

**Profibrotische Effekte von
Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoragonisten
in primären humanen dermalen Fibroblasten**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christina D. Keller

aus Berlin

Juni 2008

1. Gutachter: Herr Professor Dr. Burkhard Kleuser
2. Gutachter: Herr Professor Dr. Heinz H. Pertz

Datum der Disputation: 25.07.2008

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser

in der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie
des Instituts für Pharmazie
der Freien Universität Berlin angefertigt.

Für meine Eltern

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser für die Vergabe des hochinteressanten Dissertationsthemas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die hilfreiche Unterstützung während meines gesamten Promotionsvorhabens.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herr Professor Dr. Heinz H. Pertz für seine Unterstützung und die Erstellung des Zweitgutachtens bedanken.

Frau Professor Schäfer-Korting möchte ich für ihre Unterstützung danken.

Frau Dr. Bettina Sauer möchte ich für Einarbeitung in mein Dissertationsthema sowie die Unterstützung beim Beantragen meines NaFöG-Stipendiums danken.

Herrn Dr. Markus Tölle, Medizinische Klinik für Nephrologie der Charité, danke ich für das murine Gewebematerial der S1P₃-Knockout-Tiere und deren Wildtypen.

Herrn Professor Dr. Melzig, Institut für Pharmazie, danke ich für die Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops.

Ganz besonders herzlich danke ich Frau Hannelore Gonska für die Einarbeitung und ständige Hilfe bei den Zellkulturen sowie die vielen aufmunternden Worte und etlichen Tassen Kaffee.

Ich danke Herrn Dr. Jung, Herrn Dr. Schildknecht, dem Ärzteteam des St. Joseph-Krankenhauses sowie dem Ärzteteam des Operationszentrums Birkenwerder für das Gewebematerial zur Zellgewinnung.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser und Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting danke ich für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gemeinsamen Aktivitäten. Besonders möchte ich mich bei meiner Laborpartnerin Frau Judith Wanda Seeber, Frau Peggy Schlupp und Herrn Karsten Zimmermann für die vielen hilfreichen Gespräche und wertvollen Tipps bedanken.

Herrn Ulrich Kürschner und Herrn Henrik Potteck danke ich ganz herzlich für die Unterstützung, die Anregung und den Beistand während all der Zeit. Ihnen sowie Frau Bärbel Keller, Frau Hannelore Keller, Frau Friederike Schwegler, Frau Katharina Ackermann und Herrn Mike Bawden danke ich für die kritische Durchsicht meiner Dissertationsschrift.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Anke Müller, Frau Freia Feldmann, Frau Silvia Kietzmann, Frau Fernanda Ribeiro da Costa, Frau Uta Forstreuter, Herrn Thomas Müller und Herrn Raik Lieske für die beständige Zusprache und Motivation bedanken.

Meiner Familie möchte ich für den Rückhalt, die Ermutigung und die Unterstützung in allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit bedanken; insbesondere möchte ich an dieser Stelle Frau Annemarie und Herrn Klaus Ediger und Herrn Manfred Hahnbuch danken.

Originalarbeiten

C. D. Keller, P. Rivera Gil, M. Tölle, M. van der Giet, J. Chun, H. H. Radeke, M. Schäfer-Korting and B. Kleuser: Immunomodulator FTY720 Induces Myofibroblast Differentiation via the Lysophospholipid Receptor S1P₃ and Smad3-signalling. *Am J Pathol* 170(1): 281-292, 2007

Poster

C. D. Keller, P. Rivera Gil, M. Tölle, M. van der Giet and B. Kleuser: Der Immunomodulator FTY720 induziert die Fibroblasten-Myofibroblasten-Differenzierung über den S1P₃ Rezeptorsubtyp und den Smad3-Signalweg. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol (Suppl. 1)* 372, 2006

P. Rivera Gil, C. Schraut, C. D. Keller and B. Kleuser: Sphingosine 1-phosphate as a mediator of the fibrotic response. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol (Suppl. 1)* 371, 2005

Stipendium

NaföG-Promotionsstipendium durch das Land Berlin (April 2004 bis März 2006).

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	14
1.1	FIBROSE	15
1.2	DIE ZENTRALE ROLLE DES MYOFIBROBLASTEN.....	19
1.2.1	<i>Funktion</i>	21
1.3	DIFFERENZIERUNG ZU MYOFIBROBLASTEN DURCH TGF- β - DE NOVO EXPRESSION VON α -SMA.....	26
1.4	BEDEUTUNG VON SPHINGOSIN-1-PHOSPHAT FÜR DIE FIBROSE-ÄTIOLOGIE	30
1.4.1	<i>S1P-Rezeptorsubtypen</i>	33
1.5	DAS SPHINGOLIPID-DERIVAT FTY720	35
1.6	DER BINDEGEWEBSWACHSTUMSFAKTOR.....	37
1.6.1	<i>Signaltransduktion des CTGF</i>	38
1.6.2	<i>Induktion des CTGF</i>	39
1.6.3	<i>Bedeutung des CTGF in Fibrose</i>	41
1.7	EGF UND IGF-2.....	42
1.8	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	43
2	MATERIAL UND METHODEN	45
2.1	MATERIALEN	46
2.1.1	<i>Geräte</i>	46
2.1.2	<i>Reagenzien und Verbrauchsmaterialien</i>	47
2.1.3	<i>Nährmedien und Lösungen</i>	51
2.1.3.1	Zellkulturmedien.....	51
2.1.3.2	Lösungen zur Zellkultivierung.....	52
2.1.3.3	Lösungen zur Zellyse.....	53
2.1.3.4	Lösungen für die Elektrophorese und Western-Blot-Analyse.....	53
2.1.3.5	Lösungen für die Immunfluoreszenzuntersuchungen.....	55
2.2	METHODEN	55
2.2.1	<i>Kultivierung von Zellen</i>	55
2.2.1.1	Humane Fibroblasten.....	55
2.2.1.2	Murine Smad3-Knockout/Wildtyp-Fibroblasten.....	56
2.2.1.3	Murine S1P ₃ -Knockout/Wildtyp-Fibroblasten	56
2.2.2	<i>Quantifizierung von Zellen</i>	57
2.2.3	<i>Lagerung und Verdünnung von Testsubstanzen</i>	57
2.2.4	<i>Lagerung und Verdünnung von Inhibitoren</i>	58
2.2.5	<i>Detektion von spezifischen Proteinen</i>	59
2.2.5.1	Zellyse.....	59
2.2.5.2	Bestimmung des Proteingehaltes	59
2.2.5.3	SDS-Gelelektrophorese	60
2.2.5.4	Western-Blot-Analyse und Detektion.....	60

2.2.6	<i>Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen</i>	61
2.2.7	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>	62
2.2.8	<i>Antisense-Technologie</i>	63
2.2.9	<i>Untersuchungen zur Genexpression</i>	64
2.2.9.1	Isolierung der Gesamt-RNA.....	64
2.2.9.2	Reverse Transkription.....	65
2.2.9.3	Real-Time Polymerasekettenreaktion.....	66
2.2.10	<i>Statistik</i>	68
3	ERGEBNISSE	69
3.1	BILDUNG DES α -SMA DURCH S1P-AGONISTEN IN HUMANEN FIBROBLASTEN	70
3.1.1	<i>FTY720 induziert die Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten</i> 70	
3.1.2	<i>Die Aktivierung zu FTY720-P ist essentiell für den Differenzierungsprozess</i>	73
3.1.3	<i>Signaltransduktion via $G_{\alpha i}$-Protein gekoppelte Rezeptoren</i>	79
3.1.4	<i>FTY720-P vermittelt seine differenzierende Wirkung über den $S1P_3$</i>	80
3.1.5	<i>Bedeutung von Smad3 in der α-SMA-Expression</i>	83
3.2	EINFLUSS DES LIPIDMEDIATORS S1P AUF DIE CTGF-BILDUNG.....	87
3.2.1	<i>S1P erhöht die Expression der CTGF-mRNA</i>	87
3.2.2	<i>Einfluss auf die CTGF-Proteinneubildung</i>	91
3.2.3	<i>Beteiligung von S1P-Rezeptorsubtypen</i>	92
3.2.4	<i>Smad3 ist entscheidend an der Signaltransduktion beteiligt</i>	95
3.3	EFFEKTE EINER CO-STIMULATION VON EGF BZW. IGF-2.....	96
3.3.1	<i>Beeinflussung der Myofibroblastendifferenzierung durch die Wachstumsfaktoren IGF-2 und EGF</i>	96
3.3.2	<i>Beeinflussung der CTGF-Expression durch die Wachstumsfaktoren IGF- 2 und EGF</i>	99
4	DISKUSSION	101
4.1	DIE INDUKTION DER MYOFIBROBLASTENDIFFERENZIERUNG.....	102
4.1.1	<i>FTY720</i>	102
4.1.2	<i>Myofibroblastendifferenzierung durch das natürliche Phospholipid S1P</i> 104	
4.1.3	<i>Induktion des α-SMA durch FTY720 und FTY720-P</i>	105
4.1.4	<i>Keine Abhängigkeit von TGF-β</i>	106
4.1.5	<i>Der aktive Metabolit FTY720-P stellt das wirksame Agens dar.</i>	107
4.1.6	<i>Die Signaltransduktion via $S1P_3$</i>	108
4.1.7	<i>Beteiligung des Signaltransduktionsproteins Smad3 am Differenzierungsprozess</i>	110
4.1.7.1	TGF- β	112
4.1.7.2	FTY720 und S1P.....	113

4.2	DIE INDUKTION DER CTGF-MRNA IN HUMANEN DERMALEN FIBROBLASTEN	115
4.2.1	<i>Bestätigung der CTGF-Induktion durch TGF-β</i>	116
4.2.2	<i>Die CTGF-mRNA-Bildung durch den Lipidmediator SIP</i>	117
4.2.3	<i>Beeinflussung der CTGF-Protein-Expression durch den Lipidmediator SIP</i>	118
4.2.4	<i>Rezeptorbeteiligung</i>	118
4.2.5	<i>Signaltransduktion</i>	120
4.3	DER EINFLUSS VERSCHIEDENER CO-STIMULATIONEN	121
4.3.1	<i>EGF</i>	123
4.3.2	<i>IGF-2</i>	124
4.4	BEWERTUNG DES FIBROTISCHEN POTENTIALS VON FTY720 UND SIP	126
4.5	AUSBLICK	128
5	ZUSAMMENFASSUNG	130
5.1	ZUSAMMENFASSUNG	131
5.2	SUMMARY	132
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	134

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase (Adenylat Cyclase)
ACE	Angiotensinkonversionsenzym (Angiotensin Converting Enzyme)
ALK5	Activin-linked Kinase 5
ANG II	Angiotensin II
ASO	Antisense-Oligodesoxynukleotide
AT ₁	Angiotensin II-Rezeptorsubtyp 1
α -SMA	α -Glattmuskelaktin (α -Smooth Muscle Actin)
BMP	„Bone Morphogenetic Proteins“
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
Cam Kinase II	Kalzium- und Calmodulin-abhängige Kinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (Cyclic Adenosine Monophosphate)
CCN	Cystein-Rich 61 (CYR61/CCN1), CTGF/CCN2 und (NOV/CCN3)-Familie
Co-Smad	Co-Smad-Protein
CTGF	Bindegewebswachstumsfaktor (Connective Tissue Growth Factor)
CDK	Cyclin abhängige Kinasen (Cyclin Dependent Kinase)
CycA	Cyclophilin A
CYR61	Cysteine-Rich 61
CYS-KNOT	Cysteine Knot
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's Medium
DMS	<i>N,N</i> -Dimethylsphingosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelzellen
ECM	Extrazelluläre Matrixproteine (Extracellular Matrix Protein)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor)

EMT	Epitheliale Mesenchymale Umwandlung (Epithelial-Mesenchymal Transition)
EndMT	Endotheliale Mesenchymale Umwandlung (Endothelial Mesenchymal Transition)
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
Erk	Extrazellulär Regulierte Kinase (Extracellular Regulated Kinase)
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor (Fibroblast Growth Factor)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FTY720-P	FTY720-Phosphat
GRK-2	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase 2
HEK	Humane Embryonale Nierenzellen (Human Embryonal Kidney Cells)
HRP	Merretichperoxidase (Horse Radish Peroxidase)
HSC	Hepatische Stellazellen (Hepatic Stellat Cells)
HUVEC	Humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
IGFBD	IGF-Bindungsmotiv
IGFBP	IGF-bindendes Protein (IGF Binding Protein)
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1 (Insulin-Like Growth Factor 1)
IGF-2	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 2 (Insulin-Like Growth Factor 2)
IGFR-I	IGF-Rezeptorsubtyp-I
IGFR-II	IGF-Rezeptorsubtyp-II
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-6	Interleukin-6
IL-13	Interleukin-13
INF- γ	Interferon- γ
IR	Insulinrezeptor
I-Smad	Inhibierendes Smad-Protein (Inhibitory Smad Protein)

JNK	c-Jun-NH ₂ Kinase
LPP	Lipidphosphatase
MAPK	Mitogen Aktivierte Protein Kinase (Mitogen activated Protein Kinase)
MMP	Matrixmetalloproteinase
NOV	Nephroblastoma Over Expressed
NRK	Normale Rattennierenfibroblasten (Normal Rat Kidney Fibroblasts)
PAMP	Pathogen Assoziierte Molekulare Strukturen (Pathogen-Associated Molecular Patterns)
PBS	Phosphatpufferlösung (Phosphate Buffer Solution)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PDGF	Blutplättchen-Wachstumsfaktor (Platelet Derived Growth Factor)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	Struktur-Erkennungs-Rezeptoren (Pattern Recognition Receptors)
PTX	Pertussistoxin
PVPF	Polyvinylidifluorid
Real-Time RT-PCR	Real-Time Reverse Transkription-PCR
R-Smad	Rezeptor-Smad-Protein
ScrO	Scrambled-Oligodesoxynukleotide
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses (Systemic Lupus Erythematoses)
SMS	Glattmuskelzellen (Smooth Muscle Cells)
SphK1	Sphingosin-Kinase 1
SphK2	Sphingosin-Kinase 2

S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1P ₁	S1P-Rezeptorsubtyp 1
S1P ₂	S1P-Rezeptorsubtyp 2
S1P ₃	S1P-Rezeptorsubtyp 3
S1P ₄	S1P-Rezeptorsubtyp 4
S1P ₅	S1P-Rezeptorsubtyp 5
SPL	S1P-Lyase
SPP	S1P-Phosphatase
SSc	Sklerodermie (Systemic Sclerosis)
STAT	„Signal Transducers and Activators of Transcription“
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylenethylamin
TβRI	TGF-β-Rezeptor-I
TβRII	TGF-β-Rezeptor-II
TβRIII	TGF-β-Rezeptor-III
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor-β
TH1	T1-Helferzellen
TH2	T2-Helferzellen
TIMP	Gewebsinhibitoren der Matrixmetalloproteinase (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases)
TSP	Thrombospondin Typ 1
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (Vascular Endotheliale Growth Factor)
VSMC	Vaskuläre Glattmuskelzellen (Vascular Smooth Muscle Cells)
VWC	von Willebrand Factor Typ 1C-Motiv

1 Einleitung

1.1 Fibrose

Beim Krankheitsbild der Fibrose oder Sklerose handelt es sich um eine pathologische Vermehrung des Bindegewebes in einem Organ, das dadurch hart, derb und wenig elastisch wird und seine spezifische Funktion nicht mehr wahrnehmen kann. Pathologische Ursachen liegen in chronischen Entzündungen, einer überschießenden Wundheilung, Durchblutungsstörungen oder degenerativen Prozessen, deren genaue Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind. In das betroffene Gewebe wandern viele proliferierende Fibroblasten ein und differenzieren dort zu Myofibroblasten (Khouw, van Wachem et al. 1999). Beide Zelltypen synthetisieren extrazelluläre Matrixproteine (ECM) wie vor allem Kollagen Typ I (Poncelet and Schnaper 1998). Die Myofibroblasten exprimieren zusätzlich α -Glattmuskelaktin (α -Smooth Muscle Actin, α -SMA), welches das fibrotische Areal zusammenzieht (Desmouliere, Geinoz et al. 1993). Auch werden zahlreiche Wachstumsfaktoren exprimiert, die Fibrose-limitierende Faktoren wie Apoptose der Myofibroblasten und Umwandlung der Fibroblasten in stoffwechsel-inaktive Fibrozyten entgegenwirken. Die Bedeutung dieser Erkrankungen nimmt weiterhin zu. Man nimmt an, dass ca. 45% aller Todesfälle mit fibrotischen Erkrankungen vergesellschaftet sind (Wynn 2008). Von großer Relevanz sind fibrotische Veränderungen, die durch unterschiedliche Primärerkrankungen verursacht werden. Als Beispiel sei die Entwicklung einer Niereninsuffizienz bei Diabetes mellitus Patienten oder die fibrotische Leber nach chronischem Alkoholabusus genannt. Selbstverständlich darf die Bedeutung der Fibrose als selbstständige Krankheit, wie sie bei der systemischen Sklerose oder Sklerodermie (SSc) auftritt, nicht vernachlässigt werden. Auch können verschiedene Noxen - wie die Inhalationen von Stäuben - zur Entwicklung einer Lungenfibrose führen.

Die Nephropathie ist eine häufige Komplikation bei Patienten, die an Diabetes mellitus leiden. Sie wird als häufigste Ursache eines Nierenversagens in den Industrienationen angesehen. Schätzungen gehen davon aus, dass sich die Inzidenz des Diabetes mellitus Typ 2 bis zum Jahre 2025 verdreifachen wird (King, Aubert et al. 1998), so dass die Neuerkrankungsrate der diabetischen Nephropathie ebenfalls stark zunehmen wird (Anderson, McGill et al. 2007). Diese pathologische Veränderung stellt eine

mikrovaskuläre Komplikation des Diabetes mellitus dar, wobei ungefähr 30% der Patienten des Typ 1 Diabetes und 40% der Patienten des Typ 2 Diabetes diese Nierenpathologie ausbilden (Anderson, McGill et al. 2007; Nelson and Tuttle 2007; Wolf and Ziyadeh 2007). Sie entwickelt sich üblicherweise nach mehreren Jahren eines Diabetes mellitus und ist durch die Ausbildung einer Glomerulosklerose und einer intestinalen Fibrose charakterisiert. Im Endstadium kommt es zum vollständigen Funktionsverlust der Niere und der Patient wird dialysepflichtig. Bei der Ausbildung einer Nierenfibrose kommt den Mesangiumzellen eine große Bedeutung zu. Sie stellen spezielle Bindegewebszellen der Kapillarschleifen in den Malpighi-Körperchen des Glomerulus dar. Unter hyperglykämischen Bedingungen differenzieren sie zu einem myofibroblastischen Phänotyp, der für Bildung von ECM-Proteinen in großen Teilen verantwortlich ist (Ayo, Radnik et al. 1990; Ziyadeh 1994). Therapeutisch werden eine optimale Blutzuckerkontrolle, verringerte Proteinzufuhr, eine Normotonie und eine Aufgabe des Rauchens angestrebt. Pharmakologisch werden vor allem Angiotensinkonversionsenzym (ACE)-Inhibitoren oder Angiotensin-II-Rezeptorsubtyp1 (AT₁)-Blocker eingesetzt, die neben ihrer blutdrucksenkenden Funktion zusätzlich noch eine nephroprotektive Wirkung haben sollen. Die Wirkung beider Arzneistoffe ist wahrscheinlich auf eine verminderte Bildung des profibrotischen Zytokins TGF- β zurückzuführen (Wolf 2006). Trotz der genannten Maßnahmen ist es oft nicht möglich die Progression der Nephropathie aufzuhalten oder gar eine Heilung zu erreichen. Es existieren verschiedene antifibrotische Ansatzpunkte, die aber noch nicht erfolgreich in der Therapie eingesetzt werden können (Anderson, McGill et al. 2007).

Die intrahepatische Fibrosierung ist für die Entstehung der Leberzirrhose und letztendlich für den völligen Funktionsverlust der Leber von großer Bedeutung. Weltweit sterben fast 800.000 Menschen pro Jahr an den Folgen einer Leberzirrhose und zurzeit gibt es keine kurativen Therapieformen. Aktivierte hepatische Stellazellen oder Ito-Zellen (Hepatic Stellat Cells, HSC) sind essentiell an der Entstehung einer Leberfibrose beteiligt (Bataller and Brenner 2005; Gressner and Weiskirchen 2006). Nach einer Initiationsphase folgt eine Beibehaltungsphase, in der vermehrt Wachstumsfaktoren, ECM-Proteine und andere Substanzen vor allem von den HSC gebildet werden (Gressner and Weiskirchen 2006). Eine Leberfibrose stellt ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Zellen hepatischer und nicht-hepatischer

Herkunft und Mediatoren dar, wobei die Wirkungen des Blutplättchen-Wachstumsfaktors (Platelet Derived Growth Factors, PDGF) und TGF- β am besten untersucht sind (Moreira 2007). Da eine Leberfibrose in der Regel nicht mehr rückbildungsfähig ist, sollten therapeutische Interventionen möglichst vor dem Beginn einer Leberfibrose einsetzen. Bleibt die Behandlung der Grunderkrankung aus, entwickelt sich aus einer progredienten Leberfibrose fast zwangsläufig eine Leberzirrhose. Um eine Therapie auch späterer Krankheitsphasen zu ermöglichen, wird nach antifibrotischen Substanzen gesucht. Es wurden schon mehrere Stoffe getestet, aber bis dato ist keine erfolgreiche Therapie gefunden worden. Ansatzpunkte sind häufig anti-TGF- β - oder anti-PDGF-Regime (Borkham-Kamphorst, Herrmann et al. 2004; Borkham-Kamphorst, Stoll et al. 2004; Gressner and Weiskirchen 2006), die wegen ihrer pluripotenten Wirkungen häufig mit schweren Nebenwirkungen behaftet sind. Das Hepatikum Silymarin, gewonnen aus den Früchten der Mariendistel *Silybum marianum*, verfügt ebenfalls über einen antifibrotischen Mechanismus. Eine aktuelle Untersuchung an einem Leberfibrosetiermodell zeigt einen neuen Ansatzpunkt in der antifibrotischen Therapie auf. Durch eine Hemmung der Ribosomalen S-6 Kinase konnte der Krankheitsverlauf nicht nur abgeschwächt werden, sondern es erfolgte zum ersten Mal eine komplette Heilung (Buck and Chojkier 2007). Dieses Beispiel macht deutlich, dass die Untersuchung der molekularen Pathologie von fibrotischen Erkrankungen zu neuen innovativen Therapieoptionen führen kann und unterstreicht die Bedeutung der Grundlagenforschung in diesem Bereich.

Die SSc unterteilt sich in eine generalisierte (progressive systemische Sklerose) und eine lokalisierte Form (Pseudosklerodermie). Durch einen chronisch-entzündlichen Prozess im Gefäß- und Bindegewebsystem der Haut und bei der systemischen Form zusätzlich der inneren Organe kommt es zur Verhärtung des jeweiligen Organs. Betroffene Patienten leiden insbesondere unter Bewegungseinschränkungen der Finger aufgrund der zunehmenden Hautverdickung. Das Schlucken wird erschwert, weil der Ösophagus an Elastizität verliert. Je nach betroffenem Inneren Organ können noch Symptome einer Nieren- oder Lungeninsuffizienz hinzukommen. Die Ätiologie dieser Kollagenose ist noch weitestgehend unbekannt. Veränderungen in vielen verschiedenen Signalkaskaden führen zur vermehrten Bildung von ECM-Proteinen durch SSc-Fibroblasten im Vergleich mit gesunden dermalen Fibroblasten (LeRoy 1992;

Jimenez and Derk 2004), was zu einer progressiven intestinalen und perivaskulären Fibrose führt. Mit Hilfe von Kalziumantagonisten, Prostazyklinen und Acetylsalicylsäure versucht man die Mikrozirkulation zu verbessern. Glukokortikoide, nichtsteroidale Antiophlogistika und Immunsuppressiva werden aufgrund ihres antiphlogistischen bzw. immunsuppressiven Effektes eingesetzt. Durch diese Therapien ist die Erkrankung nur bedingt beeinflussbar, so dass eine Therapieform von großem Nutzen wäre, die in das fibrotische Geschehen direkt eingreift.

Die Ursache einer interstitiellen Lungenfibrose liegt in der chronischen Entzündung des Lungeninterstitiums mit sich anschließender überschießender Wundheilung (Gharaee-Kermani, Gyetko et al. 2007). Bei der exogen allergischen Alveolitis spielt die Inhalation von organischen Stäuben wie einem Aerosol aus Vogelantigenen oder Schimmelpilzen eine bedeutende Rolle. Hingegen ist der entzündliche Prozess bei der interstitiellen Pneumonie infektiös, wie zum Beispiel durch Viren, Mykoplasmen oder Chlamydien, bedingt. Auch kommen interstitielle Lungenfibrosen im Rahmen von Systemerkrankungen (Systemischer Lupus Erythematodes, SLE, Vaskulitiden, rheumatischer Formenkreis) vor. Durch die Lungenfibrosierung kommt es zu Beginn der Krankheit zu Atemnotsymptomen. Patienten leiden unter trockenem Husten, einer Belastungszyanose und zunehmender Tachy- und Dyspnoe. Schreitet die Erkrankung fort, kommt es im Endstadium zum vollständigen Funktionsverlust der Lunge. Grundsätzlich kann eine interstitielle Lungenfibrose systemisch mit Glukokortikoiden behandelt werden. Sie sollen den Übergang von der chronisch-entzündlichen in die fibrotische Phase durch ihr antiphlogistisches Potential unterbinden. Diese Therapie muss langfristig durchgeführt werden und kann von erheblichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen begleitet werden. So sind antifibrotische Substanzen zu bevorzugen, die mechanistisch nach der Entzündungsphase eingreifen.

Die genannten Beispiele machen deutlich, dass es eine Vielzahl verschiedenartiger fibrotischer Erkrankungen gibt, die nicht ausreichend therapiert werden können. Es ist daher wünschenswert die molekulare Pathologie weiter aufzuklären, um neue Ansatzpunkte für die Therapie zu finden, die keine schwerwiegenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen zeigen und das Fortschreiten einer Fibrose beenden.

1.2 Die zentrale Rolle des Myofibroblasten

Myofibroblasten stellen den Zelltyp dar, der an der überschießenden Wundheilung, der Fibrose, maßgeblich beteiligt ist. Sie weisen Charakteristika von Bindegewebs- und Muskelzellen auf und werden phänotypisch als eine Zwischenform dieser Zelltypen beschrieben (Majno 1971). Sie kommen in verschiedenen Geweben vor und verfügen unabhängig von ihrer Herkunft über eine verwandte Morphologie und besitzen ähnliche biochemische Fähigkeiten. Myofibroblasten zeigen im Lichtmikroskop die Ausbildung sogenannter Stressfasern, sie sind untereinander über viele Gap-Junctions verbunden und bilden eine Verbindung zum Fibronectin der ECM aus (Fibronexus) (Eyden 2005). Immunologisch lässt sich der Myofibroblast am besten über die Expression des α -SMA charakterisieren. Des Weiteren können die Expression von Vimentin, Desmin, Lamin oder das saure fibrilläre Gliaprotein (glial fibrillary acidic protein) einen Hinweis auf die myofibroblastische Natur einer Zelle geben (Mermall, Post et al. 1998). Die Synthese dieser Marker hängt von vielen Faktoren ab. Beispielsweise können die Herkunft der Zellen, bestimmte Grunderkrankungen sowie die Kultivierungsbedingungen (Sappino, Masouye et al. 1990; Masur, Dewal et al. 1996; Arora, Narani et al. 1999; Powell, Mifflin et al. 1999; Powell, Mifflin et al. 1999) die Expression der verschiedenen Marker beeinflussen.

Ursprünglich wurde angenommen, dass Myofibroblasten aus lokalen Fibroblasten nach einer Gewebeverletzung entstehen (Hinz 2007). Dabei wurde postuliert, dass Fibroblasten unter entsprechenden Bedingungen zuerst in eine Zwischenform den Pro-Myofibroblasten differenzieren, um sich anschließend in einen Myofibroblasten umzuwandeln (Tomasek, Gabbiani et al. 2002). Inzwischen konnte nachgewiesen werden, dass Myofibroblasten auch aus anderen Zellpopulationen entstehen können (Hinz, Phan et al. 2007). Zirkulierende Fibrozyten, die aus dem Knochenmark stammen (Bucala, Spiegel et al. 1994; Quan, Cowper et al. 2006) und mesenchymale Stammzellen, die wahrscheinlich in den Gefäßwänden lokalisiert sind (da Silva Meirelles, Chagastelles et al. 2006), können als Quelle für spezielle Myofibroblastensubgruppen angesehen werden. Darüber hinaus können Epithelzellen in einen myofibroblastischen Phänotyp umgewandelt werden, was mit dem Begriff Epitheliale Mesenchymale Umwandlung (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)

beschrieben wird (Willis, duBois et al. 2006). Verschiedene Wachstumsfaktoren wie TGF- β , der Fibroblastenwachstumsfaktor (Fibroblast Growth Factor, FGF), der Epidermale Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor, EGF) und der Insulin-artige Wachstumsfaktor 2 (Insulin-Like Growth Factor 2, IGF-2) zeigen einen fördernden Effekt auf die EMT (Kalluri and Neilson 2003). Auch über eine Differenzierung von Endothelzellen zu einem myofibroblastischen Zelltyp (Endothelial Mesenchymal Transition, EndMT) wurde in der Literatur berichtet (Zeisberg, Potenta et al. 2007). Letztlich sind in bestimmten Geweben nicht nur die dort ansässigen Fibroblasten als Quelle für diesen Zelltyp anzusehen, sondern auch andere lokale Zellen wie zum Beispiel die HSC der Leber (Bataller and Brenner 2005; Gressner and Weiskirchen 2006) oder die Mesangiumzellen der Niere (Ayo, Radnik et al. 1990; Ziyadeh 1994). Von vielen Autoren wird vermutet, dass die Zusammensetzung der Fibroblasten-Myofibroblastenkultur einen Einfluss auf den pathologischen Prozess hat, so dass dies Gegenstand intensiver Forschung ist (McAnulty 2007; Wynn 2008). Abb. 1 fasst die potentiellen Myofibroblasten-Vorläuferzellen noch einmal grafisch zusammen.

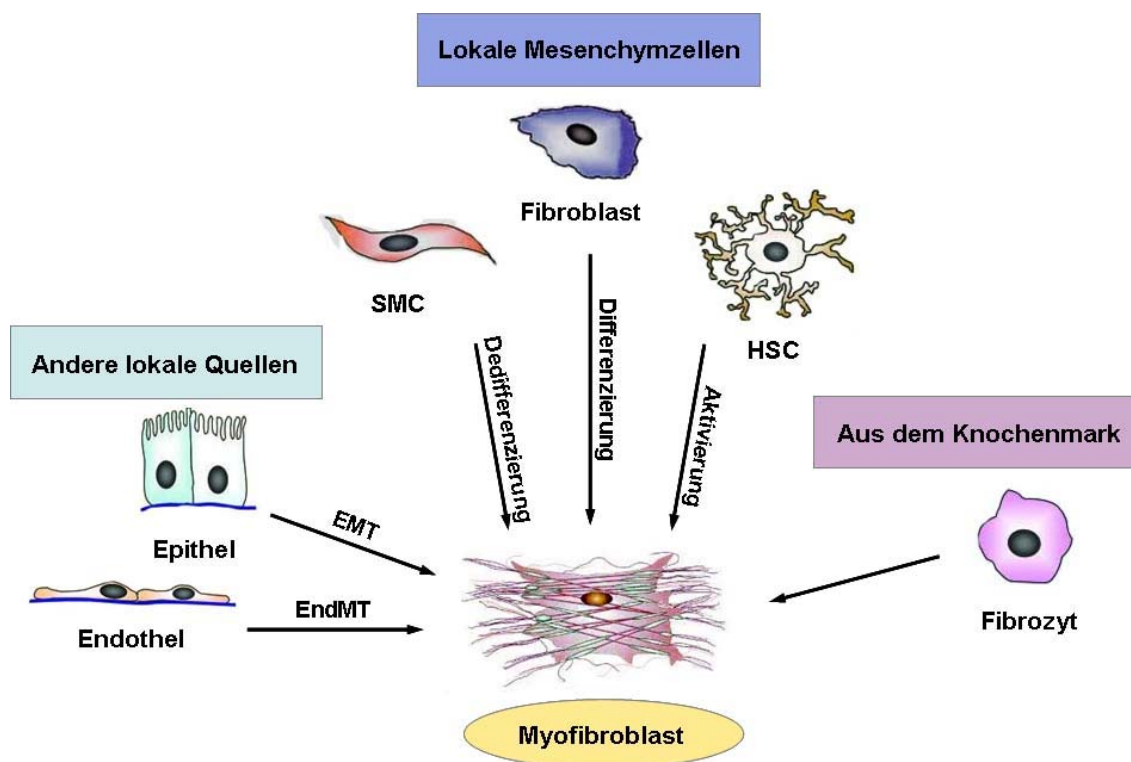


Abb. 1 Myofibroblastendifferenzierung.

Der myofibroblastische Phänotyp kann aus verschiedenen Zelltypen entstehen (verändert nach Hinz, Phan et al. 2007). Am häufigsten entstehen sie aus lokalen Fibroblasten. Nicht aufgeführt sind die Mesangiumzellen der Niere und spezielle mesenchymale Stammzellen. SMS: Glattmuskelzellen (Smooth Muscle Cells)

1.2.1 Funktion

Sowohl Fibroblasten als auch Myofibroblasten haben eine zentrale Bedeutung in der Wundheilung. Nach einer Gewebeerletzung kommt es zu Beginn zur Bildung eines Blutgerinnsels und der Freisetzung von Mediatoren aus den Thrombozyten. Diese Mediatoren wirken chemotaktisch auf Immunzellen. Sind die Makrophagen im verletzten Gewebe angelangt, setzen sie ebenfalls Botenstoffe frei, die zur Rekrutierung von Fibroblasten führen. Fibroblasten migrieren in das Wundareal, proliferieren und synthetisieren vermehrt ECM-Proteine, wie Kollagene und Fibronectin, unter Kontrolle der freigesetzten Mediatoren (Poncelet and Schnaper 1998; Khouw, van Wachem et al. 1999). Im Zuge der fortgeschrittenen Wundheilung kommt es zur Myofibroblastendifferenzierung, die das Wundareal zusammenziehen und es so

verkleinern (Desmouliere, Geinoz et al. 1993). Als kontraktile Zellen sind Myofibroblasten bestens dafür geeignet. In der finalen Phase verschiebt sich das Matrixmetalloproteinase/Gewebsinhibitoren der Matrixmetalloproteinase-Synthesemuster (MMP/TIMP (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases TIMP)-Synthesemuster) zugunsten eines ECM-degradierenden Verhältnisses und die Myofibroblasten werden durch Apoptose aus dem Gewebe entfernt (Desmouliere, Redard et al. 1995; Brew, Dinakarpanian et al. 2000; Visse and Nagase 2003). Verbleibende Fibroblasten zeigen einen nicht-kontraktilen Phänotyp und ihre Syntheseleistung wird stark eingeschränkt.

Ist dieser Regenerationsprozess gestört, kommt es entweder zu einer unvollständigen oder überschießenden Wundheilung, was in unterschiedlichen Erkrankungen resultiert. (Desmouliere, Chaponnier et al. 2005). Die Tab. 1 gibt einen Überblick über Erkrankungen, denen eine falsch regulierte Myofibroblastenaktivität zugrunde liegt.

Erkrankungen durch pathologische Fibroblastenfunktion (Auswahl)		
<i>Lunge</i>	<i>Haut</i>	<i>Andere Systeme</i>
Intestinale Lungenfibrose	Sklerodermie	Nierenfibrose
Asthma	Hypertrophe Narbenbildung	Leberfibrose
COPD	Keloide	Diabetes
<i>Bewegungsapparat</i>	<i>Herz- und Blutkreislauf</i>	Morbus Crohn
Rheumatoide Arthritis	Athereosklerose	Augenfibrose
Arthrose	Kardiale Fibrose	„Aging“

Tab. 1: Beispiele von Erkrankungen.

Eine Fibroblastenfehlfunktion kann zu pathologischen Veränderungen in fast allen Organen oder Geweben führen (verändert nach McAnulty 2007).

Von vielen fibrotischen Erkrankungen wird vermutet, dass sie eine infektiöse Ätiologie besitzen. Autoimmunreaktionen oder verschiedene Pathogene führen zu einer chronischen Entzündung, die zur Entstehung einer Fibrose führen kann. Von einigen Autoren wird die chronische Entzündung als Ursache von Fibrosen genannt (Burger,

Rezzonico et al. 1998; Azouz, Razzaque et al. 2004), andere Publikationen sehen in der chronischen Entzündung nur einen vorgeschalteten Prozess und machen eine fibroblastische Fehlfunktion für die Fibrogenese verantwortlich (Sime, Xing et al. 1997; Sime, Marr et al. 1998; Selman and Pardo 2002; Bonniaud, Margetts et al. 2005). Zusätzlich haben die mechanischen Eigenschaften des umgebenden Gewebes einen Einfluss auf die Myofibroblastendifferenzierung (Tomasek, Gabbiani et al. 2002). Für die entzündliche Krankheitsentstehung spricht das Vorhandensein von sogenannten Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP), die über eine Aktivierung von Struktur-Erkennungs-Rezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRR) zu Abwehrreaktionen der betroffenen Zelle führen. Fibroblasten exprimieren PRR und Myofibroblasten werden durch PAMP im aktivierten Zustand gehalten (Meneghin and Hogaboam 2007). Der spezielle PRR Toll-like Rezeptor führte nach einer Aktivierung direkt zur Myofibroblastendifferenzierung und vermehrten Kollagensynthese, so dass eine Inhibierung dieses Signalwegs einen neuen therapeutischen Ansatz darstellt (Otte, Rosenberg et al. 2003; Meneghin and Hogaboam 2007). Dennoch können Pathogene alleine nicht für die Entstehung aller Fibrosen verantwortlich gemacht werden. In der Therapie von Fibrosen werden häufig immunsupprimierende Arzneistoffe eingesetzt. Diese Therapien reichen jedoch nicht aus, so dass es weitere Mechanismen für die Aktivierung zu ECM-produzierenden Myofibroblasten existieren müssen. Werden Fibroblasten aus erkrankten Hautpartien von Sklerodermie-Patienten gewonnen, zeigen diese Zellen einen myofibroblastischen Phänotyp (Kirk, Mark et al. 1995). Ohne jegliche Stimulation produzieren sie vermehrt ECM-Proteine und zeigen eine erhöhte Sekretion von profibrotischen Zytokinen und Chemokinen (Jelaska, Arakawa et al. 1996; Strehlow and Korn 1998; Abraham and Varga 2005; Varga and Abraham 2007). Eine TGF- β -Stimulation führt in einer dermalen Fibroblastenkultur zu einem Phänotyp, der dem der SSc-Fibroblasten sehr stark ähnelt (Strehlow and Korn 1998). Dies führte zu der Vermutung, dass ein autokrines TGF- β -Signal für das Verhalten der SSc-Fibroblasten verantwortlich ist (Jelaska and Korn 2000). Inzwischen wird in der SSc-Pathologie auch die Möglichkeit von TGF- β /Smad3-unabhängigen Mechanismen diskutiert (Kaviratne, Hesse et al. 2004). Beispielsweise scheint das humane Zytomegalievirus eine Bedeutung zu haben, indem es zur Produktion von

Auto-Antikörpern und des Bindegewebswachstumsfaktors (Connective Tissue Growth Factor, CTGF) führt, die beide an der Myofibroblastendifferenzierung beteiligt sind (Hamamdžić, Kasman et al. 2002; Markiewicz, Smith et al. 2004; Abraham and Varga 2005). Auch B-Lymphozyten sind an der Bildung von Auto-Antikörper beteiligt und sie sezernieren zusätzlich noch Interleukin-6 (IL-6), das einen bekannten Fibroblastenwachstumsfaktor darstellt (Hasegawa, Fujimoto et al. 2005). Einige andere Studien haben die Beteiligung von T2-Helferzellen (TH2)-Zytokinen aus verschiedenen Zellen in der Fibrosepathologie diskutiert (Ong, Ip et al. 1999; Lakos, Takagawa et al. 2004; Wynn 2004; Lakos, Melichian et al. 2006; Aliprantis, Wang et al. 2007). Interleukin-4 (IL-4) zeigte *in vitro* die Fähigkeit zur vermehrten Synthese von ECM-Proteinen wie Kollagen Typ I/III und Fibronectin (Fertin, Nicolas et al. 1991), aber auch Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-13 (IL-13) haben eine Bedeutung in der Pathologie von Fibrosen (Doucet, Brouty-Boye et al. 1998; Ong, Wong et al. 1998; Zhu, Homer et al. 1999; Fallon, Richardson et al. 2000; Kolodsick, Toews et al. 2004; Keane, Gomperts et al. 2007). Interessanterweise scheinen einige T1-Helferzellen (TH1)-Zytokine ein antifibrotisches Potential zu besitzen. Interferon-gamma (INF- γ) hemmt beispielsweise die Bildung von α -SMA nach TGF- β -Stimulation in einer Fibroblastenkultur (Yokozeki, Baba et al. 1999; Tanaka, Sano et al. 2007). Obwohl die meisten Daten die essentielle Bedeutung des TGF- β in der Myofibroblastendifferenzierung bestätigen, wurde auch von Myofibroblastendifferenzierungen berichtet, die durch andere Mediatoren verursacht wurden. Die Wachstumsfaktoren PDGF (Tang, Ulich et al. 1996), IGF-2 (Lund and Zimmermann 1996) und die TH2-Zytokine IL-4 (Mattey 1997; Huaux, Liu et al. 2003; Batra, Musani et al. 2004) und IL-6 (Gallucci, Lee et al. 2006) scheinen zur Differenzierung in bestimmten Zellkulturen zu führen. Zusätzlich sind das Enzym der Blutgerinnung Thrombin (Bogatkevich, Tourkina et al. 2001; Zhang, Liu et al. 2005), das Gewebshormon Angiotensin II (ANG II) (Campbell, Janicki et al. 1995; Campbell and Katwa 1997; Rosenkranz 2004), das Mineralkortikoid Aldosteron (Campbell, Janicki et al. 1995) und das Signalpeptid Endothelin (Shi-Wen, Chen et al. 2004) in der Lage die Expression des α -SMA in bestimmten Fibroblastenpopulationen markant zu erhöhen. Allerdings führen einige dieser α -SMA-induzierenden Substanzen ebenfalls zu einer erhöhten Freisetzung oder Aktivierung von TGF- β . IL-4 steigert in pulmonalen

Epithelzellen die Freisetzung von TGF- β 2, so dass der Wachstumsfaktor parakrin auf bronchiale Mesenchymzellen seine profibrotischen Wirkung entfalten kann (Richter, Puddicombe et al. 2001). In dieser Studie führte der alleinige IL-4-Zusatz zur bronchialen Fibroblastenkultur nur zu einer vernachlässigbaren α -SMA-Induktion (Richter, Puddicombe et al. 2001). ANG II vermittelt seine differenzierende Wirkung nicht nur über eine vermehrte Freisetzung von TGF- β (Campbell and Katwa 1997), sondern auch über eine Zunahme des Smad2-Proteins und eine Verstärkung der Smad3-Phosphorylierung sowie deren Zellkerntranslokation (Tomasek, McRae et al. 2005). Thrombin ist ebenfalls in der Lage die Menge an freigesetztem TGF- β zu erhöhen (Bachhuber, Sarembock et al. 1997), wobei die α -SMA-Induktion nicht TGF- β -abhängig zu sein scheint (Bogatkevich, Tourkina et al. 2001). Andere Publikationen beschreiben teils konträre Ergebnisse hinsichtlich der Fähigkeit zur α -SMA-Bildung des PDGF (Blom, van Dijk et al. 2001; Jester, Huang et al. 2003; Kinnman, Francoz et al. 2003), IGF-2 (Grotendorst, Rahmanie et al. 2004), des Endothelins (Shephard, Hinz et al. 2004) und IL-4 (Richter, Puddicombe et al. 2001). Malmström und Kollegen postulierten, dass PDGF die Bildung des Pro-Myofibroblasten forciert und so in Kombination mit TGF- β zum profibrotischen Myofibroblasten führt (Malmstrom, Tufvesson et al. 2003). Anti-PDGF-Regime können die Myofibroblastenbildung inhibieren (Jester, Huang et al. 2003). Eine PDGF-Applikation führt jedoch nicht in jedem mesenchymalen Zelltyp zur Myofibroblastenbildung (Ronnov-Jessen and Petersen 1993). Die Myofibroblastendifferenzierung scheint von noch unbekanntem Einflussgrößen abhängig zu sein, so dass sich bei verschiedenen Versuchen unterschiedliche Abhängigkeiten herausgebildet haben. Dennoch fällt auf, dass der Wachstumsfaktor TGF- β in nahezu allen Veröffentlichungen diese differenzierende Fähigkeit besitzt.

