

Aus der Augenklinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. Franz Grehn

**Die Rolle von p38 in der TGF- $\beta$ - induzierten Transdifferenzierung  
humaner Tenonfibroblasten zu Myofibroblasten**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sonja Sieprath

aus Neu-Ulm

Würzburg, Juli 2010

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Günther Schlunck  
Koreferent: Prof. Dr. med. Heimo Steffen  
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2011

Die Promovendin ist Ärztin



Antoine de Saint-Exupéry schreibt in seinem Roman <Der kleine Prinz>  
über das Sehen:

„Man habe auch tausendmal von einem Gegenstand gehört, das Eigentümliche  
desselben spricht nur zu uns aus dem unmittelbaren Anschauen.“

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Vernarbung nach Filtrationschirurgie beim Glaukom.....	1
1.1.1 Glaukom .....	1
1.1.2 Therapie des Glaukoms .....	2
1.1.3 Postoperative Wundheilung.....	3
1.2 TGF- $\beta$ .....	4
1.2.1 Die TGF- $\beta$ -Familie .....	4
1.2.2 TGF- $\beta$ und Tenonfibroblasten .....	6
1.2.3 TGF- $\beta$ -induzierte intrazelluläre Signale .....	6
1.3 Fibroblastentransdifferenzierung.....	10
1.3.1 Myofibroblasten .....	10
1.3.2 Signaltransduktion bei der Fibroblastentransdifferenzierung.....	12
<b>2. Fragestellung der Arbeit</b> .....	13
<b>3. Material und Methoden</b> .....	15
3.1 Material.....	15
3.1.1 Verwendete Inhaltsstoffe .....	15
3.1.2 Puffer .....	16
3.2 Methoden .....	17
3.2.1 Zellkultur .....	17
3.2.2 Auswertung auf Proteinebene.....	18
3.2.3 Auswertung auf mRNA-Ebene.....	21
3.2.4 Vektoren, Klonieren und Transfektion.....	27
<b>4. Ergebnisse</b> .....	29
4.1. Biphaseische p38-Aktivierung in HTF durch TGF- $\beta$ 1 .....	29
4.2 Frühe p38-Aktivierung .....	30
4.3 Späte p38-Aktivierung.....	31
4.3.1 TBR-I-Blockade durch SB431542 .....	31
4.3.2 Charakterisierung der tiefen pP38-Bande durch Immunpräzipitation (IP) .....	32
4.4 TGF- $\beta$ -Expositionsdauer bestimmt die $\alpha$ SMA-Expression .....	33
4.5 Bedeutung der Proteinbiosynthese für die TGF- $\beta$ -induzierte SMA-Transkription.....	34

4.5.1 Translationshemmer Cycloheximid aktiviert p38 .....	35
4.5.2 Cycloheximid verhindert die $\alpha$ SMA-mRNA-Ind. nach TGF- $\beta$ -Stimulation .....	35
4.6 GADD45 $\beta$ zur Vermittlung der TGF- $\beta$ -induzierten Spätaktivierung von p38 .....	37
4.6.1 Qualitativer Nachweis von GADD45 $\beta$ .....	37
4.6.2 Zeitverlauf der GADD45 $\beta$ -Induktion nach TGF- $\beta$ 1-Stimulation .....	38
4.6.3 GADD45 $\beta$ -Transfektionsversuche .....	39
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>41</b>
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>48</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>50</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>62</b>
<b>9. Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>64</b>

## **1. Einleitung**

### 1.1 Vernarbung nach Filtrationschirurgie beim Glaukom

#### 1.1.1 Glaukom

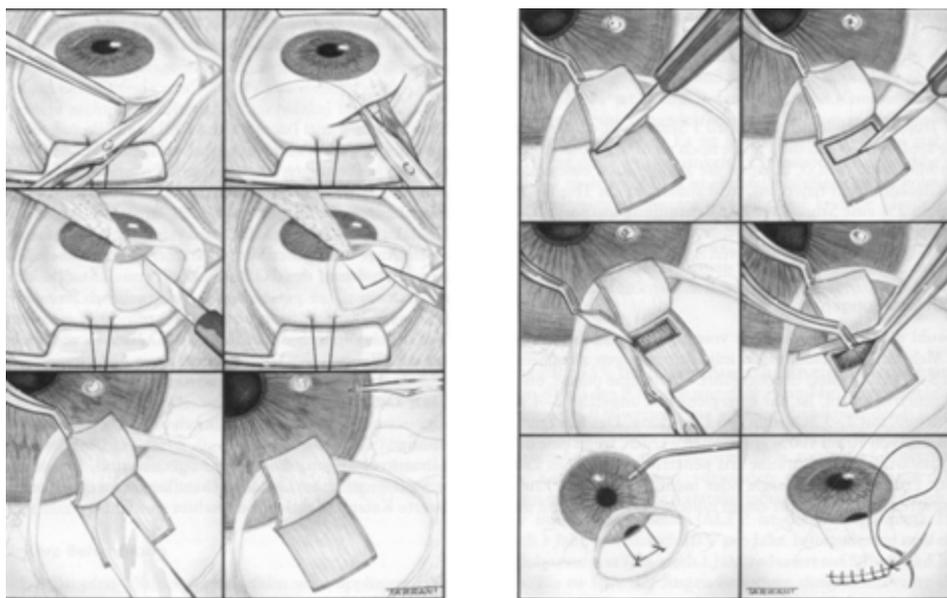
Glaukomerkrankungen sind weltweit die zweithäufigste Erblindungsursache. Zum Jahr 2010 wird mit 60,5 Millionen Erkrankten und 8,4 Millionen beidseits Erblindeten gerechnet [Quigley et al. 2006]. Im Rahmen aller Glaukomformen führt ein Untergang von Ganglienzellen der Netzhaut zum Verlust von Sehnervenfasern mit der Folge irreversibler Gesichtsfeldausfälle. Diese Ausfälle sind den Patienten aufgrund der Kompensationsmechanismen des Sehsystems oft nicht bewusst, weshalb die Pathologie oft längere Zeit unentdeckt bleibt. Die Prävalenz chronischer Glaukomerkrankungen beträgt bei über 40-Jährigen in der Bevölkerung der Industrienationen etwa 2% und nimmt mit steigendem Lebensalter zu. Durch die Verschiebung der Bevölkerungspyramide steigt ihre Bedeutung somit [Thylefors et al. 1994, [www.augeninfo.de/leit/leit15c.pdf](http://www.augeninfo.de/leit/leit15c.pdf)].

