

4 Diskussion

4.1 *Lysophosphatidylsäure und kardiale Fibroseprozesse*

Die Stimulation von kardialen Rattenfibroblasten mit dem EDG-2 Agonisten Lysophosphatidylsäure führte in dem verwendeten Versuchsaufbau nicht zu einer Regulation der Fibrosezielgene CTGF, Col I, Col III, Fibronectin, TGF- β und MMP-2, hingegen zu einer verminderten Expression von MMP-9 und TIMP-2 (siehe Abb. 3.2.2 b-i).

Die Stimulationsbedingungen wurden optimiert (siehe 3.1) und die proliferative Reaktion der Fibroblasten auf den LPA-Stimulus im XTT Proliferations-Assay deutlich gezeigt (siehe 3.4.2). Außerdem zeigte sich unter TGF- β -Stimulation eine Regulation der Fibrosezielgene Col I, TGF- β , MMP-2, und TIMP-2 (siehe 3.2.3). Auch das Ursprungsgewebe der Fibroblasten wurde auf eventuelle fibrotische Umbauprozesse überprüft. Mit Hilfe von PAS- und Sirius Red-Färbungen konnten aber keine derartigen Veränderungen des Rattenmyokards festgestellt werden (siehe Abb. 3.5.2a - d). Darüber hinaus wurde in den Versuchen 3.5.4a - g deutlich gezeigt, dass es sich bei den isolierten Zellen um Fibroblasten der zweiten Passage handelte, da diese Zellen in Färbungen mit Antikörpern gegen den Fibroblastenmarker Vimentin positiv waren, aber negativ bei Färbung mit Antikörpern gegen den Endothelzellmarker von-Willebrandt-Faktor.

Bei den Ergebnissen aus den Versuchen zur Genexpression von Fibrosezielgenen unter Stimulation mit LPA ist auffällig, dass die Expressionsniveaus der Nullwerte und Kontrollen nicht vergleichbar waren, was zu erwarten gewesen wäre (siehe 3.2.2). So lassen sich nur die Werte der Kontrollgruppe nach 24h mit denen der Nullwerte vergleichen, denn die Expression der Kontrollgruppe nach 90 min liegt auf einem höheren Niveau verglichen mit den Nullwerte. Da man dieses Phänomen bei allen Genen in verschiedener Ausprägung beobachten kann, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um einen Effekt handelt, der durch den Mediumwechsel hervorgerufen wird und daher nach der kurzen Zeit von 90 min noch sichtbar ist. An den Aussagen der Ergebnisse ändert sich dadurch nichts, da die mit LPA stimulierten Proben mit der jeweiligen Kontrollgruppe zum selben Zeitpunkt verglichen wurden.

Die MMP-9 Gene kodieren für eine 92 kDa Gelatinase, welche Gelatine, Typ IV und V Kollagene, Elastin, Entactin und Proteoglykane der EZM enzymatisch degradiert [73]. In der vorliegenden Dissertation führte die Stimulation von 1 μ M LPA über 90 min in kardialen Rattenfibroblasten zu einer verminderte Genexpression von MMP-9. Nach 24h Stimulation war

dieser Effekt nicht mehr zu erkennen, so dass von einem Kurzzeiteffekt von LPA ausgegangen werden muss (siehe Abb. 3.3.2h & i).

Aus der Literatur ist bekannt, dass die gezielte Ausschaltung der MMP-9 Gene in einem Maus-Herzinfarktmodell dazu führte, dass die Dilatation des Herzgewebes sowie die Ansammlung von Kollagenen in der Infarktregion vermindert wurden [47]. Außerdem war das Ausmaß an myokardialen Schäden nach Reperfusion des ischämischen Myokards signifikant reduziert, wenn die MMP-9 Gene ausgeschaltet wurden. Aus diesen und anderen Versuchen ergibt sich die Vorstellung, dass bestimmte MMP's, in dem sie die EZM-Struktur auflösen, im Herzinfarkt die progressive linksventrikuläre Dilatation, Wandverdünnung und kardiale Dysfunktion noch verstärken. Eine Inhibition dieser MMP's könnte einen therapeutischen Nutzen haben [47].

