

# 1 Einleitung

## 1.1 Phospholipide und deren Rezeptoren

### 1.1.1 LPA und S1P

Die Lysophospholipide Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Lysophosphatidylsäure (LPA) haben für das kardiovaskuläre System eine Vielzahl von Bedeutungen. Beispiele sind die Morphogenese, Angiogenese von Muskel- oder Endothelzellen, Neointimabildung im Rahmen der Atherosklerose, myokardiale Hypertrophie, Extrazellulärmatrixvermehrung (EZM), Wundheilung oder protektive Wirkung bei ischämischen Verletzungen des Myokards sowie Bedeutung bei Apoptoseprozessen [4-11]. Aber auch im Rahmen von Immunität, Inflammation, Krebsentwicklung und myozytärer Kalziumhomöostase spielen Rezeptoren dieser Lysolipide eine wichtige Rolle [12-15]. In einem Knock-out Modell für einen LPA-Rezeptor konnte die Bedeutung von LPA für die Myelinisierung von Nervenfasern eindeutig gezeigt werden. Jungtiere ohne diesen Rezeptor verstarben kurz nach der Geburt, u.a. weil ihnen ohne funktionellen olfaktorischen Nerv der Saugreflex für die Nahrungsaufnahme fehlte [16, 17].

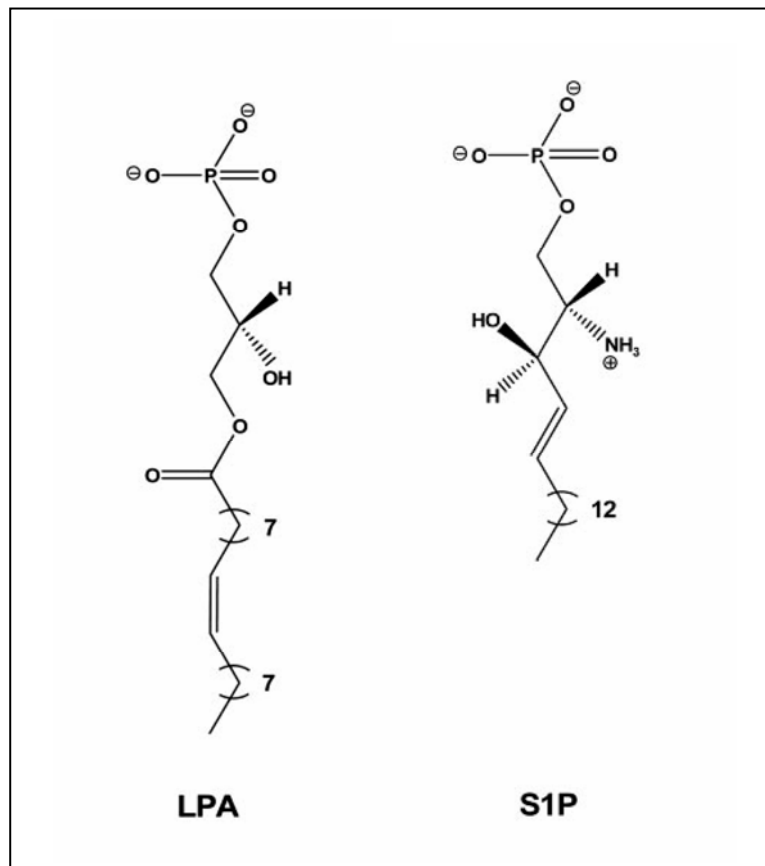
Die Effekte der beiden Lipidmediatoren LPA und S1P werden durch Bindung an spezifische Rezeptoren auf Zelloberflächen vermittelt. S1P kann aber auch intrazellulär als „second messenger“ wirken. Erst vor kurzer Zeit ist für den LPA Rezeptor EDG-2 eine nukleäre Lokalisation beschrieben worden, die Gegenstand weiterer Untersuchungen sein wird [18].

### 1.1.2 Synthese der Sphingolipide LPA und S1P

LPA mit der chemischen Bezeichnung 1-acyl-glycerol-3-phosphat wird aus aktivierten Plättchen ausgeschüttet und erreicht im humanen Serum Konzentrationen von 1 - 5  $\mu\text{M}$ . Die Synthesewege für LPA sind noch nicht vollständig aufgeklärt, klar ist aber, dass verschiedene Enzyme daran beteiligt sind: Monoacylglycerolkinase, Phospholipase A<sub>1</sub> und Lysophospholipase D. LPA liegt im Serum in gebundener Form an Albumin, LDL ("low-density Lipoproteine") oder andere Proteine vor, durch welche es vor einem schnellen Abbau geschützt scheint. Der Abbau von LPA läuft enzymatisch über die Lysophospholipase, Lipidphosphatphosphatase und LPA-alkyltransferase [1, 12].