Man unterscheidet zwischen primären und sekundären Glaukomerkrankungen. Die häufigste Form des Glaukoms in der westlichen Welt ist das primäre Offenwinkelglaukom, kurz POWG. Risikofaktoren für diese Erkrankung sind neben einem für das Individuum zu hohen intraokulären Druck (IOD) zunehmendes Alter, Glaukomerkrankungen in der Familie, Myopie und eine geringe zentrale Hornhautdicke [Spalton et al. 2006, Coleman et al. 2001]. Eine Senkung des Augeninnendrucks durch Medikamente oder chirurgische Eingriffe ist derzeit die einzige Behandlungsstrategie mit bewiesener Wirksamkeit. Die früher vertretene Ansicht, dass IOD-Werte über 21 mmHg (das heißt 2 Standardabweichungen über dem Mittelwert des IOD in der Bevölkerung) als generell zu hoher Augeninnendruck zu bewerten sei, ist dem Konzept eines individuellen Ziel- oder Schwellen-IOD gewichen. Dies fundiert auf der Erkenntnis, dass bei etwa der Hälfte der Patienten eine Schädigung bei IOD-Werten unter 21 mmHg auftritt, zugleich aber auch Menschen mit deutlich höheren IOD-Werten gesund bleiben. Der Augeninnendruck wird beeinflusst durch den Kammerwassereinstrom und den Abflusswiderstand im Trabekelwerk. Das Kammerwasser fließt ausgehend vom Ziliarkörperepithel mit einer Rate von 2,4 mm<sup>3</sup>/min aus der Hinterkammer um die Linse durch die Pupille in die Vorderkammer.

Dort gelangt es im Kammerwinkel über das schwammartige Trabekelwerk in den Schlemmkanal und von den Kollektorkanälchen in die Venen der Bindehaut, die ins Blutgefäßsystem führen. Etwa 15% des Kammerwasserausstroms gelangt im sogenannten uveoskleralen Abflussweg über die Septen des Ziliarmuskels in das Gefäßsystem der Choroidea. Die Kammerwasserproduktion ist unabhängig vom IOD und nachts um etwa 40% geringer als tagsüber [Grehn 2008].

### 1.1.2 Therapie des Glaukoms

Therapeutisch steht beim POWG eine Senkung des IOD im Vordergrund. Andere Strategien wie eine Verbesserung der okulären Perfusion oder Neuroprotektion sind sicherlich pathophysiologisch erstrebenswert, jedoch bisher in der Klinik kaum effektiv umzusetzen. Ist durch medikamentöse Therapie oder Laserbehandlung des Trabekelmaschenwerks keine ausreichende IOD-Regulierung zu erzielen, muss eine operative IOD-Senkung erwogen werden. Hierfür hat sich insbesondere die Trabekulektomie als sogenannte filtrierende Glaukomoperation etabliert, bei der ein künstlicher Kammerwasserabflussweg von der Vorderkammer unter die Bindehaut geschaffen wird. Zur Flusskontrolle dient ein zuvor präparierter Skleradeckel, welcher die chirurgisch angelegte Öffnung der Sklera bis auf einen feinen Spalt am Schnitttrand abdeckt. Aufgrund des ausströmenden Kammerwassers entwickelt sich eine leichte Schwellung der Bindehaut, das so genannte Sickerkissen.



**Abbildung 1: Schema des chirurgischen Procedere der Trabekulektomie [Kanski et al. 1996]**

Ziel der Trabekulektomie ist es, den IOD langfristig auf Zieldruckniveau zu senken ohne zusätzlich Medikamente einsetzen zu müssen. Dies gelingt üblicherweise bei etwa 40% der Patienten. Durch intensive postoperative Überwachung und Nachbehandlung kann die Erfolgsrate auf 65% gesteigert werden [Marquardt et al. 2004]. Der Hauptgrund für die eingeschränkte Erfolgsrate nach Trabekulektomie ist eine überschießende Wundheilung mit konsekutiver Vernarbung der Bindehaut im Bereich des Sickerkissens. Oft wird deshalb innerhalb von 12 Monaten der erneute Einsatz drucksenkender Medikamente nötig. Im Rahmen der intensivierten Nachbetreuung wird der Heilungsverlauf im Bereich des Sickerkissens beobachtet. Zur Beurteilung wurden standardisierte Kriterien bezüglich Ausmaß der Vaskularisation, Auftreten von Korkenzieher-Gefäßen und Mikrozysten, Abgrenzbarkeit zur Umgebung, Transparenz und Vorwölbung des Sickerkissens, Verschieblichkeit und Dichtigkeit beschrieben [Picht et al. 1998, Addicks et al. 1983]. Bei Patienten mit erhöhtem Vernarbungsrisiko wird der Erfolg der Filtrationschirurgie bisher pharmakologisch verbessert [Mutsch et al. 2000; Khaw et al. 2001]. Zur Prävention überschießender Vernarbung werden die Antimetaboliten 5-Fluorouracil (5-FU), ein DNA-Synthesehemmer oder Mitomycin C (MMC), ein DNA-Replikationshemmer eingesetzt. Deren toxische Nebenwirkungen, insbesondere auf das Hornhautepithel, sind häufig eine Belastung für die Patienten, was die Anwendung der Antimetaboliten deutlich einschränkt [Wimmer et al. 2002].

### 1.1.3 Postoperative Wundheilung

Der therapeutische Einsatz von Antimetaboliten zielt auf eine Hemmung der Proliferation von Fibroblasten ab, die Granulationsgewebe und später kollagenes Narbengewebe bilden. Die Wundheilung ist ein dynamischer Prozess, an dem Blutzellen, extrazelluläre Matrix und Parenchymzellen sowie Wachstumsfaktoren beteiligt sind. Während der Wundheilung lassen sich verschiedene Phasen abgrenzen: Inflammation, Gewebeformation und Gewebereorganisation [Singer et al. 1999]. Nach Verletzung kommt es zum Austritt von Plasmaproteinen und Blutzellen, es bilden sich Fibrin-Fibronectin-Komplexe. Blutplättchen erleichtern nicht nur die Bildung von Koageln sondern sezernieren auch verschiedene Botenstoffe, die Makrophagen und Fibroblasten anziehen und aktivieren. Zahlreiche vasoaktive Mediatoren und chemotaktische Faktoren wie Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ) bewirken das

Einwandern inflammatorischer Leukozyten und Monozyten. Diese helfen, die Wunde von eingedrungenen Fremdkörpern und Bakterien zu befreien. Wichtige von Monozyten und Makrophagen gebildete Wachstumsfaktoren wie Transforming Growth Factor alpha und beta (TGF- $\alpha$ / - $\beta$ ), Platelet derived Growth Factor (PDGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Interleukin-1 (IL-1) und Insulin-like Growth Factor (IGF-1) initiieren die Proliferation von Fibroblasten und die Angiogenese.

Wesentlich für eine ausreichende Wundheilung aber auch eine Vernarbungsreaktion ist die Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Diese tritt vor allem zwischen dem dritten und zehnten Tag nach Verletzung auf. Die Myofibroblasten synthetisieren vermehrt extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin, Collagen und Glycosaminoglykane, woraus Granulationsgewebe entsteht. Zugleich exprimieren Myofibroblasten glattmuskuläres Actin, das ihnen eine verstärkte Kontraktionskraft verleiht. Nach Rückbildung eingesprosseter Blutgefäße und Zellapoptose entsteht dichtes kollagenes Narbengewebe [Grinnell 1994/ 2003, Clark et al 1997, Gabbiani et al. 1978, Montesano et al. 1988].

Die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten wird wesentlich durch den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  angestoßen, worauf im Weiteren näher eingegangen werden soll.