Der in dieser Arbeit beschriebene Effekt nach 90min von LPA auf MMP-9 kann also als frühzeitig regulatorischer Effekt im Sinne einer Stabilisierung der Zusammensetzung von EZM-Komponenten betrachtet werden, der aber nur gefolgt von anderen Mechanismen Auswirkungen auf Proteinebene haben kann.

TIMP-2 gilt als spezifischer Inhibitor der 72kDa Gelatinase MMP-2, welche am Abbau von Gelatinen, Typ IV, V, VII, XI Kollagenen, Fibronectin, Laminin, Elastin und Proteoglykanen beteiligt ist [73]. Für TIMP-2 Proteine konnte gezeigt werden, dass sie in dilatativer Kardiomyopathie (DCM) signifikant erhöht waren. Die unterschiedliche Datenlage zu den einzelnen TIMP's lässt ein exaktes Verständnis von allgemein gültiger Regulation und Bedeutung bislang nicht zu [47]. Man könnte vermuten, dass durch die verminderte Inhibition von MMP-2 vermehrt EZM-Komponenten abgebaut werden, wenn sich diese Regulation auch auf die Proteinebene auswirkt. Eine Verminderung z.B. der Fibronectinproteine konnte in der vorliegenden Dissertation nach 48h LPA-Stimulation im ELISA-Verfahren jedoch nicht beobachtet werden (siehe Ergebnisteil). Eine verminderte Expression von MMP-9 und TIMP-2 nach LPA-Stimulation konnte neben anderen Effekten vor kurzem von Sengupta et al. in Ovarian Cancer Cells gezeigt werden [74].

Ein erhöhter Abbau von EZM-Bestandteilen muss nicht unbedingt negative Auswirkungen auf das Herzgewebe haben, solange das Gesamtgefüge bestehen bleibt, bzw. andere Regulationswege diesen erhöhten Abbau kompensieren. Eine Veränderung der Genexpression für die EZM-Komponenten Col I, Col III und Fibronectin nach 90 min oder 24h LPA Stimulation konnte jedoch nicht gefunden werden, so dass der beschriebene LPA-Effekt für TIMP-2 eher als destruktiv für die Gewebzusammensetzung zu bewerten ist. Dieses Ergebnis für TIMP-2 steht im Gegensatz zu der als gewebeprotectiv zu bewertenden verminderten Expression von MMP-9 nach 90 min Stimulation mit 1 μ M LPA. Die unterschiedlichen

Zeitpunkte der gefundenen Expressionsmuster von 90 min bei MMP-9 und 24h bei TIMP-2 könnten einen Grund für diesen scheinbaren Widerspruch darstellen.

Lysophosphatidylsäure wirkt am EDG-2 Rezeptor vor allem stimulierend auf DNA-Syntheseprozesse, die MAPKinase-Signalwege, Phospholipase C (PLC) bzw. die Calciummobilisierung, auf Rho sowie die PI3Kinase bzw. Akt mit den entsprechenden Effekten wie Proliferation, Hypertrophie oder Einfluss auf Apoptoseprozesse. Die Adenylatzyklase (AC) wird von LPA über EDG-2 inhibiert [1]. Genauere Aussagen zu möglichen Signalwegen zu den MMP-9 bzw. TIMP-2 Effekten sind nicht möglich. Denkbar ist eine Interaktion von LPA mit der Synthesesteuerung von MMP's und deren Inhibitoren auf verschiedenen zellulären Ebenen.

