goodwin, A. T., Chester, A. H. und Yacoub, M. H.: Endothelin-1 stimulates proliferation of human coronary smooth muscle cells via the ET(A) receptor and is co-mitogenic with growth factors. In: *Atherosclerosis*, Band 146(2):S. 351–9, 1999.

- Hafizi, S., Wharton, J., Chester, A. H. und Yacoub, M. H.: Profibrotic effects of endothelin-1 via the ETA receptor in cultured human cardiac fibroblasts. In: *Cell Physiol Biochem*, Band 14(4-6):S. 285–92, 2004.
- Hall, A.: Rho GTPases and the actin cytoskeleton. In: *Science*, Band 279(5350):S. 509–14, 1998.
- Hart, C. E., Bailey, M., Curtis, D. A., Osborn, S., Raines, E., Ross, R. und Forstrom, J. W.: Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets. In: *Biochemistry*, Band 29(1):S. 166–72, 1990.
- Heldin, C. H.: Development and possible clinical use of antagonists for PDGF and TGF-beta. In: *Ups J Med Sci*, Band 109(3):S. 165–78, 2004.
- Hellerbrand, C., Stefanovic, B., Giordano, F., Burchardt, E. R. und Brenner, D. A.: The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. In: *J Hepatol*, Band 30(1):S. 77–87, 1999.
- Hinz, B.: Masters and servants of the force: The role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. In: *Eur J Cell Biol*, Band 85(3-4):S. 175–81, 2006.
- Hinz, B. und Gabbiani, G.: Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. In: *Curr Opin Biotechnol*, Band 14(5):S. 538–46, 2003.
- Hoffman, B. B., Sharma, K., Zhu, Y. und Ziyadeh, F. N.: Transcriptional activation of transforming growth factor-beta1 in mesangial cell culture by high glucose concentration. In: *Kidney Int*, Band 54(4):S. 1107–16, 1998.
- Iglesias-de la Cruz, M. C., Ziyadeh, F. N., Isono, M., Kouahou, M., Han, D. C., Kalluri, R., Mundel, P. und Chen, S.: Effects of high glucose and TGF-beta1 on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. In: *Kidney Int*, Band 62(3):S. 901–13, 2002.
- Ishikawa, O., LeRoy, E. C. und Trojanowska, M.: Mitogenic effect of transforming growth factor beta 1 on human fibroblasts involves the induction of platelet-

- derived growth factor alpha receptors. In: *J Cell Physiol*, Band 145(1):S. 181–6, 1990.
- Ito, W., Kanehiro, A., Matsumoto, K., Hirano, A., Ono, K., Maruyama, H., Kataoka, M., Nakamura, T., Gelfand, E. W. und Tanimoto, M.: Hepatocyte growth factor attenuates airway hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling. In: *Am J Respir Cell Mol Biol*, Band 32(4):S. 268–80, 2005.
- Jun, C. D., Choi, B. M., Kim, S. U., Lee, S. Y., Kim, H. M. und Chung, H. T.: Down-regulation of transforming growth factor-beta gene expression by antisense oligodeoxynucleotides increases recombinant interferon-gamma-induced nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. In: *Immunology*, Band 85(1):S. 114–9, 1995.
- Katwa, L. C.: Cardiac myofibroblasts isolated from the site of myocardial infarction express endothelin de novo. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, Band 285(3):S. H1132–9, 2003.
- Kernochan, L. E., Tran, B. N., Tangkijvanich, P., Melton, A. C., Tam, S. P. und Yee, Jr., H. F.: Endothelin-1 stimulates human colonic myofibroblast contraction and migration. In: *Gut*, Band 50(1):S. 65–70, 2002.
- Kordes, C., Brookmann, S., Haussinger, D. und Klonowski-Stumpe, H.: Differential and synergistic effects of platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta1 on activated pancreatic stellate cells. In: *Pancreas*, Band 31(2):S. 156–67, 2005.
- Korth, P., Bohle, R. M., Corvol, P. und Pinet, F.: Cellular distribution of endothelin-converting enzyme-1 in human tissues. In: *J Histochem Cytochem*, Band 47(4):S. 447–62, 1999.
- Kurihara, H., Yoshizumi, M., Sugiyama, T., Takaku, F., Yanagisawa, M., Masaki, T., Hamaoki, M., Kato, H. und Yazaki, Y.: Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. In: *Biochem Biophys Res Commun*, Band 159(3):S. 1435–40, 1989.