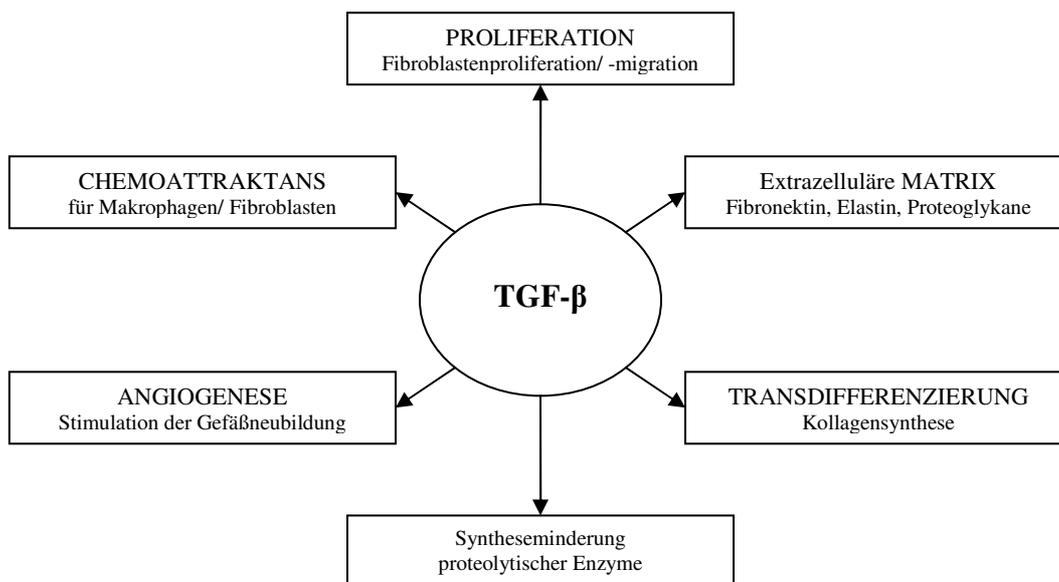
## 1.2 TGF- $\beta$

Transforming Growth Factor beta, kurz TGF- $\beta$ , gilt als eines der wichtigsten Signalmoleküle in Zusammenhang mit Zelldifferenzierung, Fibrosierung und Wundheilung in okulärem Gewebe [Connor et al. 1998, Lee et al. 1999, Li et al. 1999, Cordeiro 2003].

### 1.2.1 Die TGF- $\beta$ -Familie

TGF- $\beta$  repräsentiert den Prototyp von über 30 strukturell verwandten, jedoch funktionell verschiedenen Wachstumsfaktoren, TGF- $\beta$ -Superfamilie genannt [Massagué 1987]. Hierzu gehört die Familie des Bone Morphogenetic Proteins (BMP), deren Homologa in Drosophila namens Drosophila Decapentaplegic (Dpp), die Familie der Growth and Differentiation Factors (GDF), Activin, Inhibin und der entfernt verwandte Glial-derived Neurotrophic Factor (GDNF) sowie das Anti-Müllerian Hormone (AMH)

[Burt et al. 1994]. Diese Proteine sind evolutionär konserviert und kommen in unterschiedlichen Organismen vom Insekt bis zum Menschen vor. Sie zeichnen sich durch eine charakteristische „cystein-knot-structure“, bestehend aus sieben oder neun Cystein-Residuen, aus. Daher können sie auch der Gruppe der cystein-knot enthaltenden Wachstumsfaktoren zugeordnet werden, zu der auch der Nerve Growth Factor (NGF), der Platelet-derived Growth Factor (PDGF), der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und das humane Choriongonadotropin (HCG) zählen [McDonald et al. 1993]. TGF- $\beta$  wurde initial als wachstumsinduzierendes Protein aus Nierenfibroblasten von Ratten isoliert und aufgrund seiner in diesem Modell beobachteten onkogen transformierenden Eigenschaften als Transforming Growth Factor bezeichnet. Inzwischen ist TGF- $\beta$  als multifunktionales Protein bekannt, das auf viele verschiedene Zelltypen unterschiedlich wirkt [Lawrence 1996, Blobel et al. 2000, Abreu et al. 2002, Bhatnagar et al. 1990]. Dazu zählen unter anderem Zellmigration, -differenzierung und -proliferation [Strutz et al. 2001, Kasai et al. 2005, Li et al. 2003], Apoptoseinduktion [Alexandrow et al. 1995, Edlund et al. 2003/ 2005], Produktion extrazellulärer Matrix [Singer et al. 1999] und Immunregulation [Shull et al. 1992]. Eine wesentliche pathogenetische und regulierende Rolle wurde für Krebserkrankungen [Markowitz et al. 1996] und fibrosierende Erkrankungen [Zhang et al. 1994, Border et al. 1994, Branton et al. 1999, Leask et al. 2004, Saika et al. 2006] beschrieben.



**Abbildung 2: TGF- $\beta$ -induzierte Vorgänge**

Es sind drei Isoformen, TGF- $\beta$ -1 bis - $\beta$ -3 für Säugetiere bekannt [Roberts et al. 1990]. Für TGF- $\beta$ -1 und - $\beta$ -2 ist die Rolle als Stimulans der dermalen Narbenbildung bekannt, TGF- $\beta$ -3 scheint die Vernarbung in vivo zu hemmen [Shah et al. 1995].

### 1.2.2 TGF- $\beta$ und Tenonfibroblasten

Unter den Wachstumsfaktoren nimmt TGF- $\beta$  mit den Isoformen  $\beta$ -1,  $\beta$ -2 und  $\beta$ -3 eine regulatorische Schlüsselposition für die Vernarbungsinduktion in Tenonfibroblasten nach filtrierender Glaukomchirurgie ein, wobei vor allem die Isoformen 1 und 2 im Kammerwasser des Auges nachweisbar sind [Pasquale et al. 1993]. Die Konzentration von TGF- $\beta$ -2 ist im Kammerwasser bei Patienten mit POWG signifikant erhöht und korreliert mit einer erhöhten Vernarbungstendenz des Sickerkissens [Lama et al. 2003, Picht et al. 2001]. Alle drei Isoformen sind potentielle Modulatoren der konjunktivalen Vernarbungsabläufe [Cordeiro et al. 2000]. TGF- $\beta$ -2 modifiziert die Wirkung der Antimetaboliten nach Filtrationschirurgie [Cordeiro et al. 1999(1)]. Die Neutralisation von TGF- $\beta$ -2 mittels des monoklonalen Antikörpers CAT-152 (Lederlimumab), welcher subkonjunktival perioperativ und postoperativ appliziert wurde, zeigte im Tiermodell sowie in Pilotstudien vielversprechende Ergebnisse [Cordeiro et al. 1999(2), Mead et al. 2003, Khaw et al. 2005]. Im Rahmen von multizentrischen Phase III Studien konnte jedoch keine signifikante Vernarbunsminderung gegenüber der Placebogabe gezeigt werden [Khaw et al. 2007].