Ein weiterer zu diskutierender Punkt ist die Auswahl der Zielgene. Von Col I und Col III ist bekannt, dass sie die Hauptbestandteile der EZM ausmachen, Fibronectin ist ein weiteres Protein aus dieser Gruppe. Die beiden Zytokine TGF- β und CTGF haben ebenfalls eine gut beschriebene Bedeutung für die Regulation der EZM-Zusammensetzung [28, 35, 36, 42, 75, 76]. Um auch die Protein-Abbauwege zu überprüfen wurden die beiden Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 sowie TIMP-2 ausgewählt, für die ebenfalls regulatorische Funktionen im Zusammenhang mit Herzerkrankungen beschrieben sind [45, 73, 77]. Diese Auswahl an Proteinen und Zytokinen repräsentiert demnach die wichtigsten Gene im Zusammenspiel der EZM-Komponenten.

Mit den kardialen Rattenfibroblasten wurde außerdem die geeignete Zellart verwendet, um einen Zusammenhang zwischen LPA und Vermehrung der EZM, als solche ist Fibrose definiert, herzustellen. Kardiale Fibroblasten produzieren die EZM-Proteine und sind daher die entscheidenden Effektorzellen der fibrotischen Umbauprozesse [25, 26, 28]. Verschiedene Gruppen haben diesen Zusammenhang näher untersucht: Fibroblasten spielen eine bedeutende Rolle im Rahmen von Hochdruckerkrankungen [27-29] oder im Rahmen der Fibroseentstehung bei diastolischer Dysfunktion [78].

Von besonderem Interesse sind Arbeiten von Brown und Dawes et al. [2, 54], die neben möglichen therapeutischen Ansätzen bei der Fibroblastenregulation auch den Aspekt der Heterogenität der Fibroblasten beschreiben: Unterschiede im Phänotyp und im Verhalten auf bestimmte Stimuli der Fibroblasten können sogar in ein und derselben Gewebeart festgestellt werden. Fibroblasten scheinen je nach Gewebetyp und Differenzierungszustand hochspezialisierte Möglichkeiten in ihren Antworten auf die unterschiedlichen intrazellulären Signale zu besitzen und so z.B. auf bestimmte Stimuli hin zu Myofibroblasten transdifferenzieren zu können [2, 69].

Die verwendeten Zellkulturbedingungen sind nur begrenzt in der Lage, pathophysiologische *in vivo* Bedingungen zu imitieren. Denn für myokardiale Prozesse wie Hypertrophie oder Fibrose sind mehr als nur eine Zellart im Zusammenspiel mit beispielsweise immunologischen Prozessen verantwortlich, so etwa die Muskelzellen, Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Thrombozyten und Endothelzellen (siehe Abb. 4.1) [2, 79, 80].