- Lavoie, P., Robitaille, G., Agharazii, M., Ledbetter, S., Lebel, M. und Lariviere, R.: Neutralization of transforming growth factor-beta attenuates hypertension and prevents renal injury in uremic rats. In: *J Hypertens*, Band 23(10):S. 1895–903, 2005.
- Leask, A. und Abraham, D. J.: TGF-beta signaling and the fibrotic response. In: *Faseb J*, Band 18(7):S. 816–27, 2004.
- Li, X., Tjwa, M., Moons, L., Fons, P., Noel, A., Ny, A., Zhou, J. M., Lennartsson, J., Li, H., Lutun, A., Ponten, A., Devy, L., Bouche, A., Oh, H., Manderveld, A., Blacher, S., Communi, D., Savi, P., Bono, F., Dewerchin, M., Foidart, J. M., Autiero, M., Herbert, J. M., Collen, D., Heldin, C. H., Eriksson, U. und Carmeliet, P.: Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via effects on endothelial cells and their progenitors. In: *J Clin Invest*, Band 115(1):S. 118–27, 2005.
- Massague, J.: TGF-beta signal transduction. In: *Annu Rev Biochem*, Band 67:S. 753–91, 1998.
- Masunaga, Y., Muto, S., Asakura, S., Akimoto, T., Homma, S., Kusano, E. und Asano, Y.: Ascites from patients with encapsulating peritoneal sclerosis augments NIH/3T3 fibroblast proliferation. In: *Ther Apher Dial*, Band 7(5):S. 486–93, 2003.
- Mathieu, M. N., Vittet, D., Laliberte, M. F., Laliberte, F., Nonotte, I., Hamroun, D., Launay, J. M. und Chevillard, C.: Endothelin expression in human megakaryoblastic leukemia cell lines and normal platelet precursors. In: *Regul Pept*, Band 68(2):S. 91–7, 1997.
- Matsumoto, K., Mizuno, S. und Nakamura, T.: Hepatocyte growth factor in renal regeneration, renal disease and potential therapeutics. In: *Curr Opin Nephrol Hypertens*, Band 9(4):S. 395–402, 2000.
- Miyauchi, T. und Masaki, T.: Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. In: *Annu Rev Physiol*, Band 61:S. 391–415, 1999.
- Mizuno, S., Matsumoto, K. und Nakamura, T.: Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. In: *Kidney Int*, Band 59(4):S. 1304–14, 2001.

- Morgera, S., Kuchinke, S., Budde, K., Lun, A., Hoher, B. und Neumayer, H. H.: Volume stress-induced peritoneal endothelin-1 release in continuous ambulatory peritoneal dialysis. In: *J Am Soc Nephrol*, Band 10(12):S. 2585–90, 1999.
- Morgera, S., Schlenstedt, J., Giessing, M., Deger, S., Hoher, B. und Neumayer, H. H.: Glucose-mediated Transforming Growth Factor-beta1 Release in Human Mesothelial Cells is Endothelin Independent. In: *J Cardiovasc Pharmacol*, Band 44:S. S216–S218, 2004.
- Morgera, S., Schlenstedt, J., Hambach, P., Giessing, M., Deger, S., Hoher, B. und Neumayer, H. H.: Combined ETA/ETB receptor blockade of human peritoneal mesothelial cells inhibits collagen I RNA synthesis. In: *Kidney Int*, Band 64(6):S. 2033–40, 2003.
- Mutsaers, S. E., Foster, M. L., Chambers, R. C., Laurent, G. J. und McAnulty, R. J.: Increased endothelin-1 and its localization during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. In: *Am J Respir Cell Mol Biol*, Band 18(5):S. 611–9, 1998a.
- Mutsaers, S. E., Harrison, N. K., McAnulty, R. J., Liao, J. Y., Laurent, G. J. und Musk, A. W.: Fibroblast mitogens in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from asbestos-exposed subjects with and without clinical evidence of asbestosis: no evidence for the role of PDGF, TNF-alpha, IGF-1, or IL-1 beta. In: *J Pathol*, Band 185(2):S. 199–203, 1998b.
- Mutsaers, S. E., Marshall, R. P., Goldsack, N. R., Laurent, G. J. und McAnulty, R. J.: Effect of endothelin receptor antagonists (BQ-485, Ro 47-0203) on collagen deposition during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. In: *Pulm Pharmacol Ther*, Band 11(2-3):S. 221–5, 1998c.
- Naiki, Y., Maeda, Y., Matsuo, K., Yonekawa, S., Sakaguchi, M., Iwamoto, I., Hasegawa, H. und Kanamaru, A.: Involvement of TGF-beta signal for peritoneal sclerosing in continuous ambulatory peritoneal dialysis. In: *J Nephrol*, Band 16(1):S. 95–102, 2003.
- Nguyen, M., Parker, L. und Arora, K.: Identification of maverick, a novel member