S1P wird ebenso aus seinen Speicher in Thrombozyten nach deren Aktivierung freigesetzt und liegt im humanen Serum gebunden an Albumin und Lipoproteine in Konzentrationen von 0,5-0,8 $\mu\text{M}$  und im Plasma in Konzentrationen von 0,2-0,4 $\mu\text{M}$  vor. Sphingosin-1-phosphat entsteht

durch die Sphingosinkinase (SPK) aus Sphingosin (siehe Abb.1.1.2) und wird entweder über die S1P-lyase oder S1P-phosphatase degradiert [1, 3].



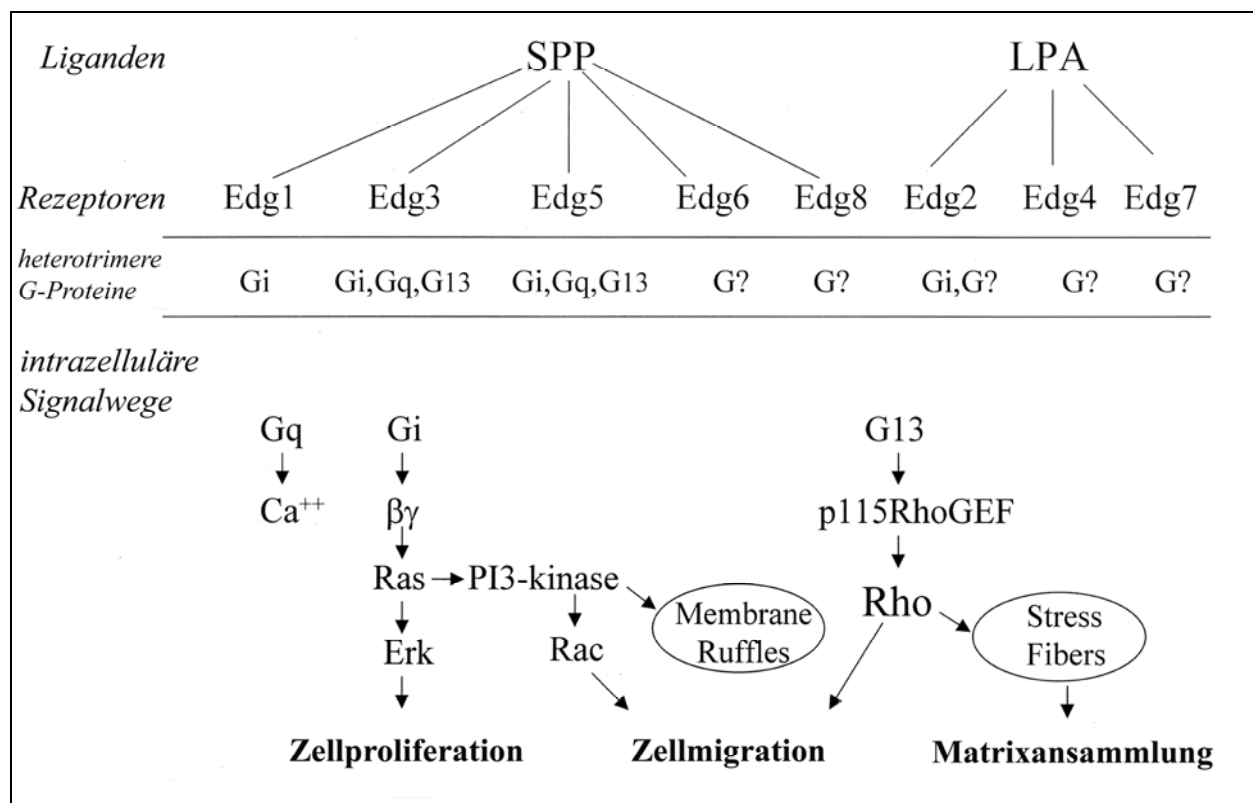
**Abb. 1.1.2: Strukturformeln von LPA und S1P.**  
Abbildung aus Ishii et al. 2004 [1].

### 1.1.3 Die EDG-Rezeptoren

Die Rezeptoren für LPA und S1P werden EDG-Rezeptoren (Endothelzell Differenzierungs-Gen) genannt und lassen sich nach ihren Liganden in zwei Hautgruppen einteilen. Für LPA sind insgesamt drei Rezeptorsubtypen bekannt: LPA<sub>1</sub>(EDG-2), LPA<sub>2</sub> (EDG-4) und LPA<sub>3</sub> (EDG-7). Für S1P gibt es fünf Subtypen: S1P<sub>1</sub> (EDG-1), S1P<sub>2</sub> (EDG-5), S1P<sub>3</sub> (EDG-3), S1P<sub>4</sub> (EDG-6) und S1P<sub>5</sub> (EDG-8) [12, 19]. Sie gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die S1P-Rezeptoren zeigen eine Aminosäuresequenz-Übereinstimmung mit der Gruppe der LPA-Rezeptoren von ungefähr 30%, mit den Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 von rund 20% [20] (siehe auch Abb. 1.1.2). Die EDG-Rezeptoren werden zell-, bzw. gewebespezifisch expremiert [21]. So kommt der EDG-2 Rezeptor z.B. in fast allen Geweben vor: Gehirn, Herz, Plazenta, Kolon, Dünndarm, Testes, Ovarien, Pankreas, Milz, Niere, Skelettmuskulatur und Thymus [22]. Die Existenz von weiteren Rezeptoren für LPA und S1P wird gegenwärtig diskutiert [23].