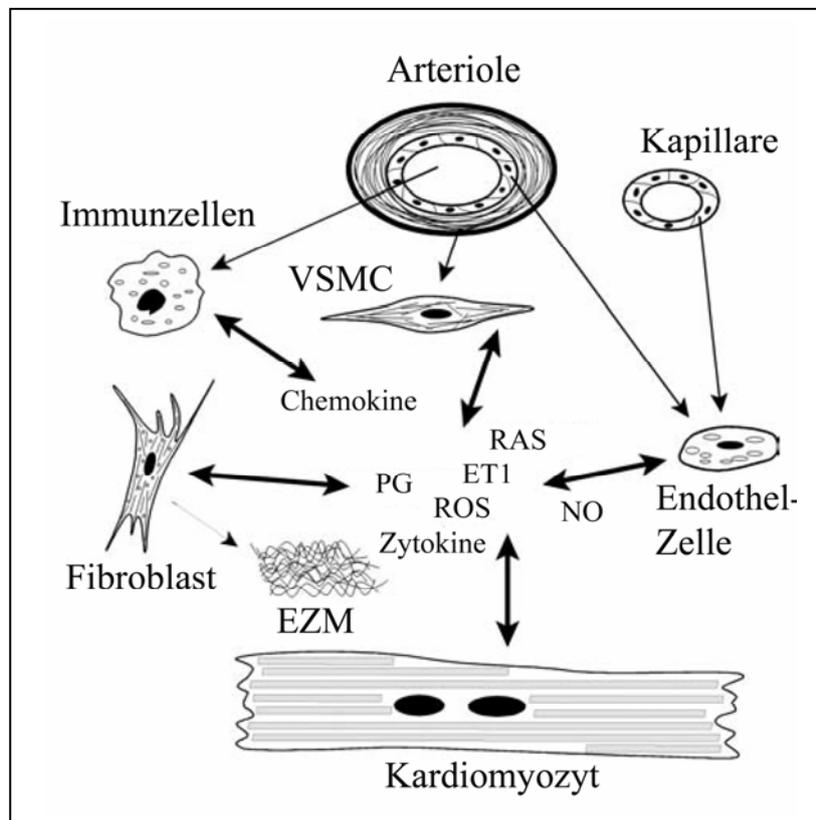


Abb. 4.1: Schema der interzellulären Kommunikation im Myokard. Die Zellarten im Myokard reagieren auf humorale und mechanische Reize und setzen im Gegenzug autokrin-parakrine Mediatoren frei. Therapeutisches Modulieren der interzellulären Signalwege kann die sich negativ verstärkende Spirale aus Imflammation und Fibrose in Herzerkrankungen unterbrechen. Abkürzungen: PG-Prostaglandine, ROS-reaktive Sauerstoffspezies, VSMC-vaskuläre glatte Muskelzellen („vascular smooth muscle cells“). Abbildungen aus Brown et al. 2005 [2].

Das Zusammenspiel dieser Zellarten mit ihren unterschiedlichen Zytokinen ist entscheidend für fibrotische Umbauprozesse. Wichtig in diesem Zusammenhang sind auch die inflammatorischen Prozesse, in deren Zusammenhang vermehrt die Ausschüttung der EDG-Agonisten LPA und S1P beobachtet wurde [79]. Mit den *in vitro* Versuchen dieser Arbeit kann man sicherlich nur einen Teilaspekt betrachten und nicht die ganze Komplexität, die unter *in vivo* Bedingungen vorhanden ist.

Abschließend muss noch der Bezug zu den Arbeiten anderer Gruppen hergestellt werden, die den Zusammenhang bestimmter EZM-Komponenten untereinander und mit LPA untersucht haben [35, 36, 38, 42-44, 76]: So konnten Piazza et al. zeigen, dass LPA-Stimulation vermehrt zur Produktion von TGF- β in humanen Keratinozyten führte. Außerdem zeigten diese Zellen

dramatische morphologische Veränderungen. Kritisch zu bewerten an dieser Arbeit sind die extrem hohen LPA Konzentrationen von 100 μM [43]. Die normale Serumkonzentration von LPA liegt im Menschen bei etwa 1 – 5 μM [1].

In der vorliegenden Dissertation konnten im Widerspruch zu der Publikation von Piazza et al. keine eindeutig sichtbaren morphologischen Veränderungen der Zellkultur im Zusammenhang mit LPA-Stimulation im Lichtmikroskop trotz des sehr ähnlichen Versuchsaufbaus beobachtet werden (siehe 3.5.1). Dies lässt sich damit erklären, dass die verwendeten Konzentrationen von 1,0 μM LPA auch 100-fach niedriger waren als in der oben genannten Arbeit.

Olorundare et al. konnten 2001 zeigen, dass die Zusammenlagerung einer Fibronectin-Matrix durch humane Thrombozyten-Plättchen mit LPA stimuliert werden konnte [31]. Bereits 1994 hatten Zhang et al. in MG-63 Osteosarkom-Zellen nachgewiesen, dass LPA die Anlagerung von Fibronectin signifikant steigern konnte [76]. Auf diesen Arbeiten gründete auch die Hypothese, dass durch LPA-Stimulation die Produktion von Fibronectin als EZM-Protein induziert werden könnte.