- of the TGF-beta superfamily in *Drosophila*. In: *Mech Dev*, Band 95(1-2):S. 201–6, 2000.
- Ohta, K., Hirata, Y., Imai, T., Kanno, K., Emori, T., Shichiri, M. und Marumo, F.: Cytokine-induced release of endothelin-1 from porcine renal epithelial cell line. In: *Biochem Biophys Res Commun*, Band 169(2):S. 578–84, 1990.
- Park, S.H., Saleh, D., Giaid, A. und Michel, R.P.: Increased endothelin-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelin receptor antagonist. In: *Am J Respir Crit Care Med*, Band 156:S. 600–608, 1997.
- Phillips, A. O., Steadman, R., Topley, N. und Williams, J. D.: Elevated D-glucose concentrations modulate TGF-beta 1 synthesis by human cultured renal proximal tubular cells. The permissive role of platelet-derived growth factor. In: *Am J Pathol*, Band 147(2):S. 362–74, 1995.
- Pichon, S., Bryckaert, M. und Berrou, E.: Control of actin dynamics by p38 MAP kinase - Hsp27 distribution in the lamellipodium of smooth muscle cells. In: *J Cell Sci*, Band 117(Pt 12):S. 2569–77, 2004.
- Powell, D. W., Mifflin, R. C., Valentich, J. D., Crowe, S. E., Saada, J. I. und West, A. B.: Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. In: *Am J Physiol*, Band 277(1 Pt 1):S. C1–9, 1999a.
- Powell, D. W., Mifflin, R. C., Valentich, J. D., Crowe, S. E., Saada, J. I. und West, A. B.: Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. In: *Am J Physiol*, Band 277(2 Pt 1):S. C183–201, 1999b.
- Preaux, A. M., Mallat, A., Rosenbaum, J., Zafrani, E. S. und Mavier, P.: Pentoxifylline inhibits growth and collagen synthesis of cultured human hepatic myofibroblast-like cells. In: *Hepatology*, Band 26(2):S. 315–22, 1997.
- Rodriguez-Barbero, A., Obreo, J., Yuste, L., Montero, J. C., Rodriguez-Pena, A., Pandiella, A., Bernabeu, C. und Lopez-Novoa, J. M.: Transforming growth factor-beta1 induces collagen synthesis and accumulation via p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in cultured L(6)E(9) myoblasts. In: *FEBS Lett*, Band 513(2-3):S. 282–8, 2002.