Zusammengefasst scheinen parakrine Signale von aktivierten Lymphozyten, autokrine Faktoren von Fibroblasten, der mechanische Stress des umgebenden Gewebes und Pathogene zusammen zu einer Initiierung und Beibehaltung des myofibroblastischen Phänotyps zu führen.

1.3 Differenzierung zu Myofibroblasten durch TGF- β - de novo Expression von α -SMA

α -SMA ist der meist genutzte Marker für die myofibroblastische Natur einer Zelle. Die α -SMA-Bildung wird vor allem von dem Wachstumsfaktor TGF- β (Desmouliere, Geinoz et al. 1993; Ronnov-Jessen and Petersen 1993), speziellen ECM-Proteinen wie die Fibronectin-EDA-Domäne (Serini, Bochaton-Piallat et al. 1998) und die mechanischen Charakteristika der Umgebung (Tomasek, Gabbiani et al. 2002) reguliert. TGF- β ist das namensgebende Mitglied der TGF- β -Superfamilie, die aus einer Gruppe von multifunktionalen Wachstumsfaktoren (42 Mitgliedern) besteht und zu der auch die Aktivine und die sogenannten „Bone Morphogenetic Proteins“ (BMP) gehören. Die Mitglieder dieser Superfamilie sind an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen entscheidend beteiligt. Sie beeinflussen biologische Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung, Entzündung, ECM-Synthese oder auch Apoptose (Roberts and Sporn 1993; Taipale, Saharinen et al. 1998). Defekte in der TGF- β -Funktion sind mit der Ausbildung vieler pathologischer Prozesse assoziiert. Dazu gehören Erkrankungen des fibrotischen Formenkreises, Autoimmunkrankheiten und Tumorbildung (Blobe, Schiemann et al. 2000). TGF- β ist ein Zytokin, das von fast allen Zellen synthetisiert werden kann. Es existieren drei verschiedene Isotypen in Säugetieren, die *in vitro* ähnliche biologische Effekte zeigen (Roberts, Kim et al. 1991). *In vivo* können sich die Isoformen unterscheiden (Letterio and Roberts 1996; Kinbara, Shirasaki et al. 2002). Dabei besitzt die Isoform TGF- β 1 die größte profibrotische Potenz (Broekelmann, Limper et al. 1991; Border and Noble 1994). Der Wachstumsfaktor ist aus zwei identischen Polypeptidketten (112 Aminosäuren) aufgebaut, die über Disulfidgruppen miteinander verbunden sind. Jede Kette wird als Prepropeptid aus 390 Aminosäuren gebildet und posttranslational modifiziert, phosphoryliert und dimerisiert, um als pro-TGF- β sezerniert zu werden. Im Extrazellularraum können verschiedene Substanzen wie Thrombospondin-1 (Schultz-Cherry and Murphy-Ullrich 1993) oder Plasmin (Sato and Rifkin 1989), MMP-2, MMP-9 (Yu and Stamenkovic 2000) und Integrine (Munger, Huang et al. 1999; Yang, Mu et al. 2007) TGF- β aus diesem latenten Komplex herauslösen und in die aktive Wirkform überführen. Die bioaktive Form bindet an den TGF- β -Rezeptor-II (T β RII), dieser Komplex interagiert mit den TGF- β -Rezeptor-I (T β RI, auch Activin-linked

Kinase 5, ALK5), was in dessen Rekrutierung in einen heterotetrameren Rezeptor-Liganden-Komplex resultiert. TGF- β -Rezeptoren gehören zur Familie der membranständigen Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren und werden in drei verschiedene Subtypen unterteilt, wobei die TGF- β -Rezeptoren-III (T β RIII) Betaglycan und Endoglin über keine intrinsische Aktivität verfügen und den Zugang von TGF- β zu seinen transduzierenden Rezeptoren regulieren (Cheifetz, Weatherbee et al. 1987; Gougos and Letarte 1990; Lopez-Casillas, Cheifetz et al. 1991; Wang, Lin et al. 1991). Der T β RII phosphoryliert die Serin- und Threonin-Reste in der TTSGSGSG-Seqenz des T β RI nach Ligandenaktivierung. Nachfolgend phosphoryliert der aktivierte T β RI Rezeptor-Smad-Proteine (R-Smads). Zur weiteren Signaltransduktion bilden am C-terminalen SSV/MS-Motiv phosphorylierte R-Smads ein Oligomer mit dem zytoplasmatischen Co-Smad (Smad4), das in den Zellkern permeiert und dort zusammen mit verschiedenen DNA-Transkriptionsfaktoren an DNA-Promotoren anlagert (Poncellet, de Caestecker et al. 1999; Feng and Derynck 2005; Massague, Seoane et al. 2005). Die α -SMA-Transkription wird in Lungenmyofibroblasten und myofibroblastischen HSC über die Bindung des aktivierten Smad3 an das Smad-bindende Element 1 des α -SMA-Promoters transduziert. Die Bedeutung eines zweiten Smad-bindenden Elements ist zurzeit noch nicht eindeutig geklärt (Hinz 2007). Im Kontrast dazu steht eine Studie, die Smad2, nicht aber Smad3 die entscheidende Funktion in der α -SMA-Induktion zuweist (Evans, Tian et al. 2003). Neben den oben genannten Smad-Proteinen gibt es noch eine weitere Smad-Subgruppe, die inhibitorischen Smads (I-Smads) Smad6 und Smad7. Vor allem das Smad7 inhibiert TGF- β -Effekte. Beispielsweise führt die Überexpression von Smad7 zu einer verminderten Bildung von α -SMA nach einer TGF- β -Stimulation (Gu, Zhu et al. 2007). Die I-Smads können sowohl mit den R-Smads um die Rezeptorbindung konkurrieren als auch die Wechselwirkung zwischen Co- und R-Smad blockieren und so die TGF- β -Wirkung limitieren (Imamura, Takase et al. 1997; Nakao, Afrakhte et al. 1997). Co-Smad und R-Smads bestehen aus einer hoch konservierten N-terminalen MH1-Domäne, die über eine variable Linkerregion mit einer C-terminalen MH2-Domäne verbunden ist. Mit Ausnahme des Smad2 interagieren die R-Smads über die MH1-Domäne mit der DNA. Die Funktion der MH2-Domäne liegt in der Ausbildung der Smad-Oligomere und der Interaktionen mit dem T β RI. Die I-Smads

besitzen ebenfalls eine MH2-Domäne, können aber aufgrund der fehlenden MH1-Domäne nicht an die DNA binden. Abb. 2 fasst die Regulation der Smad-abhängigen α -SMA-Transkription noch einmal grafisch zusammen.

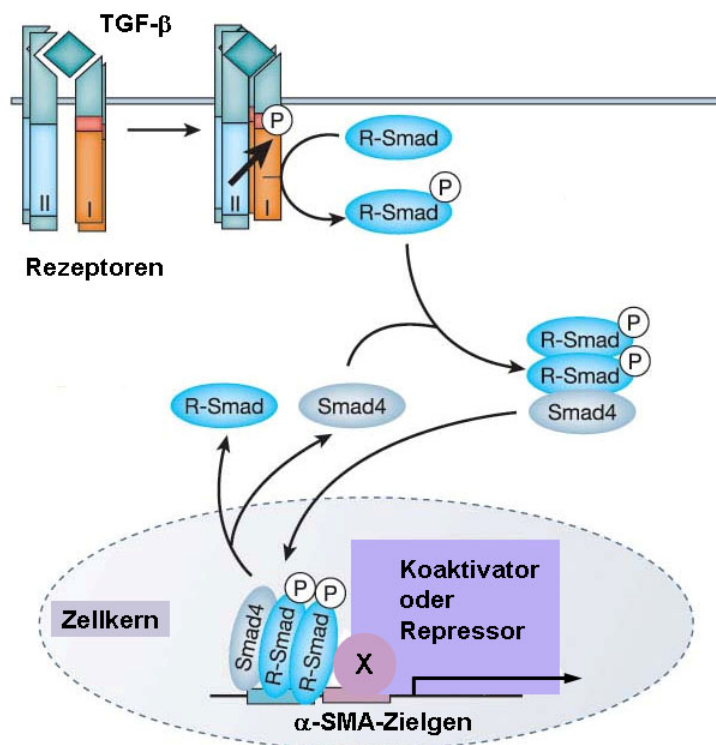


Abb. 2 Smad-Signalweg.

Schematische Darstellung der Signaltransduktion via Smad-Proteine in der TGF- β vermittelten α -SMA-Synthese (verändert nach Derynck and Zhang; Hu, Wu et al. 2003).

Nicht nur die I-Smads modulieren die Signaltransduktion via Smad-Proteine, auch verschiedene Kinasen anderer Signaltransduktionswege können die Smad-Signalweiterleitung beeinflussen. Meistens erfolgt eine Phosphorylierung in der Linkerregion oder MH1-Domäne, die nicht in allen Smads vertreten ist (Abb. 3) (Xu 2006). Nach entsprechender Aktivierung von der Mitogen Aktivierten Protein Kinase (MAPK) (Kretzschmar, Doody et al. 1997; Kretzschmar, Doody et al. 1999), der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) (Matsuura, Denissova et al. 2004), der Kalzium- und Calmodulin-abhängigen Kinase II (Cam Kinase II) (Wicks, Lui et al. 2000) und der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase 2 (GRK-2) (Ho, Cocolakis et al. 2005) können diese Kinasen zu einer Phosphorylierung von R-Smads führen. Diese Phosphorylierungen erfolgen nicht im SSXS-Motiv, welches durch den T β RI

phosphoryliert wird, sondern in der MH1-Domäne oder der Linkerregion des entsprechenden R-Smads. Häufig führt das zu einer Inhibierung der Signaltransduktion über die Smad-Proteine, indem der Transport in den Nucleus verhindert wird (Kretzschmar, Doody et al. 1997; Wicks, Lui et al. 2000). Andererseits wurde über Smad2 auch eine verstärkte Transkription vermittelt, nachdem es durch die extrazellulär regulierte Kinase (Extracellular Regulated Kinase, Erk) phosphoryliert wurde (Funaba, Zimmerman et al. 2002). Das Co-Smad Smad4 kann ebenfalls durch MAPK phosphoryliert werden. Dieser Prozess erfolgt konstitutiv und führt zu einer Akkumulation im Zellkern, wobei die physiologische Bedeutung noch nicht geklärt werden konnte (Nakao, Afrakhte et al. 1997; Roelen and Dijke 2003).

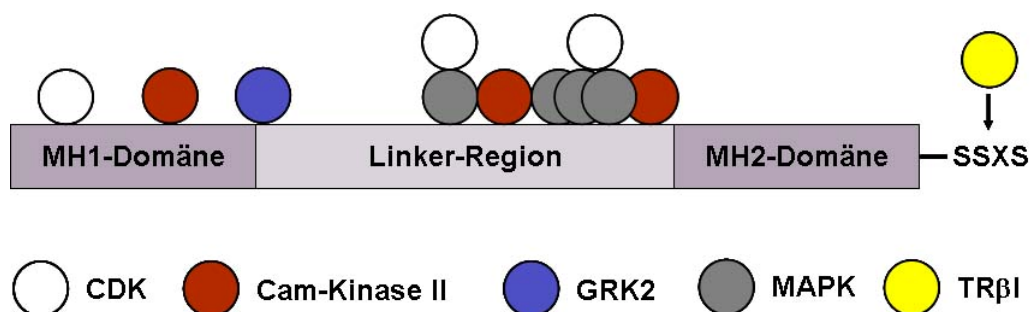


Abb. 3 R-Smad-Struktur.

Schematische Struktur eines R-Smad mit Phosphorylierungsstellen (verändert nach Xu 2006).

Neben der Signalweiterleitung über Smad-Proteine sind weitere TGF- β -Signalwege an der α -SMA-Transkription beteiligt (Derynck and Zhang 2003; Moustakas and Heldin 2005). In Smad3-Knockout-HSC konnte nach entsprechender Aktivierung eine Zunahme der α -SMA-Bildung *in vitro* gemessen werden (Schnabl, Kweon et al. 2001). Ein Smad-unabhängiger Signaltransduktionsweg des TGF- β scheint über die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) mit konsekutiver Involvierung der p21-aktivierten Effektor kinase-2 zu erfolgen. In dieser Studie wurde die Differenzierung zum Myofibroblasten allerdings nicht über die Expression des Markers α -SMA gemessen, sondern über die Analyse lichtmikroskopischer Aufnahmen und Bewertung der morphologischen Transformation (Wilkes, Mitchell et al. 2005). Die Smad-unabhängige Transkription des α -SMA in Fibroblasten wird über das TGF- β -Kontroll-Element reguliert (Roy, Nozaki et al. 2001; Tomasek, McRae et al.

2005), welches zusammen mit der TGF- β -hypersensitiven Region als Bindungsstelle für das Aktivatorprotein Sp1/3 dient (Cogan, Subramanian et al. 2002); (Subramanian, Polikandriotis et al. 2004). Ein weiteres notwendiges Element für die α -SMA-Transkription ist die MCAT-1-Bindungsstelle. Dieses Signal wird durch die Bindung des Transkriptions-erhöhenden Faktor-1 verstärkt, welcher mit MCAT-Suppressor-Proteinen um die Bindungsstelle konkurriert (Swartz, Johnson et al. 1998; Carlini, Getz et al. 2002). Oberhalb des α -SMA-Promoters hat sich eine weitere MCAT-Bindungsstelle als unbedeutend in diesem Kontext herausgestellt. Andere Studien haben eine Bedeutung des MAPK-Signalwegs in der α -SMA-Induktion durch TGF- β gefunden (Hu, Peng et al. 2006; Meyer-Ter-Vehn, Gebhardt et al. 2006; Ramirez, Shen et al. 2006). In einer weiteren Studie zeigte eine direkte Inhibierung der MAPK p38 in HSC keinen hemmenden Effekt auf die TGF- β -induzierte α -SMA-Bildung (Lindert, Wickert et al. 2005). Aber auch die c-Jun-NH₂ Kinase (JNK) (Hashimoto, Gon et al. 2001), die Proteinkinase C (PKC) (Gao, Li et al. 2003) und eine Aktivierung der kleinen Rho-Proteine scheinen in der TGF- β induzierten Bildung von α -SMA ihre Bedeutung zu haben (Harvey, Parnavitana et al. 2007; Kono, Nishiuma et al. 2007).

1.4 Bedeutung von Sphingosin-1-Phosphat für die Fibrose-Ätiologie

Das wichtigste beschriebene fibrotische Signalmolekül ist das TGF- β , dessen vielfältige Wirkungen denen des Sphingosin-1-Phosphats (S1P) ähneln. S1P vermittelt als Wachstumsfaktor Proliferation, Differenzierung, Schutz vor dem programmierten Zelltod sowie Chemotaxis. S1P ist ein bioaktiver Sphingolipidmediator, der sowohl als intrazellulärer Botenstoff als auch als extrazellulärer Ligand seine Wirkungen vermittelt. Gebildet wird dieser Botenstoff aus dem Sphingolipid Sphingosin, das durch die Sphingosin-Kinase 1 (SphK1) oder 2 (SphK2) an der Hydroxylgruppe phosphoryliert wird. Durch Aktivierung gelangen die Enzyme aus dem Zytosol an die Zellmembran oder in das Kernplasma, wo die Phosphorylierung stattfindet (Le Stunff, Milstien et al. 2004). Die Phosphorylierung kann intra- und extrazellulär erfolgen.

Beide SphK-Isoformen verfügen über unterschiedliche kinetische Eigenschaften und werden sowohl in der Ontogenese als auch im adulten Individuum unterschiedlich stark exprimiert. Unterschiede werden bei der Beeinflussung des programmierten Zelltods und der Proliferation offensichtlich. Eine Überexpression der SphK1 begünstigt das Überleben und fördert das Wachstum (Edsall, Cuvillier et al. 2001; Liu, Toman et al. 2003; Olivera, Rosenfeldt et al. 2003), wohingegen die vermehrte Bildung der SphK2 sich durch eine proapoptotische und DNA-Synthese hemmende Wirkung ausgezeichnet hat (Igarashi, Okada et al. 2003; Liu, Toman et al. 2003; Maceyka, Sankala et al. 2005). Im Gegensatz dazu konnten Experimente mit SphK1-, SphK2- oder SphK1/2-Knockout-Tieren zeigen, dass nur der Mangel an beiden SphK-Isoformen zum Versterben während der Embryogenese führte. Dieser Sachverhalt legt die Vermutung nahe, dass die beiden Enzymsubtypen sich gegenseitig ersetzen können (Allende, Sasaki et al. 2004; Kharel, Lee et al. 2005; Mizugishi, Yamashita et al. 2005). Der S1P-Abbau kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Zum einen kann S1P durch verschiedene unspezifische Lipidphosphatasen (LPP) oder unterschiedliche spezifische S1P-Phosphatasen (SPP) zu Sphingosin dephosphoryliert werden (Van Veldhoven and Mannaerts 1994; Mandala, Thornton et al. 2000). Zum anderen kann die S1P-Lyase (SPL) den Lipidmediator zu Hexadecanal und Phosphoethanolamin spalten (Zhou and Saba 1998). Sowohl die Phosphatasen als auch die Lyase gehören zu den membrangebundene Enzymen. In Abb. 4 sind die Bildung, die Funktionsweise und der Abbau des diskutierten Lipidmediators noch einmal schematisch zusammengefasst (Meyer zu Heringdorf and Jakobs 2007).

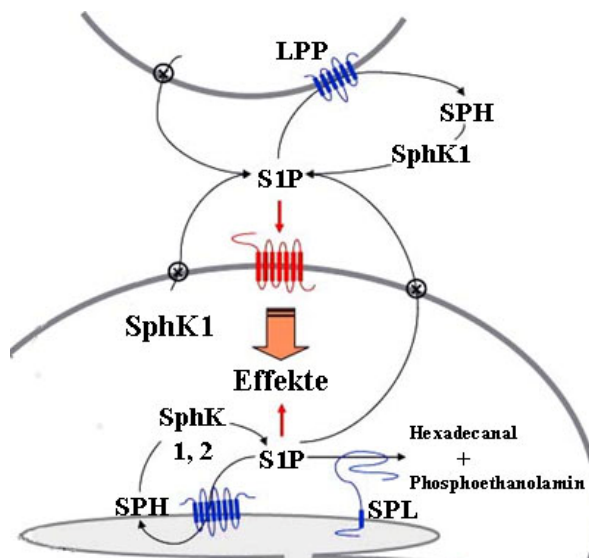


Abb. 4 S1P-Metabolismus.

Bildung, Funktionsweise und Abbau des Lipidmediators S1P (verändert nach Meyer zu Heringsdorf and Jakobs 2007).

Im Blutplasma kommt S1P gebunden an Albumin und Lipoprotein vor. Es wird in erster Linie von aktivierten Thrombozyten gebildet und liegt in erhöhten Konzentrationen im Wundareal vor (Takuwa, Takuwa et al. 2002). Hier zeigen sich Ähnlichkeiten zu TGF- β , das ebenfalls aus Blutplättchen stammt (Grainger, Wakefield et al. 1995), die Wundheilung modifiziert und dessen Effekte Analogien zu einigen S1P-vermittelten zellulären Antworten aufweisen. Von Bedeutung sind hier das starke chemotaktische Potential der beiden Substanzen sowie eine gegensätzliche Wirkung hinsichtlich der Proliferation auf Keratinozyten und Fibroblasten. S1P und TGF- β senken die Wachstumsraten von Keratinozyten (Ashcroft, Yang et al. 1999; Vogler, Sauer et al. 2003), steigern jedoch die Fibroblastenproliferation (Piek, Ju et al. 2001; Vogler, Sauer et al. 2003). Diese migratorischen und proliferativen Effekte auf Fibroblasten erklären neben Myofibroblastendifferenzierung und Anregung zur Matrixproteinsynthese, dass TGF- β die stärkste bekannte profibrotische Substanz ist. So bilden unverletzte Mäuse nach Injektion von TGF- β ein lokales Granulationsgewebe aus (Koch, Roche et al. 2000). Neben der Proliferation führt S1P in Analogie zu TGF- β zur Synthese von bestimmten Matrixproteinen (Vogler, Sauer et al. 2003), zur Fibroblastenmigration (Rivera Gil 2007) und zur α -SMA-Expression in humanen, fetalen Lungenfibroblasten (Urata, Nishimura et al. 2005).

1.4.1 S1P-Rezeptorsubtypen

Der Lipidmediator S1P vermittelt eine Vielzahl seiner Wirkungen durch Bindung an eine Familie von gut charakterisierten membranständigen Rezeptoren. Alle S1P-Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt und werden in fünf verschiedene Subtypen unterteilt. Die G-Proteine der verschiedenen Rezeptorsubtypen können sich unterscheiden, aber für alle Subtypen ist eine Signaltransduktion über das inhibitorische $G_{\alpha i/o}$ -Protein beschrieben worden. $G_{\alpha i/o}$ -Proteine vermitteln neben der Hemmung der Adenylatzyklase (Adenylat Cyclase, AC) häufig eine proliferative Wirkung auf Zielzellen, indem sie die MAPK stimulieren (Pebay, Toutant et al. 2001). Daneben kommt es durch die Phospholipase C (PLC) und die resultierende Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern auch zur Einleitung von Differenzierungsprozessen (Goetzl and An 1998). Neben $G_{\alpha i/o}$ -Proteinen wurden aber auch PTX-insensitive $G_{\alpha 12}$ - und $G_{\alpha 13}$ -Proteine sowie die kleinen G-Proteine Rac/Rho als Kopplungspartner identifiziert. Diese vermitteln in Zielzellen eine chemotaktische Antwort, was erklärt, dass S1P auf viele Zelltypen migratorisch wirkt. Zusätzlich ist die Ausbildung eines Myofibroblasten-typischen Zytoskeletts von der kleinen GTPase RhoA abhängig. Eine starke Lokomotion wird vor allem nach Aktivierung von S1P-Rezeptorsubtyp 1 (S1P₁) und S1P-Rezeptorsubtyp 3 (S1P₃) (Goetzl and An 1998) erreicht. Daneben kann der S1P-Rezeptorsubtyp 4 (S1P₄) ebenfalls promigratorischen Effekte in stabil S1P₄-transfizierten Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (Chinese Hamster Ovarial Cells, CHO) via einer weiteren Rho-GTPase Cdc42 übermitteln (Kohno, Matsuyuki et al. 2003). So führt die Überexprimierung dieser drei Rezeptorsubtypen zu starken Migrationsprozessen und morphologischen Änderungen. Der ebenfalls weit verbreitete S1P-Rezeptorsubtyp 2 (S1P₂) koppelt zwar an dieselben G-Proteine, besitzt aber ein untypisches Signalprofil. Es tritt eine Erhöhung der Kalziumionen-Konzentration sowie die Aktivierung von MAPK und PLC auf, aber auch die Konzentration an zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) steigt, während Rac inhibiert wird (Takuwa, Takuwa et al. 2002). Die Überexprimierung führt somit zur Hemmung der Zellmigration (Gonda, Okamoto et al. 1999; Takuwa, Takuwa et al. 2002). Über eine Aktivierung des PI3K/Akt/Proteinkinase B-Weg zeigte S1P seine antiapoptotische Wirkung in endothelialen Zellen (Limaye, Li et al. 2005). Darüber

hinaus wurden weitere G-Protein gekoppelte Rezeptoren aus dem GPCR-Kluster (GPR3, GPR6, GPR12) identifiziert, die eine circa 40%ige Homologie zu den S1P-Rezeptoren aufweisen (Kostenis 2004). GPR3, GPR6 und GPR12 verfügen zwar über eine konstitutive Aktivität, können aber auch durch S1P aktiviert werden (Uhlenbrock, Gassenhuber et al. 2002; Ignatov, Lintzel et al. 2003; Ignatov, Lintzel et al. 2003). Eine Transfektion mit GPR3, GPR6 und GPR12 in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK-239 (Human Embryonal Kidney Cells, HEK) erhöhte die intrazelluläre Kalziumionen-Konzentration nach einer Stimulation mit S1P, die sich durch eine $G_{\alpha i/o}$ -Protein-Inhibierung vollständig aufheben ließ (Uhlenbrock, Gassenhuber et al. 2002). Einen Überblick über das Vorkommen, die wichtigsten Signaltransduktionswege und die biologische Funktion der S1P-Rezeptorsubtypen gibt die Tab. 2 wieder.

Rezeptor	Vorkommen	G-Protein	Signalweg
S1P₁	Ubiquitär	$G_{\alpha i/o}$	Erk↑, PI3K/Akt↑, Rac↑, AC↓
S1P₂	Ubiquitär	$G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 12/13}$	PLC↑, $[Ca^{2+}]_i$ ↑, Erk↑, Rho↑, Rac↓, Cdc42
S1P₃	Ubiquitär	$G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 12/13}$	PLC↑, $[Ca^{2+}]_i$ ↑, Rho↑, Rac↑, Erk↑, Akt↑
S1P₄	Lymphoides und hämatopoetisches System	$G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha 12/13}$	PLC↑, $[Ca^{2+}]_i$ ↑, Erk↑, Rho↓, Cdc42
S1P₅	Gehirn, Oligodendrozyten, Haut	$G_{\alpha i/o}$	AC↓, Erk↓, JNK↑

Tab. 2: S1P-Rezeptorsubtypen.

Signaltransduktion und Vorkommen der S1P-Rezeptorsubtypen (Meyer zu Heringdorf and Jakobs 2007). EC: Endothelzellen; S1P₅: S1P-Rezeptorsubtyp 5; VSMC: Vascular Smooth Muscle Cells

1.5 Das Sphingolipid-Derivat FTY720

FTY720 ist ein strukturelles Derivat des Sphingosins, welches auch unter dem Namen Fingolimod bekannt ist. Es wurde erstmals 1992 durch Modifikation des Naturstoffs Myriocin hergestellt (Adachi, Kohara et al. 1995; Brinkmann, Cyster et al. 2004). Während eines Screening-Programms von biologischen Substanzen wurde die potentiell immunsuppressive Wirkung des Myriocin gefunden, welches zuvor auch aus dem Ascomyzeten *Isaria sinclairii* isoliert wurde (Fujita, Inoue et al. 1994; Fujita, Inoue et al. 1994). Die Derivatisierung zu FTY720 konnte durch ein geringeres toxisches Potential gegenüber der Ausgangssubstanz Myriocin überzeugen und zeigte in verschiedenen Versuchen eine stark immunsupprimierende Wirkung (Adachi, Kohara et al. 1995). Die FTY720-Applikation führt im Tiermodell zu einer Lymphozyten-Retention und vermittelt so seinen immunmodulierenden Effekt, ohne dabei die Lymphozyten zu schädigen (Chiba, Yanagawa et al. 1998; Yanagawa, Sugahara et al. 1998; Pinschewer, Ochsenbein et al. 2000; Matloubian, Lo et al. 2004). Dieses innovative Wirkprinzip zeichnet sich durch komplette Remission der peripheren Lymphopenie nach dem Absetzen des neuen Wirkstoffs aus (Chiba, Yanagawa et al. 1998). Interessanterweise hebt eine $G_{\alpha i/o}$ -Protein-Hemmung mit PTX die protektive FTY720-Wirkung bei der Kollagen-induzierten Arthritis (im Rattenmodell) auf, was auf die Beteiligung von $G_{\alpha i}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren hinweist (Brinkmann, Pinschewer et al. 2000). FTY720 befindet sich als neuer Wirkstoff momentan in der Phase III der Klinischen Prüfung zur Behandlung der schubförmig verlaufenden Multiplen Sklerose mit Remissionen.

In vitro und *in vivo* wird FTY720 als Sphingosin-Analoges von der SphK als Substrat erkannt und zu FTY720-Phosphat (FTY720-P) metabolisiert (Mandala, Hajdu et al. 2002). Die Umwandlung wird vor allem durch die SphK2 und weniger durch die SphK1 bewerkstelligt. Das FTY720-P bindet als potenter Agonist an vier der fünf S1P-Rezeptorsubtypen (Brinkmann, Davis et al. 2002). FTY720-P kann durch Phosphatasen wieder dephosphoryliert, aber im Gegensatz zum natürlichen Mediator S1P nicht durch die SPL abgebaut werden (Bandhuvula, Tam et al. 2005). Die

agonistische Bindung an den S1P₁ auf den Lymphozyten mit anschließender Rezeptorinternalisierung bildet eine mögliche Erklärung des Wirkmechanismus. Es besteht ein S1P-Konzentrationsgradient zwischen den Lymphknoten und dem Blut. Physiologisch migrieren Lymphozyten aus den Lymphknoten in das Blut aufgrund des S1P-Stimulus. Ist der S1P₁ internalisiert, kann keine Chemokinese auf diesen Reiz erfolgen (Matloubian, Lo et al. 2004). Eine zweite Erklärung des Wirkmechanismus stellt die Beeinflussung der Endothelzellen dar. So führt FTY720 zur Translokation von E-Cadherin an die fokale Kontaktseite und erzielt dadurch eine verstärkte Zusammenlagerung der Endothelzellen (Sanchez, Estrada-Hernandez et al. 2003). Aufgrund der erhöhten Barrierefunktion ist die Transmigration von Lymphozyten durch das Endothel der efferenten Lymphgefäße erschwert. So scheint FTY720 seinen immunsupprimierenden Effekt über verschiedene Zelltypen zu vermitteln. Noch ist nicht abschließend geklärt, ob FTY720 nur über seinen aktiven Metaboliten seine immunmodulierende Wirkung entfaltet. Dieser Sachverhalt wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Xin, Ren et al. 2006; Payne, Oskeritzian et al. 2007).

Als potenter S1P-Agonist kann FTY720-P auch zu weiteren Wirkungen über die S1P-Rezeptorsubtypen S1P_{1,3,4,5} führen. Sowohl in Tiermodellen als auch in klinischen Studien zeigte FTY720 nach einer Initialdosis eine Verlangsamung der Herzfrequenz (Brinkmann, Pinschewer et al. 2001; Brinkmann, Davis et al. 2002; Tedesco-Silva, Mourad et al. 2004). Für das physiologische Analogon S1P ist ebenfalls eine Bradykardie im Tiermodell gezeigt worden. Eine Beteiligung des S1P₃ konnte in weiteren Versuchen nachgewiesen werden (Forrest, Sun et al. 2004; Sanna, Liao et al. 2004). Darüber hinaus waren FTY720 und der natürliche Sphingolipidmediator S1P in der Lage, proinflammatorische Mechanismen in Endothelzellen und vaskulären Glattmuskelzellen zu hemmen. Es wird vermutet, dass sie über eine antiathereosklerotische Wirkung verfügen (Tolle, Levkau et al. 2005; Tolle, Levkau et al. 2007). Diese Wirkung scheint ebenfalls über eine Aktivierung des S1P₁ und S1P₃ transduziert zu werden (Tolle, Levkau et al. 2005; Tolle, Levkau et al. 2007). Es bleibt abzuwarten, ob den einzelnen Rezeptorsubtypen bestimmte Effekte auch in der Therapie zugeordnet werden können. Sollte dies geschehen, könnte die Entwicklung spezifischer Agonisten für einzelne Subtypen zu einem zusätzlichen Benefit führen.

1.6 Der Bindegewebswachstumsfaktor

CTGF gehört zur Familie der CCN-Proteine. Die Abkürzung **CCN** steht für die ersten drei Mitglieder dieser Gruppe von Wachstumsfaktoren, wobei das erste **C** für „Cystein-Rich 61“ (CYR61/CCN1), das zweite **C** für CTGF/CCN2 und das **N** für „Nephroblastoma Over Expressed“ (NOV/CCN3) steht.

Alle Mitglieder dieser Familie enthalten viele Cysteine (10%) in ihrer Primärstruktur und sind zwischen 30 und 40 kDa groß. Entdeckt wurden sie in den 90iger Jahren (Brigstock, Steffen et al. 1997; Lau and Lam 1999; Perbal 2001). CTGF wurde das erste Mal im Überstand von kultivierten humanen Endothelzellen identifiziert (Bradham, Igarashi et al. 1991). Ihre Bedeutung liegt in einer Beeinflussung von Mitose, Adhäsion, Apoptose, ECM-Produktion und Migration. Darüber hinaus sind sie an vielen biologischen Vorgängen wie Angiogenese, Chondrogenese, Tumorgenese, Wundheilung und fibrotische oder vaskuläre Krankheiten beteiligt. Zu ihren Zielzellen gehören Fibroblasten, epitheliale Zellen, Endothelzellen, Glattmuskelzellen und Neuronalzellen (Moussad and Brigstock 2000).

CCN-Proteine enthalten vier hoch konservierte Domänen in ihrer Struktur, wobei das CCN5 eine Ausnahme darstellt (Pennica, Swanson et al. 1998). Abb. 5 gibt den schematischen Aufbau eines CCN-Proteins am Beispiel des CTGF wieder. Die Domäne 1 enthält ein IGF-Bindungsmotiv (IGFBFD), während die Domäne 2 Homologien mit dem von Willebrand Faktor Typ 1C-Motiv (VWC) besitzt. Die Domäne 3 stimmt mit dem ursprünglich in Thrombospondin gefundenen Typ 1 (TSP-1) überein und die C-terminale Domäne 4 wird als „Cysteine Knot“ (CYS-KNOT) bezeichnet.



Abb.: 5 CTGF (CCN2).

Schematische Darstellung der CTGF-Struktur. Dargestellt sind die verschiedenen Domänen und das Signalpeptid (S), was für die CTGF-Sekretion benötigt wird (Grotendorst and Duncan 2005).

Teilweise ist es gelungen, den einzelnen Domänen Funktionen zuzuordnen. CTGF bindet über seine Domäne 4 an Heparin (Brigstock, Steffen et al. 1997). Die gleiche Struktur ist auch an der Komplexbildung mit dem Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) beteiligt (Inoki, Shiomi et al. 2002). *In vitro* wurde für CTGF eine IGF-Bindung beschrieben, jedoch konnte das nicht eindeutig der IGFBP zugeordnet werden (Kim, Nagalla et al. 1997). Es wird allerdings postuliert, dass CTGF als IGF-bindendes Protein (IGFBP) aufzufassen ist, obwohl die Affinität zum IGF deutlich schwächer ist als bei den klassischen Vertretern dieser Gruppe (Yang, Kim et al. 1998). Über die VWC-Struktur wird eine Wechselwirkung mit dem Wachstumsfaktor TGF- β vermutet. Wahrscheinlich erhöht das CTGF die Bindung an den T β R (Abreu, Ketpura et al. 2002). Die TSP-1-Domäne ist essentiell an Interaktionen mit sulfatierten Glykokonjugaten beteiligt (Holt, Pangburn et al. 1990; Bork 1993). Der CYS-KNOT hat eine große strukturelle Ähnlichkeit mit einer Sequenzfolge in anderen Wachstumsfaktoren. Hier dient sie unter anderem zur Dimerisierung von Wachstumsfaktoren (Murray-Rust, McDonald et al. 1993).

1.6.1 Signaltransduktion des CTGF

Der Wirkungsmechanismus CTGF ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Hypothese besagt, dass CTGF die funktionelle und räumliche Lücke zwischen ECM-assoziierten Proteinen und Zelloberflächenproteinen schließt und so Signale transduziert (Lau and Lam 1999). Es konnte gezeigt werden, dass CTGF an bestimmte Integrine bindet und so Kinasen aktiviert (Lau and Lam 1999; Schober, Chen et al. 2002; Weston, Wahab et al. 2003; Gao and Brigstock 2006). Zusätzlich hat CTGF eine hohe Affinität zu Heparin und liegt deshalb an Zelloberflächen oder in der ECM in Assoziation mit Heparansulfat-Proteoglykanen vor, die möglicherweise eine Funktion als Co-Rezeptoren einnehmen (Gao and Brigstock 2004). Wahab und Kollegen konnten zeigen, dass eine Inhibierung des Neurotrophinrezeptors TrkA CTGF-Effekte hemmen konnte (Wahab, Weston et al. 2005). Folglich stellt dies eine weitere Möglichkeit der Signaltransduktion durch CTGF dar.

1.6.2 Induktion des CTGF

TGF- β ist der bedeutendste Induktor des CTGF (Igarashi, Okochi et al. 1993). Für die erhöhte CTGF-Transkriptionsrate werden eine TGF- β und Smad-bindende Domäne im Promoter dieses Gens benötigt (Grotendorst, Okochi et al. 1996; Leask, Holmes et al. 2003). Aber auch einige andere Botenstoffe und bestimmte Reize erhöhen die CTGF-Expression. Die Tab. 3 benennt unterschiedliche Stimuli der CTGF-Bildung in verschiedenen mesenchymalen Zellen. Darüber hinaus sind die Arzneistoffe Dexamethason (Dammeier, Beer et al. 1998; Okada, Kikuta et al. 2006), Bleomycin (Yamamoto, Eckes et al. 2000) oder Phenytoin (Uzel, Kantarci et al. 2001) ebenfalls in der Lage die CTGF-Syntheserate zu verstärken. Interessanterweise verstärkt Dexamethason *in vitro* auch die TGF- β vermittelte Myofibroblastendifferenzierung (Gü, Zhu et al. 2004). Über Bleomycin und Phenytoin sind fibrotische Veränderungen der Lunge bzw. der Gingiva als unerwünschte Arzneimittelwirkungen beschrieben worden. Auch der Lipidmediator S1P kann die CTGF-Bildung forcieren (Chowdhury and Chaqour 2004; Muehlich, Schneider et al. 2004; Katsuma, Ruike et al. 2005). Dabei scheint die kleine GTPase RhoA eine Rolle zu spielen (Chowdhury and Chaqour 2004; Katsuma, Ruike et al. 2005).

Stimulus	Zelltyp	Literatur
Angiotensin II	Humane pulmonale Fibroblasten	(Long, Xiong et al. 2007)
Histamin	IMR-90 (fetale Fibroblastenzelllinie)	(Kunzmann, Schmidt-Weber et al. 2007)
Thrombin	Fetale und adulte Fibroblasten HFL-1 (fetale Fibroblastenzelllinie)	(Chambers, Leoni et al. 2000) (Howell, Goldsack et al. 2001)
S1P	Glattmuskelzellen Mesangiumzellen	(Chowdhury and Chaqour 2004) (Katsuma, Ruike et al. 2005)
Lysophosphatidsäure	Humane renale Fibroblasten	(Heusinger-Ribeiro, Eberlein et al. 2001)
Sphingosylphosphorylcholin	Humane dermale Fibroblasten	(Zhu, Kim et al. 2005)
Endothelin-1	Humane pulmonale Fibroblasten	(Xu, Howat et al. 2004)
IE-1 Protein (humanes Zytomegalievirus)	Humane dermale Fibroblasten	(Markiewicz, Smith et al. 2004)
Aldosteron	Mesangiumzellen	(Han, Kang et al. 2006)
Hypoxie	TK173 (renale Fibroblastenzelllinie)	(Rong, Huang et al. 2005)
Hochglukose-Therapie	Mesangiumzellen	(Murphy, Godson et al. 1999; Yevdokimova and Podpryatov 2007)
Mechanischer Stress	IMR-90 (s. o.)	(Schild and Trueb 2002)

Tab. 3: Induktion des CTGF.

Verschiedene Stimuli führen zur CTGF-Expression in mesenchymalen Zellen.

Einige der genannten Stimuli führen zur Freisetzung von TGF- β , so dass eine TGF- β -abhängige CTGF-Bildung nicht von vornherein ausgeschlossen werden kann (Bachhuber, Sarembock et al. 1997; Campbell and Katwa 1997; van Wamel, Ruwhof et al. 2001; Lai, Chen et al. 2006). Über den Wachstumsfaktor TGF- β sind verschiedene Signaltransduktionswege für die CTGF-Bildung beschrieben worden. Neben den MAPK und der kleinen GTPase Rho hat vor allem der Smad-Signalweg eine wichtige Funktion in der CTGF-Synthese (Heusinger-Ribeiro, Eberlein et al. 2001; Holmes, Abraham et al. 2001; Leivonen, Hakkinen et al. 2005).