### 1.1.4 Signalwege von LPA und S1P

Über die Stimulation von spezifischen Rezeptoren für LPA und S1P werden je nach heterotrimeren G-Protein (u.a. G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub>, G<sub>13</sub> oder bisher unbekannte G-Proteine) unterschiedliche Signaltransduktionswege angesteuert (siehe Abb. 1.1.4), die z.B. über Ras/Erk zu Zellproliferation, oder durch Rac und Rho zu Zellmigration führen. Auch kann die Vermehrung der Extrazellulärmatrix induziert werden [19, 24].



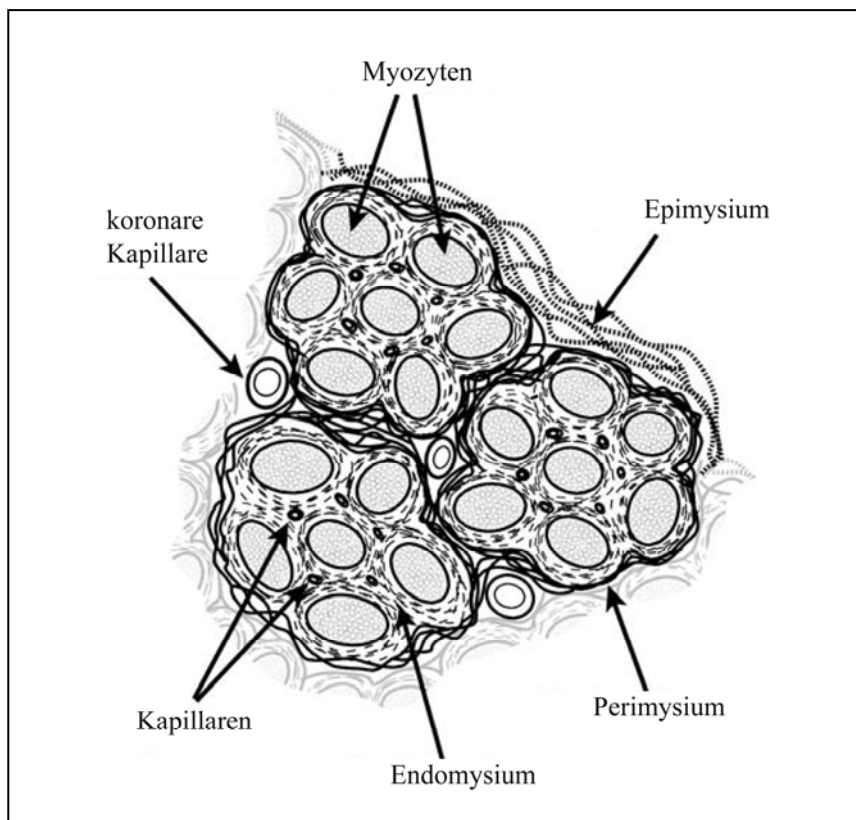
**Abb. 1.1.4: Signalwege der EDG-Rezeptoren.** Dargestellt sind schematisch die Liganden Sphingosin-1-phosphat (SPP) und Lysophosphatidylsäure (LPA) an ihren unterschiedlichen G-Protein-gekoppelten EDG-Rezeptoren. Im unteren Teil sind schematisch die intrazellulären Signalwege aufgezeigt, die zu Zellproliferation, -Migration und Matrixansammlung führen. G? = bisher unbekannte G-Proteine; Stress fibers = Belastungsfasern; Membrane Ruffles = Membranfaltungen. Abbildung aus Panetti TS et al. 2001 [19].

## 1.2 Fibroseprozesse und deren Parameter

### 1.2.1 Myokardiale Fibrose

Das Herz ist eine muskuläre Pumpe, die neben Myozyten aus einer Reihe weiterer Zellarten wie Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Immunzellen besteht (siehe Abb.1.2.1 und Abb.4.1). Dabei spielen die Fibroblasten eine besondere Bedeutung für den myokardialen Strukturerhalt. Sie umgeben die Myozyten und formen die typischen Muskelbündel im Herzen. Außerdem produzieren sie die Hauptbestandteile der EZM [2, 25, 26].