- Rodriguez-Pascual, F., Redondo-Horcajo, M. und Lamas, S.: Functional cooperation between Smad proteins and activator protein-1 regulates transforming growth factor-beta-mediated induction of endothelin-1 expression. In: *Circ Res*, Band 92(12):S. 1288–95, 2003.
- Ruwhof, C., van Wamel, A. E., Egas, J. M. und van der Laarse, A.: Cyclic stretch induces the release of growth promoting factors from cultured neonatal cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. In: *Mol Cell Biochem*, Band 208(1-2):S. 89–98, 2000.
- Saed, G. M. und Diamond, M. P.: Effect of glucose on the expression of type I collagen and transforming growth factor-beta1 in cultured human peritoneal fibroblasts. In: *Fertil Steril*, Band 79(1):S. 158–63, 2003.
- Schild, C. und Trueb, B.: Mechanical stress is required for high-level expression of connective tissue growth factor. In: *Exp Cell Res*, Band 274(1):S. 83–91, 2002.
- Schnabl, B., Kweon, Y. O., Frederick, J. P., Wang, X. F., Rippe, R. A. und Brenner, D. A.: The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. In: *Hepatology*, Band 34(1):S. 89–100, 2001.
- Schrijvers, B. F., De Vriese, A. S. und Flyvbjerg, A.: From hyperglycemia to diabetic kidney disease: the role of metabolic, hemodynamic, intracellular factors and growth factors/cytokines. In: *Endocr Rev*, Band 25(6):S. 971–1010, 2004.
- Shephard, P., Hinz, B., Smola-Hess, S., Meister, J. J., Krieg, T. und Smola, H.: Dissecting the roles of endothelin, TGF-beta and GM-CSF on myofibroblast differentiation by keratinocytes. In: *Thromb Haemost*, Band 92(2):S. 262–74, 2004.
- Shi, Y. und Massague, J.: Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. In: *Cell*, Band 113(6):S. 685–700, 2003.
- Shi, Y., O'Brien, J. E., Fard, A. und Zalewski, A.: Transforming growth factor- $\beta$ 1 expression and myofibroblast formation during arterial repair. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Band 16:S. 1298–1305, 1996.

- Soma, Y. und Grotendorst, G. R.: TGF-beta stimulates primary human skin fibroblast DNA synthesis via an autocrine production of PDGF-related peptides. In: *J Cell Physiol*, Band 140(2):S. 246–53, 1989.
- Tokudome, T., Horio, T., Yoshihara, F., Suga, S., Kawano, Y., Kohno, M. und Kangawa, K.: Direct effects of high glucose and insulin on protein synthesis in cultured cardiac myocytes and DNA and collagen synthesis in cardiac fibroblasts. In: *Metabolism*, Band 53(6):S. 710–5, 2004.
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. und Brown, R. A.: Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. In: *Nat Rev Mol Cell Biol*, Band 3(5):S. 349–63, 2002.
- Ueda, Y., Wang, S., Dumont, N., Yi, J. Y., Koh, Y. und Arteaga, C. L.: Overexpression of HER2 (erbB2) in human breast epithelial cells unmasks transforming growth factor beta-induced cell motility. In: *J Biol Chem*, Band 279(23):S. 24505–13, 2004.
- Ueki, T., Kaneda, Y., Tsutsui, H., Nakanishi, K., Sawa, Y., Morishita, R., Matsumoto, K., Nakamura, T., Takahashi, H., Okamoto, E. und Fujimoto, J.: Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. In: *Nat Med*, Band 5(2):S. 226–30, 1999.
- Varga, J., Diaz-Perez, A., Rosenbloom, J. und Jimenez, S. A.: PGE2 causes a coordinate decrease in the steady state levels of fibronectin and types I and III procollagen mRNAs in normal human dermal fibroblasts. In: *Biochem Biophys Res Commun*, Band 147(3):S. 1282–8, 1987.
- Vaughan, M. B., Howard, E. W. und Tomasek, J. J.: Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. In: *Exp Cell Res*, Band 257(1):S. 180–9, 2000.
- Verrecchia, F. und Mauviel, A.: TGF-beta and TNF-alpha: antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression. In: *Cell Signal*, Band 16(8):S. 873–80, 2004.
- Wells, R. G.: The role of matrix stiffness in hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. In: *J Clin Gastroenterol*, Band 39(4 Suppl 2):S. S158–61, 2005.