1.6.3 Bedeutung des CTGF in Fibrose

CTGF ist ein wichtiger Downstream-Mediator des TGF- β im fibrotischen Geschehen (Wang, Denichilo et al. 2001; Yokoi, Sugawara et al. 2001; Yokoi, Mukoyama et al. 2002). Über ihn vermittelt TGF- β unter anderem die Kollagenbildung, die Myofibroblastendifferenzierung und das Wachstum von normalen Rattennierenfibroblasten (NRK) (Grotendorst, Rahmanie et al. 2004). Zusätzlich ist CTGF in der Lage, TGF- β -Wirkungen zu verstärken (Chujo, Shirasaki et al. 2005). Bei verschiedenen Fibrosen oder Fibrose-Modellen wurde eine erhöhte CTGF-Konzentration gefunden (Lasky, Ortiz et al. 1998; Paradis, Dargere et al. 1999). Bei Typ-1 Diabetikern führen hohe Glukose-Spiegel zur Mesangiumzellproliferation und ECM-Produktion. Diese Effekte können durch exogene Gabe von CTGF hervorgerufen werden (Riser, Denichilo et al. 2000; Abdel-Wahab, Weston et al. 2002). Außerdem führen hohe Glukosekonzentrationen, TGF- β , mechanischer Stress und CTGF selbst zur Aktivierung der CTGF-Expression in Mesangiumzellen (Murphy, Godson et al. 1999; Riser, Denichilo et al. 2000). Gressner und Kollegen postulierten sogar, dass der CTGF-Spiegel im Blut mit der fibrotischen Aktivität von Leberfibroblasten korreliert (Gressner, Weiskirchen et al. 2007). Obwohl Anti-CTGF-Regime das Ausmaß von fibrotischen Erkrankungen linderten, gibt es in der Fibrotherapie noch keinen Arzneistoff mit diesem Wirkmechanismus (Mageto, Flaherty et al. 2004).

1.7 EGF und IGF-2

Weitere für die Wundheilung und Fibrose wichtige Wachstumsfaktoren sind der EGF und die Isoformen des IGF. Diese Wachstumsfaktoren interagieren mit membranständigen Rezeptoren aus der Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. EGF und IGF wirken stark mitogen, modulieren zelluläre Prozesse der Differenzierung, Apoptose und ECM-Synthese (Colige, Lambert et al. 1992; Stewart and Rotwein 1996; Baserga, Hongo et al. 1997; Hackel, Zwick et al. 1999; Hetzel, Bachem et al. 2005; Horio, Maki et al. 2005; Oliveira, van Bergen en Henegouwen et al. 2006).

Bindet der 6 kDA schwere Polypeptidwachstumsfaktor EGF an seinen Rezeptor, kommt es im ersten Schritt zur Dimerisierung von Rezeptormonomeren. Sukzessiv erfolgt eine Aktivierung der enzymatischen Aktivität der EGFR-Tyrosinkinase. Dabei werden zwei Tyrosinreste des Rezeptordimers autophosphoryliert. Anschließend binden verschiedene Botenstoffe daran, um eine Reihe von komplexen Signalkaskaden einzuleiten. Dabei können der Ras-Raf-MAPK-Weg, der STAT-Signalweg (Signal Transducers and Activators of Transcription) und auch der PI3K und Akt-Kinase aktiviert werden. Nach Aktivierung durch EGF wird der Ligand-Rezeptor-Komplex internalisiert und anschließend recycelt oder abgebaut. (Yarden and Sliwkowski 2001)

Der Wachstumsfaktor IGF-2 gehört dem IGF-System an. Die drei Liganden des Systems IGF-1, IGF-2 und Insulin binden agonistisch an den IGF Rezeptorsubtyp-I (IGFR-I), IGF Rezeptorsubtyp-II (IGFR-II) oder den Insulinrezeptor (IR). Die IGF transduzieren die meisten ihrer Effekte über den IGFR-I, wobei IGF-2 eine zehnfach geringere Affinität als IGF-1 besitzt. Dieser Tyrosinkinase-rezeptor hat eine heterotetramere Struktur, die aus zwei ligandenbindenden α -Untereinheiten und zwei transmembranären β -Untereinheiten besteht. Die Ligandenbindung an die α -Untereinheiten ruft eine Änderung der räumlichen Struktur hervor. Dabei kommt es zu verschiedenen Phosphorylierungen an den β -Untereinheiten, was konsekutiv zur Aktivierung der katalytischen Domäne führt. Nach der Phosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrats dient es als Andockstelle für verschiedene Botenstoffe (Kellerer, Lammers et al. 1999). Über diese Botenstoffe induziert der IGFR-I nachgeschaltete Signalkaskaden wie die MAPK- und PI3K/Akt-Kaskade, aber auch den

STAT-Signalweg (Fukunaga and Kawano 2003; Grimberg 2003). Der IGFR-II ist ein Monomer und ähnelt dem kationenunabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor sehr. Bis vor kurzem wurde ihm keine Bedeutung in der Signaltransduktion zugeschrieben. Eine aktuelle Publikation konnte nun eine Erk-Aktivierung über diesen Rezeptorsubtyp nachweisen (El-Shewy, Lee et al. 2007). Wichtige Modulatoren des IGF-Systems sind die IGFBP. Beispielsweise regulieren sie die Verfügbarkeit und können auch als Speicher der IGF dienen (Kostecka and Blahovec 1999).

Die durch EGF oder IGF aktivierten Signalkaskaden beeinflussen die Gentranskription, was direkt oder über eine Wechselwirkung mit anderen Signalwegen erfolgen kann.

1.8 Fragestellung und Zielsetzung

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass S1P hinsichtlich kritischer Parameter der Wundheilung sehr ähnliche Effekte wie TGF- β aufweist und das Smad3-Protein aktiviert. Der proliferative Effekt des S1P auf dermale Fibroblasten lässt ein fibrotisches Potential von S1P-Agonisten vermuten, das im vorliegenden Forschungsprojekt näher charakterisiert werden soll. So ist es das Ziel des vorliegenden Promotionsvorhabens, die fibrotischen Eigenschaften des natürlichen Lipidmediators S1P und des Sphingosin-Analogons FTY720 in Analogie zu TGF- β näher zu charakterisieren. Des Weiteren soll erstmals eine Aktivierung der Smad-Signalkaskade durch FTY720 untersucht werden. Als wichtiger Parameter der Fibrose dient die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, so dass sich der erste Teil dieser Arbeit mit der Myofibroblastendifferenzierung beschäftigt. Im Detail wurde die Beteiligung der Signalwege an zellulären Wirkungen der S1P-Agonisten überprüft. Der zweite Teil dieses Promotionsvorhabens widmet sich der Induktion des profibrotischen Wachstumsfaktors CTGF durch S1P. Die Arbeit gliedert sich deshalb in folgende Teilgebiete:

- Untersuchung der differenzierenden Effekte anhand der α -SMA-Expression nach S1P- oder FTY720-Applikation
- Charakterisierung an der Myofibroblastendifferenzierung beteiligten S1P-Rezeptorsubtypen
- Aktivierung der Smad-Kaskade durch FTY720
- Beteiligung von Smad3 im Differenzierungsprozess
- Induktion der CTGF-mRNA durch S1P
- Charakterisierung der an der CTGF-Bildung beteiligten S1P-Rezeptorsubtypen
- Beteiligung des Smad3 in der CTGF-Synthese
- Einfluss der Wachstumsfaktoren EGF oder IGF-2 auf die S1P-vermittelte Myofibroblastendifferenzierung und CTGF-mRNA-Induktion

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Analysenwaage AK 160	Mettler-Toledo, Giessen
Autoklav	Guwina-Hofmann, Berlin
Brutschrank Hera _{cell} 240	Heraeus, Hanau
Digitalkamera für Fluoreszenzmikroskop DXM1200	Nikon, Japan
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
ELISA-Reader	Merlin, Bornheim
Entwicklungskassette	Kodak, München
FLOUstar Optima (Microplatten-Spektrophotometer)	BMG Labtech, Offenburg
Fluoreszenzmikroskop BX 41	Olympus, Japan
Lamin-Air-Sterilarbeitsbank HS 12	Heraeus, Hanau
Lightcycler480	Roche, Mannheim
Magnetrührer IKA-COMBIMAG TM RCT	Janke& Kunkel; Staufen
Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm ² /0,1 mm)	Zeiss, Jena
pH-Meter	Knick, Nürnberg
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 40C	Carl-Zeiss, Jena
Pipetten Eppendorf Reference TM	Integra Biosciences, Fernwald
Pipettierhilfe Pipetboy acu TM	Integra Biosciences, Fernwald
Schüttelapparat Duomax1030	Heidolph, Schwabach

Schüttler IKA MTS-2 TM	Karow, Berlin
Spektralphotometer, Gene-Ray	Biometra, Göttingen
Tank-Blot	Biometra, Göttingen
Thermoblock TB 1	Biometra, Göttingen
Trockenschrank	Memmert GmbH, Schwabach
Ultraschallbad Sonorex TM RK 100	Bandelin, Berlin
Vortex REAX top	Heidolph, Kellheim
Wasser Deionisierungsanlage MilliQ	Millipore-Waters, Eschborn
X-Omat Film-Entwicklungsgerät	Kodak, München
Zentrifuge Eppendorf 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau

2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid/Bisacrylamid 40%, 29:1	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Agarose (Elektrophorese-Grad)	Life Technologies, Paisley
Agarosegelmarker	New England Biolabs, Frankfurt
Ammoniumpersulfat	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Amphotericin B	Biochrom, Berlin
Ampicillin	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Aprotinin	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Bradford Reagenz	Biometra, Göttingen
Deckgläschen, rund	Roth, Karlsruhe
D-erythro-Sphingosin-1-phosphat	Calbiochem, Bad Soden/Ts.

Dimethylsulfoxid, DMSO	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol, DTT	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
dNTP-Set (10 mM, pH7,0)	Abgene, Hamburg
Dulbecco's Modified Eagles's Medium, DMEM	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Einmalküvetten	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Epidermaler Wachstumsfaktor, EGF	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Eppendorf Reaktionsgefäße, Safe-Lock	Merck/Eurolab, Berlin
Ethanol (HPLC-rein)	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum, FKS	Biochrom, Berlin
Filme, Kodak X-OMAT, XAR-5	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Filmentwickler	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Filmfixierer	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
FITC-gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Gentamycinsulfat	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Glycin	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg
HRP-gekoppelter Anti-Mäuse-IgG-Antikörper	New England Biolabs, Frankfurt
HRP-gekoppelter Anti-Ziegen-IgG-Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg
Kaliumchlorid	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Leupeptin	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
L-Glutamin	Sigma/Aldrich, Darmstadt
LumiGlo Chemilumineszenz Reagenz	New England Biolabs, Frankfurt

Methanol	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Molekularbiologisch reines Wasser	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Monoklonaler α -SMA-Antikörper (IgG Maus)	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Monoklonaler Smad1,2,3-Antikörper (IgG Maus)	Santa Cruz, Heidelberg
Mowiol	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Multititer-Platten TPP (6-, 12-, 24-Loch)	Biochrom, Berlin
Natriumchlorid	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Natriumdodecylsulfat, SDS	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Natriumorthovanadat, Na_3VO_4	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
<i>N,N</i> -Dimethylsphingosin, DMS	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Oligodesoxynucleotide,	Tib Molbiol, Berlin
Penicillin	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Pertussistoxin, PTX	Calbiochem, Bad Soden/Ts.
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Polyklonaler PAI-1-Antikörper (Maus)	Santa Cruz, Heidelberg
Polyklonaler CTGF-Antikörper (Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg
Polyvinyliden-difluorid (PVDF)-Transfermembran	Millipore, Eschborn
Probenpuffer Agarosegelelektrophorese	New England Biolabs, Schwalbach
Proteingrößenmarker	New England Biolabs, Frankfurt
Qiashredder TM	Qiagen, Hilden
Ribonuklease-Inhibitor	Fermentas, St.Leon-Rot

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit™	Fermentas, St. Leon-Rot
RNeasy™ Mini Kit	Qiagen, Hilden
3xSDS-Probenpuffer	Santa Cruz, Heidelberg
Serumalbumin vom Rind, fettsäurefrei, BSA	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Spezifische Primer	Tib Molbiol, Berlin
Streptomycin	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
SYBR Green I Master-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylamin, TEMED	Biometra, Göttingen
Transformierender Wachstumsfaktor-β1, TGF-β1	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Tris Base	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Tris Hydrochlorid	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Vancomycin	Sigma/Aldrich, Schnelldorf
Zellkulturflaschen (25 cm ² und 75 cm ²)	Biochrom, Berlin
Zellkulturschalen TPP, 10 cm	Biochrom, Berlin
Zellschaber TPP	Biochrom, Berlin
Zentrifugenröhrchen TPP (15 und 50 ml)	Biochrom, Berlin

2.1.3 Nährmedien und Lösungen

2.1.3.1 Zellkulturmedien

Fibroblastenmedien für humane Zellen

Humanen Fibroblasten wurden in Fibroblastenwachstumsmedium kultiviert, für alle Versuche wurden die Zellen für 24 bis 48 h auf Fibroblastenbasalmedium umgestellt. Die genaue Zusammensetzung gibt Tab. 4 wieder.

Fibroblastenwachstumsmedium	Fibroblastenbasalmedium
7,5% FKS	0% FKS
2 mM L-Glutamin	2 mM L-Glutamin
100 Einheiten/ml Penicillin	100 Einheiten/ml Penicillin
0,1 mg/ml Streptomycin	0,1 mg/ml Streptomycin

Tab. 4 Zusätze zu DMEM Nutrition F 12 Ham zur Herstellung der humanen Zellmedien.

Fibroblastenmedien für murine Zellen

Die Anzucht aller muriner Fibroblasten erfolgte in murinen Fibroblastenwachstumsmedium. In allen Versuchen wurde das Fibroblastenbasalmedium verwendet. Die genaue Zusammensetzung gibt Tab. 5 wieder.

Fibroblastenwachstumsmedium	Fibroblastenbasalmedium
10% FKS	0% FKS
2 mM L-Glutamin	2 mM L-Glutamin
100 Einheiten/ml Penicillin	100 Einheiten/ml Penicillin
0,1 mg/ml Streptomycin	0,1 mg/ml Streptomycin

Tab. 5 Zusätze zu DMEM Nutrition F 12 Ham zur Herstellung der murinen Zellmedien.

2.1.3.2 Lösungen zur Zellkultivierung

Antibiotikallösung:

100 Einheiten/ml	Penicillin
0,1 mg/ml	Streptomycin
in	PBS

Einfriermedium:

10%	DMSO
10%	FKS
in	DMEM

Stopppmedium:

10%	FKS
in	DMEM

Phosphatpufferlösung (Phosphat Buffered Solution, PBS):

0,2 g/l	KCl
8,0 g/l	NaCl
0,2 g/l	KH ₂ PO ₄
1,44 g/l	Na ₂ HPO ₄
in	bidestilliertem Wasser

Transportmedium:

50 µg/ml	Gentamicinsulfat
50 µg/ml	Vancomycin
in	DMEM

Trypsin-EDTA-Lösung:

1,67 mg/ml	Trypsin
0,67 mg/ml	EDTA
in	PBS

2.1.3.3 Lösungen zur Zellyse

RIPA-Puffer

	50 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	1%	Nonidat P-40
	0,5%	Desoxycholinsäure
	0,1%	SDS
	1 mM	EDTA
supplementiert mit	1 mM	PMSF
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	5 mM	NaF
	1 µg/ml	Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin

2.1.3.4 Lösungen für die Elektrophorese und Western-Blot-Analyse

Blockpuffer:

5% Magermilchpulver in TBST

Transferpuffer:

14,4 mg/ml	Glycin
3,02 mg/ml	Tris HCl
in	bidestilliertem Wasser

Laufpuffer (pH 8,3):

14,4 mg/ml	Glycin
3,02 mg/ml	Tris HCl
1 mg/ml	SDS
in	bidestilliertem Wasser

Polyacrylamidgel (10%):

10 µl	TEMED
60 µl	Ammoniumpersulfat
3,0 ml	Acrylamid/Bisacrylamid 40%
2,4 ml	Trenngelpuffer
5,4 ml	bidestilliertem Wasser

Sammelgelpuffer (pH 6,8):

0,5 M	Tris HCl
48%	1 M-HCl
in	bidestilliertem Wasser

TBE-Puffer (pH 8):

445 mM	Tris
445 mM	Borsäure
10 mM	EDTA
in	bidestilliertem Wasser

TBST-Puffer:

2 mM	Tris HCl(pH 7,4)
15 mM	NaCl
0,05%	Tween 20
in	bidestilliertem Wasser

2.1.3.5 Lösungen für die Immunfluoreszenzuntersuchungen

Rinderserumalbuminlösung (Blocklösung):

1% BSA in PBS

Verwendetet primäre Anti- α -SMA-Antikörperlösung:

Anti- α -SMA-Antikörperlösung in Blocklösung (1:50 Verdünnung)

Verwendete sekundäre Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-gekoppelter
Anti-Maus-IgG-Antikörperlösung:

FITC-gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper in Blocklösung
(1:125 Verdünnung)

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zellen

2.2.1.1 Humane Fibroblasten

Humane dermale Fibroblasten wurden aus juveniler Vorhaut, die bei Zirkumzisionen in der kinderchirurgischen Ambulanz der Berliner Ärzte Dr. Jung, Dr. Knoblauch, Dr. Schildknecht sowie dem St. Joseph-Krankenhaus, Berlin Tempelhof, anfiel und dem Arbeitskreis nach Genehmigung der Ärztekammer Berlin zur Verfügung gestellt wurde, isoliert. Die Hautstücke wurden am gleichen oder Folgetag der Operation in Transportmedium gekühlt in das Institut gebracht, wo anschließend die Isolation der Zellen erfolgte. Der Zellverband des Gewebes wurde durch eine einstündige Inkubation mit Trypsin-EDTA-Lösung gelockert. Um die Ablösungsreaktion der Zellen zu beenden, wurde zur Haut Stoppmedium hinzu gegeben. Darauf wurde das Hautstück

noch zweimal in PBS geschwenkt, so dass eine Fibroblastensuspension erhalten wurde. Die gewonnenen Fibroblasten wurden bei 4°C über 5 min mit 1000 Umdrehungen abzentrifugiert, nachfolgend in Fibroblastenwachstumsmedium aufgenommen und bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Bei Erreichen eines Konfluenzgrads von etwa 50 bis 70% wurden die Zellen durch Trypsin-EDTA-Zugabe von den Zellkulturflaschen abgelöst und im Verhältnis 1:3 als sogenannte ersten Passage neu eingesät. Für alle Experimente wurden Fibroblasten von mindestens drei Spendern vereinigt und bis zur siebten Passage verwendet.

2.2.1.2 Murine Smad3-Knockout/Wildtyp-Fibroblasten

Die murinen Smad3-Knockout/Wildtyp-Fibroblasten wurden uns freundlicherweise vom National Cancer Institute, Bethesda, MD überlassen. Kultiviert wurden sie in murinen Fibroblastenwachstumsmedium. Waren die Zellen zu circa 50-70% konfluent gewachsen, wurden sie mit Trypsin-EDTA-Lösung von der Kulturflasche gelöst und im Verhältnis von 1:3 passagiert. Für Experimente wurden Zellen bis zur 30. Passage genutzt. Die murinen Fibroblasten wurden mittels Real-Time Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (Real-Time RT-PCR) typisiert (Initiale Denaturierung 1 Zyklus 5 min 95°C, 45 Zyklen mit 10 s bei 95°C, 7 s bei 55°C und 6 s bei 72°C, Schmelzkurvenanalyse). Folgende murinen Primer wurden verwendet:

- 5'-AGAGTGTTACAGGAAGC-3'
- 5'-AATTCATTGATGCAACTTGTCT-3'

2.2.1.3 Murine S1P₃-Knockout/Wildtyp-Fibroblasten

Murine Fibroblasten wurden aus der Rückenhaut entsprechenden Knockout- bzw. Wildtyp-Tiere isoliert. Die Haut wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. van der Giet zur Verfügung gestellt. Hergestellt wurden diese Knockout-Tiere von Dr. Jerold Chun (Ishii, Friedman et al. 2001). Am Tag der Entnahme wurden die Zellen isoliert. Bis dahin wurden die murinen Hautstücke in Transportmedium aufbewahrt. Im

Unterschied zur menschlichen Haut wurde die Mäusehaut direkt vor der Zellisolierung für 1 h in eine Antibiotikallösung eingelegt, um eine bakterielle Kontamination zu vermindern. Die eigentliche Isolierung der murinen Fibroblasten unterschied sich nicht wesentlich von der Isolierung humaner Fibroblasten. Die Hautstücke wurden 2 h mit Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert, anschließend mit Stoppmedium behandelt und in PBS geschwenkt, um eine Fibroblastensuspension zu erhalten. Die Suspension wurde bei 4°C über 5 min mit 1000 Umdrehungen zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet wurde in murinen Fibroblastenwachstumsmedium suspendiert und anschließend bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Ebenso wie die humanen Fibroblasten wurden die murinen Fibroblasten nach Erreichen eines Konfluenzgrades von 50 bis 70% mit einer Splitratio von 1:3 passagiert und bis zur siebten Passage für die Experimente genutzt. Die murinen Fibroblasten wurden mittels Real-Time RT-PCR typisiert (35 Zyklen 95°C für 30 s, 56°C für 1 min, 72°C für 1 min). Dafür wurden die folgenden Primersequenzen genutzt:

- 5'-CACAGCAAGCAGACCTCCAGA-3'
- 5'-TGGTGTGCGGCTGTCTAGTCAA-3'
- 5'-ATCGATACCGTCGATCGACCT-3'

2.2.2 Quantifizierung von Zellen

Die Zelldichte hat für das Wachstum, das Überleben und die Differenzierung der Zellen eine entscheidende Bedeutung. Um einen Effekt, der durch eine unterschiedliche Zellzahl bei der Einsaat auszuschließen, wurde die Menge an Zellen stets mit einem Hämozytometer bestimmt und eine gleiche Zellzahl ausgesät. Zur Anwendung kam eine Neugebauer Zählkammer verbessert nach Bürker.

2.2.3 Lagerung und Verdünnung von Testsubstanzen

TGF-β1 wurde mit einer Stammkonzentration von 1 µg/ml in steriler 4 mM Salzsäurelösung mit 1 mg/ml Rinderserumalbumin gelöst und in 12 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

S1P wurde mit einer Konzentration von 5×10^{-4} mol/l in Methanol gelöst und bei -80°C gelagert.

Das Sphingosinanalogen FTY720 wurde in Ethanol in einer Konzentration von 5×10^{-4} $\mu\text{mol/l}$ gelöst. Diese Stammlösung wurde bei -80°C gelagert.

Aufgrund seines schlechten Lösungsverhaltens wurde FTY720-P in Dimethylsulfoxid (DMSO) mit einer Konzentration von 1×10^{-3} mol/l gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Wurden die Auswirkungen einer FTY720-P-Stimulation untersucht, wurde den anderen Proben noch die entsprechende Menge an DMSO zugesetzt, um eventuelle vorhandene Effekte des DMSO auszugleichen.

Die Rekonstitution des EGF erfolgte mit einer 0,1%igen Rinderserumalbuminlösung in einer 10 mM Essigsäure zu einer Lösung mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$. Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Es wurde eine IGF-2-Lösung mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ in 10 mM Essigsäure mit 0,1% Rinderserumalbumin hergestellt. Aliquots dieser Stammlösung wurden bei -20°C gelagert.

Alle Testsubstanzen, mit Ausnahme des S1P, wurden kurz vor dem jeweiligen Versuch zu fertigen Gebrauchslösungen mit steriler 0,4%iger Rinderserumalbumin-PBS-Lösung verdünnt. Die entsprechende Menge der S1P-Stammlösung wurde vor der Stimulation abgenommen und das Lösungsmittel wurde unter Stickstoffbegasung abgedampft. Der erhaltene Feststoff wurde in steriler 0,4%iger Rinderserumalbumin-PBS-Lösung aufgenommen und mit Hilfe eines Ultraschallbades gelöst. Die so gewonnene Lösung wurde für die Stimulationsversuche genutzt.

2.2.4 Lagerung und Verdünnung von Inhibitoren

Die Stammlösung des PTX mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ wurde durch Auflösen der Festsubstanz in bidestilliertem Wasser hergestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C . 3 h vor einer Stimulation wurde das PTX den Zellen in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. PTX greift an die α -Untereinheit der Proteine $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha o}$ und $G_{\alpha t}$ an und verhindert so die Rezeptor-vermittelte Aktivierung dieser

G-Proteine. So konnte eine Abhängigkeit von PTX-sensitiven G-Proteinsubtypen bei den jeweiligen Signaltransduktionen untersucht werden.

Der Sphingosinkinaseinhibitor *N,N*-Dimethylsphingosin (DMS) wurde in Ethanol in einer Konzentration von 5×10^{-3} mol/l gelöst. Die Stammlösung wurde bei -80°C aufbewahrt. Das DMS wurde den Zellen zeitgleich mit den Stimulantien in einer Konzentration von 5×10^{-6} mol/l zugesetzt.

2.2.5 Detektion von spezifischen Proteinen

2.2.5.1 Zellyse

Nach der jeweiligen Behandlung der Zellen wurde das Medium abgenommen, zweimal mit 2 ml eiskalter PBS gewaschen und über 20 min bei 4°C unter Zusatz von 50 μl RIPA-Lysepuffer inkubiert. Nach dem Einwirken des Lysepuffers wurden die Zellen auf Eis abgekratzt und die gewonnene Suspension wurde bei 15.000 g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Aus dem Überstand erfolgte die Proteingehaltsbestimmung.

2.2.5.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt der einzelnen Probe wurde mit Hilfe einer modifizierten Methode nach Bradford gemessen (Bradford 1976). Der im Bradford Reagenz enthaltene Farbstoff Coomassie Brilliant B lagert sich an Proteine, dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Extinktionsmaximums von 465 nm (rotbraun) zu 595 nm (blau). Es wurde eine Standardgerade aus Mischungen verschiedene Volumina einer BSA-Lösung (50 μg /100 μl bidestilliertes Wasser) mit 5 μl RIPA-Lysepuffer, die mit diesem Wasser auf 100 μl aufgefüllt, und mit jeweils 1 ml Bradford Reagenz vermischt wurden, erstellt. Für die Bestimmung an Protein der Proben wurden 5 μl Zellysat mit 95 μl bidestilliertem Wasser und 1 ml Bradford Reagenz gemischt. Die anschließende Bestimmung erfolgte kolorimetrisch über die Extinktion bei 595 nm. Aus dem so

gewonnenen Extinktionswert wurde mittels der zuvor erstellten Standardgerade die Proteinkonzentration ermittelt.

2.2.5.3 SDS-Gelelektrophorese

Das Volumen, das 10 µg Protein (für die Detektion des α -SMA-Proteins), 20 µg Protein (für die Detektion des Smad3-, S1P₁-, S1P₂-, S1P₃-, S1P₄- und S1P₅-Proteins) bzw. 40 µg Protein (für Detektion des CTGF-Proteins) enthielt, wurde mit einem halb so großen Volumina an Laemmli-SDS-Probenpuffers gemischt und für 2,5 min auf 95°C erhitzt. Die so gewonnenen Proben wurden in die Geltaschen eines diskontinuierlichen Systems aus zwei unterschiedlichen Polyacrylatgelen aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 35 mA im oberen Gel, dem Sammelgel, und bei 55 mA im unteren Gel, dem Trenngel in einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer. Für die Detektion aller Proteine wurden 10%ige Polyacrylattrenngele verwendet.

2.2.5.4 Western-Blot-Analyse und Detektion

Die Gele aus der SDS-Gelelektrophorese wurden zurechtgeschnitten und für 15 min in der Blotpufferlösung inkubiert. In dieser Zeit wurde pro Gel eine Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran mit Methanol aktiviert und ebenfalls in der Blotpufferlösung mindestens 5 min equilibriert. Der Proteintransfer erfolgte in 1000 ml Blotpufferlösung in einer Tank-Blotkammer über Nacht bei 100 mA.

Zur Visualisierung des entsprechenden Proteins diente die indirekte Immundetektion. Hierzu wurden die unspezifischen Bindungen auf der PVDF-Membran mit einer 5%igen Magermilchlösung in TBST über 1 h bei 37°C abgesättigt. Danach folgte erst eine Inkubation mit der jeweiligen primären Antikörperlösung für 30 min (Anti- α -SMA-Antikörper) bzw. 2 h (andere Primärantikörper) und daraufhin eine einstündige Inkubation mit der sekundären Antikörperlösung. Der sekundäre Antikörper war mit der Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) gekoppelt. Im Anschluss wurden die Membranen in einer mit destilliertem Wasser frisch hergestellten

Verdünnung des LumiGlo™-Reagenz der Firma New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) inkubiert. In der Gegenwart von Wasserstoffperoxid und des Enzyms HRP bildete sich aus Luminol das entsprechende Dianion, welches zur Chemilumineszenz führte. In einer Expositionskassette färbte das emittierte Licht den Röntgenfilm an den Stellen schwarz, wo zuvor der sekundäre Antikörper gebunden hatte. Eine sich anschließende densitometrische Auswertung ermöglichte die Quantifizierung (Syngene GeneGenius (Cambridge, UK)).

2.2.6 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Für die hier verwendete indirekte Immunfluoreszenz-Methode wurden Fibroblasten auf Deckgläschen in Zwölf-Lochplatten ausgesät und entsprechend stimuliert. Nach drei Tagen erfolgte die Aufarbeitung. Die Zellen wurden mit eiskalter PBS gewaschen und nachfolgend mit Methanol bei 4°C permeabilisiert und auf dem Deckgläschen fixiert. Anschließend folgten weitere Waschstschritte mit PBS und die Inkubation mit einer 1%igen Rinderserumalbuminlösung in PBS für 30 min, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Danach wurde diese Lösung abgenommen und eine 1:50 Verdünnung des primären murinen monoklonalen Anti- α -SMA-Antikörpers für 30 min dazugegeben. Nach erneutem Waschen wurde eine 1:125 Verdünnung des sekundären FITC-gekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörpers unter Lichtausschluss für 30 min hinzu gegeben. Bevor die Zellen auf dem Deckgläschen mit Mowiol-Lösung benetzt und so auf einem Objektträger fixiert wurden, wurde zum letzten Mal gewaschen. Mowiol hydratisiert die Zellen und fixiert das Deckgläschen zugleich auf dem Objektträger. Die so behandelten Proben konnten im Fluoreszenzmikroskop BX 41 von Olympus (Hamburg, Deutschland) betrachtet werden. Festgehalten wurden die Ergebnisse mit der Digitalkamera für Fluoreszenzmikroskope DXM1200 von Nikon (Düsseldorf, Deutschland). Freundlicherweise wurde das Fluoreszenzmikroskop mit Digitalkamera von dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Melzig zur Verfügung gestellt. Die Dokumentation und Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder erfolgte mit dem Computerprogramm ACT-1 Window.

2.2.7 Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Die Konzentration an TGF- β im Überstand von Zellkulturen wurde mit dem kommerziell erhältlichen Enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) TGF- β Human, BiotrakTM ELISA System (RPN2774) der Firma Amersham Biociences, (Freiburg, Deutschland) nach Herstellerangaben bestimmt.

Zur Probengewinnung wurden $2,2 \times 10^5$ humane Fibroblasten pro Loch einer Sechs-Lochplatte eingesät. Nachdem die Zellen am Folgetag auf FKS-freies Basalmedium für 2 Tage umgestellt wurden, erfolgte der Zusatz der zu untersuchenden Substanzen für 24 h. Anschließend wurde das Medium der stimulierten Zellkultur abgenommen und zur Entfernung von Partikeln für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand jeder Probe wurde bis zur Bestimmung des TGF- β -Gehalts bei -20°C eingefroren. TGF- β wird von Zellen als latenter Komplex sezerniert; um seine pharmakologische Wirkung zu entfalten, aber auch um TGF- β messen zu können, musste TGF- β aus dem Komplex gelöst werden. *In vitro* ließ sich das über eine Azidifizierung der Proben erreichen. Anschließend wurden die Proben mit einer basischen Pufferlösung wieder neutralisiert. Es wurde stets die TGF- β -Konzentration vor und nach der Azidifizierung bestimmt.

Das TGF- β Human, BiotrakTM ELISA Kit enthielt bereits eine vorbereitete Mikrotiterplatte, die mit einem murinen Anti-TGF- β -Antikörpern beschichtet worden war. Der Test basierte auf der Komplexbildung von TGF- β mit den gebundenen murinen Anti-TGF- β -Antikörpern auf der Mikrotiterplatte; ein zweiter gelöster polyklonaler Anti-TGF- β -Antikörper, gekoppelt mit dem Enzym HRP, band an den Antikörper-Antigenkomplex und ermöglichte nach Zugabe des Substrats Tetramethylbenzidin die Bestimmung der jeweiligen Absorption bei 450 nm mittels Microplatten-Spektrophotometers FLUOstarTM Optima der Firma BMG Labtech (Offenburg, Deutschland). Parallel zu den Proben wurden TGF- β -Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen (von 15,6 bis 1000 pg/ml) vermessen, um durch Erstellung einer Kalibrationskurve und nachfolgende Interpolation die genaue TGF- β -Konzentration der jeweiligen Probe zu ermitteln. Nach Ablauf jeder

Inkubationsphase wurde die Mikrotiterplatte mehrmals sorgfältig gewaschen, um ungebundene Bestandteile zu entfernen.

2.2.8 Antisense-Technologie

Mit Hilfe des Einsatzes von komplementären Antisense-Oligodesoxynukleotiden (ASO) kam es durch die Inhibierung des Translationsprozesses zu einer verminderten Expression des spezifisch gehemmten Proteins. Die spezifische Sequenz der ASO wurde so konstruiert, dass der komplementäre Strang der Initiationsstelle des betreffenden Gens entsprach, was zur effektivsten Hemmung führte. Die hier verwandten Oligodesoxynukleotide wurden von der Firma Tib Molbiol (Berlin, Deutschland) synthetisiert. In Tab. 6 sind die entsprechenden Sequenzen wiedergegeben. Zu jedem spezifischen ASO wurde noch ein Scrambled-Oligodesoxynucleotid (ScrO) hergestellt. Dieses ScrO enthielt die gleichen Nukleotide in zufälliger Reihenfolge und schloss damit unspezifische Effekte verursacht durch Oligodesoxynukleotide aus.

Auf einer Sechs-Lochplatte wurden $1,2 \times 10^5$ humane Fibroblasten pro Loch ausgesät. Nach dem Anwachsen der Zellen über Nacht wurden 100 μl Reaktionsmischung, bestehend aus ASO bzw. ScrO (500 nm) und dem Transfektionsagens FugeneTM (doppelt so viel in μl an FugeneTM wie μg der verwendeten Oligodesoxynukleotide), ergänzt auf 100 μl mit Optimem-Medium, zu den Zellen für drei Tage gegeben. Danach wurden die Zellen auf das jeweilige Basalmedium umgestellt und entsprechend stimuliert. Als Kontrolle der Funktionalität der verwendeten ASO wurde die Western-Blot-Analyse eingesetzt.

Protein	ASO	ScrO
S1P ₁	GACGCTGGTGGGCCCCAT	ATGGGGCCCACCAGCGTC
S1P ₃	CGGGAGGGCAGTTGCCAT	ATGGCAACTGCCCTCCCG
S1P ₄	GAAGGCCAGCAGGATCATCAGCAC	ACCTAGCCAACCTCCATGAAGGC
S1P ₅	GCAACAACATAACGGGCCAGCAG	GCAACAACATAACGGGCCAGCAG
Smad3	GCAGGATGGACGACAT	GTGGACAGCTAGAGAC
SphK2	CAGGGGAAGAGGCAGGTCAGACA	TGCAAGCTCACCAACCCACATA

Tab. 6: Oligodesoxynukleotidsequenzen (von 5'- nach 3'-Ende).

2.2.9 Untersuchungen zur Genexpression

2.2.9.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Isolierung der RNA erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen RNeasy Mini KitTM nach Angaben des Herstellers Qiagen (Hilden, Deutschland). Das Prinzip der Aufreinigung basierte auf selektiven Bindungseigenschaften von Siliziumdioxid-basierenden Membranen in Kombination mit der Mikrospin-Technologie. Der Versuch lief unter Ribonuklease-freien Bedingungen ab, dazu wurden die Arbeitsflächen, Geräte und Hände in Handschuhen zuvor mit 70%igen Ethanol behandelt. Ribonukleasen oder RNAsen sind Nukleasen, die Ribonukleinsäure (RNA) in kleinere Moleküle zerlegen. Pro Isolierung wurden Fibroblasten gesplittet und gezählt (Neugebaur Zählkammer), so dass 1×10^6 Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml PCR-Röhrchen überführt werden konnten. Nach Zentrifugation über 3 min bei 1500 g und 4°C wurde der Überstand verworfen und die Zellen in Guanidinium-Thiocyanat-haltigen Extraktionspuffer (RLT-Puffer) suspendiert. Mit den im Qias shredderTM bereitgestellten Säulen wurden die Zellkulturproben aufgeschlossen, um einen maximalen Zugang zur RNA zu gewährleisten. Dem so gewonnenen Eluat wurde 70%iger Ethanol zugesetzt, um geeignete Bedingungen zur RNA-Bindung an die Säule der RNeasy Mini Spin Column zu schaffen. Zur Beseitigung von Protein- und

Salzkontaminationen wurde die Probe mehrmals gewaschen (RW1-Puffer und RPE-Puffer). Danach wurde die Gesamt-RNA mit molekularbiologisch reinem Wasser von der Säule gewaschen. Darauf wurde mit den Proben eine RNA-Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Als erstes wurde die Quarzküvette zuvor für mindestens 1 h in einer Mischung zu gleichen Anteilen aus Methanol und konzentrierter Salzsäure eingelegt, um RNase-Freiheit zu garantieren. Der Nullabgleich wurde zuvor mit 400 µl Tris-Puffer (pH 7) durchgeführt. Daraufhin wurde jede Probe 1:50 in Tris-Puffer verdünnt und in der Quarzküvette bei 260 nm und 280 nm vermessen. Folgende Formel wurde zur Berechnung verwandt:

$$[\text{RNA}] = A \times 40 \times F$$

[RNA]:	Konzentration der mRNA in µg/ml
A	: Absorption bei 260 nm
F	: Verdünnungsfaktor (hier: 0,02)

Zur Überprüfung der Reinheit der einzelnen Proben wurde der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm gebildet. Dieser durfte nicht kleiner als 1,6 sein. Die Proben wurden bis zum Transkribieren in cDNA bei -80°C gelagert.

2.2.9.2 Reverse Transkription

Eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transcriptase) katalysierte die Reaktion, bei der zu jeder RNA-Matrize ein komplementärer DNA-Strang gebildet wurde. Das Enzym wurde erstmals in Retroviren entdeckt. Inzwischen wurden Reverse Transkriptasen aus verschiedenen Organismen isoliert. In dieser Arbeit wurde die Moloney Murine Leukemia Reverse Transkriptase (M-MuLV RT, auch RevertAid™) verwendet, die über eine geringe RNase-Aktivität verfügt. Eine definierte Menge der isolierten Gesamt-RNA (0,1 bis 5 µg) wurde umgeschrieben. Dazu wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit™ von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Jede Lösung wurde gemischt und kurz zentrifugiert, um Flüssigkeitsreste zu sammeln. Der Versuch wurde gekühlt, weil RNAsen eine verminderte Aktivität bei niedrigen Temperaturen zeigen. Der RNA-Abbau wurde so

auf ein minimales Maß reduziert. Zusätzlich verringert eine Kühlung eine unkontrollierte cDNA-Synthese. Nach Angaben des Herstellers wurde die gewonnene RNA in ein Reaktionsröhrchen vorgelegt. Zu dieser Matrize wurde eine Oligo-dT-Primer-Lösung ($c = 0,5 \mu\text{g/ml}$) gegeben und mit molekularbiologisch reinem Wasser zu $12,0 \mu\text{l}$ aufgefüllt. Diese Mischung wurde für 5 min bei 70°C denaturiert. Der Oligo-dT-Primer bindet an die Poly(A)-Sequenz der eukaryontischen mRNA und dient als Startpunkt für die Reaktion (Rappolee et al. 1998). Im folgendem wurden der Reaktionspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2), der Ribonuclease-Inhibitor (RiboLockTM, 20 u/ μl) und ein dNTP (Desoxynukleosidtriphosphate)-Mix (Mischung aus je 10 mM Lösungen von dATP, dTTP, dGTP, dCTP) zugesetzt. Die Negativkontrollen enthielten anstatt der RNA das verwendete Wasser. Zu jedem Ansatz wurde M-MuLV RT (200 u/ μl) hinzupipettiert. Alle Proben wurden für 60 min bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Reaktionsansätze für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach dem Abkühlen konnten die Proben direkt vermessen oder bei -20°C für den späteren Gebrauch gelagert werden.

2.2.9.3 Real-Time Polymerasekettenreaktion

Die hier genutzte Real Time RT-PCR ist eine spezielle Form der PCR. Allgemein stellt die PCR eine *in vitro* Methode zur Vermehrung von DNA bekannter Nukleotidsequenz (Saiki et al. 1985) dar. Sie wurde ursprünglich als Endpunkt-Methode entwickelt. Als Startmoleküle dienen zwei Oligonukleotidprimer (auch Amplimer), die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden und die Zielsequenz flankieren. Unter den richtigen Reaktionsbedingungen und dem Zusatz einer dNTP-Mischung verlängert die DNA-Polymerase entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert so neue DNA-Sequenzen, die komplementär zur Ausgangs-DNA sind. Die PCR ist ein zyklisches Verfahren, dass sich aus den Phasen Denaturierung, Anealling und Elongation zusammensetzt.