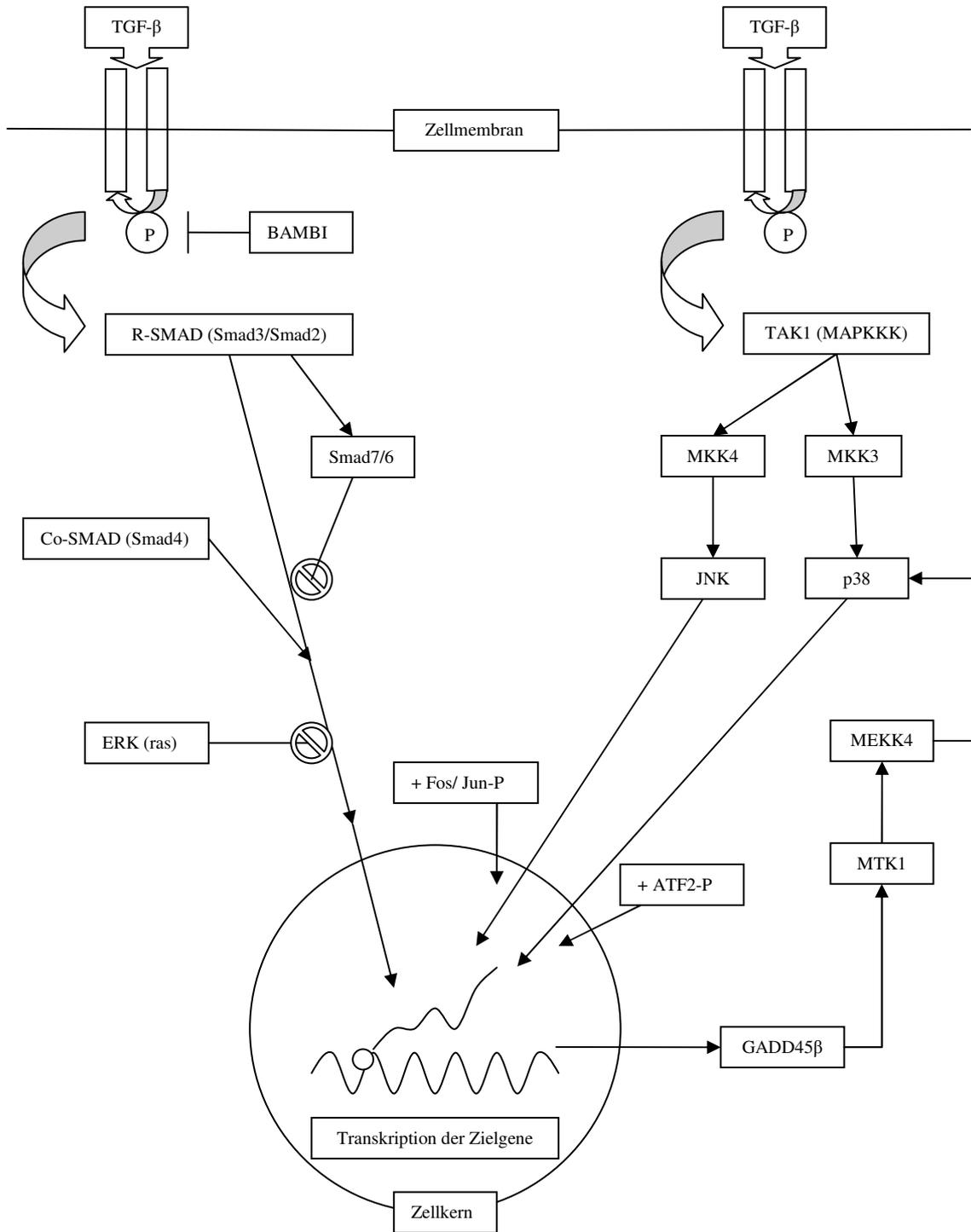
Weitere Ansätze zielen auf die Hemmung von TGF- $\beta$  auf mRNA-Ebene durch antisense-Oligonukleotide ab [Cordeiro et al. 2003]. Eine Alternative stellt eine Rezeptorblockade dar, die bisher in anderen Organsystemen wie der durch TGF- $\beta$  induzierten Leberzellfibrose in Tierversuchen Erfolg zeigte [Jiang et al. 2004].

### 1.2.3 TGF- $\beta$ -induzierte intrazelluläre Signale

Um neue spezifische und nebenwirkungsarme Therapieansätze zu entwickeln, ist ein besseres Verständnis der Pathophysiologie der Wundheilung wichtig. Bisherige Ansätze widmen sich der Inhibition der Zellteilung oder dem Abfangen von TGF- $\beta$ . Die Identifikation zentraler Signalmoleküle, die in der Zelle eine Umsetzung des Wachstumsfaktorsignals in zelluläre Veränderungen bewirken, kann die Basis für weitere spezifische Ansätze zur Vernarbungshemmung sein. Zu beachten ist immer,

dass die betrachteten Signalkaskadenteilnehmer Teil eines komplexen Netzwerkes sind. Zur schematischen Übersicht über die diversen Signalkaskaden betrachte man Abbildung 3, ergänzende Erläuterungen der dargestellten Kaskadenteilnehmer folgen.

Mehrere Pfade der Signalweitergabe von TGF- $\beta$  in Effektorzellen sind beschrieben [Massagué et al. 2000, Rahimi et al. 2007]: Die Bindung von TGF- $\beta$  erfolgt an spezifische membranständige Serin-/ Threoninkinase-Rezeptorpaare, wobei TGF- $\beta$  als Ligand jeweils einen Typ I und einen Typ II Rezeptor, kurz TBR I und II, zusammenführt. TBR II aktiviert TBR I durch Phosphorylierung. Dieser aktiviert wiederum unter anderem SMAD-Signalproteine, die das Signal intrazellulär weiterleiten. Neben dem SMAD-Signalweg ist die Signalvermittlung über verschiedene Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) beschrieben. Vertreter sind die Jun N-terminal Kinase (JNK), die p38 Kinase und die Extracellular-signal-regulated Kinase (ERK). So aktiviert TGF- $\beta$  in Fibrosarkomzellen JNK über die MAP-Kinase Kinase MKK 4 [Hocevar et al. 1999] und in Lungen- und Nierenepithelzellen p38 über die MKK 3 [Hanafusa et al. 1999, Sano et al. 1999]. Auch Verknüpfungen der jeweiligen Signalkaskaden sind bekannt [Furukawa et al. 2003].