Als kardiale Fibrose wird histopathologisch eine disproportionale Vermehrung von fibrillärem Kollagen, einem EZM-Bestandteil, bezeichnet [27, 28]. Klinisch gesehen spielen fibrotische Prozesse eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der diastolischen Dysfunktion als Ursache von Herzinsuffizienz. In Folge dessen steigen die viskoelastische Belastung, der diastolische Sog und die passive Steifigkeit an. Messbar werden diese Veränderungen v.a. durch die Änderung des Verhältnis Col I (Kollagen Typ 1) zu Col III (Kollagen Typ 3) durch eine Verschiebung zu Gunsten des Col I [28]. Der Hauptfokus bei diesem „Remodeling“ liegt auf den kardialen Fibroblasten, die diese Hauptbestandteile der EZM produzieren. Die Ursachen für diese Überproduktion sind vielseitig und reichen von ischämischer Kardiomyopathie bis hin zum Hypertonus [28]. So spielt das RAS-System (Renin-Angiotensin-System) eine entscheidende Rolle, mechanische Belastungen durch erhöhtes Volumen resultieren in einer Fibrose-Induktion [29, 30]. Die Fibrose lässt sich in eine reparative Form im Zusammenhang mit der Bildung von Narbengewebe und in eine reaktive Form perivaskulär oder interstitiell einteilen [27]. Die Veränderungen der EZM und damit die messbaren Parameter sind ähnlich.



**Abb. 1.2.1: Schema der strukturellen EZM-Organisation.** Dargestellt ist die schematische Ansammlung von fibrillärem Kollagen in Bezug auf die kardialen Myozyten und das koronare Gefäßsystem. Kollagen umgibt einzelne Myozyten und verbindet diese untereinander zum Endomysium. Im Perimysium werden Gruppen aus Myozyten gebündelt. Das Epimysium umschließt wiederum mehrere Bündel des Perimysiums. Die Versorgung der Myozyten erfolgt über Diffusion durch die EZM Bestandteile aus Kapillaren und koronaren Mikrogefäßen. Abbildung aus Brown et al 2005 [2].

### 1.2.2 LPA und Extrazellulärmatrixproteine

Neben den beiden Kollagentypen 1 und 3 setzt sich die EZM auch aus diversen anderen Komponenten wie Fibronectin oder Laminin zusammen, deren Produktion unter Fibrosebedingungen gesteigert wird [31, 32]. Auch für das Peptidhormon Relaxin wurde eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Fibroblastenproliferation beschrieben [33]. Für die Fibroblastenregulation spielen neben Angiotensin II auch andere auto- und parakrine Faktoren eine Rolle, wie etwa TGF- $\beta$  („Transforming Growth Factor beta“) oder Östrogen beim „Remodeling“ im Alter [10, 27]. 17 $\beta$ -Estradiol inhibiert so z.B. das Wachstum von Fibroblasten [34]. Das Zytokin TGF- $\beta$  reguliert Bestandteile des Bindegewebes, so auch CTGF („Connective Tissue Growth Factor“). Eine vermehrte Produktion von CTGF durch TGF- $\beta$  führte zu gleichzeitig hochregulierten weiteren EZM-Fibroseparametern [35]. Die TGF- $\beta$ -Produktion in Rattenfibroblasten wird durch das für das kardiovaskuläre System bedeutende Hormon Angiotensin II gesteigert. In einem Modell mit hypertensiven Ratten konnte gezeigt werden, dass man durch Blockade der TGF- $\beta$  Funktion die Entstehung von myokardialer Fibrose und diastolischer Dysfunktion verhindern kann [36]. Aus all diesen Studien ergeben sich sowohl für TGF- $\beta$  als auch für CTGF wichtige Funktionen bei der Entwicklung von Fibroseprozessen [35, 37]. So reguliert CTGF die TGF- $\beta$  induzierte Hochregulation von Kollagen und Fibronectin [38] und kann mit erhöhten mRNA-Werten bei Patienten mit Glomerulosklerose und tubulointerstitieller Fibrose nachgewiesen werden [39]. CTGF und TGF- $\beta$  haben scheinbar eine synergistische Wirkung auf die Entstehung renaler Fibrose [40, 41]. Neben TGF- $\beta$  ist vor allem LPA in der Lage, die CTGF-mRNA-Expression zu steigern [42], sowie selbst auch TGF- $\beta$  Produktion zu induzieren [43]. Ein weiterer Hinweis für eine Interaktion von LPA mit Signalwegen von TGF- $\beta$  findet sich u.a. in Studien von Sauer et al. [11].

Für den EDG-Rezeptor-Liganden LPA ist mittlerweile vielfach beschrieben, dass er proproliferativ und migrationsfördernd wirkt. Aus diesen Beschreibungen und den oben genannten Studien zu Fibroseprozessen mit seinen Markergenen ergibt sich das Interesse an einem möglichen Einfluss der EDG-Rezeptoren auf Entstehungsmechanismen von myokardialer Fibrose. So wäre es denkbar, dass LPA über CTGF die Kollagenproduktion stimuliert. Es gibt aber auch Studien, die einen inhibierenden Effekt von LPA auf die TGF- $\beta$  vermittelte Kollagenexpression gefunden haben [44].