In dieser Arbeit wurde mittels Real-Time RT-PCR die CTGF-Genaktivität untersucht. Die Real-Time RT-PCR funktioniert analog der oben beschriebenen Endpunkt-PCR. Im

Gegensatz zu dieser läuft sie in einem geschlossenen System ab und misst die Amplifikationsreaktion zu festgelegten Zeitpunkten im Zyklus. Der hier verwendete LightCycler480 von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) misst die Laser-induzierten Fluoreszenzsignale am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus und quantifiziert so die Menge des PCR-Produkts (Gibson et al. 1996; Giulietti et al. 2001). In den Experimenten dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green eingesetzt. Da er in die doppelsträngige DNA interkaliert, korreliert die Fluoreszenzzunahme mit der DNA-Menge. Die spezifischen Primerpaare für die Real-Time PCR wurden mittels Primer Design Software der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) entworfen. Für jedes Primerpaar wurde eine Standardkurve aufgenommen, um die Effizienz zu bestimmen. Der ideale Effizienz-Wert liegt bei 2. Der gemessene Wert geht in die Berechnung der Mengenbestimmung mit ein. Bei jedem Versuch wurde ein interner Standard zugesetzt. Dieser Kalibrator enthielt für alle Versuche eine bestimmte Menge an humaner bzw. muriner cDNA und machte verschiedene Experimente untereinander vergleichbar. Alle Proben wurden in einer Dreifachbestimmung untersucht. Zum Vermessen wurden die DNA-Proben in eine 96-Lochplatte einpipettiert und mit einer Lösung aus SYBR Green Mix (FastStart Taq DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, dNTP-Mix (dATP, dUTP, dGTP, dCTP), SYBR Green Fluoreszenzfarbstoff und $MgCl_2$) und spezifischen Primern (Endkonzentration $0,5 \mu M$) vorsichtig vermischt. Nachdem die Proben zentrifugiert waren, erfolgte die eigentliche Real-Time PCR nach folgendem Programm: initiale Denaturierung für 5 min bei $95^\circ C$, 45 Zyklen bestehend aus Denaturierung für 10 s bei $95^\circ C$, Annealing für 7 s bei $55^\circ C$ und Elongation für 6 s bei $72^\circ C$. Anschließend wurde eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt, um die Bildung von unspezifischen Primerdimeren ausschließen zu können. Die Ergebnisse wurden auf das Referenzgen Cyclophilin A normalisiert und auf den Kalibrator standardisiert. Die Tab. 7 gibt die Sequenzfolge der verwendeten Primerpaare wieder.

Gen	Forward-Primer	Reverse-Primer
CTGF	CACTGGTTTGAAGAATGTAAAGAC	GGCATATTACTCGTATAAGATGCTA
hCycA	TTTGCTTAATTCTACACAGTACTTAGAT	CTACCCTCAGGTGGTCTT
Fisp	AGTGGAGTTCAAATGCC	GGCATGGATGTGGTACG
mCycA	GGCATGGATGTGGTACG	TGCTTAGAGGGATGAGGTC

Tab. 7: Primersequenzen (von 5'- nach 3'-Ende) für die Real-Time RT-PCR. Fisp ist das murine CTGF. Synthetisiert wurden sie von der Firma Tib Molbiol (Berlin, Deutschland). hCycA: humanes Cyclophilin A, mCycA: murines Cyclophilin A

2.2.10 Statistik

Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD). Die gewonnenen Ergebnisse wurden in mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten verifiziert. Für die Prüfung auf Signifikanz diente der Students-t-Test. Die Anzahl der Sternchen gibt das Signifikanzniveau der Irrtumswahrscheinlichkeit wieder (* $p \leq 0,05$ bzw. ** $p \leq 0,01$ Signifikanzniveau). Die Normalverteilung der Stichprobenmenge ist eine notwendige Bedingung für den Students-t-Test. Daher wurde als erstes überprüft, ob die gewonnenen Daten normalverteilt vorliegen. Für diese Untersuchung wurde der Shapiro-Wilk-Test herangezogen. Eine weitere Bedingung zur Durchführung des Students-t-Tests ist die Varianzhomogenität der Daten. Mittels F-Test wurde auf Varianzhomogenität geprüft. Konnte die Homogenität der Varianzen nachgewiesen werden, wurde die Signifikanz mit dem Students-t-Test geprüft. Lag keine Varianzhomogenität vor, wurde die Signifikanz mittels Welch-Test überprüft, für den keine Varianzhomogenität vorliegen muss.

3 Ergebnisse

3.1 Bildung des α -SMA durch S1P-Agonisten in humanen Fibroblasten

3.1.1 FTY720 induziert die Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten

Die Expression von α -SMA ist der bekannteste Marker zur Identifizierung von Myofibroblasten (Darby, Skalli et al. 1990). Myofibroblasten stellen einen Zelltyp dar, der sowohl Eigenschaften von Fibroblasten als auch von Glattmuskelzellen in sich vereint und unter anderem Bedeutung in der Wundheilung, aber auch bei der Entstehung von Fibrosen hat. Das bedeutendste Zytokin in der Entstehung einer Fibrose ist TGF- β (Border, Okuda et al. 1990; Qi, Atsuchi et al. 1999; Denton, Merkel et al. 2007). Dieser Wachstumsfaktor führt zur Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und somit zur Expression von α -SMA (Desmouliere, Geinoz et al. 1993). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass zwischen den TGF- β - und S1P-Rezeptoren eine Interaktion in Form eines so genannten Crosstalks besteht und dass S1P in der Lage ist, biologische Effekte des TGF- β in verschiedenen Zelltypen zu imitieren (Sauer, Vogler et al. 2004; Radeke, von Wenckstern et al. 2005). Das Sphingosin-Analogon FTY720 wird *in vitro* und *in vivo* zu seinem aktiven Metaboliten FTY720-P umgewandelt (Brinkmann, Davis et al. 2002; Mandala, Hajdu et al. 2002). FTY720-P ist mit dem endogenen Lipidmediator S1P strukturell eng verwandt und kann seine Wirkungen über das S1P-System vermitteln. Darüber hinaus veröffentlichten Urata und Kollegen, dass S1P in der Lage ist, die Expression des α -SMA in humanen Fibroblastenzelllinie WI-38 zu erhöhen (Urata, Nishimura et al. 2005). Aufgrund dieser Gegebenheiten wurde untersucht, ob auch FTY720 die Expression von α -SMA in humanen Fibroblasten beeinflussen kann. Dazu wurden humane Fibroblasten auf Deckgläschen in Sechs-Lochplatten angezüchtet, für zwei Tage mit Basalmedium inkubiert und anschließend mit TGF- β , FTY720 oder Vehikel über 72 h stimuliert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung mit Methanol wurde mittels indirekter Fluoreszenztechnik das α -SMA des Zytoskeletts sichtbar gemacht. Mikroskopische

Aufnahmen dieser Zellen zeigten, dass sowohl der Immunmodulator FTY720 als auch der bekannte Induktor TGF- β zu einer erhöhten Expression von α -SMA und somit zur Myofibroblastendifferenzierung führten. Mit FTY720 behandelte Fibroblasten bildeten zahlreiche Bündel bestehend aus Aktinmikrofilamenten aus, die in ihrer Struktur vergleichbar mit TGF- β -stimulierten Zellen waren. Allerdings unterschied sich die Morphologie beider Gruppen dahingehend, dass FTY720 zu einem etwas länger gestreckten Phänotyp führte (Abb. 6). Wie in der Literatur bereits beschrieben (Desmouliere et al. 1993), wurde die Konzentrationsabhängigkeit der differenzierenden Wirkung des TGF- β auf Fibroblasten unter Einsatz der Western Blot Technik sichtbar gemacht. Erste Effekte traten bei einer Konzentration von 0,02 ng/ml TGF- β in humanen dermalen Fibroblasten auf. Die maximale Wirkung wurde bei 2,0 ng/ml beobachtet (Abb. 7 A).

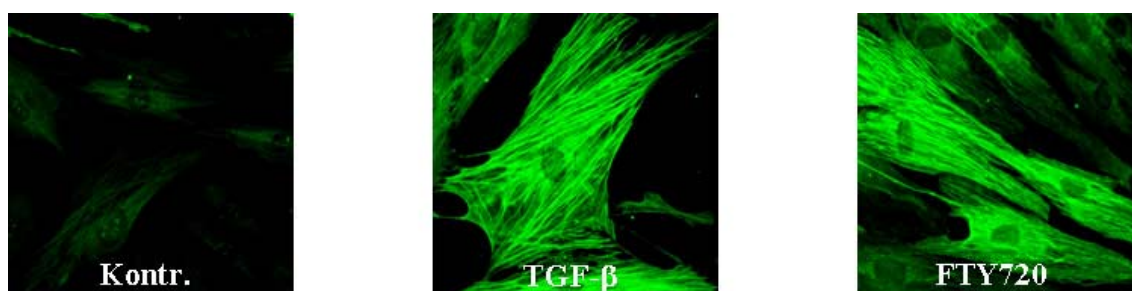


Abb. 6: TGF- β und FTY720 erhöhen die α -SMA-Expression.

Indirekte Fluoreszenzfärbung zur Detektion von α -SMA nach Stimulation mit 2,0 ng/ml TGF- β bzw. 1,0 μ M FTY720 über 72 h; 400fache Vergrößerung.

Weitere Versuche konnten eine erhöhte α -SMA-Expression nach FTY720-Stimulation bestätigen und zeigten eine Konzentrationsabhängigkeit dieses Effekts, wobei Konzentrationen ab 0,1 μ M FTY720 zu einem Anstieg des α -SMA-Gehalts führten und das Maximum bei 1,0 μ M FTY720 lag (Abb. 7 B). Höhere Konzentrationen führten zu keinem weiteren Anstieg der α -SMA-Expression aufgrund einer toxischen Wirkung von FTY720 auf humane Fibroblasten, die in unserem Arbeitskreis bereits zuvor gezeigt werden konnte.

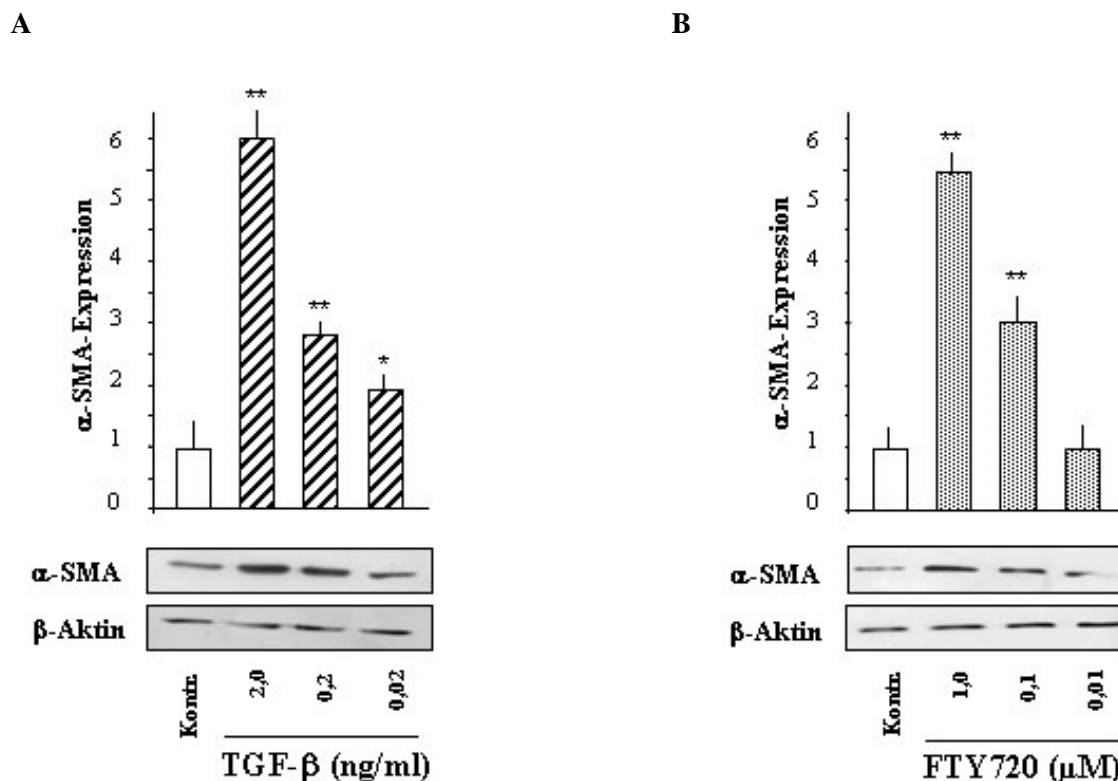


Abb. 7: Konzentrationsabhängigkeit der TGF- β - bzw. FTY720-vermittelten α -SMA-Proteinexpression.

Humane Fibroblasten wurden mit den angegebenen Konzentrationen an TGF- β oder FTY720 über 72 h stimuliert. Anschließend wurde mittels Western Blot aus dem Zelllysat die α -SMA-Expression analysiert und quantifiziert (bezogen auf die β -Aktin-Kontrolle).

Anschließend Experimente bestätigten die Abhängigkeit der Stimulationsdauer bei der durch TGF- β -verursachten Zunahme der α -SMA-Expression in Fibroblasten (Serini et al. 1998; Grotendorst et al. 2004). Nach 24 h ließ sich eine Zunahme des α -SMA-Proteins erstmals nachweisen, nach 72 h war das Maximum erreicht und nach 120 h nahm die α -SMA-Menge wieder deutlich ab (Abb. 8 A). Darüber hinaus war eine signifikante Zunahme der α -SMA-Expression nach 24stündiger Behandlung mit FTY720 messbar, wohingegen die maximale Antwort auf den Immunmodulator erst nach 72 h sichtbar wurde und nach 120 h die α -SMA-Expression wieder deutlich abfiel (Abb. 8 B).

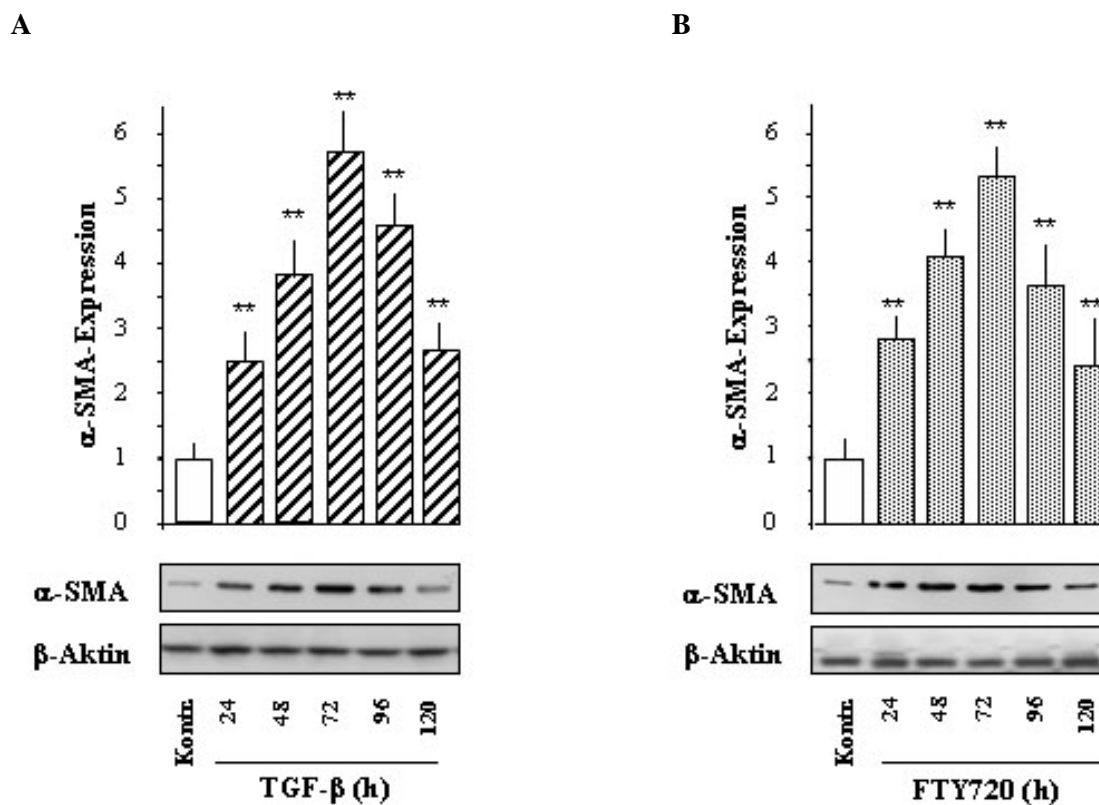


Abb. 8: Kinetik der TGF- β - bzw. FTY720-vermittelten α -SMA-Proteinexpression.

Die Zellen wurden mit 2,0 ng/ml TGF- β oder 1 μ M FTY720 über die angegebenen Zeiträume inkubiert. Anschließend wurde mittels Western Blot aus dem Zellysate die α -SMA-Expression analysiert und quantifiziert (bezogen auf die β -Aktin-Kontrolle).

3.1.2 Die Aktivierung zu FTY720-P ist essentiell für den Differenzierungsprozess

Obwohl FTY720 die Myofibroblastendifferenzierung herbeiführte, weisen mehrere Studien darauf hin, dass eine Phosphorylierung der primären Alkoholfunktion zum Phosphat für die Entfaltung seiner biologischen Wirkungen notwendig ist (Brinkmann, Davis et al. 2002; Mandala, Hajdu et al. 2002), auch ist die Bildung des aktiven Metaboliten FTY720-P unter anderem in Zellkulturen nachgewiesen worden (Paugh, Payne et al. 2003). Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob FTY720-P ebenfalls in der Lage ist, den Differenzierungsprozess in humanen Fibroblasten zu induzieren. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde der myofibroblastische

Differenzierungsmarker nach einer Stimulation mit dem aktiven Metaboliten FTY720-P über 72 h in Analogie zu der FTY720- bzw. TGF- β -vermittelten α -SMA-Bildung detektiert (Abb. 9). Da FTY720-P strukturell dem natürlichen Lipidmediator S1P stark ähnelt und viele seiner Wirkungen über das S1P-Rezeptorsystem vermittelt werden (Forrest, Sun et al. 2004; Chiba 2005; Chiba, Hoshino et al. 2005), wurde im nächsten Schritt überprüft, ob auch S1P die α -SMA-Synthese in primären dermalen Fibroblasten beeinflussen kann. In der Tat führte die S1P-Stimulation zu einer Zunahme des α -SMA-Proteins (Abb. 9). Hiermit bestätigten sich die Ergebnisse von Urata und Kollegen, die in der fetalen Fibroblastenzelllinie WI-38 die α -SMA-Induktion durch S1P nachgewiesen hatten (Urata, Nishimura et al. 2005).

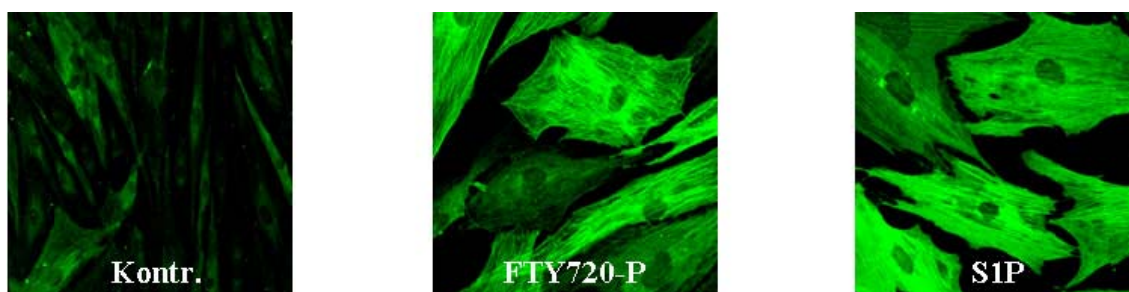


Abb. 9: FTY720-P und S1P erhöhen die α -SMA-Expression.

Indirekte Fluoreszenzfärbung zur Detektion von α -SMA nach Stimulation mit 1,0 μ M FTY720-P bzw. 10,0 μ M S1P über 72 h; 400fache Vergrößerung.

Nachdem in dieser Arbeit der Nachweis erbracht wurde, dass sowohl FTY720-P als auch S1P die Fähigkeit zur Myofibroblastendifferenzierung besitzen, sollten weitere Experimente die genaueren Modalitäten dieser Wirkung klären. Als erstes wurden verschiedene Konzentrationen der Substanzen getestet. So führten Konzentrationen von 0,01 bis 1,0 μ M FTY720-P und 1,0 bis 10 μ M S1P zu einer Zunahme der α -SMA-Synthese, wobei die Neubildung des Myofibroblastenmarkers bei einer Konzentration von 1,0 μ M FTY720-P bzw. von 10,0 μ M S1P am stärksten war (Abb. 10 A und B).

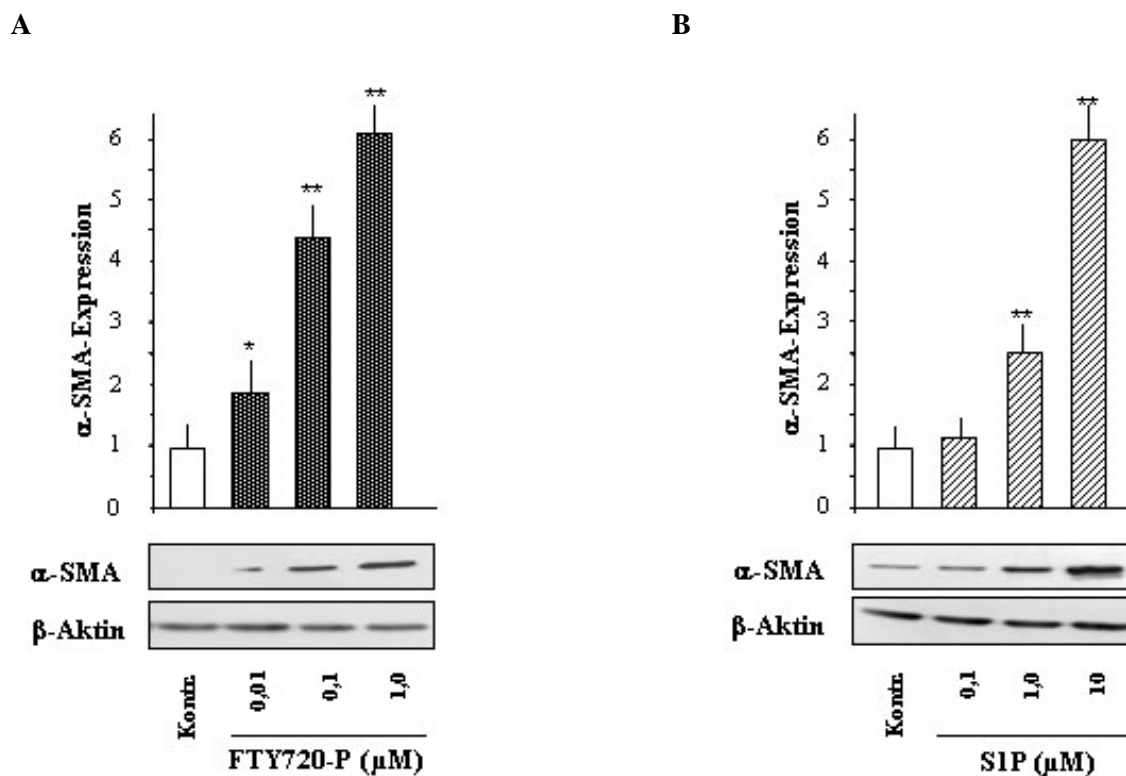


Abb. 10: Konzentrationsabhängigkeit der FTY720-P- bzw. S1P-vermittelten $\alpha\text{-SMA}$ -Proteinexpression.

Humane Fibroblasten wurden mit den angegebenen Konzentrationen an FTY720-P oder S1P über 72 h stimuliert. Anschließend wurde mittels Western Blot aus dem Zelllysate die $\alpha\text{-SMA}$ -Expression analysiert und quantifiziert (bezogen auf die $\beta\text{-Aktin}$ -Kontrolle).

Neben der Konzentrationsabhängigkeit sollte im Folgenden der zeitliche Verlauf der Konzentrationszunahme der Aktin-Isoform durch die Phosphate näher untersucht werden. Interessanterweise zeigten Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der $\alpha\text{-SMA}$ -Induktion, dass der maximale Effekt des aktiven Metaboliten erst nach 72 bis 96 h erreicht wurde, was eine rasante Phosphorylierung des FTY720 vermuten lässt (Abb. 11 A). Durch das natürliche Lysophospholipid S1P kam es zu einer maximalen Steigerung der Proteinexpression nach einer Stimulationsdauer von 72 h (Abb. 11 B).

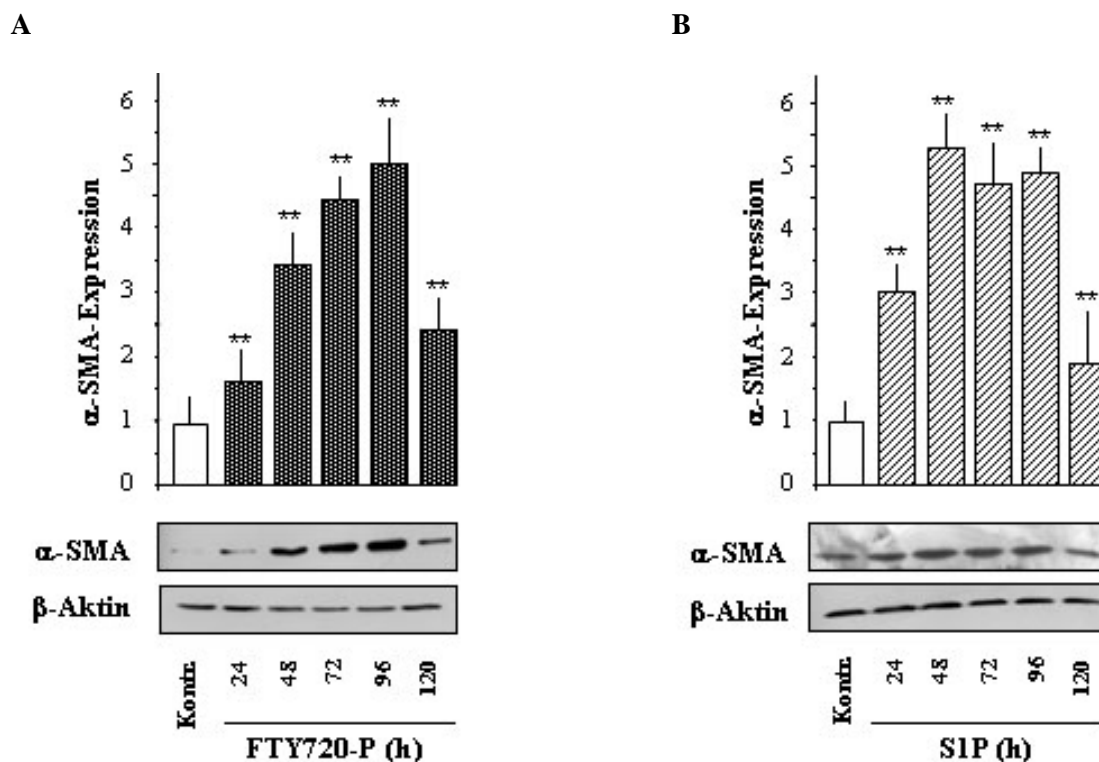


Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der FTY720-P- bzw. S1P-induzierten α -SMA-Bildung.

Humane Fibroblasten wurden mit 1,0 μ M FTY720-P oder 10,0 μ M S1P über die angegebenen Zeiträume inkubiert. Anschließend wurde mittels Western Blot Analyse aus dem Zelllysat die α -SMA-Expression quantifiziert (bezogen auf die β -Aktin-Kontrolle).

In Anbetracht des ähnlichen Effekts von FTY720 und seinem aktiven Metaboliten FTY720-P hinsichtlich der Myofibroblastendifferenzierung und der Möglichkeit, dass FTY720 seine Effekte direkt oder nach Aktivierung zum Phosphat entfalten kann (Payne, Oskeritzian et al. 2007), wurde nachfolgend die Bedeutung der Phosphorylierung in der FTY720-vermittelten α -SMA-Bildung näher untersucht. Zu diesem Zweck wurden humane Fibroblasten in Gegenwart des SphK-Inhibitors DMS mit FTY720 inkubiert. DMS hemmt beide Subtypen der SphK und verhindert so die Umwandlung von FTY720 zu FTY720-P. Eine fluoreszenzmikroskopische Analyse des α -SMA-Proteins zeigte, dass DMS die differenzierende Wirkung des FTY720 nahezu vollständig aufhob, wohingegen die Fähigkeit des TGF- β zur Myofibroblastendifferenzierung durch die zusätzliche Applikation von DMS nicht beeinflusst wurde (Abb.12 und Abb. 13).

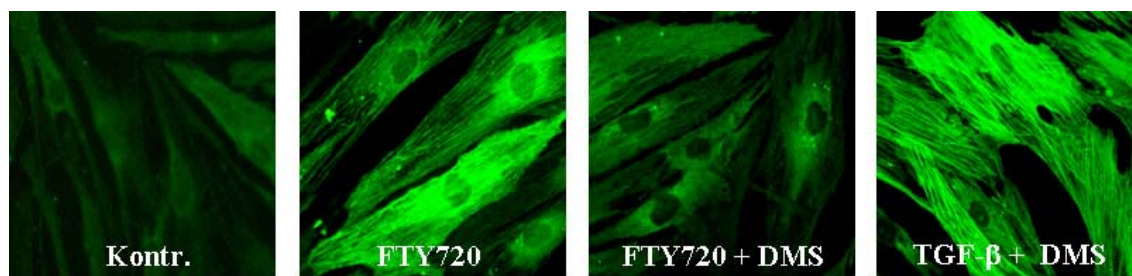


Abb. 12: Der phosphorylierte Metabolit FTY720-P ist für die α -SMA-Induktion des FTY720 verantwortlich.

Humane Fibroblasten wurden über 72 h mit 1,0 μ M FTY720 oder 2 ng/ml TGF- β und 5,0 μ M DMS co-inkubiert. Anschließend wurde eine indirekte Fluoreszenzfärbung zur Detektion von α -SMA durchgeführt; 400fache Vergrößerung.

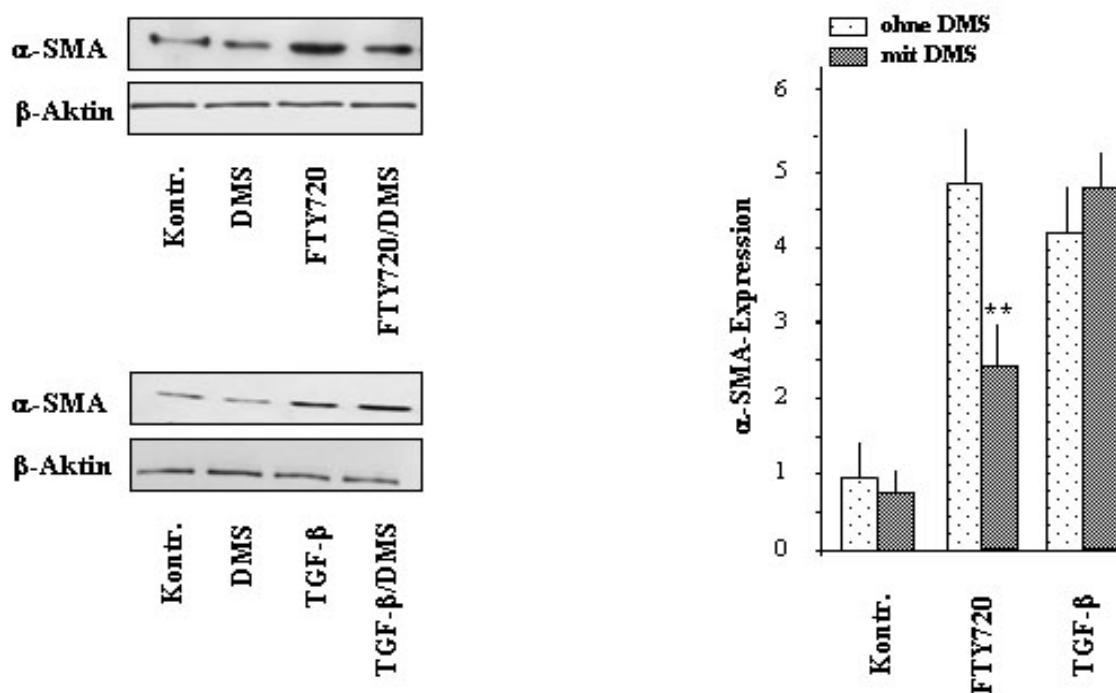


Abb. 13: Quantifizierung des Effekts durch den SphK-Inhibitor DMS.

Humane Fibroblasten wurden über 72 h mit 1,0 μ M FTY720 oder 2 ng/ml TGF- β und 5,0 μ M DMS co-inkubiert. Anschließend wurde eine Western Blot Analyse mit densitometrischer Quantifizierung (bezogen auf die β -Aktin-Kontrolle) aus dem Zelllysat durchgeführt.

Darüber hinaus ist bekannt, dass die SphK2 zu großen Teilen für die Phosphorylierung von FTY720 verantwortlich ist (Paugh, Payne et al. 2003; Zemann, Kinzel et al. 2006). Unter Zuhilfenahme der Antisense-Technologie wurde die Expression der SphK2 herabgeregelt und die so behandelten Zellen mit FTY720 stimuliert, um danach eine Beeinflussung auf die α -SMA-Expression zu untersuchen. Deutlich ist zu erkennen, dass FTY720 in Gegenwart von SphK2-ASO seine Fähigkeit zur α -SMA-Induktion verliert. Die TGF- β -induzierte α -SMA-Expression ließ sich durch den SphK2-ASO-Zusatz jedoch nicht beeinflussen (Abb. 14). Diese Ergebnisse weisen klar auf die essentielle Bedeutung des FTY720-P- in der FTY720-vermittelten Erhöhung der α -SMA-Expression hin und unterstreichen die Bedeutung des aktiven Metaboliten.

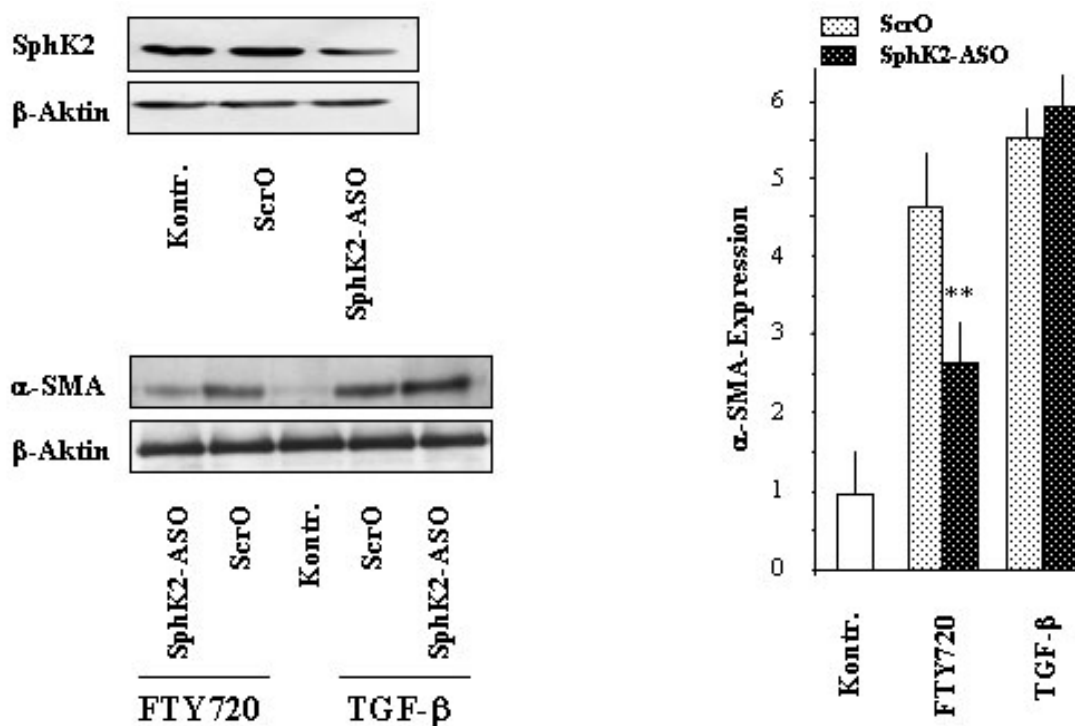


Abb. 14: Die Zellen wurden mit 500 nM/l SphK2-ASO oder ScrO für 72 h transfiziert.

Eine Western Blot Analyse bestätigte die Effektivität der Transfektionsmethode. Im Nachhinein wurden die transfizierten Fibroblasten mit 1,0 μ M FTY720 oder 2,0 ng/ml TGF- β über 72 h stimuliert und eine Detektion der α -SMA-Expression mittels Western Blot mit anschließender densitometrischer Auswertung (bezogen auf die β -Aktin-Kontrolle) durchgeführt.

3.1.3 Signaltransduktion via $G_{\alpha i}$ -Protein gekoppelte Rezeptoren

Der aktive Metabolit des FTY720, das FTY720-P, greift als potenter Agonist an vier der fünf S1P-Rezeptorsubtypen an (Brinkmann, Davis et al. 2002; Mandala, Hajdu et al. 2002). Es wurden sämtliche mRNA-Transkripte aller fünf S1P-Rezeptorsubtypen in humanen primären Fibroblasten quantitativ mittels Real-Time RT-PCR nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Alle fünf S1P-Rezeptorsubtypen interagieren mit $G_{\alpha i}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren, S1P₁ sogar ausschließlich. Um die Beteiligung der Rezeptoren am Differenzierungsprozess zu untersuchen, wurde zunächst eine Stimulation in Gegenwart von PTX durchgeführt. Dazu wurden Fibroblasten in der Gegenwart von PTX mit FTY720, S1P oder TGF- β stimuliert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass eine PTX-Applikation den FTY720-Effekt hinsichtlich der α -SMA-Expression deutlich verminderte (Abb. 15). Die Inhibierung des Signaltransduktionswegs via $G_{\alpha i}$ -Protein gekoppelte Rezeptoren hatte jedoch keinen Einfluss auf den TGF- β -Effekt (Abb. 15). Eine weitere Western Blot Analyse bestätigte die aus der Fluoreszenzmikroskopie gewonnenen Ergebnisse (Abb. 16 A) und zeigte zusätzlich auf, dass auch die S1P-verursachte α -SMA-Neubildung PTX-sensitiv war (Abb. 16 B).



Abb. 15: Einfluss von PTX auf die Bildung von α -SMA.

Indirekte Fluoreszenzfärbung von α -SMA nach einer Stimulation mit 2 ng/ml TGF- β bzw. 1 μ M FTY720 mit oder ohne 3stündige Präinkubation mit 2 μ g/ml PTX; 200fache Vergrößerung.

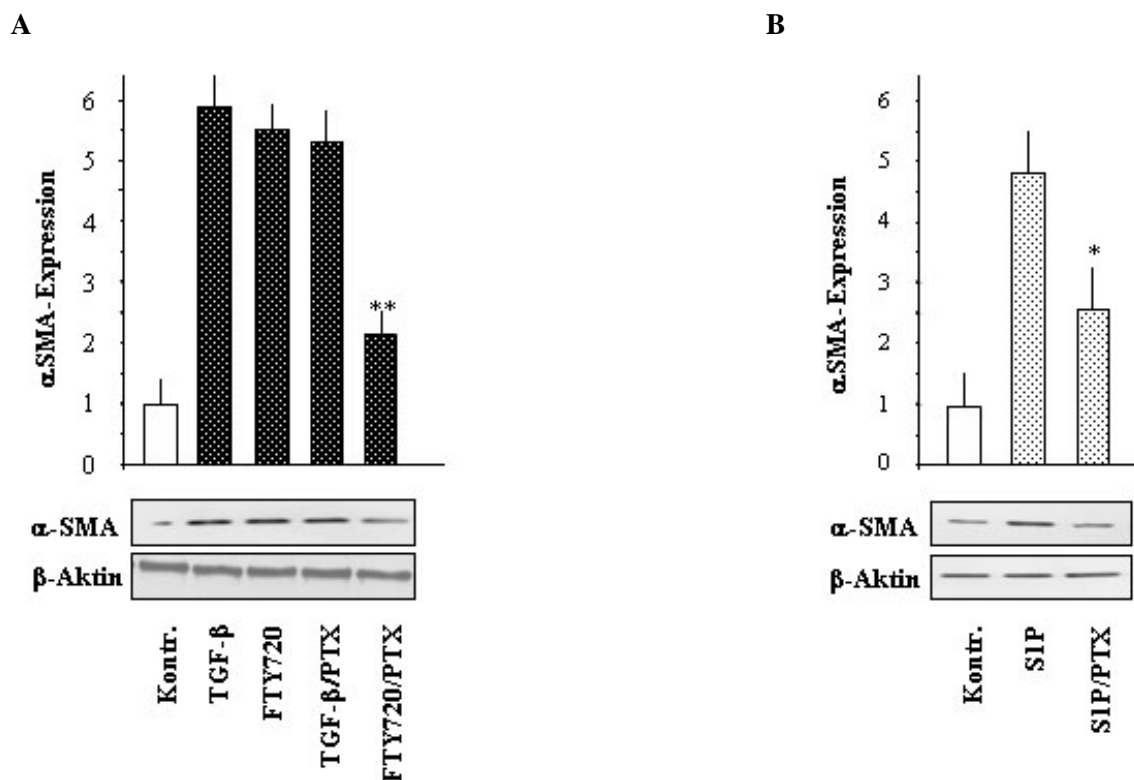


Abb. 16: Quantifizierung der Hemmung durch PTX auf die Bildung von α -SMA.

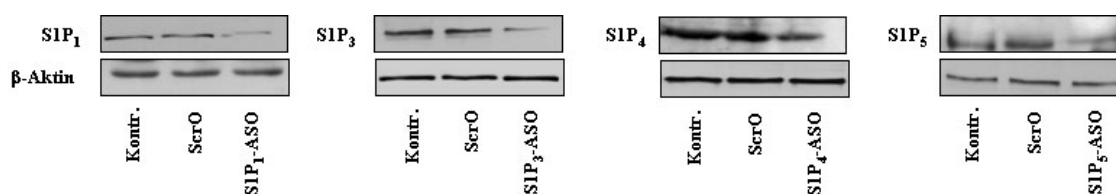
Humane Fibroblasten wurden mit 2 μ g/ml PTX für 3 h inkubiert und anschließend mit 2 ng/ml TGF- β oder 1 μ M FTY720 (A) bzw. 10 μ M S1P (B) für 72 h stimuliert. Darauf wurde eine Western Blot Analyse auf α -SMA durchgeführt und densitometrisch quantifiziert (bezogen auf β -Aktin-Kontrolle).

3.1.4 FTY720-P vermittelt seine differenzierende Wirkung über den S1P₃

Nachdem eine Beteiligung von G $_{\alpha i}$ -Proteinen in der Signaltransduktion durch die S1P-Rezeptoragonisten-verursachten Myofibroblastenbildung gezeigt werden konnte, sollte im Folgenden untersucht werden, welcher S1P-Rezeptorsubtyp daran beteiligt ist. Dazu wurde die Expression des S1P₁-, S1P₃-, S1P₄- und S1P₅-Rezeptorsubtyps für die FTY720-P-vermittelte α -SMA-Expression mittels spezifischer ASO gehemmt. Zunächst wurde die Effektivität der Antisense-Strategie mittels Western Blot Analyse nachgewiesen. Alle verwendeten spezifischen Rezeptorsubtyp-Antisense-Sequenzen führten zu einer verminderten Expression des jeweiligen Rezeptorsubtyps (Abb. 17 A).