Duncan et al. beschrieben in einer Arbeit mit humanen Vorhautzellen und einer Nierenfibroblastenzelllinie (NRK), dass CTGF für den stimulierenden Effekt von TGF- β auf die Kollagensynthese verantwortlich ist. Außerdem konnte durch *in-vivo* Blockade von CTGF die TGF- β bedingte Bildung von Granulationsgewebe durch Hemmung der Kollagensynthese und der Ansammlung von Fibroblasten reduziert werden [38]. Dieser induzierende Effekt von TGF- β auf CTGF konnte ebenfalls von Chen et al. in humanen Stroma-Fibroblasten des Herzens und in kardialen Myozyten der Ratte nachgewiesen werden. Beide Zytokine sowie diverse EZM-Komponenten wurden nach einem Herzinfarkt vermehrt expremiert [35]. In einer Arbeit von Heusinger-Ribeiro et al. wurde als Antwort auf einen 90-minütigen 10 μM LPA-Stimulus eine Expressionssteigerung von CTGF sowie morphologische Veränderungen beschrieben. Diese Versuche wurden in humanen, renalen Fibroblasten durchgeführt [42].

Die Ergebnisse der oben genannten Arbeiten führten zu der Arbeitshypothese, dass LPA über CTGF die Expression von TGF- β , Col I, Col III und Fibronectin steigern könnte. Mögliche Abbauwege sollten ebenfalls auf Regulationen überprüft werden. Aufgrund der Ergebnisse dieser Dissertation kann die Hypothese eines stimulatorischen Effekts von 1 μM LPA über 90 min und 24h im Sinne einer Expressionssteigerung der genannten Fibrosezielgene in kardialen Rattenfibroblasten nicht aufrechterhalten werden.

Eventuell reicht 1 μM LPA bei den gewählten Zeitpunkten nicht aus. Wahrscheinlicher ist aber die Annahme, dass die LPA-Wirkung auf Zellen von vielen Faktoren und anderen Zellen abhängt und in verschiedenen Systemen völlig unterschiedlich sein kann. So haben 2004 Sato et

al. für LPA eine antagonisierende Wirkung auf die TGF- β Regulation der EZM beschrieben. Mit der relativ geringen Menge von 250 nM LPA konnte der induzierende Effekt von 5 ng/ml TGF- β auf die Col I-Produktion in humanen Hautfibroblasten komplett verhindert werden [44].

Kritisch zu hinterfragen bleiben demnach bei allen genannten Literaturstellen die Zellspezifität der beschriebenen Effekte, sowie der Versuchsaufbau mit Methoden und Stimulationsbedingungen, da diese einen erheblichen Einfluss auf die jeweiligen Ergebnisse haben. Ein besonderes Augenmerk sollte auch auf das Alter der verwendeten Zellen gelegt werden, da sich bestimmte Effekte je nach Passagezahl einer Zellart z.T. dramatisch unterscheiden können [51].

Cremers et al. konnten neben EDG-7 vor allem EDG-2 in humanen atrialen und ventrikulären Proben nachweisen sowie den Einfluss von LPA auf die myokardiale Kontraktilität näher untersuchen [81]. Untersuchungen von Mazurais et al. [21] und von Becher et al. (Anm. des Autors: *Publikation in Vorbereitung*) der AG Regitz-Zagrosek haben gezeigt, dass die Rezeptoren EDG-1 und EDG-2 in bestimmten Erkrankungen des humanen Myokards eine Rolle spielen könnten. So wurden bei den Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Regitz-Zagrosek, CCR Charité, beide Rezeptoren in dilatativer Kardiomyopathie (DCM) im Vergleich zu Proben aus gesunden Kontrollherzen verstärkt auf mRNA- und Proteinebene exprimiert. Zusätzlich wurde der EDG-1 Rezeptor auch in Aortenstenosen-Proben (AS) verstärkt exprimiert. Die Rezeptorexpression von EDG-1 und EDG-2 unterschied sich bei den DCM Proben hinsichtlich der Zellart: So wurde EDG-1 besonders auf kardialen Myozyten exprimiert, EDG-2 hingegen vermehrt auf Endothelzellen. Beobachtungen einer zytoplasmatischen und nukleären Lokalisation von EDG-2 in DCM Proben mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen konnten in HUVEC's mit Zellfraktionierung und Westernblots bestätigt werden.