Neben den oben beschriebenen Faktoren für die EZM Komposition spielen auch die Matrix Metalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren (TIMP) eine bedeutende Rolle im pathophysiologischen Gleichgewicht der Matrixproteine. Diese zinkabhängigen Enzyme

degradieren je nach Subtyp und Stimulus verschiedene Komponenten der EZM [45, 46]. Es gibt über 20 verschiedene MMP-Spezies, die sich je nach abbauender Matrixkomponente in vier verschiedene Gruppen einteilen lassen: Die Kollagenasen (z.B. MMP-1), die Gelatinasen (z.B. MMP-2 und MMP-9), die Stromelysine (z.B. MMP-3) und die MMP's vom Membrantyp (MT-MMP). Die Gruppe der TIMP's repräsentiert die endogenen Inhibitoren der MMP's. Sie binden an aktivierte MMP's und formen mit ihnen einen 1:1 Enzym-Inhibitor-Komplex. Dadurch können die MMP's ihre Substrate nicht mehr degradieren [47].

### **1.2.3 Fibrosemodelle in vivo und in vitro**

Um Fibroseprozessen geeignet studieren zu können, werden in der Literatur diverse Modelle diskutiert. Auf Zellkulturebene werden dabei Isolationen von Fibroblasten, verantwortlich für die EZM-Bestandteile, des entsprechenden Organsystems genannt. Im Vordergrund stehen dabei Primärzellen, u.a. Mesangialzellen [48-50], Keratinozyten [43], Hautfibroblasten und kardiale Fibroblasten [33, 34]. Prinzipiell sind diese Zellsysteme auch aus humanen Proben denkbar [51]. Neben diesen Primärzellen werden ebenso Standardzelllinien benutzt, wie etwa HEK293, Swiss3T3 [22] oder "Ovarian Cancer Cells" [52]. Von wissenschaftlichem Interesse sind auch die so genannten HFL-1-Zellen, eine Fibroblastenzelllinie, die aus dem Menschen generiert wurde [53-55].

Die Bandbreite an Möglichkeiten für Tiermodelle ist mindestens ebenso weit gefächert. Von größerem Interesse ist die anti-THY-1-induzierte Glomerulosklerose, mit der ein Kooperationspartner der AG Regitz-Zagrosek Fibroseprozesse der Niere untersucht. Hierbei ist die Rolle von EDG-1 interessant, da der EDG-1-Agonist FTY720 u.a. Effekte im Sinne einer Reduktion der anti-THY-1-induzierten Glomerulosklerose besitzt. Peters et al. konnten 2004 eindeutig eine Verbesserung von renaler Fibrose durch Applikation dieser Substanz zeigen. So verringerten sich neben dem Matrixscore auch Fibronectin- und TGF- $\beta$ -Produktion bei tubulointerstitieller Fibrose durch Gabe von FTY720 [56].

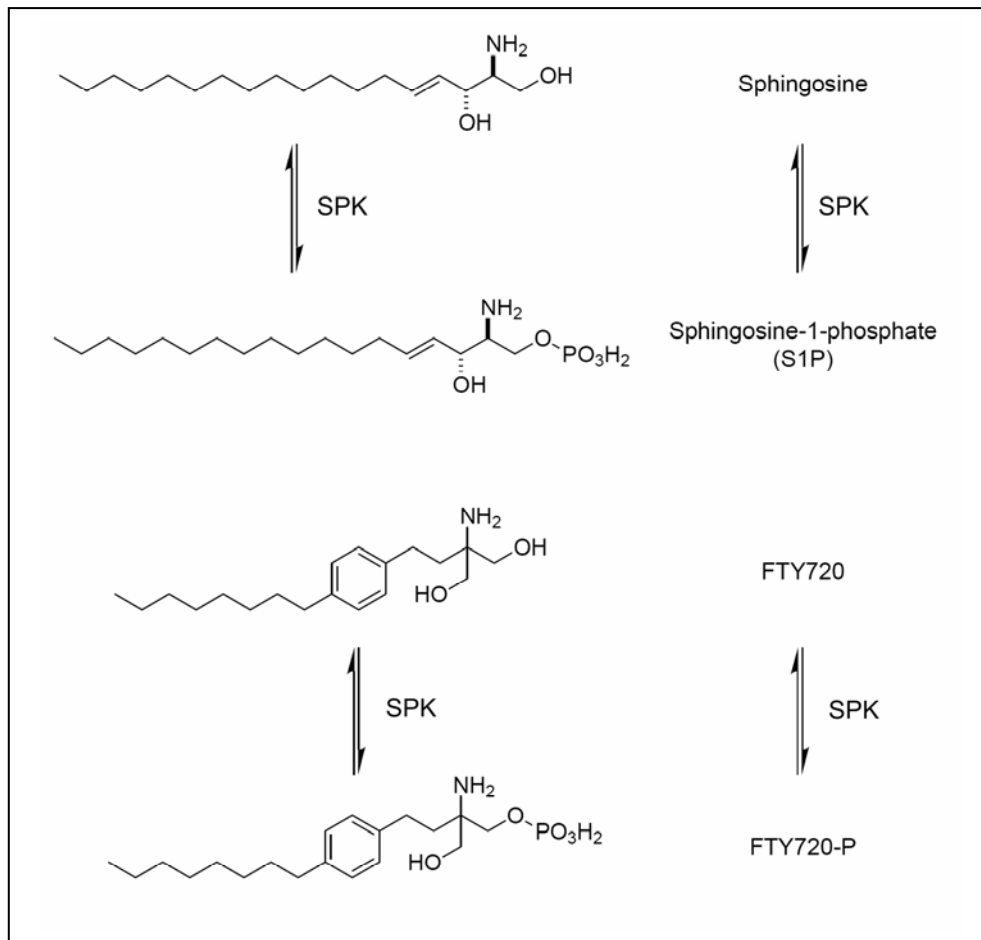
Diese Studien stehen vor allem im Zusammenhang mit immunologischen Vorgängen im Rahmen von Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen [56, 57].