Allerdings zeigte nur die Verminderung der S1P₃-Expression einen Einfluss auf die FTY720-vermittelte α -SMA-Neubildung (Abb. 17 B). Die Reduktion der Expressionsraten der S1P_{1/4/5}-Rezeptorsubtypen hingegen beeinflusste die FTY720-vermittelte Erhöhung des α -SMA-Proteins nicht.

A



B

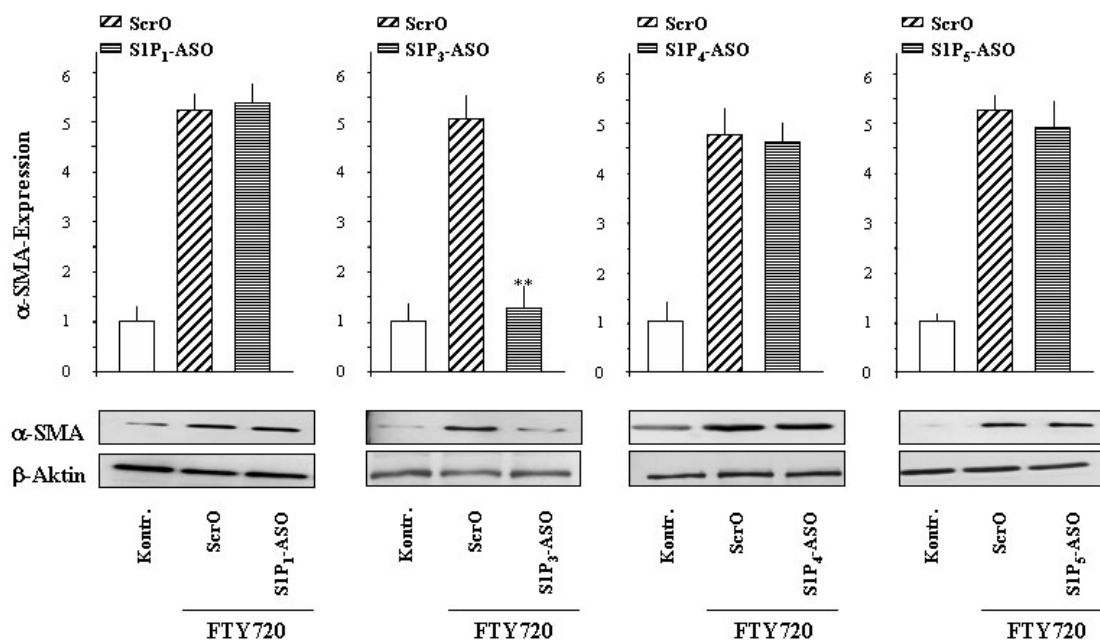


Abb. 17: Die Bedeutung der S1P-Rezeptorsubtypen in der Myofibroblastendifferenzierung.

Humane Fibroblasten wurden mit 500 nmol/l ScrO bzw. mit jeweils 500 nmol/l S1P₁-, S1P₃-, S1P₄- oder S1P₅-ASO für 72 h vorbehandelt. Als Nachweis der Wirksamkeit der Antisense-Strategie wurde nach der Behandlung der Zellen ein Western Blot mit S1P₁-, S1P₃-, S1P₄- bzw. S1P₅-Antikörpern durchgeführt (A). Danach wurden die Zellen mit 1 μ M FTY720 für 72 h stimuliert und eine Detektion der α -SMA-Expression mittels Western Blot Analyse mit sich anschließender densitometrischer Auswertung (bezogen auf die β -Aktin-Kontrolle) durchgeführt (B).

Zur Bestätigung der Beteiligung des S1P₃ wurden aus der Haut von S1P₃-Knockout-Mäusen und entsprechenden Wildtyp-Mäusen primäre Fibroblasten isoliert. Die Experimente mit diesen Zellen zeigten, dass die Knockout-Fibroblasten nach der Stimulation mit FTY720 nicht mehr in der Lage waren, α -SMA vermehrt zu bilden und bestätigten so die aus der Antisense-Technologie gewonnenen Ergebnisse (Abb. 18). Der Wachstumsfaktor TGF- β führte sowohl in den S1P₃-Wildtyp- als auch in den S1P₃-Knockout-Fibroblasten zu einer vermehrten Bildung von α -SMA und zeigte so, wie erwartet, keine Abhängigkeit vom S1P₃-Rezeptorsubtyp (Abb. 18).

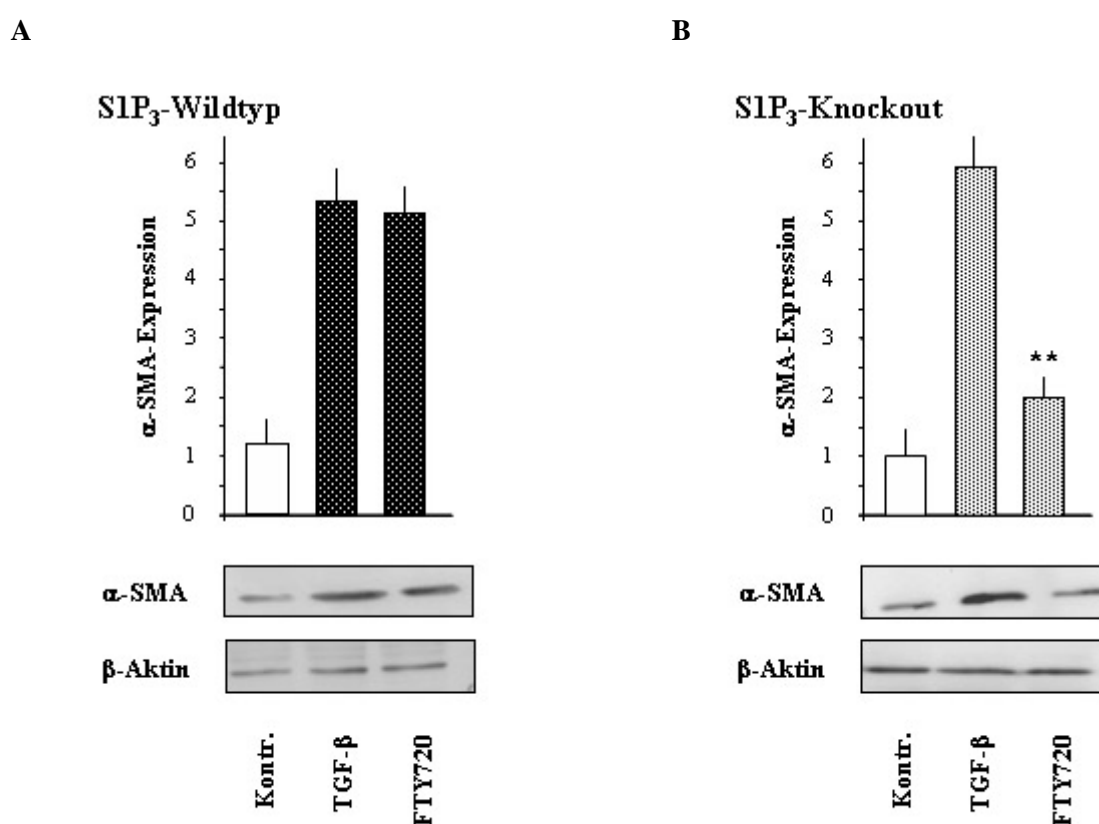


Abb. 18: Untersuchung der Myofibroblastendifferenzierung an murinen S1P₃-Wildtyp- und S1P₃-Knockout-Fibroblasten.

Nach einer Stimulation mit FTY720 (1 μ M)- oder TGF- β (2ng/ml) über 48 h wurde die α -SMA-Bildung in dermalen Fibroblasten, isoliert aus S1P₃-Wildtyp-Mäusen (A), und in dermalen Fibroblasten, gewonnen aus S1P₃-Knockout-Mäusen (B), untersucht. Die Detektion der α -SMA-Expression erfolgte mittels Western Blot mit sich anschließender densitometrischer Auswertung (bezogen auf die β -Aktin-Kontrolle).

3.1.5 Bedeutung von Smad3 in der α -SMA-Expression

TGF- β -Signale werden durch transmembranäre Rezeptoren mit Serin/Threonin-Kinaseaktivität durch Aktivierung von Smad-Proteinen übermittelt. In Bezug auf die Erhöhung der α -SMA-Expression scheint vor allem die Aktivierung des Smad3-Proteins von Bedeutung zu sein (Roberts, Russo et al. 2003). In der dendritischen Zelllinie XS52, sowie in primären humanen Keratinozyten und Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass auch S1P zur Smad3-Aktivierung führt (Sauer 2003; Sauer, Vogler et al. 2004; Radeke, von Wenckstern et al. 2005). FTY720 führte in Mesangiumzellen ebenfalls zur Phosphorylierung von Smad1, 2 und 3 und transduzierte seinen Effekt über den Smad-Signalweg (Xin, Ren et al. 2006). So wurde im Folgenden die Bedeutung des Smad3-Proteins als Botenstoff hinsichtlich der FTY720- bzw. S1P-induzierten α -SMA-Erhöhung untersucht. Da für den Lipidmediator S1P eine Smad3-Aktivierung bereits in unserem Arbeitskreis nachgewiesen wurde (Sauer 2003), wurde im Folgenden die Fähigkeit des FTY720 hinsichtlich einer Aktivierung der Smad-Kaskade untersucht. Dazu wurden Fibroblasten mit FTY720 oder TGF- β stimuliert und mit anti-Smad1,2,3-Antikörpern immunpräzipitiert und anschließend mit anti-Smad4-Antikörpern im Western Blot Verfahren detektiert. Abb. 19 A belegt eine Smad-Oligomer-Bildung und deutet somit auf eine Signaltransduktion via Smads als Antwort auf eine FTY720-Stimulation hin. Um die Bedeutung des Smad3-Proteins in der FTY720- bzw. S1P-induzierten α -SMA-Expression weiter zu untermauern, wurde die Smad3-Expression mittels Antisense-Technologie in humane dermale Fibroblasten drastisch vermindert (Abb. 19 B). Nachfolgend wurden diese Zellen mit FTY720, S1P oder TGF- β als Positivkontrolle stimuliert und deren Gehalt an α -SMA mittels Western Blot Verfahren gemessen. Die mit Smad3-ASO behandelten Fibroblasten waren in ihrer Fähigkeit zur Myofibroblastendifferenzierung nach FTY720- oder S1P-Stimulation stark eingeschränkt (Abb. 19 C und D). Mit ScrO behandelte Fibroblasten zeigten weiterhin die Fähigkeit, nach entsprechender Stimulation vermehrt α -SMA zu exprimieren. Wie erwartet, verminderte sich ebenfalls die α -SMA-Expression nach TGF- β -Stimulation der mit Smad3-ASO behandelten Fibroblasten (Abb. 19 E).

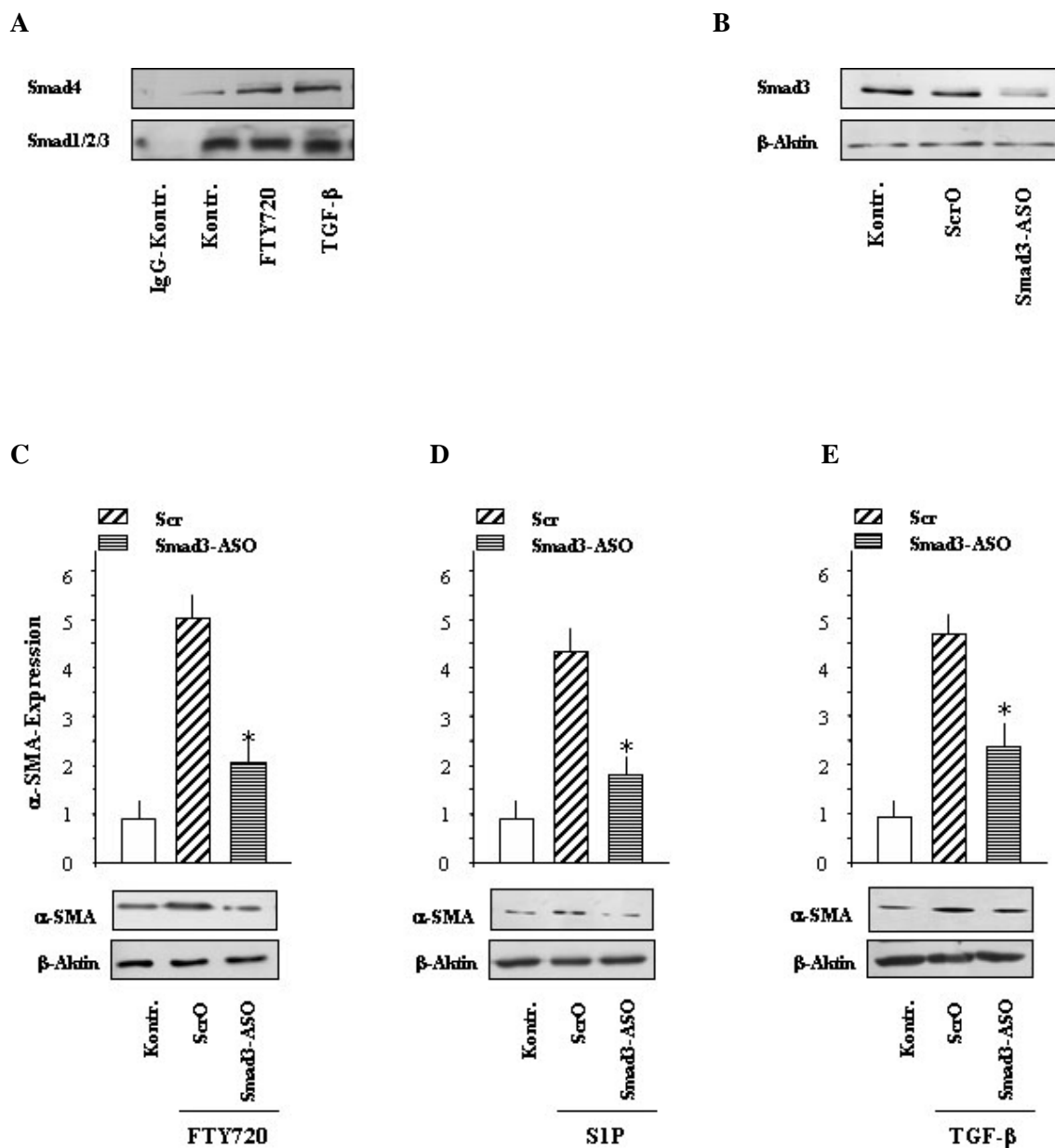


Abb. 19: Bedeutung des Smad-Signalwegs in der FTY720-vermittelten α -SMA-Expression.

Humane Fibroblasten wurden mit Kontroll-Vehikel, 1 μ M FTY720 oder 2 ng/ml TGF- β für 30 min stimuliert. Anschließend wurde aus den Zelllysaten eine Immunopräzipitation mit Smad1,2,3-Antikörpern oder einem unspezifischen Ziegen-IgG durchgeführt, gefolgt von einer Western Blot Analyse auf Smad4 (oben) und Smad1,2,3 (unten) (A). Die Zellen wurden mit 500 nmol/L ScrO bzw. mit 500 nmol/L Smad3-ASO für 72 h vorbehandelt. Als Nachweis der Wirksamkeit der Antisense-Strategie wurde nach der Behandlung der Zellen ein Western Blot mit Smad1,2,3-Antikörpern durchgeführt (B). Testung der mit Smad3-Antisense transfizierten Zellen auf α -SMA-Expression mittels Western Blot Analytik nach FTY720- (1 μ M) (C), SIP- (10 μ M) (D) oder TGF- β -Zugabe (2 ng/ml) (E).

Die Testung in murinen Smad3-Knockout-Fibroblasten und im entsprechenden Wildtyp bestätigte die aus der Antisense-Technologie gewonnenen Ergebnisse. Abb. 20 zeigt deutlich, dass die Smad3-Knockout-Zellen im Gegensatz zu den entsprechenden Wildtyp-Zellen nach Stimulation mit S1P, FTY720, bzw. TGF- β zu keiner Steigerung der α -SMA-Expression mehr befähigt waren.

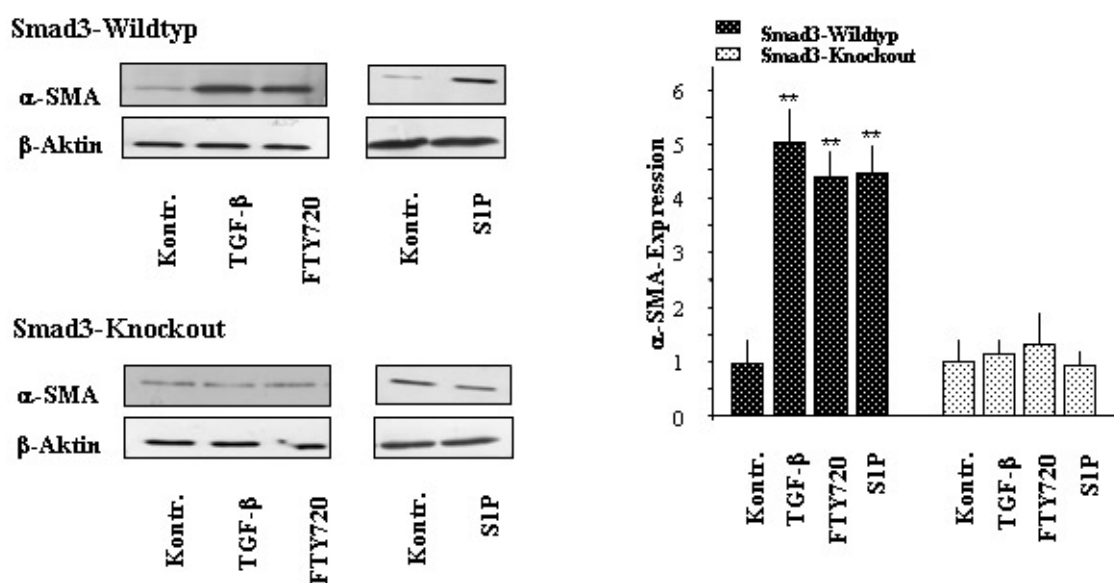


Abb. 20: Untersuchung der Myofibroblastendifferenzierung an murinen Smad3-Wildtyp- und Smad3-Knockout-Fibroblasten.

Nach einer Stimulation mit FTY720 (1 μ M), TGF- β (2ng/ml) oder S1P (10 μ M) über 48 h wurde die α -SMA-Bildung untersucht. Die Detektion der α -SMA-Expression erfolgte mittels Western Blot mit sich anschließender densitometrischer Auswertung (bezogen auf die β -Aktin-Kontrolle).

Da sich sowohl die Kinetik, als auch die Signaltransduktionswege der drei Induktoren hinsichtlich der α -SMA-Expression in humanen dermalen Fibroblasten auffallend glichen, schloss sich die Frage nach einer Beteiligung des TGF- β in der FTY720 bzw. S1P-verursachten Erhöhung der α -SMA-Bildung an. Deshalb sollte im Folgenden untersucht werden, ob FTY720 oder S1P zu einer Freisetzung des Wachstumsfaktors TGF- β führen können und so ihren Effekt der Myofibroblastendifferenzierung vermitteln. Als erstes wurde ein ELISA-Test auf TGF- β nach 24stündiger Stimulation mit 1,0 μ M FTY720 oder 10 μ M S1P durchgeführt. Der TGF- β -Wert unstimulierter

Fibroblasten unterschied sich nicht signifikant von dem stimulierter Zellen. Analog verhielt es sich mit dem latenten TGF- β -Komplex (Abb. 21).

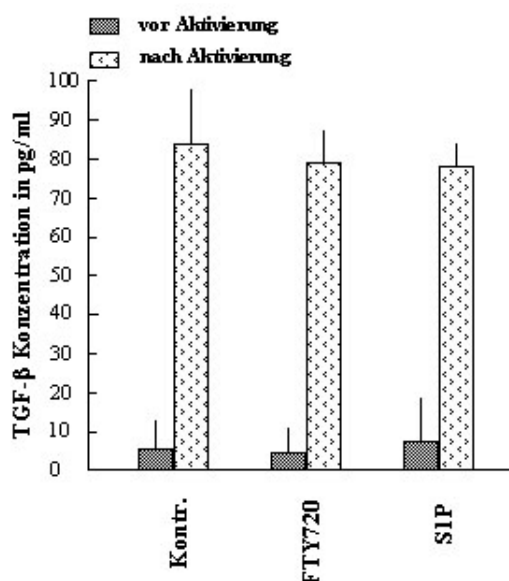


Abb. 21: Messung der TGF- β -Konzentration.

Humane primäre Fibroblasten (1×10^5 Zellen/ml) wurden über 24 h mit FTY720 (1,0 μ M) oder SIP (10 μ M) stimuliert. Anschließend wurde die TGF- β -Konzentration im Überstand mittels selektiven ELISA-Kit bestimmt, wobei der latente TGF- β -Komplex mit einer Säure aktiviert wurde (nach Aktivierung).

Um noch einmal zu unterstreichen, dass FTY720 über einen TGF- β -unabhängigen Mechanismus zur Myofibroblastendifferenzierung führte, wurden Zellen mit einem neutralisierenden TGF- β -Antikörper oder Kontroll-IgG mit TGF- β bzw. FTY720 co-inkubiert. Die Detektion des α -SMA mittels indirekter Fluoreszenzfärbung machte deutlich, dass der neutralisierende TGF- β -Antikörper zwar in der Lage war, die TGF- β -induzierte Myofibroblastenbildung annähernd vollständig zu hemmen, nicht aber die FTY720-verursachte Differenzierung. Erwartungsgemäß hatte der Kontroll-IgG-Antikörper weder einen Effekt auf die TGF- β - noch auf die FTY720-Wirkung (Abb. 22).



Abb. 22: Einfluss des neutralisierenden TGF- β -Antikörpers auf die α -SMA-Synthese.

Humane Fibroblasten wurden mit normalen Ziegen-IgG oder TGF- β -Antikörper (TGF- β -AK) inkubiert und mit 1 μ M FTY720, 2 ng/ml TGF- β für 72 h stimuliert. Nachfolgend wurde eine indirekte Fluoreszenzfärbung zur Detektion von α -SMA durchgeführt; 400fache Vergrößerung.

3.2 Einfluss des Lipidmediators S1P auf die CTGF-Bildung

3.2.1 S1P erhöht die Expression der CTGF-mRNA

CTGF stellt einen wichtigen Mediator im fibrotischen Prozess dar. Zum einen wurden erhöhte Konzentrationen dieses Wachstumsfaktors in Biopsiematerial von Patienten gefunden, die an verschiedenen fibrotischen Erkrankungen litten (Igarashi, Nashiro et al. 1995; Dammeier, Brauchle et al. 1998; Ito, Aten et al. 1998; Paradis, Dargere et al. 1999; Shi-wen, Pennington et al. 2000; Pan, Yamauchi et al. 2001). Zum anderen zeigte eine Verminderung der CTGF-Bildung hemmende Effekte auf profibrotische Prozesse. Beispielsweise wird die vermehrte Bildung des ECM-Proteins Kollagen in humanen oder porcinen Fibroblasten durch eine CTGF-Inhibierung abgeschwächt (Wang, Olson et al. 2004; Zhou, Xiong et al. 2006).

Der prominenteste und potenteste Induktor der CTGF-Synthese in Mesenchymzellen verschiedener Herkunft ist der Wachstumsfaktor TGF- β (Igarashi, Okochi et al. 1993; Grotendorst, Okochi et al. 1996; Kothapalli, Frazier et al. 1997; Chen, Lam et al. 2000; Folger, Zekaria et al. 2001; Kucich, Rosenbloom et al. 2001). Aber auch andere Substanzen, wie beispielsweise Histamin (Kunzmann, Schmidt-Weber et al. 2007), Thrombin (Chambers, Leoni et al. 2000; Howell, Goldsack et al. 2001) oder

Endothelin-1 (Xu, Howat et al. 2004) können die Synthese von CTGF forcieren. Unter anderem wird CTGF als sogenannter „Second Messenger“ für einige profibrotische Effekte des TGF- β verantwortlich gemacht. Dazu gehören die Myofibroblastendifferenzierung (Grotendorst, Rahmanie et al. 2004), die Kollagenbildung (Duncan, Frazier et al. 1999) und die Proliferation in NRK-49D Zellen (Kothapalli, Frazier et al. 1997). Allerdings führt der alleinige Zusatz von CTGF zur NRK-49D Zellkultur nicht zur vermehrten Synthese von α -SMA oder zu einer erhöhten Proliferationsrate (Grotendorst, Rahmanie et al. 2004). Die Kollagenbildung kann allerdings allein durch das CTGF in renalen Fibroblasten induziert werden (Duncan, Frazier et al. 1999). Auch in humanen Mesenchymzellen vermittelt TGF- β sowohl die Fibronektinsynthese als auch die Bildung des Fibronektinrezeptors α 5 β 1-Integrinen zumindest teilweise über CTGF. Eine alleinige Zugabe von CTGF konnte die Qualität der TGF- β -Wirkungen in humanen Mesangiumzellen nachahmen, zeigte jedoch nicht das gesamte Ausmaß einer TGF- β -Stimulation (Abdel-Wahab, Weston et al. 2002; Weston, Wahab et al. 2003).

Da auch SIP in der Lage ist, in Endothelzellen, Glattmuskelzellen und Mesangiumzellen die Expression des profibrotischen Mediators CTGF zu erhöhen (Chowdhury and Chaqour 2004; Muehlich, Schneider et al. 2004; Katsuma, Ruike et al. 2005), sollte überprüft werden, ob der Sphingolipidmediator ebenfalls in primären humanen Fibroblasten zu einer verstärkten CTGF-Bildung führt. Hierfür wurden Fibroblasten in großen Zellkulturschalen über Nacht kultiviert, anschließend für 48 h mit Basalmedium inkubiert und über verschiedene Zeiträume mit unterschiedlichen Konzentrationen von SIP oder TGF- β stimuliert. Aus den so behandelten Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Abb. 23 A zeigt die Ergebnisse einer Real-Time RT-PCR-Analyse, die die Konzentrationsabhängigkeit der TGF- β -vermittelten CTGF-mRNA-Bildung bestätigt (Igarashi, Okochi et al. 1993). Die maximal eingesetzte TGF- β -Konzentration von 1 ng/ml führte auch zum stärksten Effekt. Den ersten signifikanten Einfluss auf die CTGF-Bildung wies eine Konzentration von 0,1 ng/ml auf (Abb. 23 A). In einer weiteren Real-Time RT-PCR-Analyse wurde nachgewiesen, dass auch der natürliche Lipidmediator SIP die CTGF-mRNA-Synthese konzentrationsabhängig in humanen dermalen Fibroblasten

beeinflusste (Abb. 23 B). Der maximale Effekt lag bei 10 μ M S1P, wobei Konzentrationen ab 1,0 μ M S1P einen Effekt auf die CTGF-Synthese zeigten (Abb. 23 B).

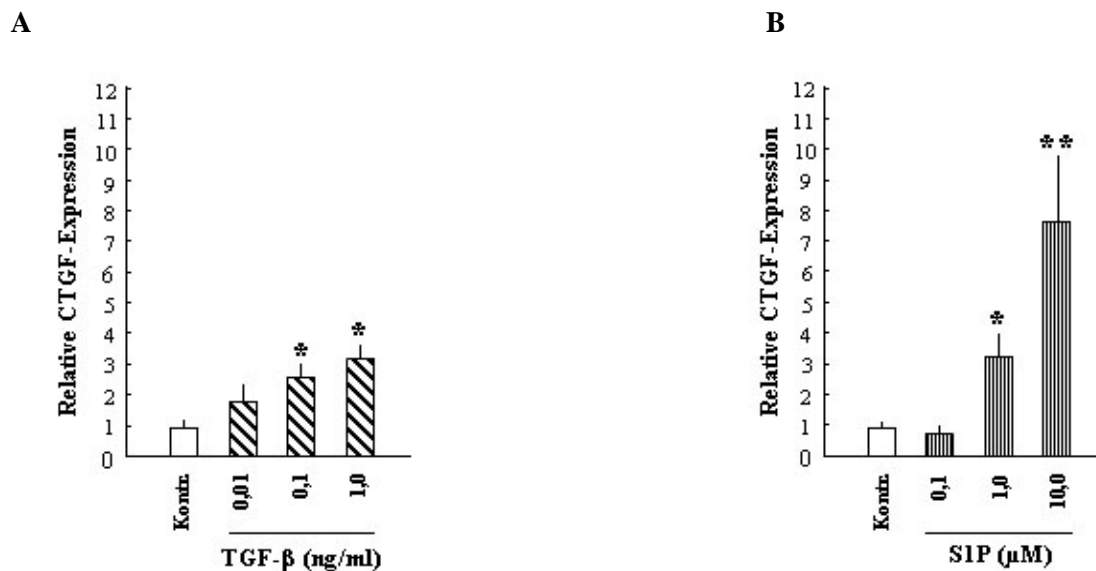


Abb. 23: Konzentrationsabhängigkeit der CTGF-mRNA-Expression.

Stimuliert wurde mit TGF- β (A) oder S1P (B). Humane Fibroblasten wurden mit den angegebenen Konzentrationen an S1P oder an TGF- β über 3 h stimuliert. Die RNA wurde aus behandelten Zellen isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Die CTGF-Bestimmung erfolgte mittels Real-Time RT-PCR und wurde auf das Cyclophilin A Gen normalisiert.

Nachdem eine Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen wurde, sollten weitere Experimente den zeitlichen Verlauf der CTGF-Synthese in humanen Fibroblasten näher beschreiben. Hierfür wurden Zellen analog zu den vorherigen Untersuchungen vorbereitet und anschließend mit der jeweils optimalen Konzentration an TGF- β oder S1P über verschiedene Zeiträume inkubiert. TGF- β führte nach einer 30minütigen Inkubation zu einer leichten Erhöhung der CTGF-mRNA-Bildung. Erst nach 3 h war ein signifikanter Anstieg in der CTGF-Expression messbar. Das Ausmaß der CTGF-mRNA-Neubildung nahm nach 7 h weiter zu und fiel auch nach 16 h Stimulationsdauer kaum ab (Abb. 24 A). Diese Untersuchungen bestätigten die Daten von Igarashi und Kollegen, die ebenfalls erste Effekte der TGF- β -vermittelten CTGF-mRNA-Induktion nach 30 min gefunden hatten, welche mit zunehmender Stimulationsdauer weiter zunahmen (Igarashi, Okochi et al. 1993). Der Lipidmediator

zeigte eine andere Kinetik, auch lag der maximale Effekt des S1P unter dem des Wachstumsfaktors. Nach einer einstündigen Stimulation erreichte die S1P-vermittelte Wirkung ihr maximales Ausmaß, welches bis zu mindestens 7 h erhalten blieb. Danach verminderte sich die CTGF-Menge wieder, um nach 16 h wieder basale Werte anzunehmen (Abb. 24 B). Dieser zeitliche Verlauf unterscheidet sich von den Daten, die Chowdhury und Kollegen oder auch Katsuma und Mitarbeiter in Glattmuskelzellen bzw. in Mesangiumzellen erhalten haben. Beide Arbeitsgruppen fanden eine maximale CTGF-mRNA-Expression nach einer zweistündigen Stimulation mit S1P, danach fielen die Werte schnell wieder ab (Chowdhury and Chaqour 2004; Katsuma, Ruike et al. 2005).

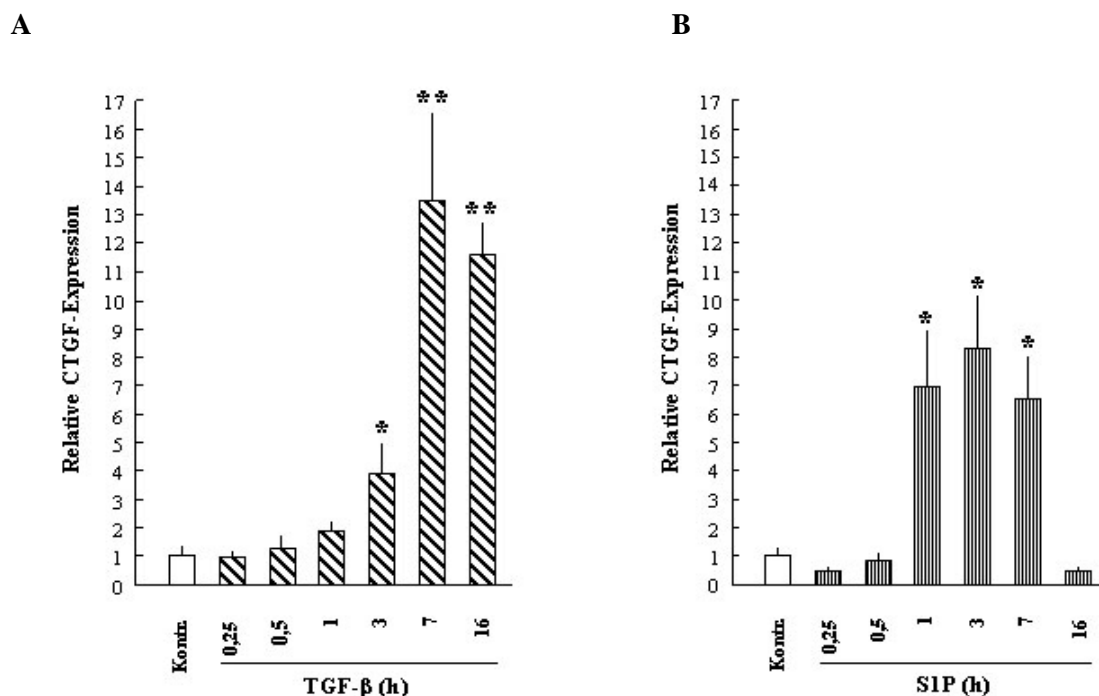


Abb. 24: Kinetik der CTGF-mRNA-Expression durch TGF- β und S1P.

Humane Fibroblasten wurden mit 1 ng/ml TGF- β (A) bzw. 10 μ M S1P (B) über die angegebenen Zeiträume inkubiert. Die RNA wurde aus behandelten Zellen isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Die CTGF-Bestimmung erfolgte mittels Real-Time RT-PCR und wurde auf das Cyclophilin A Gen normalisiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl TGF- β als auch S1P die Expression des CTGF auf mRNA-Ebene in Abhängigkeit der Konzentration und der Stimulationsdauer erhöhten.

3.2.2 Einfluss auf die CTGF-Proteinneubildung

Da S1P hinsichtlich der α -SMA- und der CTGF-mRNA-Bildung eine dem TGF- β sehr ähnliche Wirkung in humanen Fibroblasten zeigte, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob S1P ebenfalls in der Lage ist, die Neusynthese des Wachstumsfaktors CTGF auf Proteinebene zu induzieren. Die Zellen wurden in Sechslöchplatten ausgesät, nach dem Anwachsen für 48 h mit Fibroblastenbasalmedium inkubiert und anschließend mit S1P oder TGF- β für unterschiedliche Zeiten stimuliert. In Abb. 25 ist exemplarisch ein Western Blot, welcher das CTGF-Protein aus dem Zelllysate nachweist, nach einer 24stündigen S1P- bzw. TGF- β -Stimulation dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass S1P nicht zu einer Erhöhung der CTGF-Proteinsynthese in humanen dermalen Fibroblasten führte. Auch eine Veränderung der Stimulationsdauer führte zu keiner CTGF-Proteininduktion durch den Lipidmediator S1P (Daten nicht gezeigt).

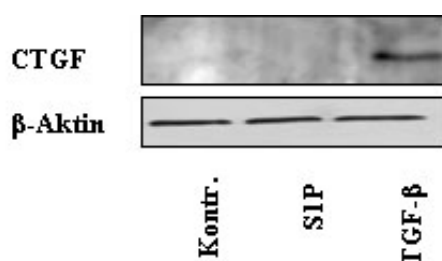


Abb. 25: Detektion des CTGF-Proteins nach S1P- bzw. TGF- β -Stimulation.

Humane Fibroblasten wurden über 24 h mit 10 μ M S1P oder 2 ng/ml TGF- β inkubiert. Anschließend wurde mittels Western Blot Analyse aus dem Zelllysate die CTGF-Bildung detektiert. Der β -Aktin-Blot stellte sicher, dass die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde (20 μ g Protein).

3.2.3 Beteiligung von S1P-Rezeptorsubtypen

Da S1P seine Effekte über Rezeptoren oder intrazellulär vermitteln kann, wurde als erstes untersucht, ob Rezeptoren an der Signaltransduktion beteiligt sind. Dazu wurden humane Fibroblasten mit PTX präinkubiert und anschließend mit S1P oder TGF- β in Gegenwart des $G_{\alpha i}$ -Protein-Inhibitors PTX stimuliert. Interessanterweise zeigten diese Versuche eine partielle Hemmung dieses S1P-Effektes durch PTX, obwohl die S1P-vermittelte Induktion von CTGF in Mesangiumzellen und Endothelzellen in der Literatur als PTX-insensitiv beschrieben worden war (Muehlich, Schneider et al. 2004; Katsuma, Ruike et al. 2005). Abb. 26 A visualisiert eine Teilabhängigkeit von $G_{\alpha i}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren nach einer S1P-Stimulation, wohingegen die TGF- β -verursachte CTGF-Induktion auch in Gegenwart von PTX nicht inhibiert wurde (Abb. 26 B). Es wurde sogar eine leichte Zunahme der TGF- β -vermittelten CTGF-Expression unter Zusatz von PTX gefunden, die sich allerdings als nicht-signifikant erwies.

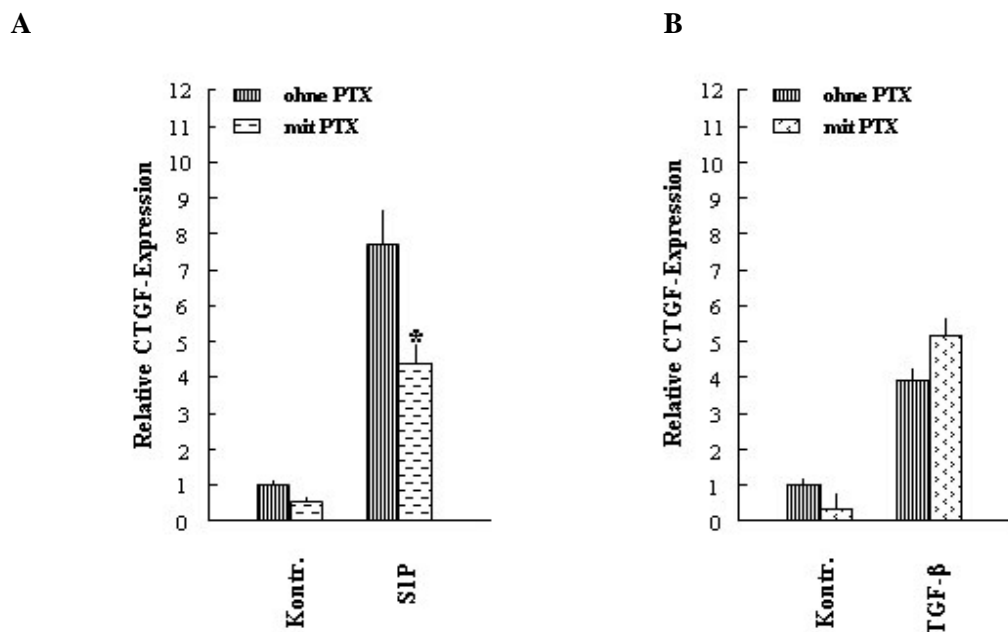


Abb. 26: PTX-Abhängigkeit der CTGF-mRNA-Expression.

Die RNA wurde aus den Zellen isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Die Bestimmung der CTGF-mRNA erfolgte mittels Real-Time RT-PCR und wurde auf das Cyclophilin A Gen normalisiert. Humane Fibroblasten wurden mit 2 µg/ml PTX 3 h präinkubiert, darauf folgte die Stimulation mit 10 µM S1P (A) oder 1 ng/ml TGF-β für jeweils 3 h (B).

Aufgrund der ausschließlichen Beteiligung des S1P₃-Subtypens in dem FTY720-P-vermittelten profibrotischen Effekt der α-SMA-Neubildung und der Tatsache, dass der S1P₃-Subtyps in humanen Fibroblasten überwiegend exprimiert wird, wurde im Folgendem die Beteiligung des S1P₃-Rezeptorsubtyps in murinen S1P₃-Knockout-Fibroblasten näher untersucht. Dazu wurden S1P₃-Knockout-Zellen bzw. deren Wildtyp-Zellen mit S1P über 3 h stimuliert. Danach erfolgte die Gewinnung von mRNA und die Synthese der entsprechenden cDNA. Im letzten Schritt wurde die cDNA mittels Real-Time RT-PCR untersucht. Abb. 27 zeigt, dass die Knockout-Fibroblasten nach einer S1P-Applikation durchaus noch in der Lage waren, CTGF-mRNA zu bilden. Allerdings fiel auf, dass das Ausmaß der CTGF-Synthese in den Knockout-Zellen im Vergleich zu murinen Wildtyp-Fibroblasten deutlich reduziert war. Wahrscheinlich transduziert S1P die CTGF-mRNA-Expression teilweise über

seinen S1P₃-Rezeptorsubtyp. Interessanterweise erwies sich bei den murinen Wildtyp-Fibroblasten 1 μ M S1P als die optimale Konzentration zur Induktion der CTGF-mRNA. Höhere Konzentrationen verminderten den S1P-Effekt, wobei auch schon Konzentrationen von 0,01 μ M S1P eine schwache Wirkung auf die CTGF-Bildung hatten (Daten nicht gezeigt.). Zusätzlich ist aus der Literatur bekannt, dass S1P in Mesangiumzellen über die Aktivierung von S1P₃ und S1P₂ zur Bildung von CTGF-mRNA führt (Katsuma, Ruike et al. 2005). Der S1P₂ besitzt ein untypisches Signalprofil. Er ist zwar an die gleichen G_{ai}-Proteine gekoppelt wie S1P₃, zeigt jedoch umgekehrte S1P-Wirkungen. Takuwa und Kollegen konnten zeigen, dass eine S1P₂-Überexprimierung die Zellmigration hemmte, wohingegen über den S1P₃ eine Chemotaxis vermittelt wird (Takuwa, Takuwa et al. 2002; Rivera Gil 2007). Da humane dermale Fibroblasten alle 5 S1P-Rezeptorsubtypen exprimieren und die S1P-vermittelte CTGF-Synthese in murinen S1P₃-Knockout-Zellen nur teilweise gehemmt ist, müsste die Bedeutung des S1P₂ in weiteren Experimenten geklärt werden.