TGF-β = Transforming growth factor beta  
 BAMBI = BMP and Activin membrane-bound inhibitor  
 ERK = Extracellular-signal regulated kinase  
 SMAD = Small mothers against decapentaplegic  
 GADD45β = growth arrest DNA damage-inducible gene 45beta

⊘ = inhibiert

TAK/MTK = TGF-/Mitogen-activated kinase  
 MKK(K) = Map kinase kinase (kinase)  
 JNK = Jun N-terminal kinase  
 p38 = Protein 38 Map kinase  
 ATF2 = Activating transcription factor

→ = stimuliert/ vermittelt

Abbildung 3: Schema intrazellulärer Signalkaskaden von TGF-β

### 1.2.3.1 SMADs (Small-size Mothers against Decapentaplegic)

Receptor-phosphorylated SMADs, kurz R-SMADs, wurden als klassische Signalübermittler der TGF- $\beta$ -Superfamilie identifiziert und werden in Zusammenhang mit TGF- $\beta$ -Signalgebung als kanonische Signalwege bezeichnet [Derynck et al. 2003]. Die intrazelluläre Signalweitergabe von TGF- $\beta$ , Activin und Nodal erfolgt über SMAD2 und SMAD3 [Chen et al. 1999, Massagué et al. 2000, Nakao et al. 1997]. Nach Bindung von TGF- $\beta$  an seinen Rezeptor und dessen Aktivierung werden die R-SMADs SMAD2 und SMAD3 phosphoryliert, wodurch sich ihre Affinität zu SMAD4 erhöht, das als Cofaktor für den Importin- $\alpha$ -unabhängigen Import in den Nucleus wirkt. Nach der Translokation vom Cytoplasma in den Nucleus reguliert der SMAD-Komplex die Expression von Zielgenen, indem er gemeinsam mit weiteren Transkriptionsfaktoren durch Protein-Protein- oder Protein-DNA-Interaktion aktivierend oder inhibierend wirkt [Attisano et al. 2000/ 2001; Itoh et al. 2000; Denissova et al. 2000; Hocevar et al. 2001; Penheiter et al. 2002]. Für SMADs wurde sowohl eine tumorsuppressive als auch eine das Tumorwachstum begünstigende Rolle in humanen Krebserkrankungen [Xu et al. 2000], sowie Bedeutung in der embryonalen Entwicklung [Letamendia et al. 2001] und Wundheilungsprozessen [Ashcroft et al. 1999] beschrieben. Letztere Arbeit konnte zeigen, daß SMAD3-knock-out Mäuse nach Zufügen einer dermalen Wunde eine geringere lokale Entzündungsreaktion sowie eine geringere Tendenz zur hypertrophen Narbenbildung als Wildtyp-Mäuse zeigten.

### 1.2.3.2 P38 MAPK

Neben der Aktivierung von SMAD-Proteinen sind weitere Signalkaskaden wie der p38-Signalweg an der Vermittlung von TGF- $\beta$ -Effekten in der Zelle beteiligt [Derynck et al. 2003, Horowitz et al. 2004]. Der p38-Signalweg gehört zu der Gruppe der Mitogen Activated Protein Kinasen (MAPK). Dies sind evolutionär konservierte dreistufige Kaskaden aus Kinasen [Chang et al. 2001]. Der p38-Signalweg wurde initial in Hefen gefunden, wobei eine Aktivierung durch Änderung der Osmolarität, insbesondere durch hyperosmolare Umgebungen auffiel [Brewster et al. 1993]. Es sind vier verschiedene p38-Isoformen, nämlich  $\alpha$  (SAPK2 $\alpha$ ),  $\beta$  (SAPK2 $\beta$ ),  $\gamma$  (SAPK3 oder ERK-6) und  $\delta$  (SAPK4) bekannt. Zunächst wurde der p38-Signalweg in Zusammenhang mit proinflammatorischen Zytokinen wie TNF oder IL-1 beschrieben [Lee et al. 1994,

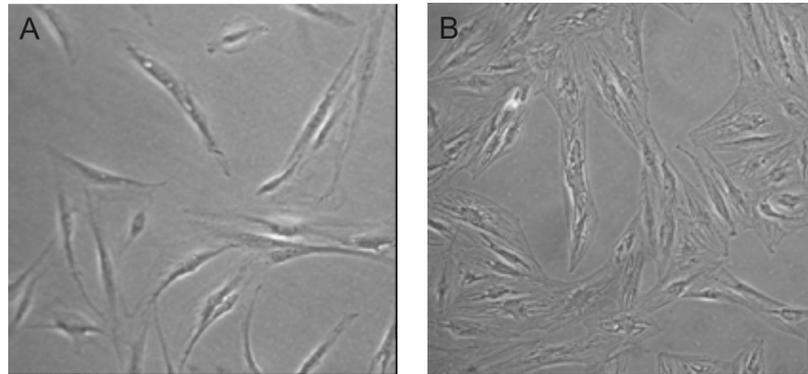
Raingaud et al. 1995]. Heute wird er allgemein als Signalweg verschiedener Stresstimuli wie Stimulation mit Lipopolysacchariden im Rahmen bakterieller Infektionen, inflammatorischer Signalgebung oder Apoptoseinduktion eingeordnet [Jiang et al. 1996/ 1997, Han et al. 1995, Takekawa et al. 1997]. In Zusammenhang mit TGF- $\beta$  wurde der p38-Pfad als einer der ersten nicht-kanonischen Signalwege etabliert. Die Phosphorylierung und damit Aktivierung von p38 durch den externen Stimulus TGF- $\beta$  kann direkt über TAK1 und MKK3 erfolgen [Sano et al. 1999, Yamaguchi et al. 1999]. Neben dieser direkten Aktivierung wurde eine weitere indirekte Aktivierung von p38 durch TGF- $\beta$  durch Synthese des Mediators GADD45 $\beta$  beschrieben, der sekundär zur Aktivierung von MTK1 und MKK4 führt [Takekawa et al. 1998/ 2002]. Growth Arrest DNA Damage-inducible Gene 45 beta (GADD45 $\beta$ ) ist ein Protein, das in die Zellantwort auf genotoxischen Stress involviert ist [Chen et al. 2002; Chi et al. 2004]. In Karzinomzellen wird es durch proliferationshemmende und proapoptotische Faktoren induziert [Amanullah et al. 2003]. An Brustdrüsenepithel konnte gezeigt werden, dass der p38-Signalweg und nicht der SMAD-Signalweg für die TGF- $\beta$ -abhängige Induktion von Apoptose sowie die Transdifferenzierung von epithelialen zu mesenchymalen Zellen entscheidend ist, wohingegen die ebenfalls durch TGF- $\beta$  bewirkte Proliferationshemmung eine intakte SMAD-Signalgebung voraussetzt [Yu et al. 2002]. Auch Bakin et al. konnten eine Beteiligung des p38-Signalwegs an der Transdifferenzierung von Epithel- zu Mesenchymzellen nachweisen [Bakin et al. 2002]. Im Folgenden soll auf die für Vernarbungsreaktionen so wichtige Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten eingegangen werden. Anschließend werden die zugrundeliegenden Signalkaskaden diskutiert.