## 1.2.4 Der Immunmodulator FTY720

Diese neue Substanz FTY720 (2-Amino-2-(2-(4-octylphenyl)ethyl)-1,3-propanediol) hat in den letzten Jahren vielversprechende Ergebnisse in verschiedenen Tiermodellen zur Lösung u.a. von Problemen bei Autoimmunprozessen sowie Transplantationen geliefert [15, 58]. Vor allem die Verbesserung von Transplantatabstoßungsreaktionen ist für die medizinische Anwendung von ausgesprochener Bedeutung. Mittlerweile wurden Phase-III-klinische Studien mit diesem potenten Immunmodulator und EDG-1-Agonisten durchgeführt [59]. Außerdem sind die vielseitigen Möglichkeiten der Anwendung auch für klinische Fragestellungen zu Pharmakokinetik und -dynamik bedeutsam [60]. So stellt diese Substanz eine Ergänzung zu den bisher bekannten Strategien der immunsuppressiven Therapie bei Transplantationen dar [61, 62].

### 1.2.4.1 Herkunft und Rezeptorbindung von FTY720

Eine Vorläufersubstanz zu FTY720 wurde ursprünglich aus dem Pilz *Isaria sinclairii* gewonnen und später synthetisch in FTY720 umgewandelt, welches genau wie S1P eine gewisse Ähnlichkeit zu Sphingosin aufweist [63]. So wirkt FTY720 in seiner nichtphosphorylierten Form als nichtkompetitiver Inhibitor an dem G-Protein gekoppelten Rezeptor EDG-1, bzw. S1P-1. Dabei wird die Signaltransduktion der Subtypen S1P<sub>1, 2, 5</sub> (EDG-1, 5, 8) durch Rezeptorinternalisation inhibiert. Die Subtypen 3 und 4 (EDG-3, 4) scheinen unberührt. Zeit und Ausmaß der Rezeptorbindung und damit der Inaktivierung bestimmt das Angebot an FTY720 [15]. FTY720 wird *in vivo* durch das Enzym Sphingosinkinase phosphoryliert (siehe Abb.1.2.4.1) und wirkt erst dann als potenter Agonist an S1P-Rezeptorsubtypen 1, 3, 4 & 5 [64]. Diese Substanz hat mit S1P einige strukturelle Gemeinsamkeiten: einen Fettsäurerestbereich, eine 2-Amino-Gruppe und eine Phosphatgruppe [20].



**Abb. 1.2.4.1: FTY720 und Sphingosin.** Beide Substanzen werden von der Sphingosinkinase (SPK) entweder zu Sphingosin-1-phosphat (S1P) oder FTY720-P phosphoryliert. Abbildung aus Rosen H et al. 2003 [3].

#### 1.2.4.2 Bedeutung von FTY720 für Fibroseprozesse

Die immunsuppressive Wirkung von FTY720-P entsteht dadurch, dass selektiv Lymphozyten unter dem FTY720-Einfluss vermehrt in lymphatische Gewebe sequestriert werden, d.h. vermehrt naive und aktivierte T(CD4+ und CD8+)- und B-Zellen aus dem Blut in die Lymphknoten und Peyer-Plaques wandern. Dabei wird jedoch nicht die Funktionalität dieser Zellen eingeschränkt [58-60]. Mit dieser Substanz konnte eine entscheidende Verbesserung der Nierenfunktion und von Fibroseparametern bei anti-THY-1-induzierter chronisch progredienter Glomerulosklerose und tubulointerstitieller Fibrose gezeigt werden [56]. Beide Tiermodelle stellen fibrotische Prozesse dar, die die Entwicklung einer Transplantatabstoßung oder den Ausfall von chronisch vorgeschädigten Organen bedeutend begünstigen. Die einmalige Injektion des anti-THY-1 Antikörpers (MAb1-22-3) in Ratten drei Tage nach Entnahme einer Niere führt über Bindung des Antikörpers an Thy-1-like-Antigen auf Mesangialzellen komplement- und



NO-abhängig zu einer akuten Glomerulonephritis, die sich dann autonom in eine chronisch progrediente Glomerulosklerose, tubulointerstitielle Fibrose und Niereninsuffizienz mit renalem Hypertonus im Verlauf von Monaten entwickelt [56, 65, 66].