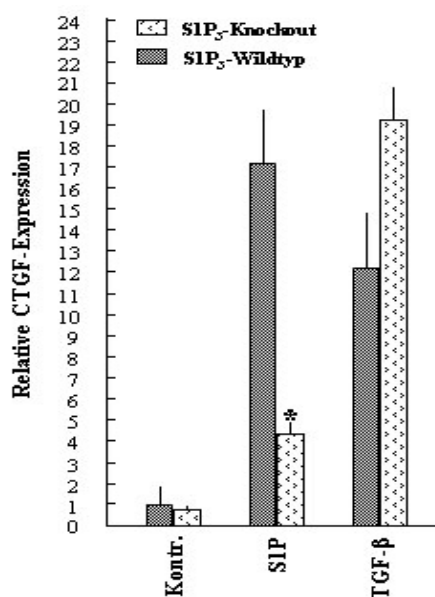


Abb. 27: Untersuchung der CTGF-Synthese an murinen S1P₃-Wildtyp und S1P₃-Knockout-Fibroblasten.

Nach einer Stimulation mit S1P (1 μ M) oder TGF- β (1 ng/ml) über 3 h, wurde die RNA aus den murinen Fibroblasten isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Die Analyse der murinen bzw. humanen CTGF-mRNA erfolgte mittels Real-Time RT-PCR und wurde auf das entsprechende murine Cyclophilin A Gen normalisiert.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass S1P die Bildung der CTGF-mRNA in Fibroblasten größtenteils über $G_{\alpha i}$ -Proteine und den S1P₃-Rezeptorsubtyp vermittelt.

3.2.4 Smad3 ist entscheidend an der Signaltransduktion beteiligt

Der Smad-Signaltransduktionsweg hat eine große Bedeutung in der Induktion der CTGF-Expression in mesenchymalen Zellen. Lakos und Kollegen fanden heraus, dass in Smad3-Knockout-Mäusen nach der Induktion einer dermalen Fibrose mit Bleomycin deutlich weniger CTGF exprimiert wurde als in gleich behandelten Wildtyp-Tieren (Lakos, Takagawa et al. 2004). Die Behandlung von Mesangiumzellen mit Smad4-siRNA schwächte die Fähigkeit des FTY720 zur Bildung von CTGF deutlich ab (Xin, Ren et al. 2006). Es ist auch durch die Hemmung des Smad3/4-Signalwegs die essentielle Bedeutung dieses Botenstoffs in der TGF- β -induzierten CTGF-Bildung nachgewiesen worden (Holmes, Abraham et al. 2001). Darüber hinaus wurde in unserem Arbeitskreis eine Aktivierung des Smad-Signalwegs durch S1P in humanen dermalen Fibroblasten zuvor nachgewiesen (Sauer 2003). Infolgedessen wurde in ergänzenden Experimenten die Bedeutung des Smad3-Proteins in der CTGF-mRNA-Expression nach S1P-Stimulation untersucht. Dazu wurden murine Smad3-Knockout-Fibroblasten bzw. entsprechende Wildtyp-Zellen mit S1P oder TGF- β als Positivkontrolle behandelt. Die Zellen wurden analog zu den obigen Experimenten ausgesät, stimuliert und nach Gewinnung der mRNA mit sich anschließender Umschreibung zu cDNA mittels Real-Time RT-PCR auf die Bildung von CTGF-mRNA untersucht. In den Smad3-Knockout-Fibroblasten war weder der Lipidmediator S1P noch der Wachstumsfaktor TGF- β in der Lage, die Bildung von CTGF zu induzieren (Abb. 28). Diese Ergebnisse bestätigen die Daten von Holmes und Kollegen die ebenfalls eine Smad3-Abhängigkeit der TGF- β -induzierten CTGF-Bildung gefunden hatten (Holmes, Abraham et al. 2001).

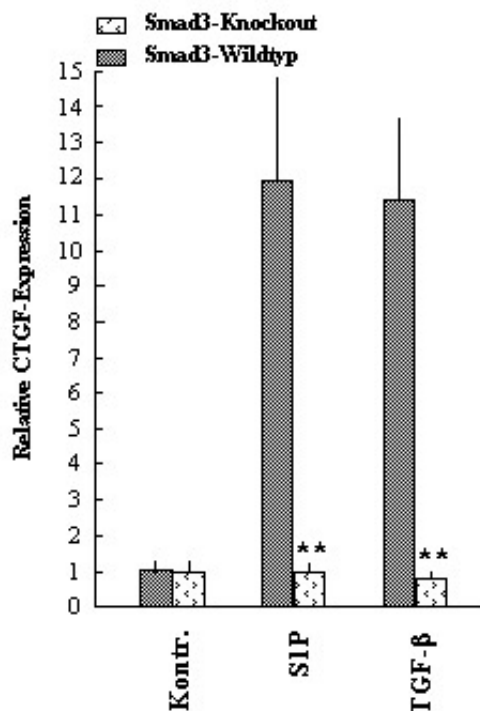


Abb. 28: Smad3-Abhängigkeit der CTGF-mRNA-Synthese.

Untersuchung der CTGF-Synthese an murinen Smad3-Knockout- und Smad3-Wildtyp-Fibroblasten. Nach einer Stimulation mit S1P (1 μ M) oder TGF- β (1 ng/ml) über 3 h wurde die RNA aus den murinen Fibroblasten isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Die Bestimmung der CTGF-mRNA erfolgte mittels Real-Time RT-PCR und wurde auf das Cyclophilin A Gen normalisiert.

3.3 Effekte einer Co-Stimulation von EGF bzw. IGF-2

3.3.1 Beeinflussung der Myofibroblastendifferenzierung durch die Wachstumsfaktoren IGF-2 und EGF

An der Pathogenese einer fibrotischen Erkrankung sind immer verschiedene Wachstumsfaktoren beteiligt. In der Literatur werden vor allem TGF- β , FGF, EGF, IGF-1, IGF-2 und PDGF als profibrotische Mediatoren benannt (Hetzl, Bachem et al. 2005). Sie zeigen eine erhöhte Expression in fibrotischen Arealen und beeinflussen die Proliferation, Differenzierung, Apoptose oder ECM-Produktion von mesenchymalen Zellen. Zusätzlich gibt es Untersuchungen, die den Einfluss einer Co-Stimulation von

TGF- β und EGF bzw. IGF-2 auf die Myofibroblastendifferenzierung in renalen Fibroblasten der Ratte (NRK-49D) beschreiben. Der Zusatz von EGF hemmte die Bildung des Myofibroblastenmarkers α -SMA stark, die zeitgleiche Applikation von IGF-2 hingegen potenziert den TGF- β -Effekt hinsichtlich der α -SMA-Synthese deutlich (Grotendorst, Rahmanie et al. 2004).

Um die Mechanismen bei der Fibrogenese näher aufzuklären, wurden im Folgenden *in vitro* Untersuchungen zu Co-Stimulationen mit dem Lipidmediator S1P und EGF bzw. IGF-2 in humanen primären Fibroblasten durchgeführt und die Myofibroblastendifferenzierung über die de novo Bildung von α -SMA detektiert. Wie erwartet, inhibierte EGF die Bildung von α -SMA teilweise, wohingegen IGF-2 die α -SMA-Produktion signifikant erhöhte (Abb. 29).

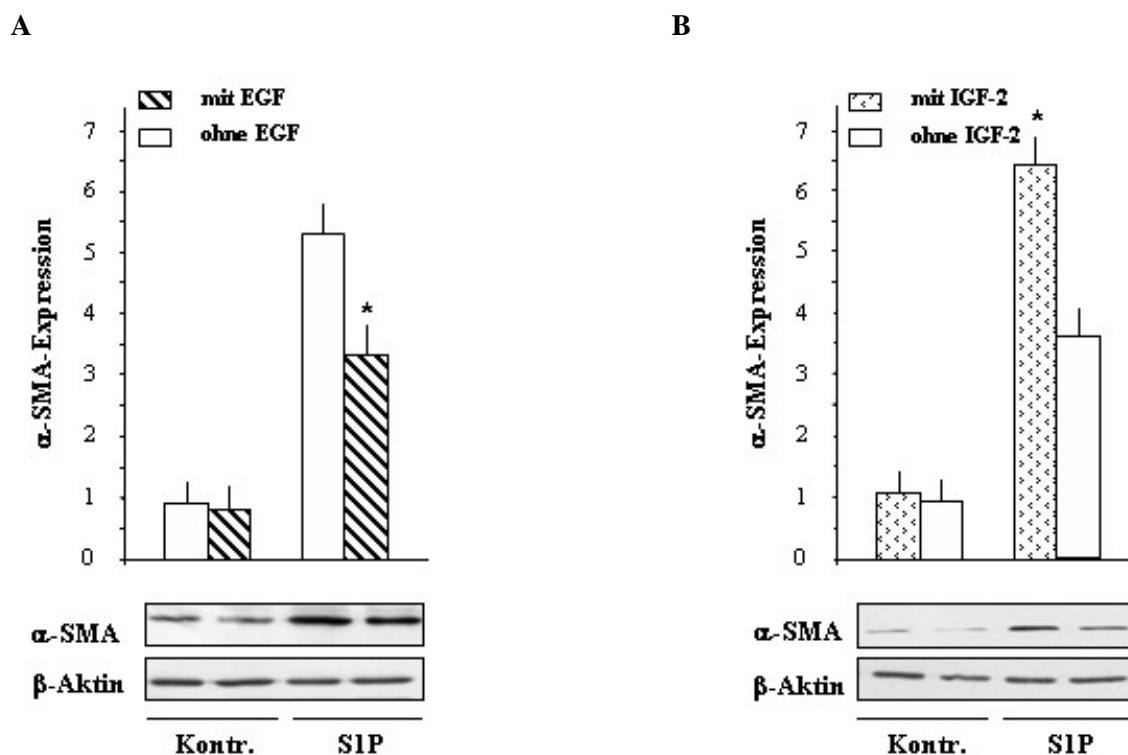


Abb. 29: Beeinflussung der S1P-vermittelten α -SMA-Bildung.

Co-Stimulation von 1 ng/ml EGF und 10 μ M S1P (**A**) bzw. 10 ng/ml IGF-2 und 10 μ M S1P (**B**) für 72 h. Untersucht wurde der Einfluss auf die α -SMA-Expression mittels Western Blot aus dem Zelllysate. (Die Quantifizierung bezog sich auf die β -Aktin-Kontrolle.)

Diese Wirkungen der Co-Stimulation glichen den von Grotendorst beschriebenen Effekten von TGF- β und EGF bzw. IGF-2 in den NRK-49D (Grotendorst, Rahmanie et al. 2004). Weitere Experimente mit TGF- β sollten die Ergebnisse von Grotendorst in primären dermalen Fibroblasten bestätigen. Erwartungsgemäß führte eine Co-Stimulation von EGF und TGF- β zu einer Abschwächung, wohingegen der Zusatz von IGF-2 zu einer TGF- β -Stimulation die Myofibroblastenbildung deutlich erhöhte (Abb. 30).

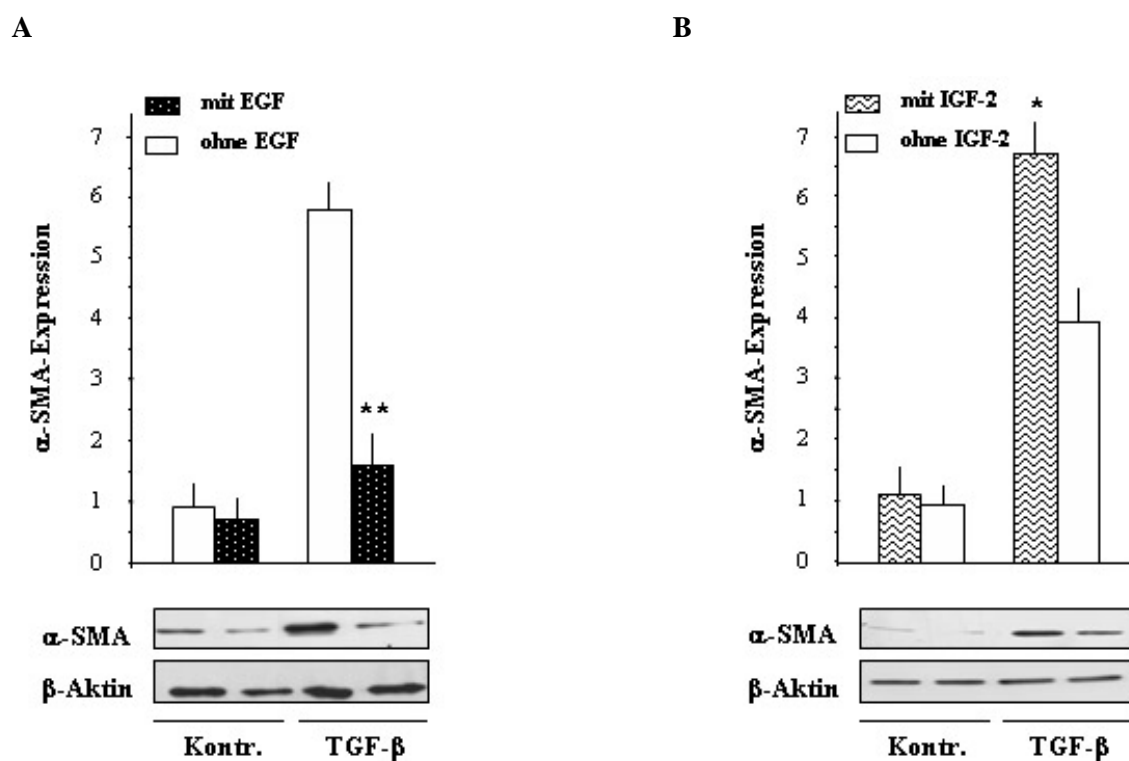


Abb. 30: Beeinflussung der TGF- β -vermittelten α -SMA-Bildung.

Humane Fibroblasten wurden mit 2ng/ml TGF- β und 1 ng/ml EGF (**A**) oder 10 ng/ml IGF-2 (**B**) über 72 h stimuliert. Anschließend wurde mittels Western Blot aus dem Zellysat die α -SMA-Expression analysiert und quantifiziert (bezogen auf die β -Aktin-Kontrolle).

3.3.2 Beeinflussung der CTGF-Expression durch die Wachstumsfaktoren IGF-2 und EGF

Wie zuvor schon erwähnt, kommt weiteren Wachstumsfaktoren bei der Entstehung und Erhaltung einer manifesten Fibrose eine große Bedeutung zu. In der S1P-vermittelten α -SMA-Proteinneubildung konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die zusätzliche Applikation der Wachstumsfaktoren EGF oder IGF-2 die Neubildungsrate des profibrotischen Proteins α -SMA gegensätzlich beeinflusste. Demnach sollten nachfolgende Untersuchungen klären, ob eine Co-Stimulation mit denselben Wachstumsfaktoren, EGF und IGF-2 die Expressionsrate der ebenfalls profibrotischen CTGF-mRNA beeinflussen kann. Bei der TGF- β -induzierten α -SMA-Bildung wird dem CTGF eine Bedeutung als „Second Messenger“, zugeschrieben. Diese Untersuchungen wurden von Grotendorst und Kollegen in der Nierenfibroblastenzelllinie NRK-49F durchgeführt (Grotendorst, Rahmanie et al. 2004). Eine Beeinflussung der CTGF-Expression konnte von dieser Gruppe nicht festgestellt werden. Sie postulierten eine Interaktion zwischen dem CTGF und EGF bzw. IGF-2 ohne eine quantitative Veränderung der CTGF-Menge. Humane dermale Fibroblasten wurden analog zu den obigen Experimenten ausgesät, stimuliert und nach Gewinnung der RNA mit sich anschließender Umschreibung zu cDNA mittels Real-Time RT-PCR auf die Synthese von CTGF-mRNA untersucht. Überraschenderweise schwächte die zusätzliche Gabe von EGF oder IGF-2 zu einer S1P- oder TGF- β -Stimulation die CTGF-Expressionsrate ab, wohingegen die alleinige Applikation der Wachstumsfaktoren nur einen sehr geringen Effekt auf die Neubildung der CTGF-mRNA zeigte (Abb. 31). Es erscheint, dass die hier untersuchten Co-Stimulationen unterschiedlich auf verschiedene profibrotische Marker wirken. Der EGF-Zusatz führt bei beiden untersuchten Effekten zu einer Verminderung. Die zusätzliche IGF-2-Applikation hingegen erhöht die Myofibroblastendifferenzierung und schwächt die CTGF-mRNA-Synthese ab. Gerade die Ergebnisse der IGF-2-Co-Stimulationen sind unerwartet. Darüber hinaus sind diese Daten nicht kongruent mit den publizierten Ergebnissen von Grotendorst und Kollegen, die in

NRK-49D Fibroblasten weder durch EGF noch durch IGF-2 eine Beeinflussung der TGF- β -induzierten CTGF-Bildung finden konnten (Grotendorst, Rahmanie et al. 2004).

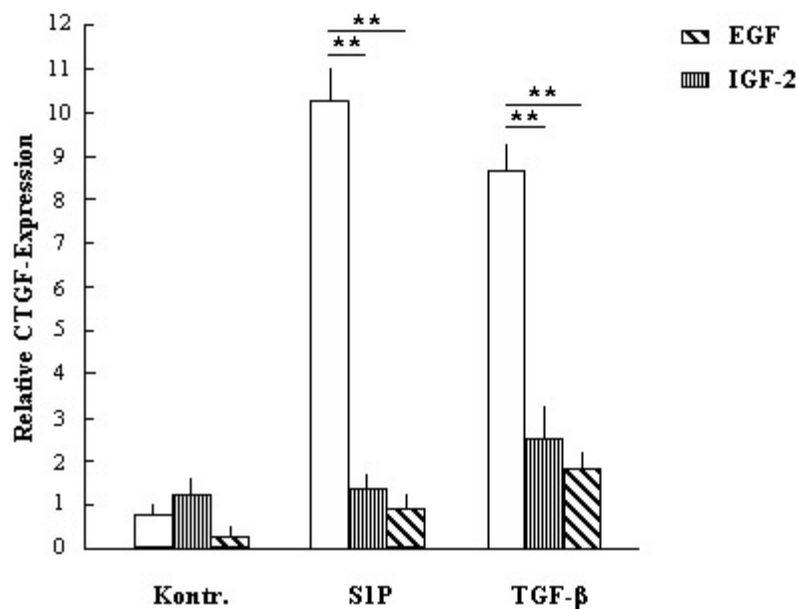


Abb. 31: Einfluss von Co-Stimulationen auf die CTGF-mRNA-Bildung.

Humane Fibroblasten wurden mit 10 μ M S1P, 1 ng/ml TGF- β , 2 ng/ml EGF, 10 ng/ml IGF-2 oder einer Kombination aus 10 μ M S1P bzw. 1 ng/ml TGF- β mit 2 ng/ml EGF bzw. 10 ng/ml IGF-2 für 5 h stimuliert. Die RNA wurde aus den Zellen isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Die Bestimmung der CTGF-mRNA erfolgte mittels Real-Time RT-PCR und wurde auf das Cyclophilin A Gen normalisiert.

4 Diskussion

4.1 Die Induktion der Myofibroblastendifferenzierung

4.1.1 FTY720

FTY720 ist ein neuer Wirkstoff, der als Immunmodulator mit einem innovativen Wirkungsmechanismus seine Effekte über das endogene S1P-System entfaltet (Matloubian, Lo et al. 2004). Er unterscheidet sich deutlich von den klassischen Immunsuppressiva, die meist über eine Inhibierung der IL-2-Signale oder eine Hemmung der DNA-Synthese ihren immunsuppressiven Effekt ausüben. Dieser neue Immunmodulator befindet sich zurzeit in der Phase III der Klinischen Prüfung, um seine Wirksamkeit bei der schubförmig verlaufenden Multiplen Sklerose mit Remissionen nachzuweisen. Bei erfolgreicher Durchführung dieser Studie (FREEDOM - NCT00289978) scheint die Zulassung bereits 2009 als möglich. FTY720 wirkt als typisches „Prodrug“ über seinen aktiven Metaboliten FTY720-P, welches ein Struktur analogon des natürlichen Lipidmediators S1P darstellt. In Tierversuchen und Klinischen Studien wurde eine verminderte Herzfrequenz als unerwünschte Wirkung des FTY720 festgestellt. Die FTY720-verursachte Bradykardie ließ sich durch eine zusätzliche Applikation eines β_2 -Rezeptorantagonisten oder eine Atropingabe wieder aufheben. Diese Hemmung wies auf eine Interaktion der jeweiligen Signalwege mit FTY720 hin (Tedesco-Silva, Mourad et al. 2005). Die Daten stimmen überein mit den Ergebnissen einiger anderer Studien, die verschiedene pharmakologische Interaktionen von S1P-aktivierten Rezeptoren mit anderen membranständigen Rezeptoren zeigten (Pyne, Waters et al. 2003; Baudhuin, Jiang et al. 2004; Pebay, Wong et al. 2005; Waters, Long et al. 2006). Solche Rezeptorinteraktionen wurden ebenso für TGF- β - und S1P-Rezeptoren in verschiedenen Zelltypen gefunden. Sie gingen mit einer Aktivierung der Smad-Kaskade einher (Sauer 2003; Sauer, Vogler et al. 2004; Xin, Ren et al. 2004; Radeke, von Wenckstern et al. 2005). Zusätzlich ist S1P in der Lage TGF- β -Wirkungen zu imitieren. Sowohl S1P als auch TGF- β zeigten in Mesangiumzellen antiinflammatorische Effekte, die sich durch die Zytokin-induzierte Sekretion der

Phospholipase A₂, die NO-Freisetzung und die Expression der MMP-9 auszeichneten (Xin, Ren et al. 2004). Neben seiner Funktion als antiinflammatorisches Zytokin hat TGF- β zusätzlich eine enorme Bedeutung in der Wundheilung, aber auch in der Entstehung und Beibehaltung von Erkrankungen des fibrotischen Formenkreises. Erhöhte TGF- β -Spiegel kommen bei fibrotischen Erkrankungen verschiedener Organe etwa der Haut, Leber, Nieren und Augen vor (Flanders 2004; Leask 2004; Abraham and Varga 2005). In verschiedenen Fibrosetiermodellen konnte diesem Wachstumsfaktor eine essentielle Bedeutung nachgewiesen werden (Flanders, Major et al. 2003). Versuche mit Anti-TGF- β -Antikörpern zeigten eine Abschwächung von profibrotischen Markern in Nieren-, Lungen- oder auch Hautfibrosen. Die Applikation eines löslichen T β RII führte zu einer antifibrotischen Wirkung bei hepatischer und intestinaler Fibrose (Flanders, Major et al. 2003).

TGF- β transduziert seine Signale über transmembranäre Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen mit anschließender Smad-Phosphorylierung und Beeinflussung der Transkription. Von großer Bedeutung ist dabei das Rezeptor-Smad3-Protein, welches mit der Beeinflussung profibrotischer Prozesse in kausalen Zusammenhang gebracht wurde (Roberts, Russo et al. 2003). Beispielsweise zeigten sich Smad3-Knockout-Mäuse resistent in der Ausbildung von Fibrosen nach Applikation von Tetrachlormethan oder Bleomycin. Entsprechend behandelte Wildtyp-Tiere entwickelten eine Leber- bzw. Lungenfibrose (Zhao and Gevert 2002; Flanders, Major et al. 2003). Der Verlust des Smad3 führt zu einer verminderten Bildung der ECM (Bonniaud, Kolb et al. 2004; Gu, Zhu et al. 2007). Die Transkription von profibrotischen Genen wie Kollagen (Verrecchia, Chu et al. 2001), PAI-1 (Dennler, Itoh et al. 1998) und TIMP-1 (Verrecchia, Chu et al. 2001) wird inhibiert und die TGF- β -Autoinduktion in fibrotischen Arealen findet nicht mehr statt (Roberts, Russo et al. 2003; Leask and Abraham 2004). Darüber hinaus führt TGF- β zur Hemmung des ECM-Abbaus durch eine negative Regulation des MMP-1-Promoters über das Rezeptor-Smad3-Protein (Yuan and Varga 2001). Wird der biologische Inhibitor des Smad3, das Smad7, vermehrt gebildet, vermindert sich die profibrotische TGF- β -Wirkung (Saika, Yamanaka et al. 2007). Die Überexpression einer dominant negativen Form des Smad3 schwächte die profibrotischen Marker deutlich ab

(Verrecchia, Chu et al. 2001; Tian, Chen et al. 2006). Das kleine Smad3-antagonisierende Molekül Halofuginone zeigte eine protektive Wirkung im Fibrosetiermodell (Xavier, Piek et al. 2004). Die TGF- β vermittelte Myofibroblastendifferenzierung ließ sich durch eine Smad3-Inhibierung deutlich abschwächen, so dass auch diese profibrotische Wirkung des Wachstumsfaktors über dieses Rezeptor-Smad-Protein vermittelt erscheint (Hu, Wu et al. 2003; Gu, Zhu et al. 2007). Auch der natürliche Lipidmediator S1P ist in der Lage, den Differenzierungsprozess in der pulmonalen embryonalen Zelllinie WI-38 herbeizuführen (Urata, Nishimura et al. 2005). Es wurde in dieser Arbeit untersucht, ob der natürliche Lipidmediator S1P und auch das Sphingosin-Analogon FTY720 zur Myofibroblastendifferenzierung in humaner Primärzellkultur befähigt sind.

4.1.2 Myofibroblastendifferenzierung durch das natürliche Phospholipid S1P

Der natürliche Lipidmediator S1P vermittelt als Wachstumsfaktor Proliferation, Differenzierung, Schutz vor dem programmierten Zelltod und Chemotaxis in verschiedenen Zelltypen. Dieser Mediator ist an Albumin und Lipoproteine gebunden und kommt im Blutplasma vor. In erster Linie wird er von aktivierten Thrombozyten gebildet und liegt in erhöhten Spiegeln im Wundareal vor (Takuwa, Takuwa et al. 2002). Hier zeigen sich Ähnlichkeiten zu TGF- β , das ebenfalls aus Blutplättchen stammt (Grainger, Wakefield et al. 1995), die Wundheilung modifiziert und dessen Effekte Analogien zu einigen Lysophospholipid vermittelten zellulären Antworten aufweist. Von Bedeutung sind das starke chemotaktische Potential der beiden Substanzen sowie die gegensätzliche Wirkung hinsichtlich der Proliferation auf Keratinozyten und Fibroblasten. S1P und TGF- β senken die Wachstumsraten von Keratinozyten (Ashcroft, Yang et al. 1999; Vogler, Sauer et al. 2003), steigern jedoch die Fibroblastenproliferation (Piek, Ju et al. 2001; Vogler, Sauer et al. 2003). Diese migratorischen und proliferativen Effekte auf Fibroblasten erklären neben der Myofibroblastendifferenzierung und der Anregung zur Matrixproteinsynthese, dass TGF- β die stärkste bekannte profibrotische Substanz darstellt. Neben der Proliferation induziert auch S1P in Analogie zu TGF- β die Synthese von bestimmten

Matrixproteinen (Vogler, Sauer et al. 2003). Urata und Kollegen konnten die Myofibroblastendifferenzierung in der fibroblastischen Zelllinie WI-38 nach S1P-Stimulation nachweisen (Urata, Nishimura et al. 2005). Diese Wirkung wurde in der vorliegenden Arbeit in primären Fibroblasten bestätigt. Allerdings unterschieden sich die Ergebnisse dahingehend, dass in der Zelllinie WI-38 ab einer S1P-Konzentrationen von 0,01 μM eine Erhöhung der α -SMA-Synthese zu erkennen war und der maximale Effekt bei 0,1 μM S1P auftrat, wohingegen in humanen dermalen Fibroblasten erst ab einer Konzentration von 1,0 μM ein signifikanter Anstieg der α -SMA-Expression messbar wurde. Höhere S1P-Konzentrationen wurden bei den Untersuchungen von Urata et al. nicht eingesetzt (Urata, Nishimura et al. 2005). Die Kinetik der durch S1P-verursachten α -SMA-Bildung zeigte eine überraschende Übereinstimmung mit dem zeitlichen Verlauf der durch TGF- β vermittelten α -SMA-Synthese. Von Urata und Kollegen wurden zum zeitlichen Verlauf keine Experimente vorgenommen, vielmehr wurde die Signaltransduktion genauer untersucht (Urata, Nishimura et al. 2005).

4.1.3 Induktion des α -SMA durch FTY720 und FTY720-P

Das Sphingosin-Analogon FTY720 und sein aktiver Metabolit FTY720-P führten in primären dermalen Fibroblasten zur Myofibroblastendifferenzierung. Beide Substanzen induzierten die Myofibroblastendifferenzierung konzentrations- und zeitabhängig. Der aktive Metabolit führte schon ab einer Konzentration von 0,01 μM zum Differenzierungsprozess in humanen Fibroblasten, wohingegen FTY720 erst nach einer Applikation ab 0,1 μM zu einem signifikanten Anstieg der α -SMA-Synthese befähigt war. Das maximale Ausmaß der Induktion war bei beiden Substanzen vergleichbar und lag bei 1,0 μM . Höhere Konzentrationen wurden nicht eingesetzt, weil bereits frühere Arbeiten in unserem Arbeitskreis nachgewiesen hatten, dass FTY720 in höheren Konzentrationen die Apoptoserate in primären humanen Fibroblasten deutlich erhöht. Dies bestätigen auch Angaben aus der Literatur, die FTY720 einen apoptotischen Effekt zuschreiben, der zwar in Tumorzellen ausgeprägter ist, aber auch in fibroblastischen Zelllinien zum Ausdruck kommt (Sonoda, Yamamoto et al. 2001; Azuma, Takahara et

al. 2002; Azuma, Takahara et al. 2003). Die Kinetik der beiden Substanzen bei der Induktion des α -SMA-Proteins zeigte einen ähnlichen Verlauf. Allerdings trat das zeitliche Maximum des FTY720-P erst nach 96 h im Gegensatz zum FTY720 (nach 72 h) auf. Zum einen scheint der zeitlich vorgezogene Effekt des FTY720 auf eine rasante Phosphorylierung zum aktiven Agens hinzudeuten, zum anderen könnte er auf eine sehr gute Bioverfügbarkeit des Sphingosinanalogs zurückzuführen sein.

4.1.4 Keine Abhängigkeit von TGF- β

Verschiedene mesenchymale Zellen sind in der Lage, zu Myofibroblasten auszudifferenzieren. Myofibroblasten verkleinern das Wundareal und synthetisieren vermehrt ECM-Proteine, die die Fibroseentstehung begünstigen. Allgemein ist inzwischen anerkannt, dass Myofibroblasten den essentiellen Zelltyp in der Wundheilung, aber auch in der Fibrogenese darstellen (Gabbiani 2003; Desmouliere, Chaponnier et al. 2005). Die Produktion von mehreren Komponenten der ECM kann als molekularer Marker genutzt werden. Die bedeutsamsten ECM-Proteine sind die Kollagene des Typs I, III und V, welche allerdings nicht ausschließlich von Myofibroblasten synthetisiert werden. S1P ist in der Lage die Expression weiterer ECM-Komponenten zu beeinflussen. Beispielsweise wird die Sekretion von Fibronectin erhöht, welches die Verankerung der Kollagenfasern untereinander und zur Einbettung von Zellen in die ECM beiträgt (Zhang, Peyruchaud et al. 1999; Velling, Risteli et al. 2002). Daneben induziert S1P auch die Bildung des Proteaseinhibitors PAI-1, der dem Abbau der neu gebildeten Matrix entgegenwirkt (Sauer 2003). Vor kurzem hatten Xin und Kollegen nachgewiesen, dass sowohl FTY720 als auch der aktive Metabolit zur erhöhten Expression von Kollagen Typ IV führen, welches ebenfalls einen wichtigen Bestandteil der ECM darstellt und zusätzlich noch als profibrotischer Marker herangezogen wird (Xin, Ren et al. 2006). Da sowohl die Differenzierung zu Myofibroblasten, die Fibronectinsekretion als auch die PAI-1-Bildung potent durch den Wachstumsfaktor TGF- β hervorgerufen werden können, war es notwendig zu untersuchen, ob der Lipidmediator S1P und das Sphingosin-Analogon FTY720 ihre differenzierende Wirkung auf Fibroblasten über eine Bildung und Sekretion des

pluripotenten Zytokins TGF- β vermitteln. Die Ergebnisse aus einem TGF- β -ELISA-Assay zeigten, dass weder S1P noch FTY720 die Sekretion des TGF- β oder des latenten TGF- β -Komplexes signifikant veränderte. Zur weiteren Absicherung wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung unter TGF- β -immunneutralisierenden Bedingungen die Expression des α -SMA nach Stimulation mit TGF- β oder FTY720 visualisiert. Hierbei zeigte sich ein TGF- β -unabhängiger Effekt des FTY720 auf humane Fibroblasten, wobei die TGF- β -vermittelte α -SMA-Induktion fast komplett unterbunden wurde. Infolgedessen lässt sich abschließend eine Beteiligung des Zytokins TGF- β in der S1P und FTY720 induzierten Myofibroblastendifferenzierung ausschließen. Da die Daten von Xin und Kollegen auf eine Wechselwirkung des T β RII in einem FTY720-vermittelten profibrotischen Effekt hindeuten, müssten allerdings weitere Experimente eine Bedeutung der T β R in der FTY720- bzw. S1P-vermittelten α -SMA-Induktion untersuchen (Xin, Ren et al. 2006).

4.1.5 Der aktive Metabolit FTY720-P stellt das wirksame Agens dar.

Da FTY720 und der aktive Metabolit FTY720-P in der Lage waren, die α -SMA-Synthese in gleichem Maße zu erhöhen, sollten weitere Untersuchungen klären, ob die Umwandlung von FTY720 zu FTY720-P einen notwendigen Schritt zur Induktion der Differenzierung darstellt. Die aktive, phosphorylierte Form greift als potenter Agonist an vier der fünf S1P-Rezeptorsubtypen an. Die Bindung an den S1P₁ mit sich anschließender Rezeptorinternalisierung der T-Lymphozyten stellt ein Wirkprinzip der Lymphozyten-Retention in den peripheren Lymphknoten mit einhergehender Lymphopenie dar (Brinkmann 2004). Inzwischen sind allerdings auch Hypothesen veröffentlicht, die eine direkte Wirkung des Sphingosinanalogs FTY720 ohne Aktivierung zum S1P-Analogon postulieren (Matsuoka, Nagahara et al. 2003; Xin, Ren et al. 2006). Radioligand-Verdrängungs-Experimente (Radioligand Competition Assays) mit FTY720 zeigten in der Gegenwart von [³³P]S1P zwar einen IC₅₀ Wert von 300 nmol/l für den S1P₁, jedoch wurde keine spezifische Bindungsaffinität des FTY720

zu den anderen S1P-Rezeptorsubtypen gefunden (Mandala, Hajdu et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte in weiteren Experimenten nachgewiesen werden, dass FTY720-P das aktive Wirkprinzip bei dem untersuchten Effekt der Myofibroblastendifferenzierung darstellt. Um die Phosphorylierung des FTY720 zu inhibieren, wurde den Zellkulturen DMS zugesetzt. DMS hemmt die Sphingosinkinase unspezifisch und verhindert so die Phosphatbildung. In so durchgeführten Experimenten kam es zu einer signifikanten Abschwächung der FTY720-vermittelten α -SMA-Bildung. Auf die TGF- β -induzierte Zunahme der α -SMA-Synthese hatte DMS keinen Einfluss. Mehrere Publikationen deuten darauf hin, dass FTY720 überwiegend durch die Sphingosinkinase vom Subtyp 2 phosphoryliert wird (Paugh, Payne et al. 2003; Zemann, Kinzel et al. 2006). In SphK2-Knockout-Mäusen führte die FTY720-Applikation nicht zu dem Effekt der Lymphopenie, wobei der aktive Metabolit FTY720-P weiterhin befähigt war, eine transiente Lymphopenie in diesen Tieren auszulösen. Dies weist auf die Notwendigkeit einer andauernden SphK2-Expression hin, um einen lang anhaltende Wirkung des Immunmodulators erzielen zu können (Kharel, Lee et al. 2005; Zemann, Kinzel et al. 2006). Diese Daten stimmen mit Ergebnissen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Stimulation mit FTY720 in Gegenwart von SphK2-ASO überein. Eine verminderte SphK2-Expression schwächte den FTY720-vermittelten Differenzierungsprozess ab. Auf eine TGF- β -verursachte Zunahme der α -SMA-Synthese hatten SphK2-ASO keinen Einfluss.

4.1.6 Die Signaltransduktion via S1P₃

Die Beeinflussung der Lymphozytenzirkulation stellt nicht die einzige Wirkung des FTY720-P über das S1P-System dar. Weiterhin ist bekannt, dass S1P und FTY720-P eine Interaktion mit dem Endothel eingehen (Lee, Kim et al. 1999; Sanchez, Estrada-Hernandez et al. 2003) und zu einer Stimulation der endothelialen NO-Synthase (eNOS) über den S1P₃ führen (Nofer, van der Giet et al. 2004; Tolle, Levkau et al. 2005). Da der Aktivierung der eNOS eine protektive Rolle in der Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen zugeschrieben wird, ist ein zusätzliches Benefit in der Therapie mit FTY720 neben seiner immunsupprimierenden Wirkung möglich (Tolle,

Levkau et al. 2005). Tedesco-Silva und Kollegen berichteten allerdings von einer Reduktion der Herzfrequenz nach Exposition von FTY720, was den therapeutischen Einsatz dieses Immunmodulators limitieren könnte (Tedesco-Silva, Mourad et al. 2005). Diese unerwünschte Wirkung wurde ebenfalls über das S1P-System vermittelt und involvierte den S1P₃. Wurde FTY720 S1P₃-Knockout-Mäusen appliziert, führte dies nicht zu einer Bradykardie, wohingegen Experimente in Wildtyp-Mäusen weiterhin diesen FTY720-Effekt zeigten (Forrest, Sun et al. 2004; Tedesco-Silva, Mourad et al. 2005). Darüber hinaus wird dieser Rezeptorsubtyp am Herzen von Nagetieren vermehrt exprimiert (Forrest, Sun et al. 2004). Ein Vorversuch zeigte eine Inhibierung der FTY720-vermittelten α -SMA-Synthese mit PTX und wies so die Beteiligung eines G_{αi}-Protein gekoppelten Rezeptors nach. Aufgrund der Bedeutung des Phosphats in der de novo α -SMA-Synthese und der Tatsache, dass FTY720-P als S1P-Analagon agonistisch an vier der fünf S1P-Rezeptorsubtypen bindet (Brinkmann, Davis et al. 2002), wurde in dieser Arbeit die Bedeutung der einzelnen Subtypen untersucht. Dem S1P₃ konnte eine Beteiligung in der FTY720-vermittelten Differenzierung nachgewiesen werden. Eine Behandlung der Fibroblasten mit spezifischen S1P₃-ASO verminderte diesen FTY720-Effekt deutlich. Die spezifische Verminderung der jeweiligen S1P_{1,4,5}-Rezeptorsubtyp-Expression beeinflusste die FTY720-vermittelte α -SMA-Synthese hingegen nicht. Experimente mit murinen Fibroblasten, die aus der Haut von S1P₃-Knockout-Mäusen und deren Wildtypen isoliert wurden, untermauerten die Bedeutung des S1P₃. Ergänzend zeigte auch S1P eine S1P₃-Abhängigkeit in der α -SMA-Induktion (Daten nicht gezeigt.). Die Daten von Kono und Kollegen ergänzen die hier gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich des S1P₃. Sie postulierten, dass TGF- β die S1P-Konzentration erhöhe. Anschließend führe das S1P über S1P₂ und S1P₃ zur vermehrten α -SMA-Bildung. Eine abgeschwächte Expressionsrate des S1P₃, aber auch des S1P₂-Rezeptors inhibierte die α -SMA-Neubildung nach einer Stimulation mit TGF- β fast vollständig (Kono, Nishiuma et al. 2007). Da diese Arbeit sich schwerpunktmäßig mit der FTY720-Wirkung beschäftigt und der aktive Metabolit FTY720-P nicht an S1P₂ bindet, wurden keine weiteren Untersuchungen zur Bedeutung dieses Subtyps durchgeführt. Eine Beteiligung des S1P₂-Rezeptorsubtyps in der S1P-vermittelten α -SMA-Expression ist wahrscheinlich.