### 1.3 Fibroblastentransdifferenzierung

#### 1.3.1 Myofibroblasten

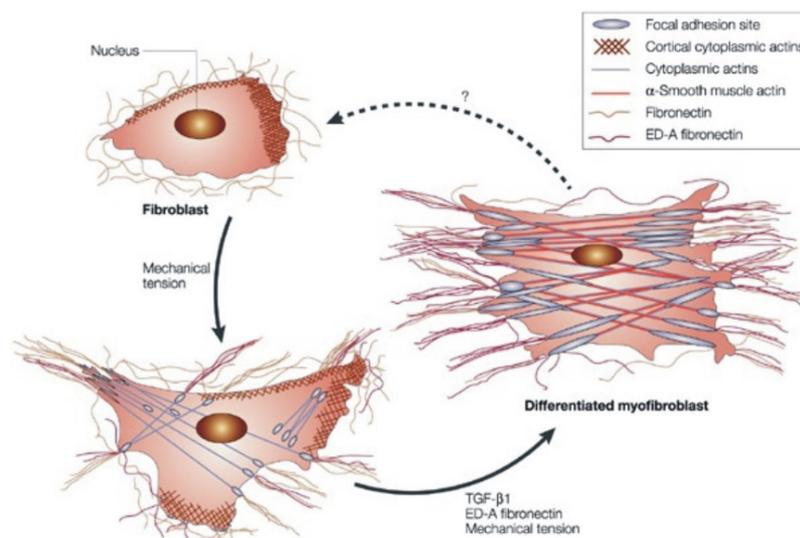
Myofibroblasten lassen sich als modifizierte Fibroblasten mit kontraktilelementen beschreiben. Sie werden während der Wundheilung im Granulationsgewebe beobachtet und es wird ihnen Bedeutung in Hinsicht auf Produktion und Reorganisation von Extrazellulärmatrix und somit der Wundkontraktion zugeschrieben [Desmouliere et al. 2005, Daniels et al. 2003, Kurosaka et al. 1998]. Morphologisch sind Myofibroblasten durch einen verstärkten kontraktilelementen Apparat mit glattmuskulärem Actin charakterisiert

[Serini et al. 1999, Jester et al. 1999, Tomasek et al 2002, Schmitt-Graff et al. 1994].  
Abbildung 4 zeigt humane Tenonfibroblasten HTF in Zellkultur mit typischem Wachstum in der Ebene und länglicher Morphologie (A), sowie transdifferenzierte Myofibroblasten mit verstärkten Filamentstrukturen (B).



**Abbildung 4: Photographie HTF in Zellkultur bei 100facher Vergrößerung. A: unstimulierte HTF in Zellkultur. B: zu Myofibroblasten transdifferenzierte HTF nach 72 Stunden TGF- $\beta$ -Stimulation**

Während der TGF- $\beta$ -induzierten Proliferation und Transdifferenzierung von Tenonfibroblasten zu Myofibroblasten wird die Expression von Collagen I $\alpha$ 1, Fibronectin und Smooth Muscle Actin alpha ( $\alpha$ SMA) gesteigert.  $\alpha$ SMA gilt als spezifischer Marker für die Transdifferenzierung zum Myofibroblasten [Desmouliere et al. 1993].



**Abbildung 5: Transdifferenzierung von Fibroblast zum Myofibroblast mit Ausbildung eines kontraktile Apparats und Organisation der Extrazellulärmatrix [Tomasek et al. 2002]**

### 1.3.2 Signaltransduktion bei der Fibroblastentransdifferenzierung

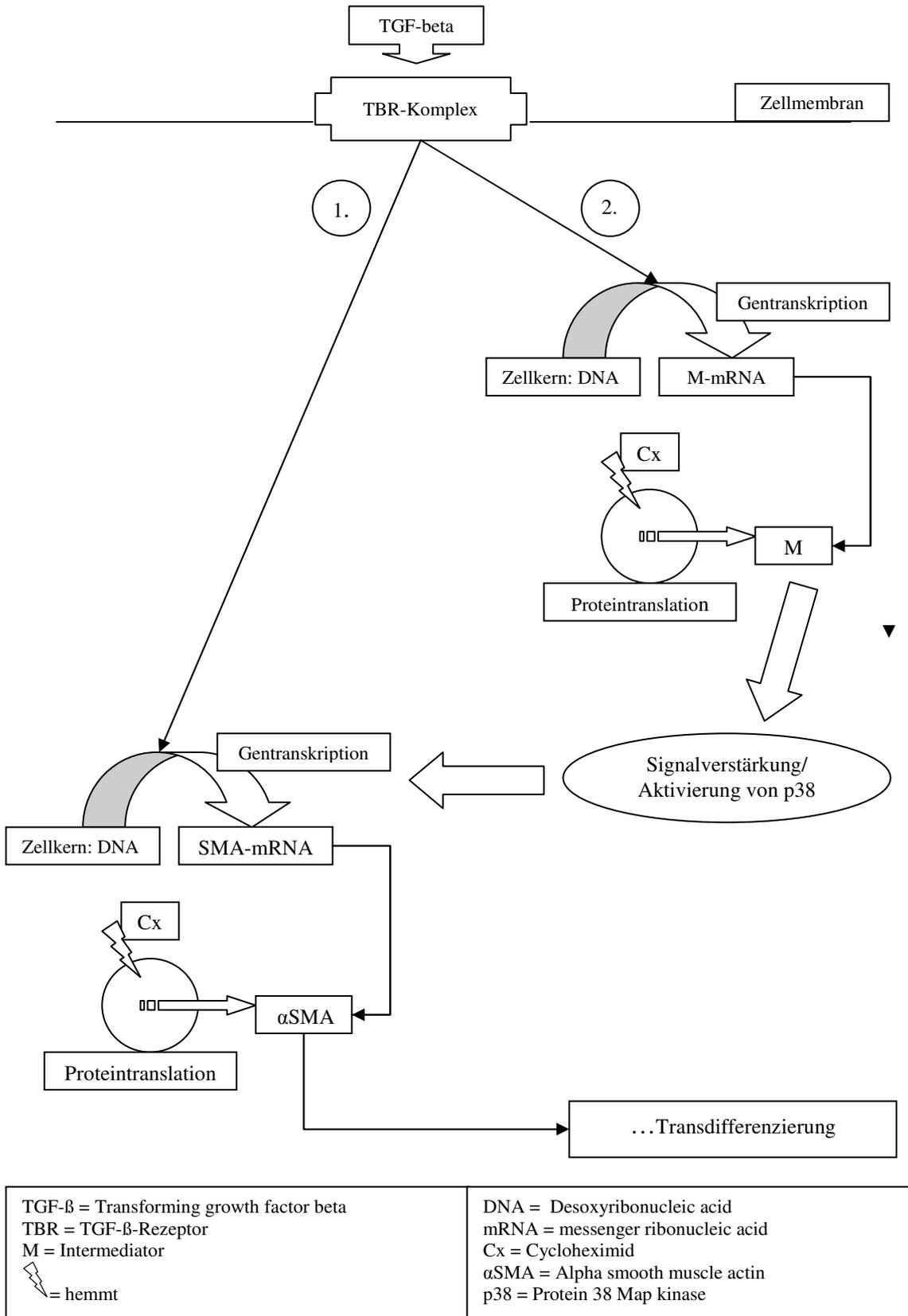
Die Signalkaskaden, welche an der durch TGF- $\beta$  induzierten Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten beteiligt sind, wurden in verschiedenen Arbeiten untersucht. Neben Hinweisen auf eine Beteiligung von SMAD3 an der TGF- $\beta$ -bedingten Transdifferenzierung [Liu et al. 2003, Hu et al. 2003] scheinen sowohl der p38-Signalweg [Li et al. 2006] als auch die Interaktion der Fibroblasten mit der Umgebung [Dugina et al. 2001], eine intakte Integrin-Signalgebung [Thannikal et al. 2003, Meyer-ter-Vehn et al. 2006-2] sowie eine gewisse Steifigkeit der Umgebung für die Transdifferenzierung wichtig zu sein [Arora et al. 1994]. In eigenen Vorarbeiten, welche teilweise auch Bestandteil dieser Doktorarbeit sind und im Detail im Ergebnisteil erörtert werden, konnte eine wesentliche Beteiligung des p38-Signalweges bei der TGF- $\beta$ -induzierten Transdifferenzierung nachgewiesen werden [Meyer-ter-Vehn et al. 2006-1]. Wichtig für die Transdifferenzierung zeigte sich vor allem eine verzögerte, nach etwa 12 Stunden einsetzende und dann anhaltende Aktivierung von p38. Wie zuvor beschrieben sind verschiedene Mechanismen für eine direkte Aktivierung von p38 nach TGF- $\beta$  Stimulation bekannt. Beispielsweise via XIAP und TAK-1 [Sano et al. 1999, Yamuguchi et al. 1999]. Aufgrund der erst verspätet einsetzenden Phosphorylierung von p38 ist ein indirekter Mechanismus, z.B. über die Synthese eines weiteren Signalmoleküls, wahrscheinlich. Takewaka et al. beschrieben hierfür die indirekte Aktivierung von p38 nach TGF- $\beta$ -Stimulation über eine zwischengeschaltete Synthese von GADD45 $\beta$  [Takakawa et al. 2002].