Die Frage ist, ob die positiven Effekte von FTY720 im Fibrosemodell der Niere lediglich auf die immunosuppressiven Eigenschaften zurückzuführen sind, oder ob auch die Nierenfunktion direkt verbessert wird. Daher sind die Regulation von EDG-1 im Krankheitsmodell, sowie die Lokalisation von EDG-1 in der Niere von Interesse.

### ***1.3 Fragestellung und Versuchsaufbau***

#### **1.3.1 Ziel der Arbeit – EDG-Rezeptoren und Fibrose**

Die Beteiligung der EDG-Rezeptoren an Proliferationsprozessen, welche auch in der Fibrose eine Rolle spielen, sowie ihre entscheidende Bedeutung für die Entwicklung verschiedener Organsysteme und -störungen sind in der Literatur gut beschrieben. Fibrose als überproportionale Vermehrung von extrazellulären Matrixproteinen stellt für viele Organe einen Umbauprozess dar, der Schädigung und letztendlich auch den Ausfall dieses Organs bedeuten kann. Mit Hilfe von Forschung an Fibrose in Leber, Herz und Niere wird gegenwärtig versucht, diese Umbauprozesse besser zu verstehen, um sie evtl. prognostisch günstig beeinflussen zu können.

Das Thema Fibrose und EDG-Rezeptoren bietet eine Vielzahl von möglichen Untersuchungsgegenständen. Geeignet scheinen für solche Untersuchungen Fibroblasten aus entsprechenden Organen. Leicht messbare Parameter sind v.a. die EZM-Bestandteile Kollagen 1 & 3, Fibronectin sowie die Zytokine TGF- $\beta$  und CTGF. Bei *in vivo* Modellen können zusätzlich inflammatorische Parameter betrachtet werden.

#### **1.3.2 Methodisches Vorgehen**

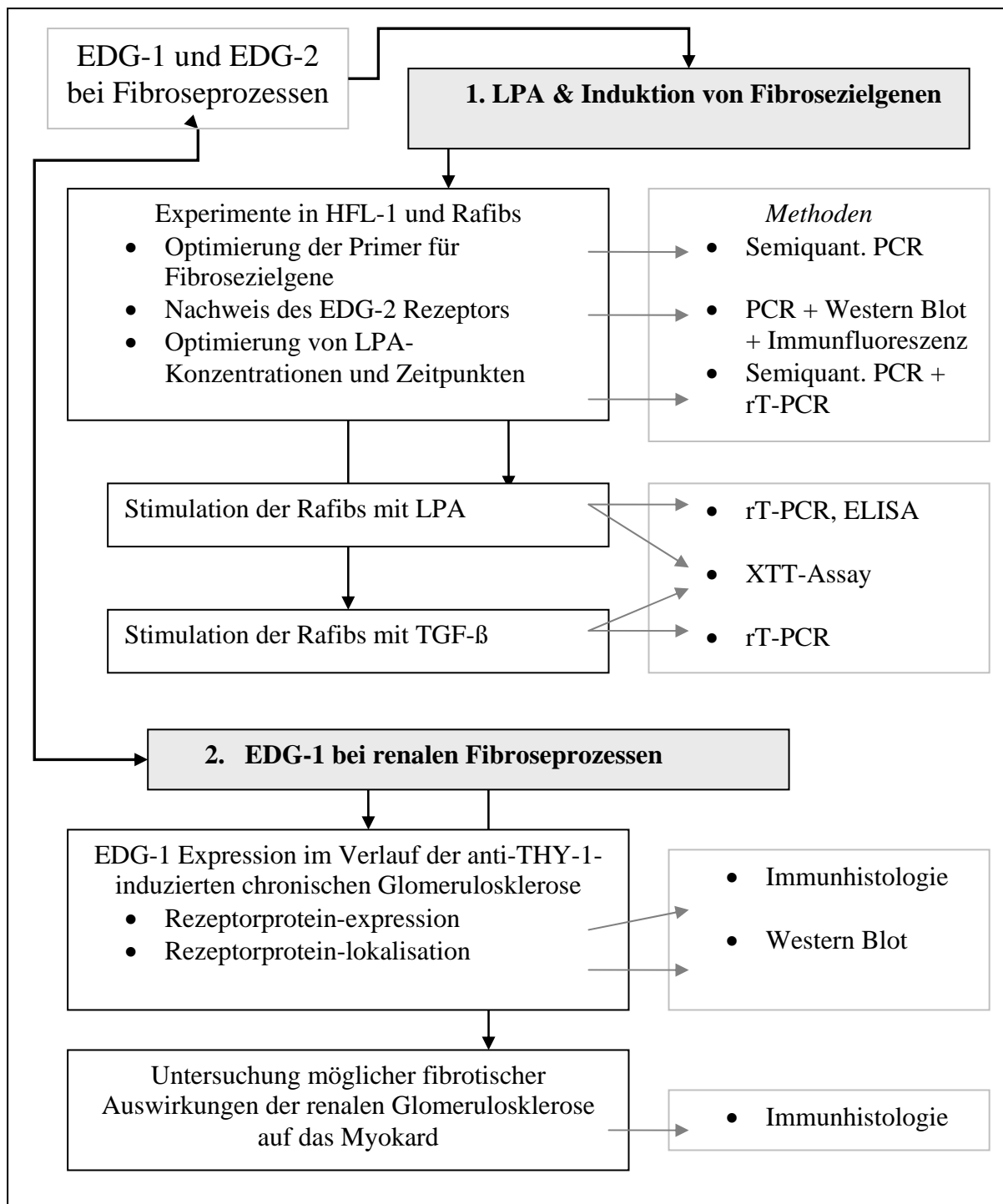
Die vorgelegte Dissertation gliedert sich in zwei Teile. Es sollten zum einen mögliche Zusammenhänge von LPA als EDG-2 Agonist bei der myokardialen Fibroseentstehung geklärt werden, zum anderen die Rolle von EDG-1 im Rahmen der anti-THY-1-induzierten chronisch progredienten Glomerulosklerose.