Zusammenfassend kann angenommen werden, dass EDG-1 vor allem durch seine myozytäre Expression und EDG-2 auf VSMC's und Endothelzellen eine Rolle in Erkrankungen des Myokards spielen könnten.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Effekten von LPA auf Fibroblasten insofern, als dass EDG-2 zwar auf den Fibroblasten der DCM Proben exprimiert war, aber nicht signifikant unterschiedlich verglichen mit den Kontroll-Proben. Der EDG-2 Rezeptor auf kardialen Fibroblasten scheint demnach nicht die entscheidende Bedeutung für Entstehung von kardialen Erkrankungen zu besitzen. Fraglich bleibt die Übertragbarkeit von Ergebnissen auf andere Spezies, z.B. von Ratte auf Mensch und umgekehrt.

4.2 *EDG-1 in der anti-THY-1 induzierten Glomerulosklerose*

Der EDG-1 Rezeptor ist in Rattennieren mit anti-THY-1-induzierter chronisch progredienter Glomerulosklerose im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert exprimiert. Interessanterweise nimmt die Signalstärke mit steigenden Proteinuriewerten ab, was sicherlich der vermehrten Schädigung der Nierenepithelien dieser Tiere geschuldet ist. Eine Auswirkung dieser renalen Schäden im Verlaufe des ebenfalls vorliegenden renalen Hypertonus auf das Myokard konnte nicht nachgewiesen werden (siehe 3.6).

Bislang unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Peters, Nephrologie Charité, zum Zeitverlauf der EDG-1 Expression bei akuter anti-THY-1-induzierter Glomerulosklerose zeigen eine deutliche Zunahme der Signalintensität bis zum Tag 10 der akuten Glomeruloskleroseentwicklung mit einem Abfall danach. Ähnlich verhalten sich andere Zytokine, u.a. TGF- β , welches für die Fibroseentstehung bzw. Inflammation essentiell ist. TGF- β steigt anders als EDG-1 auch im chronisch progredienten Modell der Glomerulosklerose auch nach Tag 10 weiter an [65, 66].

Man könnte also angesichts der nun vorliegenden Expressionsmuster für EDG-1 aus dem chronischen Glomerulosklerosemodell vermuten, dass EDG-1 eine Art Triggerwirkung auf TGF- β besitzt und über diese bei der Induktion der Fibroseentstehung im Glomerulum beteiligt ist, danach aber diese Funktion verliert und im chronischen Zustand bedingt durch den starken Tubulusschaden schwächer exprimiert wird. Andere Arbeitsgruppen haben eine Interaktion zwischen den SIP- und TGF- β -Signalwegen bereits zeigen können [82, 83].

Für die Annahme, dass EDG-1 im Tubulussystem von besonderer Bedeutung sein könnte, sprechen auch die Ergebnisse aus der Immunhistologie, die bei gesunden wie kranken Tieren mit anti-THY-1 induzierter chronisch progredienter Glomerulosklerose eine EDG-1 Expression im Tubulussystem zeigen. Dieses tubuläre Signal für EDG-1 betrifft nur distale Tubulusabschnitte und ist vor allem basozellulär lokalisiert (siehe Abb. 3.6.1a-d und Abb. 3.6.2).

Über die Bedeutung dieses tubulären Signals für inflammatorische Prozesse wurde nicht zuletzt im Rahmen von Phase-II-klinischen Studien zur Wirkung von FTY720 nachgedacht. Von diesem Immunmodulator war bekannt, dass er über ein „Lymphozyten-Homing“, einer vermehrten Sequestration von Lymphozyten, zu einer Verbesserung im Rahmen von anti-THY-1 induzierter Glomerulosklerose führt [56]. Dabei war vor allem die Wirkung auf die Lymphozyten im Kontext von immunologischen Untersuchungen bei Transplantationen betrachtet worden, nicht aber etwaige direkte Effekte am Tubulusepithel der Niere [15, 56, 59, 63].