- Wells, R. G., Kruglov, E. und Dranoff, J. A.: Autocrine release of TGF-beta by portal fibroblasts regulates cell growth. In: *FEBS Lett*, Band 559(1-3):S. 107–10, 2004.
- Wood, W. und Martin, P.: Structures in focus–filopodia. In: *Int J Biochem Cell Biol*, Band 34(7):S. 726–30, 2002.
- Yaekashiwa, M., Nakayama, S., Ohnuma, K., Sakai, T., Abe, T., Satoh, K., Matsumoto, K., Nakamura, T., Takahashi, T. und Nukiwa, T.: Simultaneous or delayed administration of hepatocyte growth factor equally represses the fibrotic changes in murine lung injury induced by bleomycin. A morphologic study. In: *Am J Respir Crit Care Med*, Band 156(6):S. 1937–44, 1997.
- Yang, Y. C., Piek, E., Zavadil, J., Liang, D., Xie, D., Heyer, J., Pavlidis, P., Kucherlapati, R., Roberts, A. B. und Bottinger, E. P.: Hierarchical model of gene regulation by transforming growth factor beta. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 100(18):S. 10269–74, 2003.
- Yang, Z., Krasnici, N. und Luscher, T. F.: Endothelin-1 potentiates human smooth muscle cell growth to PDGF: effects of ETA and ETB receptor blockade. In: *Circulation*, Band 100(1):S. 5–8, 1999.
- Yoshiji, H., Noguchi, R., Kuriyama, S., Ikenaka, Y., Yoshii, J., Yanase, K., Namisaki, T., Kitade, M., Masaki, T. und Fukui, H.: Imatinib mesylate (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, Band 288(5):S. G907–13, 2005.
- Yoshizumi, M., Kurihara, H., Sugiyama, T., Takaku, F., Yanagisawa, M., Masaki, T. und Yazaki, Y.: Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. In: *Biochem Biophys Res Commun*, Band 161(2):S. 859–64, 1989.
- Zamir, E. und Geiger, B.: Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. In: *J Cell Sci*, Band 114(Pt 20):S. 3583–90, 2001.
- Zarrinkalam, K. H., Stanley, J. M., Gray, J., Oliver, N. und Faull, R. J.: Connective tissue growth factor and its regulation in the peritoneal cavity of peritoneal dialysis patients. In: *Kidney Int*, Band 64(1):S. 331–8, 2003.

Ziyadeh, F. N., Sharma, K., Ericksen, M. und Wolf, G.: Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. In: *J Clin Invest*, Band 93(2):S. 536–42, 1994.

# Anhang A

## Anhang

### A.1 Labormaterialien

- Kulturflaschen, Nunclon / Nunc Brand Products / Dänemark
- Vortexer
- Zellschaber
- Magnetmixer
- Handschuhe
- 6-Lochplatten, Falcon, Polystyrene / Becton Dickinson Labware Europe / Meylan Cedex / Frankreich
- 96-Lochplatten, Falcon, Polystyrene / Becton Dickinson Labware Europe / Meylan Cedex / Frankreich
- 6er Dehnungsplatten, Flexcell / Dunnlabortechnik GmbH / Asbach / Deutschland
- Bohrer
- 12 ml Einmahlröhrchen, Falcon / Becton Dickinson Labware Europe / Meylan Cedex / Frankreich

- 50 ml Einmahlröhrchen, Falcon / Becton Dickinson Labware Europe / Meylan Cedex / Frankreich
- 2, 5, 10, 25 ml Pipetten, Falcon / Becton Dickinson Labware Europe / Meylan Cedex / Frankreich
- sterile Pinzette
- sterile Schere
- 96-Lochplatten, Nunc Maxisorb / Nunc Brand Products / Dänemark
- 2,5; 10; 200; 1000  $\mu$ l Pipettenspitzen / Eppendorf AG / Hamburg / Deutschland
- 500; 1000; 2000  $\mu$ l Eppendorfgefäße / Eppendorf AG / Hamburg / Deutschland
- Pipettierhilfen / Eppendorf AG / Hamburg / Deutschland
- Multipette / Eppendorf AG / Hamburg / Deutschland
- Accu-jet / Brand / Dänemark
- RIA - Röhrchen, Falcon / Becton Dickinson Labware Europe / Meylan Cedex / Frankreich
- Insulinspritzen 0.45 x 12 mm / Braun / Melsungen / Deutschland

## A.2 Geräte

- Mikroskop Dm IL, invers, Phasenkontrast / Leica / München / Deutschland
- Megafuge 2.0 R / Heraeus
- Zentrifuge
- Vortex
- Elisareader MRX / Dynatech
- Fluoreszenzmeßgerät Gemini Spektramax / Molecular Devices