### ***LPA und myokardiale Fibroseentwicklung***

Ein Modell für die Untersuchung von Fibrose am Herzen im Zusammenhang mit LPA-Stimulation der EDG-2 Rezeptoren stellen myokardiale Rattenfibroblasten dar, die aus gesunden Tieren isoliert wurden. Diese wurden einem Stimulus mit LPA ausgesetzt. Die anschließende Bestimmung der Regulation von für Fibrose relevanten Genen auf transkriptioneller Ebene erfolgte mittels semiquantitativer oder quantitativer PCR („Taqman“) [67]. Die zu untersuchenden für Fibrose relevanten Gene waren CTGF, Col I, Col III, TGF- $\beta$ , Fibronectin und MMP-2, TIMP-2 und MMP-9. Mit Hilfe des ELISA-Verfahrens konnte auch die Proteinebene auf Regulationen überprüft werden [68]. Die Immunfluoreszenz ermöglichte die Darstellung von Rezeptorlokalisationen in Zellkultur und in Paraffinschnitten von Herz und Niere. Durch den Nachweise von verschiedenen Antikörpern wie Vimentin und von-Willebrand-Faktor wurden die isolierten Zellen gut charakterisieren [26, 69, 70]. Darüber hinaus wurden auch XTT Assays in Antwort auf den LPA-Stimulus vorgenommen [71]. Als Zellkulturmodell neben den adulten myokardialen Rattenfibroblasten wurden zu Beginn der Arbeit auch HFL-1 Zellen (humane fetale Lungenfibroblasten) verwendet, die in der Literatur als Modell für die Regulation der Kollagenproduktion beschrieben wurden [53-55, 72].

### ***EDG-1 im Rahmen der anti-THY-1 induzierten chronisch progredienten Glomerulosklerose***

Der EDG-1-Agonist FTY720 wurde bereits in klinischen Studien zur Behandlung von Transplantatabstoßungsreaktionen in der Nephrologie eingesetzt. Die Bedeutung des EDG-1 Rezeptors im Rahmen solcher renaler Fibroseprozesse sollte näher untersucht werden. Hierfür wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Peters, Nephrologie Charité, die anti-THY-1-induzierte chronisch progrediente Glomerulosklerose der Ratte als geeignetes Modell verwendet [65, 66] und die EDG-1 Expression auf Protein-Ebene in Bezug zu den Proteinuriewerten der Nieren sowie auf die Lokalisation hin analysiert. In diesem Rahmen sollten auch mögliche kardiale Auswirkungen fibrotischen Charakters dieser primär renal lokalisierten Störung mit Hilfe von Kollagenfärbungen untersucht werden.



**Abb. 1.3.2: Schematische Darstellung der vorgelegten Dissertation.** Die Dissertation gliedert sich in zwei Teile: **1. LPA & Induktion von Fibrosezielgenen**, **2. EDG-1 im Rahmen der anti-THY-1-induzierten chronischen Glomerulosklerose**. Rafibs – Rattenfibroblasten.