4.1.7 Beteiligung des Signaltransduktionsproteins Smad3 am Differenzierungsprozess

Smad3 gehört als Rezeptor-Smad-Protein zu einer Familie von „Second Messengern“ einer für TGF- β typischen Signaltransduktionskaskade. Dieser Botenstoff übermittelt die meisten der profibrotischen Signale dieses Zytokins. Aufgrund der vielseitigen TGF- β -Wirkungen bringt eine direkte Inhibierung zur Prävention oder Therapie einer Fibrose viele unerwünschte Wirkungen mit sich. Eine Hemmung des profibrotischen Signalmoleküls Smad3 erscheint hier von Vorteil, um eine Inhibierung anderer erwünschter TGF- β -Signalkaskaden auszuschließen. Es wurde von verschiedenen Mechanismen zur Inhibierung des Smad3 in der Literatur berichtet. Die antifibrotische Wirkung des Interferon- α (INF- α) bei der Behandlung der chronischen Hepatitis C ist auf eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT1 zurückzuführen, der konsekutiv mit aktiviertem Smad3 um die begrenzte Menge des Co-Transkriptionsfaktors CBP/p300 konkurriert. So vermindert INF- α die basale und TGF- β -induzierte Aktivität des Smad3-abhängigen Kollagenpromoters COL1A2 (Inagaki, Nemoto et al. 2003). Springer und Kollegen untersuchten pulmonales Biopsiematerial von COPD-Patienten und stellten eine verminderte Expressionsrate der beiden inhibitorischen Smads 6 und 7 fest. Andere Smad-Proteine waren davon nicht beeinflusst (Springer, Scholz et al. 2004). In verschiedenen Fibrosetiermodellen konnte durch eine erhöhte Smad7-Expression die Fibrogenese abgeschwächt oder eine vorhandene Fibrose in ihrer Ausprägung vermindert werden (Nakao, Fujii et al. 1999; Terada, Hanada et al. 2002; Dooley, Hamzavi et al. 2003; Lan, Mu et al. 2003; Hou, Wang et al. 2005; Guo, Leung et al. 2007; Ka, Huang et al. 2007; Nie, Hao et al. 2007; Saika, Yamanaka et al. 2007). Auch ist von mehreren Substanzen wie Halofuginone, INF- γ , 17 β -Estradiol, Epigallocatechin, Perindopril und Valsartan bekannt, dass ihre antifibrotischen Wirkungen *in vivo* über eine Verstärkung der Smad7-Expression vermittelt werden (Tachikawa, Kodama et al. 2003; Xavier, Piek et al. 2004; Xu, Song et al. 2006; Dixon and Maric 2007; Meng, Li et al. 2007; Wang, Ziyadeh et al. 2007). *In vivo* Untersuchungen in Smad3-Knockout-Mäusen wiesen auf eine protektive Wirkung

des Smad3-Mangels bei künstlich induzierten Fibrosen hin (Schnabl, Kweon et al. 2001; Flanders, Sullivan et al. 2002; Zhao and Geverd 2002; Fujimoto, Maezawa et al. 2003; Inazaki, Kanamaru et al. 2004). Zusätzlich zeigten *in vitro* Untersuchungen in fibroblastischen Zellkulturen, dass die ECM beeinflussenden Gene von Kollagen (Vindevoghel, Lechleider et al. 1998; Verrecchia, Chu et al. 2001), PAI-1 (Piek, Ju et al. 2001) und TIMP-1 (Verrecchia, Chu et al. 2001) via Smad3 transduziert werden. Darüber hinaus spielt das Smad3-Protein eine bedeutende Rolle für die Migration von Fibroblasten und Entzündungszellen sowie die TGF- β -Autoinduktion in Fibroblasten (Piek, Ju et al. 2001; Cutroneo and Phan 2003; Flanders, Major et al. 2003; Rivera Gil 2007). Hu und Wu konnten in Lungenfibroblasten aus der Ratte nachweisen, dass auch die α -SMA-Expression nach Stimulation mit TGF- β Smad3-sensitiv ist (Hu, Wu et al. 2003). Sebe und Kollegen zeigten eine Smad3-Abhängigkeit in der α -SMA-Expression in renalen Tubuluszellen (Sebe, Leivonen et al. 2008). Dem Smad3-Protein kommt folglich eine bedeutende Rolle im Differenzierungsprozess zu. Interessanterweise veröffentlichten Piek und Kollegen, dass die Bildung von Fibronectin in murinen dermalen Fibroblasten weder über Smad2 noch über Smad3 transduziert wird (Piek, Ju et al. 2001), obwohl die ED-A-Domäne des Fibronectins eine notwendige Bedingung für die α -SMA-Induktion in humanen dermalen Fibroblasten darstellt (Serini, Bochaton-Piallat et al. 1998). Uemura und Kollegen kamen zu konträren Ergebnissen. Sie fanden eine Smad3-Abhängigkeit für die Fibronectininduktion in hepatischen Stellazellen, die als Myofibroblasten der Leber aufgefasst werden können (Uemura, Swenson et al. 2005). Teilweise wurden auch Daten publiziert, die einen Smad3-unabhängigen Differenzierungsprozess beschreiben. Evans und Kollegen stellten in Lungenfibroblasten fest, dass eine Smad2-Überexpression, aber eben nicht Smad3, die Neosynthese des α -SMA positiv beeinflusste (Tomasek, Gabbiani et al. 2002; Evans, Tian et al. 2003). Inzwischen wurden in der Literatur noch von weiteren Signalkaskaden berichtet, die unabhängig von der Smad-Kaskade zur Induktion der α -SMA-Bildung führten. Darunter fallen auch die Untersuchungen von Ramirez und Kollegen, die in pulmonalen Smad3-Knockout-Fibroblasten und den entsprechenden Wildtyp-Zellen sowohl eine Smad3-abhängige als auch eine Smad3-unabhängige Erhöhung der α -SMA gefunden hatten (Ramirez, Shen et al. 2006). Allerdings waren die Smad3-unabhängigen Effekte deutlich schwächer ausgeprägt und wurden über eine

weitere TGF- β typische Signalkaskade, die der MAPK, vermittelt. Bei den Untersuchungen von Ramirez und Kollegen war eine Beteiligung des Smad2-Proteins nicht auszuschließen (Ramirez, Shen et al. 2006). Ergänzend wurden weitere Experimente mit Smad3-Knockout-Fibroblasten von einer anderen Gruppe publiziert. Wilkes und Kollegen transfizierten Smad3-Knockout-Fibroblasten zusätzlich noch mit einem dominant negativen Smad2-Gen. Nach einer TGF- β -Stimulation exprimierten diese Zellen vermehrt α -SMA. Nachfolgende Untersuchungen zeigten eine Involvierung der PI3K mit anschließender Aktivierung der p21-aktivierten Kinase-2 (Wilkes, Mitchell et al. 2005). Die Smad-unabhängige Transkription des α -SMA in Fibroblasten wurde über das sogenannte TGF- β -Kontroll-Element vermittelt (Roy, Nozaki et al. 2001; Tomasek, Gabbiani et al. 2002), welches zusammen mit der TGF- β -hypersensitiven Region als Bindungsstelle für die Transkriptions-Aktivatorproteine Sp1/2 diente (Cogan, Subramanian et al. 2002; Subramanian, Polikandriotis et al. 2004). Diese Quellen stellen die alleinige Bedeutung des Smad3 in der TGF- β -vermittelten Differenzierung in Frage und zeigen alternative Signaltransduktionswege auf. Da die große Bedeutung des Smad3 in profibrotischen Prozessen unbestreitbar bleibt, wurde im Folgenden der Einfluss dieses R-Smad-Proteins auf die TGF- β -induzierten α -SMA-Expression in primären dermalen Fibroblasten überprüft.

4.1.7.1 TGF- β

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen eine Smad3-Abhängigkeit der TGF- β -vermittelten α -SMA-Induktion in humanen Fibroblasten. Eine Verminderung der Smad3-Expression mit spezifischen Smad3-ASO schwächte die TGF- β -Wirkung in diesen Zellen ab. Ob die verbleibende Induktion über das restliche Smad3 vermittelt wurde, ließ sich aus diesem Versuchsaufbau nicht ableiten. Zur Klärung dieses Sachverhalts wurde ein analoges Experiment in murinen dermalen Smad3-Knockout-Fibroblasten durchgeführt. Diese Zellen waren nicht mehr zur de novo Synthese des α -SMA nach einer Applikation des Zytokins befähigt. Allerdings war in den unstimulierten Zellen eine geringe basale Expression des Aktins

nachweisbar. Es bestätigten sich hier die Ergebnisse von Hu und Wu (Hu, Wu et al. 2003). Sie stehen dagegen im Kontrast zu den Daten von Wilkes et al. und Ramirez et al. (Wilkes, Mitchell et al. 2005; Ramirez, Shen et al. 2006). Diese Unterschiede könnten einerseits auf verschiedene Smad2- und Smad3-Funktionen zurückzuführen sein (Liu, Gaca et al. 2003), die vom Level der Myofibroblastendifferenzierung abhängen könnte. Andererseits könnte Smad3 als Regulator weiterer Transkriptionsfaktoren und nicht als essentielles Signaltransduktionsprotein aufgefasst werden (Hinz 2007). Folglich könnte es auch in seiner Funktion ersetzt werden, was durch verschiedene Faktoren wie Zellherkunft, Kultivierungsbedingungen und Passageanzahl beeinflussbar wäre. Die murinen Smad3-Knockout-Fibroblasten, die von Wilkes untersucht wurden, stellten embryonale Zellen dar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass eine Smad-unabhängige TGF- β -vermittelte α -SMA-Induktion in embryonalen Zellen denkbar ist, aber nicht in adulten Fibroblasten. Allerdings stellten Ramirez und Mitarbeiter in murinen Fibroblasten keinen Unterschied zwischen embryonalen und adulten Fibroblasten aus der Trachea fest. Abschließend lässt sich feststellen, dass es weiterer Untersuchungen bedarf, um die Faktoren zu identifizieren, die eine Smad-unabhängige α -SMA-Induktion nach TGF- β -Applikation ermöglichen oder verhindern können.

4.1.7.2 FTY720 und S1P

In unserem Arbeitskreis wurde bereits eine Smad3-Abhängigkeit der S1P-vermittelten Induktion des profibrotischen PAI-1 nachgewiesen (Schraut 2007). Daneben erwies sich die Induktion des ebenfalls profibrotischen Signalmoleküls CTGF nach FTY720-Stimulation als Smad-abhängiger Prozess (Xin, Ren et al. 2006). Die Bedeutung des Rezeptor-Smad3-Proteins bei TGF- β -verursachter Myofibroblastendifferenzierung wurde überprüft und kann in den hier verwendeten Fibroblasten als gesichert betrachtet werden. Da eine Phosphorylierung des Smad3-Proteins und eine Signaltransduktion via Smad-Proteine durch den Lipidmediator S1P bereits in unserem Arbeitskreis nachgewiesen wurde (Sauer 2003),

schloss sich eine Untersuchung der Smad-Aktivierung durch FTY720 in humanen dermalen Fibroblasten an. In einem Immunpräzipitationsexperiment führte eine FTY720-Stimulation zur Bildung eines funktionellen Rezeptor-Smad/Co-Smad-Komplexes. Diese Oligomerbildung deutet auf eine Aktivierung des Smad-Signalwegs durch diesen Wirkstoff hin. Die Daten sind kongruent mit den Ergebnissen von Xin und Kollegen, die in renalen Mesangiumzellen ebenfalls eine Aktivierung der Smad-Kaskade festgestellt hatten (Xin, Ren et al. 2006). Darauf wurde die Bedeutung des Smad3-Signaltransduktionsproteins in der S1P- bzw. FTY720-vermittelten α -SMA-Neubildung untersucht. Es ergab sich ein analoges Bild zum TGF- β -Versuch. Beide Substanzen führten in zuvor mit Smad3-ASO behandelten Fibroblasten nur noch zu einer verminderten Myofibroblastendifferenzierung. Das lag wahrscheinlich auch hier an der nur partiellen Inhibierung des Smad3-Proteins. Deswegen erfolgte im Anschluss daran eine Testung der Substanzen in murinen Smad3-Knockout-Fibroblasten, die dieses Rezeptor-Smad nicht mehr exprimierten. Erwartungsgemäß waren die Knockout-Zellen nicht mehr in der Lage nach einer S1P- oder FTY720-Applikation α -SMA vermehrt zu synthetisieren. Urata und Kollegen hatten für die α -SMA-Induktion einen anderen Signalweg aufgezeigt. Die Applikation des Rho-Kinase-Inhibitors Y-27632 hemmte den S1P-vermittelten Differenzierungsprozess (Urata, Nishimura et al. 2005). Rho-Kinasen sind Serin/Threonin-Kinasen und gehören zur Superfamilie der Ras-Kinasen. Sie haben Bedeutung bei der Veränderung des Zytoskeletts und der Ausbildung von Stressfasern. In Mesangiumzellen konnte nachgewiesen werden, dass das Aktinskelett die α -SMA-Promoter-Aktivität und konsekutiv auch die Proteinexpression reguliert (Patel, Harding et al. 2003). Eine aktuelle Publikation der gleichen Gruppe beschreibt auch in der TGF- β -vermittelten α -SMA-Induktion eine Rho-Abhängigkeit (Kono, Nishiuma et al. 2007). Allerdings erfolgte nach TGF- β -Stimulation zuerst eine vermehrte Bildung des Lipidmediators S1P und nachfolgend wurde via Rho-Aktivierung die α -SMA-Expression erhöht (Kono, Nishiuma et al. 2007).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Smad3-Signaltransduktionsprotein eine deutliche Relevanz in der TGF- β - und auch in der S1P-Agonisten-vermittelten

Myofibroblastendifferenzierung zeigte, wobei die Beteiligung anderer Signalwege als wahrscheinlich gilt.

4.2 Die Induktion der CTGF-mRNA in humanen dermalen Fibroblasten

CTGF gehört zu der Familie der CCN-Proteine und wird durch TGF- β induziert. Es ist auch unter dem Namen IGFBP-8 bekannt, weil es über eine IGF-bindende Domäne verfügt. CTGF ist assoziiert mit ECM-Proteinen und ist an der Regulation vieler vitaler Prozesse (z. B. Wundheilung und Angiogenese) maßgeblich beteiligt. Ihm kommt jedoch auch eine große Bedeutung hinsichtlich bestimmter pathologischer Prozesse (z. B. Fibrosen und Tumorerkrankungen) zu. CTGF ist vermehrt bei verschiedenen fibrotischen Erkrankungen exprimiert (Igarashi, Nashiro et al. 1995; Ito, Aten et al. 1998; Paradis, Dargere et al. 1999; Pan, Yamauchi et al. 2001; Way, Isshiki et al. 2002; Kantarci, Black et al. 2006; Gressner, Weiskirchen et al. 2007; Manetti, Neumann et al. 2007; Lang, Sauter et al. 2008) und mehrere Publikationen wiesen nach, dass dieser Wachstumsfaktor einen „Downstream-Mediator“ des TGF- β im fibrotischen Geschehen darstellt (Frazier, Williams et al. 1996; Kothapalli, Hayashi et al. 1998; Duncan, Frazier et al. 1999; Yokoi, Sugawara et al. 2001; Weston, Wahab et al. 2003; Grotendorst, Rahmanie et al. 2004; Qi, Twigg et al. 2005). Der Wachstumsfaktor spielt aber nicht nur eine Rolle als „Second Messenger“ des TGF- β , sondern er führt ebenfalls zu einer Verstärkung der profibrotischen Signale des TGF- β . Aus diesem Grund sah man in der Inhibierung des CTGF eine Behandlungsoption von Fibrosen. Zurzeit existiert eine Phase-I-Studie, die die Sicherheit des humanen monoklonalen Anti-CTGF-Antikörpers FG-3019 in Patienten mit pulmonaler Fibrose genauer untersucht hat (Mageto, Flaherty et al. 2004). Die vielversprechenden Ergebnisse dieser Studien machen deutlich, dass die vermehrte CTGF-Expression eine große Bedeutung in der Fibrogenese hat.

4.2.1 Bestätigung der CTGF-Induktion durch TGF- β

Als Positivkontrolle für die CTGF-Induktion wurde TGF- β eingesetzt, was in einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellen die CTGF-Bildung erhöht (Igarashi, Okochi et al. 1993; Grotendorst 1997). In der Literatur ist eine Zeit- sowie Konzentrationsabhängigkeit der TGF- β -vermittelten CTGF-Bildung in humanen Fibroblasten beschrieben (Igarashi, Okochi et al. 1993; Kucich, Rosenbloom et al. 2001). Das Besondere an der TGF- β -vermittelten CTGF-Expression ist die lang anhaltende Induktion von bis zu 36 h. In der vorliegenden Arbeit bestätigte sich sowohl die Konzentrations- als auch die Zeitabhängigkeit des TGF- β -verursachten Effekts. Allerdings ist anzumerken, dass in der Literatur bereits nach 15 bis 30 min Stimulationsdauer ein deutlicher Effekt zu sehen war (Igarashi, Okochi et al. 1993; Kucich, Rosenbloom et al. 2001). In den hier verwendeten Zellen konnte dies nicht bestätigt werden. Mit TGF- β behandelte Zellen zeigten nach 30 min die erste, aber nicht signifikante Zunahme der CTGF-mRNA-Expression. Erst nach 3 h ließ sich eine signifikante Induktion nachweisen, die dann im weiteren Verlauf zunahm. Zum einen könnte das an der niedrigen TGF- β -Konzentration von 1 ng/ml gelegen haben, zum anderen enthielt das von Kucich verwendete Basalmedium noch 1% FKS. Igarashi machte keine Angaben, ob die Fibroblastenkultur vor der Stimulation mit Basalmedium inkubiert wurde. TGF- β führt zur Autoinduktion, so dass sich durch das im FKS enthaltene TGF- β die eigene Konzentration im Zellmedium erhöhen kann. Dieses könnte die verzögerte Wirkung des Wachstumsfaktors erklären. In dieser Arbeit wurde der Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1,0 ng/ml TGF- β untersucht. Ab einer Konzentration von 0,1 ng/ml führte der Wachstumsfaktor zu einer signifikanten Zunahme der CTGF-mRNA-Synthese. Andere Gruppen arbeiteten meist mit 1 bis 10 ng/ml TGF- β (Igarashi, Okochi et al. 1993; Kucich, Rosenbloom et al. 2001) und erzielten dadurch stärkere Effekte. Die maximale TGF- β -Konzentration wurde analog der zur α -SMA-Induktion genutzten Konzentration in dieser Arbeit ausgewählt.

4.2.2 Die CTGF-mRNA-Bildung durch den Lipidmediator S1P

Neben TGF- β erhöht auch der Lipidmediator S1P die CTGF-mRNA-Synthese in glatten Muskelzellen (Chowdhury and Chaqour 2004), in der endothelialen Zelllinie EAHY 926 sowie in humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) (Muehlich, Schneider et al. 2004) und in Mesangiumzellen (Katsuma, Ruike et al. 2005). Das Sphingosin-Analogon FTY720 und sein aktiver Metabolit FTY720-P sind ebenfalls in der Lage die CTGF-Synthese in Mesangiumzellen zu erhöhen (Xin, Ren et al. 2006). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass S1P zur CTGF-Induktion auch in humanen dermalen Fibroblasten auf mRNA-Ebene befähigt ist. Diese Wirkung war von der Lipidmediatorkonzentration und der Stimulationsdauer abhängig ist. Der maximale Effekt konnte mit 10,0 μ M S1P nach 1 h erreicht werden und blieb bis mindestens 7 h bestehen. Nach 16 h wurden wieder basale Werte erreicht. Vergleicht man den Maximaleffekt in Fibroblasten mit dem Verhalten in glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Mesangiumzellen, stellt man bei allen fünf Zelltypen ein Maximum nach 1 bis 4 h Stimulationsdauer fest (Chowdhury and Chaqour 2004; Muehlich, Schneider et al. 2004; Katsuma, Ruike et al. 2005). Bei den Glattmuskelzellen fiel die CTGF-Menge nach 2 h wieder ab und unterschied sich nach 16 h nicht mehr von dem Wert der Negativkontrolle (Chowdhury and Chaqour 2004). Die Mesangiumzellen zeigten einen Maximaleffekt nach 2 h, der danach abfiel und nach 8 h wieder basale Werte erreichte (Katsuma, Ruike et al. 2005). In den endothelialen Zellen zeigte S1P eine transiente CTGF-mRNA-Induktion mit einem Peak nach 1 bis 2 h (Muehlich, Schneider et al. 2004). Die Kinetik der S1P-vermittelten CTGF-mRNA-Expression scheint somit in Fibroblasten, Mesangiumzellen und Glattmuskelzellen ähnlich zu verlaufen. Nur in Endothelzellen weicht der zeitliche Verlauf deutlich ab. Hier zeigte S1P nur eine sehr kurzfristige Induktion. Eine Konzentrationsabhängigkeit hinsichtlich der CTGF-mRNA-Synthese ist in allen Zelltypen gegeben. Allerdings unterscheidet sich die für den Maximaleffekt nötige S1P-Konzentration. Hier zeigt sich eine Besonderheit der Mesangiumzellen der Ratte, bei denen sich die Wirkung nur bis zu einer Konzentration von 5 μ M steigern ließ (Katsuma, Ruike et al. 2005). In allen anderen Zelltypen war dies bis zu einer Konzentration von 10 μ M möglich. Eigene Untersuchungen in murinen Fibroblasten

ergaben, dass eine Steigerung der S1P-Wirkung bis 1 μ M möglich war. Danach fiel das Ausmaß der Induktion wieder ab (Daten nicht gezeigt.). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die S1P-Konzentration des maximalen Effekts von der Spezies abhängt, weil unterschiedliche Zellen aus Nagetieren eine geringere Maximalkonzentration als humane oder bovine Zellen zeigten.

4.2.3 Beeinflussung der CTGF-Protein-Expression durch den Lipidmediator S1P

Nachdem S1P in der Lage war, die CTGF-mRNA signifikant in humanen dermalen Fibroblasten zu erhöhen, sollte geklärt werden, ob der Lipidmediator auch zu einer vermehrten CTGF-Proteinsynthese führt. S1P war im Gegensatz zu TGF- β nicht befähigt, die CTGF-Proteinexpression zu verstärken. Analysiert wurde das Zelllysate nach unterschiedlichen Stimulationszeiten. Da CTGF im Golgi-Apparat gespeichert und exozytotisch freigesetzt wird, könnte durch das Phospholipid eine erhöhte CTGF-Proteinbildung und verstärkte Sekretion erfolgen. Zum Nachweis dieser Hypothese müsste das Zellmedium und nicht das Zelllysate auf den CTGF-Gehalt untersucht werden. Da im Zellmedium häufig Verdünnungseffekte zum Tragen kommen, müsste eine Methode gewählt werden, die entweder zu einer Aufkonzentrierung des Proteins führt oder die sehr sensitiv ist. Abschließend kann nur festgehalten werden, dass S1P zwar im Zelllysate nicht die CTGF-Proteinmenge erhöht, aber es können noch keine Aussagen über die Verhältnisse im Zellmedium gemacht werden.

4.2.4 Rezeptorbeteiligung

Viele seiner Wirkungen vermittelt S1P über seine fünf verschiedenen Rezeptorsubtypen. Alle S1P-Rezeptorsubtypen sind membranständige G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Als Kopplungspartner kommen die verschiedenen G-Proteine in Frage, wobei alle Rezeptorsubtypen über das G $_{\alpha i}$ -Protein transduzieren können. S1P erhöhte die CTGF-mRNA-Expression und die α -SMA-Synthese in humanen Fibroblasten. Die erhöhte α -SMA-Induktion durch FTY720 und S1P wurde über

$G_{\alpha i}$ -Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt, so dass im Folgenden auf die Beteiligung dieses Kopplungspartners mit dem $G_{\alpha i}$ -Protein-Inhibitor PTX getestet wurde. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigten eine Teilabhängigkeit der Signaltransduktion von $G_{\alpha i}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Daten von Muehlich et al. 2004 und Katsuma et al. 2005, die eine Beteiligung von $G_{\alpha i}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren in humanen Endothelzellen bzw. Mesangiumzellen der Ratte ausgeschlossen hatten (Muehlich, Schneider et al. 2004; Katsuma, Ruike et al. 2005). Vielmehr wird in den Endothelzellen eine Signaltransduktion via $G_{\alpha q}$ - und $G_{\alpha 12/13}$ -Proteine postuliert (Muehlich, Schneider et al. 2004). Katsuma macht einen $G_{\alpha 12}$ -Protein gekoppelten Rezeptor für die S1P-induzierte CTGF-Expression in Mesangiumzellen verantwortlich (Katsuma, Ruike et al. 2005). Eine Beteiligung anderer G-Proteine kann auch in humanen Fibroblasten nicht ausgeschlossen werden, weil die Inkubation mit PTX nur zu einer teilweisen Hemmung führte. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um die beteiligten G-Proteine genau bestimmen zu können. Anders als S1P zeigte TGF- β in Gegenwart des $G_{\alpha i}$ -Protein-Inhibitors eine schwache Zunahme seiner Wirkung hinsichtlich der CTGF-Expression, die sich allerdings als nicht signifikant erwies.

S1P vermittelt einige seiner profibrotischen Effekte, wie die Induktion von α -SMA oder PAI-1 über PTX-sensitive Rezeptoren. Diese Effekte werden zumindest in Teilen über den S1P₃ transduziert. Darüber hinaus ist bekannt, dass das S1P-Analogon FTY720-P die Erhöhung der CTGF-RNA in Mesangiumzellen über den S1P₃ transduziert (Xin, Ren et al. 2006). Dies führte dazu, dass im Weiteren der Nachweis einer Beteiligung dieses Subtyps in entsprechenden murinen Knockout-Fibroblasten erbracht wurde. In der Literatur wurde dem S1P₃ ebenfalls eine Bedeutung in der S1P-vermittelten CTGF-Synthese zugeschrieben (Katsuma, Ruike et al. 2005). Allerdings zeigte diese Arbeitsgruppe auch, dass nicht nur der S1P₃, sondern auch der S1P₂ an der Signaltransduktion beteiligt ist. Da die Experimente in S1P₃-Knockout-Fibroblasten nur in einer partiellen Inhibierung resultierten, liegt die Vermutung nahe, dass dieser Subtyp auch in humanen Fibroblasten diese S1P-Wirkung vermittelt. Allerdings werden dem S1P₂ teils gegensätzliche Effekte zugeschrieben. Die promigratorische S1P-Wirkung wird über die Rezeptorsubtypen S1P₁ und S1P₃ vermittelt, wobei der S1P₂ die gerichtete

Chemokinese hemmt (Takuwa, Takuwa et al. 2002; Rivera Gil 2007). Um die Bedeutung des S1P₂ in der S1P-vermittelten CTGF-Synthese in humanen Fibroblasten erkennen zu können, bedarf es weiterer Experimente.

4.2.5 Signaltransduktion

In der Literatur wird eine Vielzahl an Signaltransduktionswegen zur Induktion des CTGF diskutiert. Der sehr gut untersuchte CTGF-Induktor TGF- β führt über eine Aktivierung der Smad-Kaskade (Holmes, Abraham et al. 2001; Leivonen, Hakkinen et al. 2005; Pannu, Nakerakanti et al. 2007), des MAPK-Signalwegs (Stratton, Rajkumar et al. 2002; Leask, Holmes et al. 2003; Zhao, Chen et al. 2004; Leivonen, Hakkinen et al. 2005; Pannu, Nakerakanti et al. 2007) und der kleinen Rho-GTPase RhoA (Heusinger-Ribeiro, Eberlein et al. 2001) zu einer erhöhten CTGF-Expression. Allerdings wurde auch berichtet, dass der Zusatz verschiedener MAPK-Inhibitoren zu einer TGF- β -Stimulation die CTGF-Expression in Fibroblasten nicht beeinflusste (Heusinger-Ribeiro, Eberlein et al. 2001) oder sogar verstärkte (Chen, Lam et al. 2000). Die Mutation des Smad-Bindungselements des CTGF-Promoters in Mesangiumzellen inhibierte die TGF- β -vermittelte CTGF-Induktion vollständig (Chen, Blom et al. 2002). Zusätzlich waren Ras/MEK/Erk und PKC maßgeblich an der Regulation beteiligt (Chen, Blom et al. 2002). Eine Erhöhung der CTGF-Synthese durch TGF- β , die Smad3-unabhängig erfolgt, ist bis dato nur in einer Art von Fibroblasten beschrieben worden. Dabei handelt es sich um Zellen, die aus fibrotischen Läsionen der Haut von Sklerodermie-Patienten isoliert wurden. Von den Autoren wird dieser Sachverhalt als eine pathologische Veränderung des Signalwegs bei dieser Erkrankung interpretiert (Pannu, Nakerakanti et al. 2007). Auch in der S1P- bzw. FTY720-P-vermittelten CTGF-mRNA-Synthese sind der MAPK-Signalweg (Chowdhury and Chaqour 2004), die Smad-Kaskade (Katsuma, Ruike et al. 2005; Xin, Ren et al. 2006) und die kleine Rho-GTPase RhoA (Chowdhury and Chaqour 2004; Muehlich, Schneider et al. 2004; Katsuma, Ruike et al. 2005) beteiligt. Da in dieser Arbeit vorrangig die Bedeutung des Smad-Signalwegs im fibrotischen Geschehen durch S1P-Agonisten untersucht wurde, konzentrierten sich die Experimente auf eine Beteiligung des profibrotischen Smad3. Untersuchungen in Smad3-Knockout-Fibroblasten wiesen eine eindeutige Abhängigkeit

von diesem Reporter-Smad-Protein nach. Somit konnte zum einen für TGF- β eine Smad3-Abhängigkeit der CTGF-Induktion in Fibroblasten bestätigt werden. Zum anderen wurde für den Phospholipidmediator S1P erstmals in Fibroblasten eine Smad3-Abhängigkeit der CTGF-Expression nachgewiesen. Allerdings erscheint es aufgrund vieler Publikationen als unwahrscheinlich, dass die Smad-Kaskade den einzigen Signaltransduktionsweg darstellt, der zur CTGF-Induktion führt. Vielmehr sollte die Transduktion via Smad-Proteine als notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung aufgefasst werden. Weitere Untersuchungen sollten vor allem eine Abhängigkeit der kleinen GTPase RhoA und der verschiedenen MAPK überprüfen.

4.3 Der Einfluss verschiedener Co-Stimulationen

Die Induktion einer Fibrose stellt einen komplexen Prozess dar, der durch ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren getragen wird. Unter anderem gehören verschiedene profibrotische Wachstumsfaktoren zu den Fibrose begünstigenden Faktoren (Hetzl, Bachem et al. 2005). Verstanden ist die Fibrogenese nur in Teilen und es bedarf weiterer Forschung, um das Krankheitsgeschehen in seiner Komplexität erfassen zu können. Weitestgehend herrscht Einigkeit darüber, dass zu Beginn einer fibrotischen Erkrankung häufig ein entzündlicher Prozess oder eine Autoimmunreaktion im betreffenden Organ stattfindet. Dabei wandern aktivierte Immunzellen und Fibroblasten in das Gewebe ein und sezernieren verschiedene Botenstoffe, die zu einer Regeneration des verletzten Gewebes beitragen. Ist der Heilungsprozess abgeschlossen, erfolgt der schnelle Abbau durch Proteasen und es kommt zur Apoptose der Mediatoren freisetzenden Leukozyten und Myofibroblasten. In fibrotischen Geweben unterbleibt diese Abbruchreaktion, so dass es konsekutiv zur überschießenden Wundheilung, einer Fibrose, kommt. Die an der Wundheilung, aber auch an der Fibrogenese beteiligten Wachstumsfaktoren wirken chemotaktisch auf Neutrophile, Makrophagen und auch Fibroblasten. Sie stimulieren die Fibroblastenproliferation und fördern die Synthese von ECM-Proteinen wie z. B. Kollagen. Ebenso wirken sie auf die beteiligten Zellen antiapoptotisch und verhindern so bei einer Fibrose die Wiederherstellung der physiologischen Gewebshomöostase. Die folgend erwähnten Mediatoren kommen in

erhöhten Konzentrationen in fibrotischen Geweben vor und es wird ihnen ein fibrogenes Potential zugeschrieben. Die größte Bedeutung kommt zweifelsfrei dem TGF- β zu, aber auch andere Wachstumsfaktoren FGF, EGF, IGF-1, IGF-2 und PDGF können die Fibrogenese verstärkend beeinflussen (Hetzel, Bachem et al. 2005). Grotendorst und Kollegen wiesen eine interessante Interaktion hinsichtlich der Myofibroblastenbildung und der Fibroblastenproliferation zwischen TGF- β und EGF bzw. IGF-2 in NRK-49D-Zellen nach (Grotendorst, Rahmanie et al. 2004). Obwohl das Zellwachstum und der Differenzierungsprozess zwei sich einander ausschließende biologische Wege darstellen, führt die TGF- β -Applikation zu beiden Effekten. Grotendorst et al. postulierten, dass es von der Präsenz weiterer Faktoren abhängt, welche Wirkung in der einzelnen Zelle erzielt werde. Sie konnten nachweisen, dass die zusätzliche Applikation von EGF die Differenzierung hemmte, aber die Proliferationsrate erhöhte (Grotendorst, Rahmanie et al. 2004). Eine Co-Stimulation mit IGF-2 potenzierte die Myofibroblastenbildung, verminderte aber das Wachstum. Untersuchungen in dieser Arbeit bestätigten die Wirkungen der Co-Stimulationen der beiden Wachstumsfaktoren mit TGF- β in primären dermalen Fibroblasten hinsichtlich des differenzierenden Effekts. Experimente zur Beeinflussung des Proliferationsverhaltens wurden nicht durchgeführt, weil EGF und IGF-2 in den hier verwendeten Zellen im Gegensatz zu der NRK-49D-Zelllinie selbst schon mitogen wirken. Weitere Experimente zeigten, dass diese Interaktion der Wachstumsfaktoren EGF bzw. IGF-2 nicht ausschließlich mit TGF- β erfolgte, sondern auch mit dem differenzierenden Lipidmediator S1P. Durch den Zusatz des jeweiligen Wachstumsfaktors ließ sich die Wirkung des Lysophospholipids analog dem TGF- β modulieren. EGF führte zu einer Verminderung, IGF-2 erhöhte die α -SMA-Neosynthese in Gegenwart des S1P. Grotendorst et al. erklärten diese Effekte über einen „Second Messenger“ des TGF- β , das CTGF, welcher mit EGF oder IGF-2 interagiere und nachfolgend die fördernde oder hemmende Wirkung vermittele (Grotendorst, Rahmanie et al. 2004). Weder die zusätzliche Applikation von EGF noch IGF-2 beeinflusste die CTGF-Bildung in NRK-49D (Grotendorst, Rahmanie et al. 2004). Es wurde überprüft, ob TGF- β und auch S1P zur Induktion des CTGF befähigt waren. TGF- β erhöhte sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene die Bildung dieses Mediators. Zwar führte S1P auf mRNA-Ebene ebenfalls zu einer starken Induktion, aber auf Protein-Ebene war zumindest im Zelllysate kein CTGF nachweisbar,

so dass eine Signaltransduktion des Lipidmediators über diesen „Second Messenger“ als unwahrscheinlich erschien. Möglich erscheint eine Interaktion über das Signalprotein Smad3.

4.3.1 EGF

EGF vermittelt seine Wirkungen über membranständige spezifische Rezeptor-Tyrosinkinasen und aktiviert vor allem den Ras-MAPK-Signalweg. Zusätzlich transduziert dieser Wachstumsfaktor auch über den STAT-Signalweg und beeinflusst unter anderen die Öffnungswahrscheinlichkeit von Kalium-Kanälen (Bowlby, Fadool et al. 1997; Hackel, Zwick et al. 1999). In der Literatur sind eine Vielzahl von Wechselwirkungen mit anderen Signalwegen und Mediatoren beschrieben worden (Hackel, Zwick et al. 1999). Der EGF-Rezeptor wird zum Beispiel durch das Lysophospholipid LPA aktiviert und ist essentiell an dessen Signaltransduktion beteiligt (Daub, Weiss et al. 1996). Eine direkte Interaktion des S1P-Systems und des EGF-Signalwegs ist durch die S1P-vermittelte EGF-Rezeptor-Aktivierung mit sich anschließender Erk-Phosphorylierung in Rattenfibroblasten beschrieben worden (Kim, Kim et al. 2000). Des Weiteren besitzt EGF die Fähigkeit zur Aktivierung der SphK 1 und 2 in verschiedenen Zelltypen (Hait, Sarkar et al. 2005; Sarkar, Maceyka et al. 2005; Paugh, Paugh et al. 2008) und S1P führte in Glattmuskelzellen zu einer Erhöhung der EGF-Rezeptorexpression (Hsieh, Sun et al. 2007). Die genannten Wechselwirkungen resultierten allerdings nicht in einer Abnahme des untersuchten Effekts und kommen als Erklärung für die Hemmung des S1P-Effektes nicht in Frage.

Weiterhin ist eine Interaktion zwischen EGF und Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie auf der Ebene der Smad-Aktivierung bekannt. Der Wachstumsfaktor ist in der Lage über eine Aktivierung der verschiedenen MAPK die Signaltransduktion via Smad-Proteine zu modulieren. Dabei kann es sowohl zu inhibierenden als auch zu potenzierenden Wirkungen kommen. Beispielsweise ist für das Smad3-Protein eine Phosphorylierung am Ser207, Ser203 und Thr178 nach einer Stimulation mit EGF in Fibroblasten bekannt geworden, die zu einer Hemmung von Smad3-transduzierten Prozessen führte (Matsuura, Wang et al. 2005). Eine Aktivierung der EGF-Rezeptor-Tyrosin-Kinase führte ebenfalls zu einer Phosphorylierung des Smad1-

und Smad2/3-Proteins, was die Signalweiterleitung über das jeweilige Rezeptor-Smad in Epithelzellen abschwächte (Kretzschmar, Doody et al. 1997; Kretzschmar, Doody et al. 1999). Neben der Inhibierung von Rezeptor-Smad-Proteinen sind die Erhöhung von inhibitorischen Smads und Stabilisierung von Smad-Co-Repressors (z. B. Transforming Growth Factor-beta Induced Factor, TGIF) als negativ regulierende Wirkungen beschrieben worden (Afrakhte, Moren et al. 1998; Lo, Wotton et al. 2001). Gegenteilig zu der inhibierenden Wirkkomponente steht die Aktivierung von Smad2-abhängigen Reporter-Genen in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 (de Caestecker, Parks et al. 1998), die Stabilisierung des T β RII in Prostataadenokarzinomzellen (Song, Krebs et al. 2006) und die Erhöhung der T β RII-Expressionsrate in dermalen Fibroblasten (Yamane, Ihn et al. 2003) durch den Wachstumsfaktor selbst. Da in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, dass die α -SMA-Protein- und CTGF-mRNA-Induktion Smad-abhängige Prozesse darstellen und in der Literatur sowohl verstärkende als auch abschwächende Effekte auf die Smad-Signaltransduktion bekannt geworden waren, erscheint eine Inhibierung auf dieser Stufe der Signaltransduktion durch EGF als möglich und müsste in weiteren Experimenten untersucht werden.

4.3.2 IGF-2

Der Wachstumsfaktor IGF-2 bindet an die IGFR-I, IGFR-II, wobei die Affinität zum Subtyp I geringer ist als beim IGF-1. Bis vor kurzem wurde dem IGFR-II keine Bedeutung in der Signaltransduktion zugeschrieben. Vielmehr sah man seine Funktion im Abbau der beiden IGF-Subtypen. Eine aktuelle Publikation zeigte nun aber eine Erk-Aktivierung, die nach IGF-2-Stimulation über den IGFR-II erfolgte (El-Shewy, Lee et al. 2007). IGF-1 und IGF-2 sind in der Lage über eine Aktivierung der SphK den S1P-Gehalt zu erhöhen, wobei die Erk-Aktivierung nachfolgend über eine Aktivierung des S1P-Rezeptors erfolgt (El-Shewy, Johnson et al. 2006). IGF-1 zeigte eine inhibierende Wirkung auf S1P-Effekte in mit S1P₂ transfizierten CHO und humanen Keratinozyten (Okamoto, Takuwa et al. 2000; Kim, Kim et al. 2004). S1P konnte in der Brustkrebszelllinie MCF-7 IGF-2 induzieren (Goetzl, Dolezalova et al. 1999). Diese direkten Interaktionen zeigen Möglichkeiten von Wechselwirkungen auf, die aber den verstärkenden Effekt

auf die α -SMA-Bildung und die inhibierende Wirkung auf die CTGF-mRNA-Synthese nicht erklären können. Gegensätzliche Wirkungen der IGF-Subtypen auf die Smad-Proteinaktivität wurden immer in unterschiedlichen Zelltypen gezeigt. Da die konträr beeinflussten Prozesse beide über das Smad3 vermittelt wurden, erschien eine alleinige Beeinflussung dieses Rezeptor-Smads als unwahrscheinlich. Einerseits führte IGF-1 ebenfalls zu einer Hemmung von TGF- β -Wirkungen über eine Deaktivierung des Smad3-Transduktionsprotein (PI3K/Akt-Weg) in den Prostataepithelzelllinien NRP-152, NRP-154 und DP-153 (Song, Cornelius et al. 2003). Zusätzlich unterband IGF-2 während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* die BMP-Wirkung über eine Phosphorylierung des Smad1-Transkriptionsfaktors (Pera, Ikeda et al. 2003). Andererseits konnte in Estrogen-defizienten weiblichen Mäusen nach Zigarettenrauchexposition eine Verdopplung der TGF- β -, Smad3- und IGF-I-Rezeptor-mRNA festgestellt werden. Mesangiumzellen, die aus den oben genannten Mäusen isoliert wurden, zeigten eine Smad3-Aktivierung nach einer Stimulation mit IGF-1, die sich durch Applikation des PI3K-Inhibitors LY294002 inhibieren ließ (Elliot, Karl et al. 2006). Da bei der TGF- β -vermittelten Myofibroblastendifferenzierung zusätzlich eine Signaltransduktion über Smad2 (Evans, Tian et al. 2003), die p38 MAPK (Meyer-Ter-Vehn, Gebhardt et al. 2006; Ramirez, Shen et al. 2006) oder über die PI3K/p21 Kinase (Wilkes, Mitchell et al. 2005) erfolgen kann, könnte eine Beteiligung dieser Signaltransduktionswege auch in der S1P-vermittelten Differenzierung von Bedeutung sein. Gerade der PI3K-Signalweg könnte für eine Verstärkung des TGF- β - bzw. S1P-Effekts verantwortlich sein, weil IGF-1 diese Signalkaskade in fibroblastischen Zellen aktivieren kann (Yamamoto, Lapetina et al. 1992; Esposito, Blakesley et al. 1997; Kulik, Klippel et al. 1997; Ishihara, Yoshimoto et al. 2000; Mockridge, Benton et al. 2000; Chetty, Cao et al. 2006; Yu, Mace et al. 2007). Die Expression des CTGF-Gens wird über Smad3 (Holmes, Abraham et al. 2001; Leivonen, Hakkinen et al. 2005), Smad1 (Pannu, Nakerakanti et al. 2007), Erk (Pannu, Nakerakanti et al. 2007), PKC/ras/MEK/Erk (Leask, Holmes et al. 2003), PKA/ras/MEK/Erk (Stratton, Rajkumar et al. 2002) und Rho (Heusinger-Ribeiro, Eberlein et al. 2001) in verschiedenen mesenchymalen Zelltypen reguliert. Bei näherer Betrachtung der involvierten Signaltransduktionswege fällt auf, dass nur CTGF, aber nicht das α -SMA über das Rezeptor-Smad1 reguliert werden kann. Da in der

Literatur beschrieben wurde, dass IGF-2 das Smad1 deaktivieren kann, wäre die Verminderung der CTGF-Expression über die Annahme von funktionellen Smad1/Smad3-Co-Smad-Komplexen erklärbar. Dies würde allerdings die Zunahme der Myofibroblastendifferenzierung noch nicht erklären. Nimmt man nun noch an, dass IGF-2 in der Lage ist das Smad3 in humanen Fibroblasten zu aktivieren, wie es das IGF-1 in Mesangiumzellen der Maus tut, oder, wie oben schon genannt, die PI3K-Kaskade zu aktivieren, könnte so eine Erhöhung der α -SMA-Synthese erklärt werden. Die genannten Erklärungen stellen nur mögliche Wege dar; um den wahren Mechanismus dieser interessanten Wechselwirkung klären zu können, bedarf es selbstverständlich weiterer Forschung.