- Betacounter
- Thymidin-wascher
- Thymidin-counter
- Fein-Waage / Sartorius AG / Göttingen / Deutschland
- Flumi
- Spotkamera, digital / Leica
- Hybridisierungsöfen
- Absaugpumpe
- Schüttler KM-2 / Edmund Bühler
- Dehnungspumpe
- Magnetmischer, monotherm / Faust GmbH Deutschland
- Osmometer
- 1470 Wizard Automatic Gamma Counter / Wallac Distribution GmbH, (über PerkinElmer life science) / Freiburg Deutschland
- Cryofuge 8000 / Heraeus Christ
- Biofuge fresco / Heraeus Christ
- LaminAir / Holten / Allerød / Dänemark
- Brutschrank, Cell House 200 / Heto Lab Equipment / Allerød / Dänemark
- Wasserbad / Heto Lab Equipment / Allerød / Dänemark
- RNA/DNA Calculator Gene Quant II / Pharmacia Biotech / Cambridge / England

### **A.3 Chemikalien**

- 0,25 % Trypsin-EDTA Lösung / Sigma Aldrich Chemie GmbH / Steinheim / Deutschland

- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  / PAA Laboratories GmbH / Linz / Österreich
- Dulbecco's MEM (1x), w 3,7 g/l  $\text{NaHCO}_3$ , w 1,0 g/l D-Glucose, w/o L-Glutamine / Biochrom AG / Berlin / Deutschland
- L-Glutamin (200mM) / Biochrom AG / Berlin / Deutschland
- Penicillin/Streptomycin 10 000 U/10 000  $\mu\text{g/ml}$  / Biochrom AG / Berlin / Deutschland
- Fetal Bovine Serum / Biochrom AG / Berlin / Deutschland
- Glycerol / Sigma Aldrich Chemie GmbH / Steinheim / Deutschland
- Glukose 20%ige Lösung / Braun / Melsungen / Deutschland
- Endothelin 1 human, porcine / Sigma Chemical Co / St. Louis / USA
- PDGF-BB, recombinant human / R&D Systems / Minneapolis / USA
- $\text{TGF}\beta_1$ , human / Biotrend Chemicalien GmbH / Köln / Deutschland
- Tween 20, pure / Serva Electrophoresis GmbH / Heidelberg / Deutschland
- Sucrose ultra pure / ICN Biomedicals, Inc / Aurora, Ohio / USA
- Bovine Serum, delipidized
- HEPES / Serva Electrophoresis GmbH / Heidelberg / Deutschland
- Methanol
- Albumin, bovine / Sigma Aldrich Chemie GmbH / Steinheim / Deutschland
- TMB-Microwell Peroxidase Substrate / Sigma Chemical Co / St. Louis / USA
- $\text{TGF}\beta_1$  -ELISA, human / R&D Systems / Minneapolis / USA
- containing: Capture Antibody (mouse anti- $\text{TGF}\beta_1$ ), Detection Antibody (chicken anti-human  $\text{TGF}\beta_1$ ), Standard, Streptavidin-HRP (horseradish-peroxidase)

- Wasch Puffer, 0.05% Tween20 in PBS, pH 7,2 - 7,4
- Block Puffer, 5% Tween20, 5% Succrose in OBS
- Reagent Diluent, 1,4
- TMB-Microwell Peroxidase Substrate / Sigma Chemical Co / St. Louis / USA
- Stop-Lösung,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (1M)
- 1N HCl
- 1,2N NaOH
- Endothelin<sub>1-21</sub> ELISA / Biomedica GmbH / Wien / Österreich
- Kaninchenserum, 1:5 verdünnt in TBS / DAKO / Dänemark
- monoklonalen Mouse Anti-Human Fibroblast Antikörper, 1:50 verdünnt in TBS / DAKO / Dänemark
- Kaninchen Anti-Mausimmunglobulin, 1:25 verdünnt in TBS / DAKO / Dänemark
- APAAP-Komplex, 1:50 verdünnt in TBS / DAKO / Dänemark
- Neufuchsin (rot) / DAKO / Dänemark
- TBS
- Kaisers Glycerin Gelatine / Merck / Darmstadt / Deutschland
- BCA Protein Assay Kit / Pierce / Rockford / USA
- 0,5 M NaOH
- 0,5 M HCl
- 0,1% Triton
- PINP RIA / Orion Diagnostica / Espoo / Finnland
- 0,2 M NaOH
- 0,8 M HCl
- Trichloressigsäure