## **2. Fragestellung der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die intrazellulären Vorgänge auf dem Wege der Transdifferenzierung humaner Tenonfibroblasten zu Myofibroblasten, insbesondere auch die Aktivierung p38-Signalweges, näher zu untersuchen.

Es galt die verzögert einsetzende Aktivierung von p38 genauer zu charakterisieren. Hier wurde besonderes Augenmerk auf den Zeitverlauf gelegt. Einer direkten Aktivierung wurde eine zwischengeschaltete Intermediator-Synthese gegenübergestellt (siehe auch Abbildung 6). Als mögliche Arbeitshypothese dienten die Ergebnisse von Takekawa et al. 2002, die in Tumorzellen des Pankreas und in Überexpressionsexperimenten eine indirekte Aktivierung von p38 durch Induktion von GADD45 $\beta$  beschrieben. Es galt jedoch zu berücksichtigen, dass sich die hierzu publizierten Daten meist auf eine epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung bezogen, die von der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten zu unterscheiden ist. Weiterhin mussten die beobachteten Zeiträume ausgeweitet werden: Takekawa et al. berichteten von einer verzögerten p38-Aktivierung nach zwei Stunden, die verzögerte Aktivierung in humanen Tenonfibroblasten wurde jedoch frühestens nach 8 Stunden beobachtet.

Auf dieser Grundlage wurden zahlreiche Experimente durchgeführt, die Analyse bezog sich auf Protein- und mRNA-Ebene. Im Folgenden werden nach Erläuterung der Methoden die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit aufgeführt und diskutiert.



**Abbildung 6: Schema direkte Transdifferenzierungsaktivierung (Pfad 1) vs. Zwischenschritt (Synthese eines Zwischenboten, Pfad 2)**

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

<i>Beschreibung</i>	<i>Merkmale</i>	<i>Vertrieb</i>
Zellkulturschalen	100x20mm-/ 60x15mm-/ 35x10mm- Falcon®-Schalen	Becton Dickinson Labware
Sterile Behälter	5ml-/10ml-/20ml Falcon®-tube	Becton Dickinson
Sterile Behälter	1,5ml-micro tubes	Sarstedt AG&Co. A.Hartenstein
total RNA purification kit	RNeasy	Qiagen
Zubehör RNA-Ernte	RNeasy spin columns	Qiagen
Proteinleiter Marker Western Blot	Bench Mark™ prestained Protein Ladder	Invitrogen
Blotmembran	Polyvinylidene-Difluorid (PVDF)	GE-Healthcare

#### 3.1.1 Verwendete Inhaltsstoffe

<i>Titel</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Charakterisierung</i>	<i>Vertrieb</i>
DMEM mit L-Glutamin -low glucose (1g/l)	DMEM	Zellkulturmedium HTF	PAA Lab. GmbH
DMEM mit L-Glutamin -high glucose (4,5g/l)		Zellkulturmedium S3T3	PAA
Penicillin/Streptomycin	PS	10.000U/10mg/ml Antibiotika 1:100 in Kulturmedien	PAA
fetales Kälberserum	FCS	Wachstumsstimulans 0,1–10% in Kulturmedien	Biochrom AG
Phosphate Buffered Saline	PBS	Proteinernte	PAA
HANK`s BSS without Ca/Mg/phenolred 2,5mM EDTA	HANK`s	Destabilisierung Zelladhärenz Passage/ Ernte	PAA
Ethylendiaminetetraacetic Acid	EDTA	Komplexbildner	Interchim Uptima
TRYPsin/EDTA		enzymatische Andauung Ca-Komplexierung	PAA
Natriumchlorid	NaCl	Kochsalz	Roth
Salzsäure	HCl	pH-Ausgleich	Merck
Trishydroxymethylaminomethan	Tris	Pufferbasis	Roth
Tween-20		Alkal. Detergens	Merck
Glyzerin	Gly	Konservierung	Roth
Sodium Dodecyl Sulfat	SDS	Ladungsmaskierung	Interchim
Bromphenolblau		Proteinlysatfärbung	Merck
2-Mercaptoethanol	2-ME	Proteindenaturierung	Roth

Triton x100		Konservierung	Sigma
Methanol	CH <sub>2</sub> OH		J.T.Baker
Sodium Vanadate		Phosphataseinhib.	
Natrimfluorid	NaF	Phosphataseinhib.	
Phenylmethylnsulphonylfluorid	PMSF	Proteaseinhibitor	
SuperScript™II	SSRT	Reverse Transkriptase	Invitrogen
Oligo-dT-/random-Primer	dT/r	Primer cDNA-Gen.	Promega
Deoxyribonucleotidtriphosphate	dNTP	Basen PCR (10mM)	Promega
taq-Polymerase	taq	Polymerase PCR	Promega
Agarose		peqGOLD Universal A.	peqLab
Ethidiumbromid	EtBr	Bromierung DNA	