4.4 Bewertung des fibrotischen Potentials von FTY720 und S1P

FTY720 und der natürliche Lipidmediator S1P besitzen in Zellkultur die gleichen profibrotischen Eigenschaften. Bei beiden Substanzen erscheint eine Beteiligung an der fibrotischen Pathogenese als möglich. Das unterstreichen Experimente in einem Mausmodell der pulmonalen Fibrose, die zu dem Schluss kamen, dass α -SMA und die SphK1 in fibrotischen Foci vermehrt exprimiert werden (Kono, Nishiuma et al. 2007). Das veranlasste diese Gruppe den Einfluss des prominenten α -SMA-Induktors TGF- β auf die SphK1 und den S1P-Gehalt in der humanen Fibroblastenzelllinie WI-38 genauer zu untersuchen. Die Daten aus diesen Versuchen zeigten auf, dass TGF- β über die Induktion der SphK1 die S1P-Menge erhöht, welches über S1P₂ und S1P₃ unter Beteiligung der Rho-Kinase zur Myofibroblastendifferenzierung führt (Kono, Nishiuma et al. 2007). Geoffroy und Kollegen induzierten eine diabetische Nephropathie mit Streptomycin und fanden eine erhöhte Konzentration von S1P in betroffenen Glomeruli (Geoffroy, Troncy et al. 2005). Sie sahen darin eine Bedeutung in der glomerulären Proliferation in der Anfangsphase dieser fibrotischen Erkrankung. Im Gegensatz zu den profibrotischen Eigenschaften des natürlichen Lipidmediators steht seine Fähigkeit die Apoptose von hepatischen Myofibroblasten zu induzieren, was bei einer antifibrotischen Therapie erwünscht wäre (Davaille, Li et al. 2002). Dieser Widerspruch

macht deutlich, dass der Einfluss von S1P von verschiedenen Faktoren abhängt und es noch weiterer Forschung bedarf, um die genaue Funktion des S1P in der Pathologie von Erkrankungen des fibrotischen Formenkreises zu verstehen.

Der aktive Metabolit des FTY720 greift als potenter Agonist an vier der fünf S1P-Rezeptorsubtypen an (Brinkmann, Davis et al. 2002; Mandala, Hajdu et al. 2002). Somit besteht hier ebenfalls die Möglichkeit einer Fibroseinduktion. FTY720 befindet sich in der Phase III der Klinischen Prüfung zur Behandlung der schubförmig verlaufenden Multiplen Sklerose mit Remissionen. Frühere Klinische Prüfungen zeigten, dass der neue Wirkstoff zu einer Bradykardie via S1P₃ führen kann, aber bisher gibt es keine Verdachtsmeldungen über fibrotische Veränderungen im Tier oder Menschen. Zwar zeigten histologische Untersuchungen von Mäusen und Ratten keine Hinweise auf profibrotische Effekte des FTY720, allerdings wurden diese Tierstudien nur über eine bzw. drei Wochen durchgeführt (Tawadrous, Mabuchi et al. 2002; Suleiman, Cury et al. 2005). Aktuellere Untersuchungen wurden von Alperovich und Kollegen über vier Monate in einem SLE-Mausmodell durchgeführt (Alperovich, Rama et al. 2007). Auch diese Studie gab keine Hinweise auf profibrotische Wirkungen des neuen Immunmodulators *in vivo*. In einem Fibrosetiermodell wurde sogar von einer protektiven Wirkung des FTY720 nach einer Anti-Thy1-induzierten chronisch-progressiven Glomerulosklerose berichtet (Peters, Martini et al. 2004). Allerdings ist anzuführen, dass bei diesem Fibrosemodell die Induktion des Krankheitsprozesses via Lymphozyteninfiltration der Niere induziert wird, so dass die Applikation einer immunsuppressiven Substanz wie FTY720 an sich schon protektiv bei der Entstehung des Fibrosemodells auswirken könnte. Es ist auch noch nicht abschließend geklärt, welche Bedeutung den Lymphozyten in der Unterhaltung einer Fibrose zukommt. Bei der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Erkrankungen des fibrotischen Formenkreises zeigten Lymphozyten und Makrophagen eine Beteiligung nicht nur zu Beginn in der entzündlichen, sondern auch in der fibrotischen Phase (Burger, Rezzonico et al. 1998; Azouz, Razzaque et al. 2004). Andere Autoren sehen keine entscheidende Funktion von Immunzellen nach der anfänglichen Entzündungsreaktion bei vielen verschiedenen Fibrosen (Thannickal, Toews et al. 2004; Bonniaud, Margetts et al. 2005). Es bleibt abzuwarten für welchen Fibrosetyp Lymphozyten bei der fortgeschrittenen Pathogenese von Bedeutung sind.

Interessanterweise scheint FTY720 über einen weiteren direkt antifibrotischen Effekt zu verfügen. Brunati und Kollegen zeigten, dass FTY720 als funktioneller Antagonist die PDGF-BB-induzierte Proliferation und Migration von hepatischen Stellazellen hemmen konnte (Brunati, Tibaldi et al. 2008). Ob sich diese protektive Wirkung auch auf andere Zelltypen oder Tiermodelle übertragen lässt, bleibt abzuwarten. Zurzeit scheinen zwei andere unerwünschte Arzneimittelwirkungen den Einsatz des FTY720 zu limitieren. Bei höheren Dosen zeigte sich zum einen eine geringere Kreatininclearance und zum anderen wurde eine Schädigung des Auges in Form eines Makulaödems beschrieben (Salvadori, Budde et al. 2006; Tedesco-Silva, Pescovitz et al. 2006; Tedesco-Silva, Szakaly et al. 2007). Die Ursachen dieser Nebenwirkungen sind noch nicht bekannt und sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Tedesco-Silva und Kollegen konnten nephrotoxische Eigenschaften des FTY720 ausschließen und vermuten eine Beeinflussung der Filtereigenschaften im Glomerulum (Tedesco-Silva, Szakaly et al. 2007). Über den Mechanismus des Makulaödems ist noch nichts publiziert. Um das fibrotische Potential des neuen Immunmodulators abschließend bewerten zu können, bedarf es Langzeitbeobachtungen mit größeren Stichproben.

4.5 Ausblick

Da in Untersuchungen von Kono et al. nicht nur der S1P₃, sondern auch der S1P₂ in die α -SMA-Induktion involviert war, sollten weitere Experimente die Bedeutung des S1P₂ in diesem Kontext klären (Kono, Nishiuma et al. 2007). Auch ist die Beteiligung des S1P₂ an der CTGF-mRNA-Bildung durch S1P in primären dermalen Fibroblasten noch nicht untersucht. Katsuma et al. hatten eine Signaltransduktion via S1P₂ und S1P₃ in Mesangiumzellen der Ratte gefunden (Katsuma, Ruike et al. 2005). Interessanterweise koppelt der S1P₂ zwar an die gleichen Signalproteine wie der S1P₃, nach Aktivierung kann er allerdings zu umgekehrten Wirkungen führen (Gonda, Okamoto et al. 1999; Takuwa, Takuwa et al. 2002).

Im vorangestellten Teil dieser Arbeit wurden verschiedene mögliche Transduktionsmechanismen der Beeinflussung durch EGF oder IGF-2 diskutiert. EGF hemmte sowohl die TGF- β als auch die S1P-vermittelte Differenzierung sowie die CTGF-mRNA-Synthese. EGF könnte über eine Inaktivierung des Smad3-Proteins seine

hemmende Wirkung entfalten, so dass Experimente mit murinen Smad3-Knockout-Fibroblasten diese Hypothese testen könnten. Anders verhielt es sich beim IGF-2. Dieser Wachstumsfaktor verstärkte die α -SMA-Bildung und schwächte die CTGF-mRNA-Expression verursacht durch TGF- β oder S1P ab. Mögliche Angriffspunkte des IGF-2 könnten das Smad1 und Smad3, die PI3K darstellen. Mit spezifischen Inhibitoren oder Knockout-Zellen könnte eine Beteiligung der genannten Signalwege untersucht werden.

Nachdem eine TGF- β -Sekretion durch die S1P-Agonisten ausgeschlossen werden konnte, stellt sich immer noch die Frage nach der Beteiligung der T β R. Xin und Kollegen konnten zeigen, dass eine verminderte T β R-Expression die CTGF-Induktion inhibierte (Xin, Ren et al. 2006). So ist es von Interesse bei den profibrotischen Effekten der S1P-Agonisten die Bedeutung der T β R zu klären und bei Involvierung auf einen möglichen Rezeptor-Crosstalk zu testen.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

In verschiedenen Transplantations- und Autoimmunitätsmodellen erwies sich der neue Immunmodulator FTY720 als wirksam. Zurzeit befindet er sich in der Phase III der Klinischen Prüfung, um seine Wirksamkeit bei der schubförmig verlaufenden Multiplen Sklerose mit Remissionen nachzuweisen. FTY720 wird *in vivo* und *in vitro* zum Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-analogen FTY720-Phosphat (FTY720-P) aktiviert. Der aktive Metabolit bindet agonistisch an vier der fünf G-Protein gekoppelten S1P-Rezeptorsubtypen. Eine Interaktion zwischen S1P- und Transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) ist inzwischen gut charakterisiert. Da TGF- β ein bekannter Induktor der Myofibroblastendifferenzierung ist, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob auch FTY720 dazu befähigt ist. FTY720 führte zur Myofibroblastenbildung aus Fibroblasten, wobei das Ausmaß mit einer TGF- β -induzierten Differenzierung vergleichbar war. Um in seine aktive Wirkform überführt zu werden, wird FTY720 von der Sphingosinkinase zum aktivierten Metaboliten phosphoryliert. Eine Inhibierung der Sphingosinkinase verhinderte die Myofibroblastendifferenzierung durch FTY720. Darüber hinaus wurde der S1P₃-Rezeptorsubtyp als essentieller Rezeptor in der Signaltransduktion identifiziert, weil FTY720 in murinen S1P₃-Knockout-Fibroblasten keine Myofibroblastendifferenzierung mehr herbeiführen konnte. In Experimenten mit Smad3-Knockout-Fibroblasten konnte ein Transduktionsmechanismus über diesen Rezeptor-Smad nachgewiesen werden.

Das Sphingolysophospholipid S1P ist ebenfalls in der Lage, die Myofibroblastendifferenzierung in ähnlicher Weise zu induzieren. Zusätzlich führte eine S1P-Applikation in primären humanen Fibroblasten zur Induktion des Bindegewebswachstumsfaktors (CTGF), wobei die Inhibierung von G_{o*i*}-Protein gekoppelten Rezeptoren diesen S1P-Effekt abschwächte. Da die CTGF-Bildung für die TGF- β -induzierte Myofibroblastendifferenzierung benötigt wird und S1P-Agonisten ebenfalls zur Myofibroblastenbildung führen, wurde getestet, ob der S1P₃-Rezeptorsubtyp und auch das Smad3 involviert sind. In S1P₃- oder

Smad3-Knockout-Fibroblasten zeigte eine S1P-Stimulation nur noch eine deutlich verminderte Wirkung hinsichtlich der CTGF-mRNA-Bildung. Das zeigt, dass S1P die CTGF-Induktion teilweise über den S1P₃-Rezeptorsubtyp mit sich anschließender Smad3-Aktivierung transduziert.

Bei verschiedenen Fibrosen sind unterschiedliche Wachstumsfaktoren beteiligt, die die fibrotische Pathogenese verstärkend beeinflussen können. Der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und der Insulin-artigen Wachstumsfaktor 2 (IGF-2) können die TGF- β -vermittelte Myofibroblastendifferenzierung verschiedenartig modulieren. Da S1P-Agonisten die gleiche Signalkaskade bei diesem Prozess aktivieren, wurden verschiedene Co-Stimulationen untersucht. EGF verminderte und IGF-2 verstärkte die TGF- β - und S1P-vermittelte Myofibroblastenbildung. Die CTGF-mRNA-Bildung wurde auch durch EGF und IGF-2 beeinflusst. Interessanterweise verhinderten beide Wachstumsfaktoren die TGF- β - oder S1P-verursachte CTGF-Bildung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben erstmals die Myofibroblastendifferenzierung durch S1P und FTY720 in primären dermalen Fibroblasten. Darüber hinaus war der natürliche Lipidmediator S1P in der Lage, die CTGF-mRNA-Synthese zu induzieren. Die Transduktionsmechanismen beider Effekte wurden identifiziert und der Einfluss von Co-Stimulationen wurde untersucht.

5.2 Summary

The novel immunomodulator FTY720 is effective in experimental models of transplantation and autoimmunity, and is currently undergoing Phase III clinical trials for multiple sclerosis. After phosphorylation, FTY720, is a structural analogue of sphingosine-1-phosphate (S1P) and therefore acts as a high-affinity agonist at four of the five G protein-coupled S1P-receptors. It has been well established that there exists a crosstalk between S1P- and transforming growth factor β (TGF- β)-signalling. Furthermore, as TGF- β is the most prominent inductor of fibrosis, we proved the feature of FTY720 to induce differentiation of fibroblasts to myofibroblasts. Indeed, FTY720 provoked myofibroblast differentiation comparable to TGF- β . For biological efficacy, FTY720 required endogenous phosphorylation, since inhibition of sphingosine kinase

completely prevented the ability of FTY720 to cause the differentiation process. Moreover, we identified the sphingolysophospholipid receptor S1P₃ as the crucial receptor subtype for FTY720-induced myofibroblast differentiation since the effect was abolished in fibroblasts isolated from S1P₃-knockout mice. Finally, we discovered that downstream of S1P₃-signalling Smad3 activation is essential for myofibroblast differentiation in response to FTY720.

The lysophospholipid S1P is able to induce myofibroblast differentiation in a similar manner. Additionally, it was discovered, that the natural mediator leads to Connective Tissue Growth Factor (CTGF)-mRNA-formation in primary human fibroblasts. Inhibition of G_{αi}-protein coupled receptors diminished this S1P-effect. As CTGF-synthesis is needed in TGF-β-induced myofibroblast formation and S1P-agonists are able to induce myofibroblast formation, it was tested next whether S1P₃- and Smad3-signalling is involved in CTGF-mRNA-induction. Indeed, S1P-treatment of S1P₃- or Smad3-knockout fibroblasts resulted in an attenuated CTGF-expression. Taken together S1P transduces CTGF-mRNA-formation partly via S1P₃-signalling and Smad3-activation.

Depending on the type of fibrosis, there are several growth factors which aggravate fibrotic pathogenesis. As there is a known impact of epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor 2 (IGF-2) on TGF-β-induced myofibroblast formation and S1P-agonists use the same signalling device, the influence of co-stimulations were of great interest. Clearly EGF extenuated and IGF-2 potentiated differentiation in response to both stimuli TGF-β and S1P. Most interestingly co-stimulation influenced CTGF formation in a different way. Both growth factors abolished CTGF-synthesis completely in response to S1P or TGF-β.

The results of this work describe for the first time that S1P and the sphingosine-analogue FTY720 effectuates myofibroblast differentiation in primary dermal fibroblast. Additionally the natural lipid mediator S1P induced CTGF-mRNA-synthesis. Furthermore, signalling pathways of both effects were identified and the influence of co-stimulations was tested.

6 Literaturverzeichnis

- Adachi, K., T. Kohara, et al. (1995). "Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of 2-Substituted-2-Amino-1,3-Propanediols: Discovery of a Novel Immunosuppressant FTY720." Bioorganic & Medicinal Letters **5**(8): 853-856.
- Afrakhte, M., A. Moren, et al. (1998). "Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members." Biochem Biophys Res Commun **249**(2): 505-11.
- Alperovich, G., I. Rama, et al. (2007). "New immunosuppressor strategies in the treatment of murine lupus nephritis." Lupus **16**(1): 18-24.
- Anderson, P. W., J. B. McGill, et al. (2007). "Protein kinase C beta inhibition: the promise for treatment of diabetic nephropathy." Curr Opin Nephrol Hypertens **16**(5): 397-402.
- Azouz, A., M. S. Razzaque, et al. (2004). "Immunoinflammatory responses and fibrogenesis." Med Electron Microsc **37**(3): 141-8.
- Bachhuber, B. G., I. J. Sarembock, et al. (1997). "alpha-Thrombin induces transforming growth factor-beta1 mRNA and protein in cultured vascular smooth muscle cells via a proteolytically activated receptor." J Vasc Res **34**(1): 41-8.
- Bandhuvula, P., Y. Y. Tam, et al. (2005). "The immune modulator FTY720 inhibits sphingosine-1-phosphate lyase activity." J Biol Chem **280**(40): 33697-700.
- Blobe, G. C., W. P. Schiemann, et al. (2000). "Role of transforming growth factor beta in human disease." N Engl J Med **342**(18): 1350-8.
- Bonnaud, P., P. J. Margetts, et al. (2005). "TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis." J Immunol **175**(8): 5390-5.
- Bowlby, M. R., D. A. Fadool, et al. (1997). "Modulation of the Kv1.3 potassium channel by receptor tyrosine kinases." J Gen Physiol **110**(5): 601-10.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brinkmann, V. (2004). "FTY720: mechanism of action and potential benefit in organ transplantation." Yonsei Med J **45**(6): 991-7.
- Brinkmann, V., M. D. Davis, et al. (2002). "The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors." J Biol Chem **277**(24): 21453-7.
- Brinkmann, V., D. Pinschewer, et al. (2000). "FTY720: a novel transplantation drug that modulates lymphocyte traffic rather than activation." Trends Pharmacol Sci **21**(2): 49-52.
- Brunati, A. M., E. Tibaldi, et al. (2008). "Cross-talk between PDGF and S1P signalling elucidates the inhibitory effect and potential antifibrotic action of the immunomodulator FTY720 in activated HSC-cultures." Biochim Biophys Acta **1783**(3): 347-59.
- Buck, M. and M. Chojkier (2007). "A Ribosomal S-6 Kinase-Mediated Signal to C/EBP-beta Is Critical for the Development of Liver Fibrosis." PLoS ONE **2**(12): e1372.
- Burger, D., R. Rezzonico, et al. (1998). "Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon

- direct contact with stimulated T lymphocytes: involvement of membrane-associated cytokines." *Arthritis Rheum* **41**(10): 1748-59.
- Chen, M. M., A. Lam, et al. (2000). "CTGF expression is induced by TGF- β in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis." *J Mol Cell Cardiol* **32**(10): 1805-19.
- Chen, Y., I. E. Blom, et al. (2002). "CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC." *Kidney Int* **62**(4): 1149-59.
- Chetty, A., G. J. Cao, et al. (2006). "Insulin-like Growth factor-I signaling mechanisms, type I collagen and alpha smooth muscle actin in human fetal lung fibroblasts." *Pediatr Res* **60**(4): 389-94.
- Chowdhury, I. and B. Chaqour (2004). "Regulation of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) gene transcription and mRNA stability in smooth muscle cells. Involvement of RhoA GTPase and p38 MAP kinase and sensitivity to actin dynamics." *Eur J Biochem* **271**(22): 4436-50.
- Cogan, J. G., S. V. Subramanian, et al. (2002). "Vascular smooth muscle alpha-actin gene transcription during myofibroblast differentiation requires Sp1/3 protein binding proximal to the MCAT enhancer." *J Biol Chem* **277**(39): 36433-42.
- Darby, I., O. Skalli, et al. (1990). "Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing." *Lab Invest* **63**(1): 21-9.
- Daub, H., F. U. Weiss, et al. (1996). "Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors." *Nature* **379**(6565): 557-60.
- Davaille, J., L. Li, et al. (2002). "Sphingosine 1-phosphate triggers both apoptotic and survival signals for human hepatic myofibroblasts." *J Biol Chem* **277**(40): 37323-30.
- de Caestecker, M. P., W. T. Parks, et al. (1998). "Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases." *Genes Dev* **12**(11): 1587-92.
- Desmouliere, A., C. Chaponnier, et al. (2005). "Tissue repair, contraction, and the myofibroblast." *Wound Repair Regen* **13**(1): 7-12.
- Duncan, M. R., K. S. Frazier, et al. (1999). "Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP." *Faseb J* **13**(13): 1774-86.
- El-Shewy, H. M., K. R. Johnson, et al. (2006). "Insulin-like growth factors mediate heterotrimeric G protein-dependent ERK1/2 activation by transactivating sphingosine 1-phosphate receptors." *J Biol Chem* **281**(42): 31399-407.
- El-Shewy, H. M., M. H. Lee, et al. (2007). "The insulin-like growth factor type 1 and insulin-like growth factor type 2/mannose-6-phosphate receptors independently regulate ERK1/2 activity in HEK293 cells." *J Biol Chem* **282**(36): 26150-7.
- Elliot, S. J., M. Karl, et al. (2006). "Smoking induces glomerulosclerosis in aging estrogen-deficient mice through cross-talk between TGF- β 1 and IGF-I signaling pathways." *J Am Soc Nephrol* **17**(12): 3315-24.
- Esposito, D. L., V. A. Blakesley, et al. (1997). "Tyrosine residues in the C-terminal domain of the insulin-like growth factor-I receptor mediate mitogenic and tumorigenic signals." *Endocrinology* **138**(7): 2979-88.

- Evans, R. A., Y. C. Tian, et al. (2003). "TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins." Exp Cell Res **282**(2): 90-100.
- Eyden, B. (2005). "The myofibroblast: a study of normal, reactive and neoplastic tissues, with an emphasis on ultrastructure. Part 1--normal and reactive cells." J Submicrosc Cytol Pathol **37**(2): 109-204.
- Fertin, C., J. F. Nicolas, et al. (1991). "Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents." Cell Mol Biol **37**(8): 823-9.
- Frazier, K., S. Williams, et al. (1996). "Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor." J Invest Dermatol **107**(3): 404-11.
- Funaba, M., C. M. Zimmerman, et al. (2002). "Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase." J Biol Chem **277**(44): 41361-8.
- Gallucci, R. M., E. G. Lee, et al. (2006). "IL-6 modulates alpha-smooth muscle actin expression in dermal fibroblasts from IL-6-deficient mice." J Invest Dermatol **126**(3): 561-8.
- Gao, R. and D. R. Brigstock (2004). "Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin alpha(v)beta(3) and heparan sulfate proteoglycan." J Biol Chem **279**(10): 8848-55.
- Geoffroy, K., L. Troncy, et al. (2005). "Glomerular proliferation during early stages of diabetic nephropathy is associated with local increase of sphingosine-1-phosphate levels." FEBS Lett **579**(5): 1249-54.
- Gharaee-Kermani, M., M. R. Gyetko, et al. (2007). "New insights into the pathogenesis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a potential role for stem cells in the lung parenchyma and implications for therapy." Pharm Res **24**(5): 819-41.
- Goetzl, E. J. and S. An (1998). "Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate." Faseb J **12**(15): 1589-98.
- Goetzl, E. J., H. Dolezalova, et al. (1999). "Dual mechanisms for lysophospholipid induction of proliferation of human breast carcinoma cells." Cancer Res **59**(18): 4732-7.
- Gonda, K., H. Okamoto, et al. (1999). "The novel sphingosine 1-phosphate receptor AGR16 is coupled via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins to multiple signalling pathways." Biochem J **337** (Pt 1): 67-75.
- Gressner, O. A., R. Weiskirchen, et al. (2007). "Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options." Comp Hepatol **6**: 7.
- Grotendorst, G. R. (1997). "Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts." Cytokine Growth Factor Rev **8**(3): 171-9.
- Grotendorst, G. R., H. Rahmanie, et al. (2004). "Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation." Faseb J **18**(3): 469-79.

- Gu, L., Y. J. Zhu, et al. (2007). "Effect of TGF-beta/Smad signaling pathway on lung myofibroblast differentiation." Acta Pharmacol Sin **28**(3): 382-91.
- Hackel, P. O., E. Zwick, et al. (1999). "Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways." Curr Opin Cell Biol **11**(2): 184-9.
- Hait, N. C., S. Sarkar, et al. (2005). "Role of sphingosine kinase 2 in cell migration toward epidermal growth factor." J Biol Chem **280**(33): 29462-9.
- Hasegawa, M., M. Fujimoto, et al. (2005). "Pathogenesis of systemic sclerosis: altered B cell function is the key linking systemic autoimmunity and tissue fibrosis." J Dermatol Sci **39**(1): 1-7.
- Hetzel, M., M. Bachem, et al. (2005). "Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts." Lung **183**(4): 225-37.
- Heusinger-Ribeiro, J., M. Eberlein, et al. (2001). "Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: regulatory roles of RhoA and cAMP." J Am Soc Nephrol **12**(9): 1853-61.
- Hinz, B. (2007). "Formation and function of the myofibroblast during tissue repair." J Invest Dermatol **127**(3): 526-37.
- Hinz, B., S. H. Phan, et al. (2007). "The Myofibroblast. One Function, Multiple Origins." Am J Pathol.
- Holmes, A., D. J. Abraham, et al. (2001). "CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling." J Biol Chem **276**(14): 10594-601.
- Hsieh, H. L., C. C. Sun, et al. (2007). "Sphingosine 1-phosphate induces EGFR expression via Akt/NF-kappaB and ERK/AP-1 pathways in rat vascular smooth muscle cells." J Cell Biochem.
- Hu, B., Z. Wu, et al. (2003). "Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression." Am J Respir Cell Mol Biol **29**(3 Pt 1): 397-404.
- Igarashi, A., K. Nashiro, et al. (1995). "Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis." J Invest Dermatol **105**(2): 280-4.
- Igarashi, A., H. Okochi, et al. (1993). "Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair." Mol Biol Cell **4**(6): 637-45.
- Ishihara, H., H. Yoshimoto, et al. (2000). "Keloid fibroblasts resist ceramide-induced apoptosis by overexpression of insulin-like growth factor I receptor." J Invest Dermatol **115**(6): 1065-71.
- Ishii, I., B. Friedman, et al. (2001). "Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/EDG-3." J Biol Chem **276**(36): 33697-704.
- Ito, Y., J. Aten, et al. (1998). "Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis." Kidney Int **53**(4): 853-61.
- Jelaska, A. and J. H. Korn (2000). "Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis." Arthritis Rheum **43**(10): 2230-9.

- Kalluri, R. and E. G. Neilson (2003). "Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis." J Clin Invest **112**(12): 1776-84.
- Kantarci, A., S. A. Black, et al. (2006). "Epithelial and connective tissue cell CTGF/CCN2 expression in gingival fibrosis." J Pathol **210**(1): 59-66.
- Katsuma, S., Y. Ruike, et al. (2005). "Transcriptional regulation of connective tissue growth factor by sphingosine 1-phosphate in rat cultured mesangial cells." FEBS Lett **579**(12): 2576-82.
- Kellerer, M., R. Lammers, et al. (1999). "Insulin signal transduction: possible mechanisms for insulin resistance." Exp Clin Endocrinol Diabetes **107**(2): 97-106.
- Kim, D. S., S. Y. Kim, et al. (2004). "Sphingosine-1-phosphate inhibits human keratinocyte proliferation via Akt/protein kinase B inactivation." Cell Signal **16**(1): 89-95.
- Kim, J. H., J. H. Kim, et al. (2000). "Sphingosine 1-phosphate activates Erk-1/-2 by transactivating epidermal growth factor receptor in rat-2 cells." IUBMB Life **50**(2): 119-24.
- Koch, R. M., N. S. Roche, et al. (2000). "Incisional wound healing in transforming growth factor-beta1 null mice." Wound Repair Regen **8**(3): 179-91.
- Kohno, T., H. Matsuyuki, et al. (2003). "Sphingosine 1-phosphate promotes cell migration through the activation of Cdc42 in Edg-6/S1P4-expressing cells." Genes Cells **8**(8): 685-97.
- Kono, Y., T. Nishiuma, et al. (2007). "Sphingosine kinase 1 regulates differentiation of human and mouse lung fibroblasts mediated by TGF-beta1." Am J Respir Cell Mol Biol **37**(4): 395-404.
- Kostecka, Y. and J. Blahovec (1999). "Insulin-like growth factor binding proteins and their functions (minireview)." Endocr Regul **33**(2): 90-4.
- Kostenis, E. (2004). "A glance at G-protein-coupled receptors for lipid mediators: a growing receptor family with remarkably diverse ligands." Pharmacol Ther **102**(3): 243-57.
- Kothapalli, D., K. S. Frazier, et al. (1997). "Transforming growth factor beta induces anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-dependent signaling pathway." Cell Growth Differ **8**(1): 61-8.
- Kothapalli, D., N. Hayashi, et al. (1998). "Inhibition of TGF-beta-stimulated CTGF gene expression and anchorage-independent growth by cAMP identifies a CTGF-dependent restriction point in the cell cycle." Faseb J **12**(12): 1151-61.
- Kretzschmar, M., J. Doody, et al. (1997). "Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1." Nature **389**(6651): 618-22.
- Kretzschmar, M., J. Doody, et al. (1999). "A mechanism of repression of TGFbeta/Smad signaling by oncogenic Ras." Genes Dev **13**(7): 804-16.
- Kucich, U., J. C. Rosenbloom, et al. (2001). "Signaling events required for transforming growth factor-beta stimulation of connective tissue growth factor expression by cultured human lung fibroblasts." Arch Biochem Biophys **395**(1): 103-12.

- Kulik, G., A. Klippel, et al. (1997). "Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt." *Mol Cell Biol* **17**(3): 1595-606.
- Lang, C., M. Sauter, et al. (2008). "Connective tissue growth factor: a crucial cytokine-mediating cardiac fibrosis in ongoing enterovirus myocarditis." *J Mol Med* **86**(1): 49-60.
- Lau, L. F. and S. C. Lam (1999). "The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection." *Exp Cell Res* **248**(1): 44-57.
- Le Stunff, H., S. Milstien, et al. (2004). "Generation and metabolism of bioactive sphingosine-1-phosphate." *J Cell Biochem* **92**(5): 882-99.
- Leask, A., A. Holmes, et al. (2003). "Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts." *J Biol Chem* **278**(15): 13008-15.
- Leivonen, S. K., L. Hakkinen, et al. (2005). "Smad3 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 coordinately mediate transforming growth factor-beta-induced expression of connective tissue growth factor in human fibroblasts." *J Invest Dermatol* **124**(6): 1162-9.
- Liu, C., M. D. Gaca, et al. (2003). "Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent." *J Biol Chem* **278**(13): 11721-8.
- Lo, R. S., D. Wotton, et al. (2001). "Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional co-repressor TGIF." *Embo J* **20**(1-2): 128-36.
- Long, X., S. D. Xiong, et al. (2007). "[Losartan inhibited angiotensin induced human lung fibroblast transformation and collagen synthesis]." *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* **30**(4): 273-8.
- Lund, P. K. and E. M. Zimmermann (1996). "Insulin-like growth factors and inflammatory bowel disease." *Baillieres Clin Gastroenterol* **10**(1): 83-96.
- Mageto, Y., K. Flaherty, et al. (2004). "Safety and Tolerability of Human Monoclonal Antibody FG-3019, Anti-Connective Tissue Growth Factor, in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *CHEST Meeting Abstracts* **126**: 773.
- Majno, G., Gabbiani, G., Hirschel, B.J., Ryan, G.B. and Statkov, P.R. (1971). "Contraction of granulations tissue in vitro: similarity to smooth muscle." *Science* **173**: 548-550.
- Mandala, S., R. Hajdu, et al. (2002). "Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists." *Science* **296**(5566): 346-9.
- Manetti, M., E. Neumann, et al. (2007). "Severe fibrosis and increased expression of fibrogenic cytokines in the gastric wall of systemic sclerosis patients." *Arthritis Rheum* **56**(10): 3442-7.
- Matsuura, I., G. Wang, et al. (2005). "Identification and characterization of ERK MAP kinase phosphorylation sites in Smad3." *Biochemistry* **44**(37): 12546-53.
- Meneghin, A. and C. M. Hogaboam (2007). "Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis." *J Clin Invest* **117**(3): 530-8.
- Mermall, V., P. L. Post, et al. (1998). "Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction." *Science* **279**(5350): 527-33.

- Meyer-Ter-Vehn, T., S. Gebhardt, et al. (2006). "p38 inhibitors prevent TGF-beta-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(4): 1500-9.
- Meyer zu Heringdorf, D. and K. H. Jakobs (2007). "Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism." Biochim Biophys Acta **1768**(4): 923-40.
- Mockridge, J. W., E. C. Benton, et al. (2000). "IGF-1 regulates cardiac fibroblast apoptosis induced by osmotic stress." Biochem Biophys Res Commun **273**(1): 322-7.
- Moreira, R. K. (2007). "Hepatic stellate cells and liver fibrosis." Arch Pathol Lab Med **131**(11): 1728-34.
- Muehlich, S., N. Schneider, et al. (2004). "Induction of connective tissue growth factor (CTGF) in human endothelial cells by lysophosphatidic acid, sphingosine-1-phosphate, and platelets." Atherosclerosis **175**(2): 261-8.
- Murray-Rust, J., N. Q. McDonald, et al. (1993). "Topological similarities in TGF-beta 2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors." Structure **1**(2): 153-9.
- Okamoto, H., N. Takuwa, et al. (2000). "Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3." Mol Cell Biol **20**(24): 9247-61.
- Pan, L. H., K. Yamauchi, et al. (2001). "Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF." Eur Respir J **17**(6): 1220-7.
- Pannu, J., S. Nakerakanti, et al. (2007). "Transforming growth factor-beta receptor type I-dependent fibrogenic gene program is mediated via activation of Smad1 and ERK1/2 pathways." J Biol Chem **282**(14): 10405-13.
- Paradis, V., D. Dargere, et al. (1999). "Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis." Hepatology **30**(4): 968-76.
- Patel, K., P. Harding, et al. (2003). "Regulation of the mesangial cell myofibroblast phenotype by actin polymerization." J Cell Physiol **195**(3): 435-45.
- Paugh, B. S., S. W. Paugh, et al. (2008). "EGF regulates plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) by a pathway involving c-Src, PKCdelta, and sphingosine kinase 1 in glioblastoma cells." Faseb J **22**(2): 455-65.
- Paugh, S. W., S. G. Payne, et al. (2003). "The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2." FEBS Lett **554**(1-2): 189-93.
- Pera, E. M., A. Ikeda, et al. (2003). "Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction." Genes Dev **17**(24): 3023-8.
- Peters, H., S. Martini, et al. (2004). "Selective lymphocyte inhibition by FTY720 slows the progressive course of chronic anti-thy 1 glomerulosclerosis." Kidney Int **66**(4): 1434-43.
- Qi, W., S. Twigg, et al. (2005). "Integrated actions of transforming growth factor-beta1 and connective tissue growth factor in renal fibrosis." Am J Physiol Renal Physiol **288**(4): F800-9.

- Ramirez, A. M., Z. Shen, et al. (2006). "Myofibroblast transdifferentiation in obliterative bronchiolitis: tgf-beta signaling through smad3-dependent and -independent pathways." Am J Transplant **6**(9): 2080-8.
- Rivera Gil, P. (2007). "Bedeutung des Transformierenden Wachstumsfaktor- β -Signalweges für die Sphingosin-1-Phosphat-Signalwirkung Relevanz für die Chemotaxis humaner dermaler Primärfibroblasten." Institut für Pharmazie.
- Roberts, A. B., A. Russo, et al. (2003). "Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta." Ann N Y Acad Sci **995**: 1-10.
- Roy, S. G., Y. Nozaki, et al. (2001). "Regulation of alpha-smooth muscle actin gene expression in myofibroblast differentiation from rat lung fibroblasts." Int J Biochem Cell Biol **33**(7): 723-34.
- Salvadori, M., K. Budde, et al. (2006). "FTY720 versus MMF with cyclosporine in de novo renal transplantation: a 1-year, randomized controlled trial in Europe and Australasia." Am J Transplant **6**(12): 2912-21.
- Sarkar, S., M. Maceyka, et al. (2005). "Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells." FEBS Lett **579**(24): 5313-7.
- Sato, Y. and D. B. Rifkin (1989). "Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture." J Cell Biol **109**(1): 309-15.
- Sauer, B. (2003). Bedeutung der Signlwege des transformierenden Wachstumsfaktors TGF- β für Effekte von Lysophospholipiden auf epidermale und dermale Zellen. Institut für Pharmazie. Berlin, Freie Universität Berlin.
- Schraut, C. (2007). Untersuchungen zu Sphingosin-1-Phosphat bei der epithelialen-mesenchymalen Transformation in humanen Keratinozyten. Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie. Berlin, Freie Universität Berlin.
- Schultz-Cherry, S. and J. E. Murphy-Ullrich (1993). "Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism." J Cell Biol **122**(4): 923-32.
- Sebe, A., S. K. Leivonen, et al. (2008). "Transforming growth factor- β -induced alpha-smooth muscle cell actin expression in renal proximal tubular cells is regulated by p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated protein kinase1,2 and the Smad signalling during epithelial myofibroblast transdifferentiation." Nephrol Dial Transplant.
- Serini, G., M. L. Bochaton-Piallat, et al. (1998). "The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1." J Cell Biol **142**(3): 873-81.
- Song, K., S. C. Cornelius, et al. (2003). "Insulin-like growth factor-I inhibits transcriptional responses of transforming growth factor-beta by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent suppression of the activation of Smad3 but not Smad2." J Biol Chem **278**(40): 38342-51.
- Song, K., T. L. Krebs, et al. (2006). "Novel permissive role of epidermal growth factor in transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling and growth

- suppression. Mediation by stabilization of TGF-beta receptor type II." J Biol Chem **281**(12): 7765-74.
- Stratton, R., V. Rajkumar, et al. (2002). "Prostacyclin derivatives prevent the fibrotic response to TGF-beta by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway." Faseb J **16**(14): 1949-51.
- Strehlow, D. and J. H. Korn (1998). "Biology of the scleroderma fibroblast." Curr Opin Rheumatol **10**(6): 572-8.
- Subramanian, S. V., J. A. Polikandriotis, et al. (2004). "Induction of vascular smooth muscle alpha-actin gene transcription in transforming growth factor beta1-activated myofibroblasts mediated by dynamic interplay between the Pur repressor proteins and Sp1/Smad coactivators." Mol Biol Cell **15**(10): 4532-43.
- Suleiman, M., P. M. Cury, et al. (2005). "FTY720 prevents renal T-cell infiltration after ischemia/reperfusion injury." Transplant Proc **37**(1): 373-4.
- Takuwa, Y., N. Takuwa, et al. (2002). "The Edg family G protein-coupled receptors for lysophospholipids: their signaling properties and biological activities." J Biochem **131**(6): 767-71.
- Tawadrous, M. N., A. Mabuchi, et al. (2002). "Effects of immunosuppressant FTY720 on renal and hepatic hemodynamics in the rat." Transplantation **74**(5): 602-10.
- Tedesco-Silva, H., M. D. Pescovitz, et al. (2006). "Randomized controlled trial of FTY720 versus MMF in de novo renal transplantation." Transplantation **82**(12): 1689-97.
- Tedesco-Silva, H., P. Szakaly, et al. (2007). "FTY720 versus mycophenolate mofetil in de novo renal transplantation: six-month results of a double-blind study." Transplantation **84**(7): 885-92.
- Thannickal, V. J., G. B. Toews, et al. (2004). "Mechanisms of pulmonary fibrosis." Annu Rev Med **55**: 395-417.
- Tomasek, J. J., G. Gabbiani, et al. (2002). "Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(5): 349-63.
- Uemura, M., E. S. Swenson, et al. (2005). "Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization." Mol Biol Cell **16**(9): 4214-24.
- Urata, Y., Y. Nishimura, et al. (2005). "Sphingosine 1-phosphate induces alpha-smooth muscle actin expression in lung fibroblasts via Rho-kinase." Kobe J Med Sci **51**(1-2): 17-27.
- Velling, T., J. Risteli, et al. (2002). "Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1." J Biol Chem **277**(40): 37377-81.
- Wahab, N. A., B. S. Weston, et al. (2005). "Connective tissue growth factor CCN2 interacts with and activates the tyrosine kinase receptor TrkA." J Am Soc Nephrol **16**(2): 340-51.
- Way, K. J., K. Isshiki, et al. (2002). "Expression of connective tissue growth factor is increased in injured myocardium associated with protein kinase C beta2 activation and diabetes." Diabetes **51**(9): 2709-18.

- Weston, B. S., N. A. Wahab, et al. (2003). "CTGF mediates TGF-beta-induced fibronectin matrix deposition by upregulating active alpha5beta1 integrin in human mesangial cells." J Am Soc Nephrol **14**(3): 601-10.
- Wilkes, M. C., H. Mitchell, et al. (2005). "Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2." Cancer Res **65**(22): 10431-40.
- Wolf, G. (2006). "Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway." Kidney Int **70**(11): 1914-9.
- Wynn, T. (2008). "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis." J Pathol **214**(2): 199-210.
- Xin, C., S. Ren, et al. (2006). "The immunomodulator FTY720 and its phosphorylated derivative activate the Smad signalling cascade and upregulate connective tissue growth factor and collagen type IV expression in renal mesangial cells." Br J Pharmacol **147**(2): 164-74.
- Xu, L. (2006). "Regulation of Smad activities." Biochim Biophys Acta **1759**(11-12): 503-13.
- Xu, S. W., S. L. Howat, et al. (2004). "Endothelin-1 induces expression of matrix-associated genes in lung fibroblasts through MEK/ERK." J Biol Chem **279**(22): 23098-103.
- Yamamoto, K., E. G. Lapetina, et al. (1992). "Insulin like growth factor-I induces limited association of phosphatidylinositol 3-kinase to its receptor." Endocrinology **130**(3): 1490-8.
- Yamane, K., H. Ihn, et al. (2003). "Epidermal growth factor up-regulates expression of transforming growth factor beta receptor type II in human dermal fibroblasts by phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway: Resistance to epidermal growth factor stimulation in scleroderma fibroblasts." Arthritis Rheum **48**(6): 1652-66.
- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-37.
- Yokoi, H., A. Sugawara, et al. (2001). "Role of connective tissue growth factor in profibrotic action of transforming growth factor-beta: a potential target for preventing renal fibrosis." Am J Kidney Dis **38**(4 Suppl 1): S134-8.
- Yu, D. H., K. A. Mace, et al. (2007). "Effects of decreased insulin-like growth factor-1 stimulation on hypoxia inducible factor 1-alpha protein synthesis and function during cutaneous repair in diabetic mice." Wound Repair Regen **15**(5): 628-35.
- Zeisberg, E. M., S. Potenta, et al. (2007). "Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts." Cancer Res **67**(21): 10123-8.
- Zhang, Q., O. Peyruchaud, et al. (1999). "Sphingosine 1-phosphate stimulates fibronectin matrix assembly through a Rho-dependent signal pathway." Blood **93**(9): 2984-90.
- Zhao, Q., N. Chen, et al. (2004). "Effect of transforming growth factor-beta on activity of connective tissue growth factor gene promoter in mouse NIH/3T3 fibroblasts." Acta Pharmacol Sin **25**(4): 485-9.