- [6-<sup>3</sup>H]Thymidin / Amersham
- <sup>3</sup>[H]-Prolin / American Radiolabeled Chemicals, Inc / St Louis / USA
- Szintillationscocktail für wässrige Proben
- Szintillationscocktail für nicht wässrige Proben
- Alexa Fluor 488 Phalloidin / Molecular Biologische Technologie / Göttingen / Deutschland
- Paraformaldehyd 4%
- Immu-Mount / Shandon / Pittsburgh / England
- Chloroform
- Isopropanol
- Ethanol
- Trizol Reagent / Invitrogen life technologies
- DEPC-Wasser / Sigma Aldrich Chemie GmbH / Steinheim / Deutschland
- HPCL-Wasser / Baker, Deventer / Holland
- Primersequenzen / Tibmolbiol Syntheselabor / Berlin / Deutschland
- Gene Amp RNA PCR KIT / Roche Molecular Systems Inc / New Jersey / USA
- MuLV Reverse Transcriptase
- Rnase Inhibitor
- Random Hexamers
- Oligo d(T)<sub>16</sub>
- pAW 109 RNA
- Ampli Taq Gold 5 U/μl
- BC Assay, Kit (ReagentA+B, BSA-Standard 2 mg/ml) / Uptima, Interchim, MontLucon, Frankreich

## A.4 Software

- L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X
- SPSS (Version 11)
- Excel
- BioLinx 2.20 Dynatech Laboratories
- SigmaPlot
- EndNote (Version 6)

## A.5 Abkürzungen

1 g	Erdbeschleunigung
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
$\alpha$ SMA	$\alpha$ Smooth Muscle Aktin (Aktin der glatten Muskelzelle)
BSA	Bovine Serum Albumin
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DEPC-H <sub>2</sub> O	Diethyl pyrocarbonate H <sub>2</sub> O
DNA	Desoxiribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ET	Endothelin
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
GapDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid
HPCL	High Performance Liquid Chromatography
HPF	Humane Peritoneale Fibroblasten
HSP 27	Heat shock protein 27kDa

---

IL-1	Interleukin -1
IGF-2	Insulin like growth factor-2
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Plateled-derived Growth Factor
PDGF <sub>BB</sub>	Plateled-derived Growth Factor <sub>BB</sub>
PINP	Intaktes N-terminales Propeptid von Prokollagen Typ I
RIA	Radioimmunoassay
Streptavidin-HRP	Streptavidin-horseradish-peroxidase
TGF $\beta_1$	Transforming Growth Factor $\beta_1$
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TMB Substrat	Tetramethylbenzidine-Microwell Peroxidase Substrate
TNF $\alpha$	Tumor necrose factor alpha

# Danksagung

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. St. Morgera für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Arbeit in der Zeit der experimentellen Arbeit und während der Phase der statistischen Auswertung und Bewertung der Ergebnisse. Besonderer Dank gilt Juliane Schlenstedt, Pia Hambach, Thorsten Böhler und Christine Lorkowski. Ohne ihre Hilfe bei der Einarbeitung in die Methoden der Zellkultur, der PCR und des Elisa wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ebenfalls zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. M. Rühl und Prof. Dr. Somasundaram. Sie stellten ihr Labor für die radioaktiven Experimente zur Verfügung und unterstützten das Gedeihen der Arbeit durch viele wichtige Diskussionen und Anregungen. Bedanken möchte ich mich sehr herzlich bei meiner Mutter PD Dr. G. Große, die sich immer Zeit nahm, mir bei der Lösung entstandener Probleme zu helfen, wichtige Anregungen während der Arbeit gab. Ich danke meinem Freund für seine Geduld.

# Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

# Selbständigkeitserklärung

Ich, Ruth Knorr, geb. Große, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: UNTERSUCHUNGEN ZUR FIBROSE BEI PERITONEALER DIALYSE 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.

Ruth Knorr