### 3.1.2 Puffer

<i>Verwendung</i>	<i>Titel</i>	<i>Inhaltsstoffe</i>	<i>Konzentration</i>
Lysepuffer Proteinernte	<u>TNE-Lysepuffer</u>	Tris NaCl EDTA Triton x100	50mM 150mM 1mM 1%
	+Phosphataseinhib.	Sodium Vanadate Natrimfluorid	1mM 50mM
	+Proteaseinhib. (Roche)	PMSF Proteaseinhibitoren	0,1% 1:6
Ladepuffer Proteinlysate	<u>4xProbenpuffer</u>	Tris Glyzerin SDS Bromphenolblau 2-Mercaptoethanol	0,1M 10% 4% 0,01% 5%
Laufpuffer SDS-PAGE	<u>10xRunnig Buffer</u>	Tris Glycine SDS H <sub>2</sub> O	25mM(30,3g) 192mM(144g) 0,1% (10g) auf 1000ml
	<u>1xRunning Buffer</u>	100ml 10xRB zu 900ml H <sub>2</sub> O	
Transferpuffer SDS-PAGE	<u>10xTransfer Buffer</u>	Tris Glycine H <sub>2</sub> O	25mM(30,3g) 192mM(144g) auf 1000ml
	<u>1xTransfer Buffer</u>	200ml 10xTB zu 400ml Methanol, 1400ml H <sub>2</sub> O	
	<u>10xTBS</u>	Tris-HCl pH7,4 NaCl HCL konz. H <sub>2</sub> O	10mM (12,11g) 150mM (87,66g) auf pH 7,4 auf 1000ml
Universalpuffer Antikörper WB	<u>1xTBST</u>	100ml 10xTBS zu 900ml H <sub>2</sub> O, 1ml Tween 20	

Lysepuffer	<u>RIPA</u>	Tris NaCl, Triton x100 SDS Sodium Desoxycholate	50mM 150mM 0,1% 0,1% 1%
Gelpuffer DNA-Gele	<u>50xTAE</u>	Tris Eisessig EDTA ph8 H2O	242g 57,1ml 0,5M auf 1000ml

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Zellkultur

Als Zellkultursystem wurden vornehmlich menschliche Tenonfibroblasten, kurz HTF verwendet. Diese wurden als primäre Zellen in Expansionskultur aus kleinen Tenonbiopsaten gezogen. Die Biopsate wurden im Rahmen von standardchirurgischen Eingriffen am Universitäts-Augenklinikum Würzburg nach ausführlicher Aufklärung und schriftlichem Einverständnis der Patienten gewonnen. Eine Bewilligung durch die Ethik-Kommission lag vor. Weiterhin wurde als Vergleichssystem mit einer Mäuse-Fibroblasten-Zelllinie, murinen Swiss-3T3-Zellen S3T3 gearbeitet.

Die Zellen wurden in logarithmischer Wachstumsphase auf 100mm Zellkulturschalen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung im Zellinkubator (HeraCell 240) gehalten. Es erfolgte ein regelmäßiger Wechsel des Kulturmediums DMEM 10% FCS und mikroskopische Kontrolle. Bei etwa 75% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Besonderheiten der Kultur von humanen Tenonfibroblasten ergaben sich aus der Zellgröße und zellspezifischen Empfindlichkeit. Der p38-Signalweg lässt sich leicht durch mechanische oder chemische Stimuli aktivieren, daher wurden im Vorfeld verschiedene Versuche zur Optimierung der Zellhandhabung durchgeführt. Es ließ sich eine artifizielle p38-Aktivierung nach 10 Minuten durch mechanische Irritation, unter anderem auch durch Medienwechsel, beobachten. Diese Aktivierung kann durch vorsichtiges Zupipettieren der benötigten Stimulantien verhindert werden. Zudem ergab sich für die HTF eine ideale Passagezahl von < 5 zur Verwendung für Experimente. Bei höheren Passagen musste vor Versuchsbeginn auf Vordifferenzierung und mögliche Induzierbarkeit des Transdifferenzierungsmarkers  $\alpha$ SMA getestet werden. Die S3T3-Zelllinie war in Hinsicht auf eine artifizielle p38-Aktivierung weniger empfindlich, die Verwendung höherer Passagen zur Versuchsaussaat war möglich. Im Rahmen dieser

Arbeit wurden die Effekte der Stimulation durch rekombinantes TGF- $\beta$ -1 (Tebu-Bio) in einer Endkonzentration von 2ng/ml in allen Experimenten sowohl bei Analysen auf Proteinebene im Western Blot als auch auf DNA-Ebene nach verschiedenen PCR-Verfahren betrachtet.

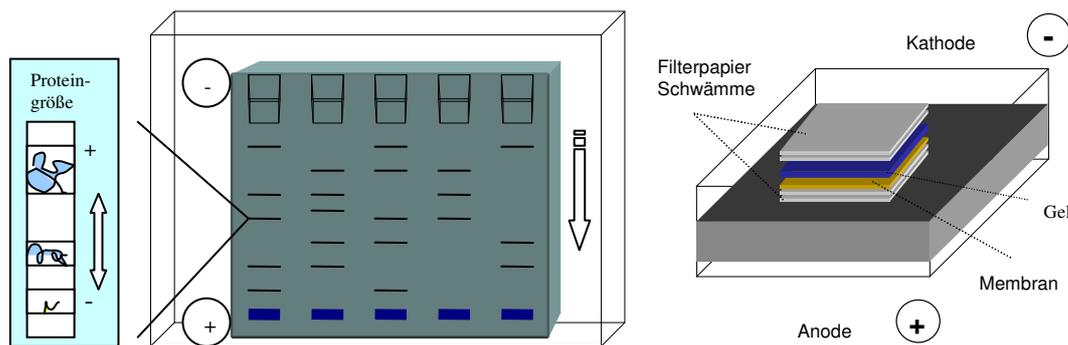
### 3.2.2 Auswertung auf Proteinebene

#### 3.2.2.1 Proteinernte

Versuchsvorbereitende Aussaat von  $2 \times 10^5$  Zellen auf die gewünschte Anzahl 60mm-Zellschalen. 6-8 Stunden vor Beginn des Experiments Medienwechsel auf DMEM 0,1% FCS "Hungermedium", um die Zellen aus der Wachstumsphase in einen möglichst physiologischen "Ruhe"-Zustand zu bringen. Es folgte je nach Versuchsaufbau die Stimulation mit 2ng/ml TGF- $\beta$ 1 im Zeitverlauf. Als Negativkontrollen wurden Schalen mit "Hungermedium" ohne Zusatz von TGF- $\beta$  stimuliert, als Positivkontrollen wurden Schalen mit 10% FCS in "Hungermedium" behandelt. Zur Erntevorbereitung wurde zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und auf sorgfältiges Absaugen geachtet. Die Proteinextraktion erfolgte mittels 200 $\mu$ l TNE-Lysepuffer pro Schale. Die Messung der Proteinkonzentration im Lysat erfolgte photometrisch mittels BCA-Reagens (Pierce) in Relation zu einer Standardreihe. Das Lysat wurde mit 4x Probenpuffer versetzt (Tab. 3.1.2) und für 5min bei 95°C denaturiert, der Einsatz von 5-10 $\mu$ g Gesamtprotein zur Auswertung mittels Western Blot nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese hat sich bewährt.

#### 3.2.2.2 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Ziel dieser Methode ist Auftrennung der zuvor isolierten Zellproteine nach Größe beim Durchwandern der definierten Porenstruktur eines Gels. Dafür werden die Proteine an Sodium Dodecyl Sulfate, kurz SDS, gekoppelt. Dieses denaturiert die Proteine. Die geschaffenen Komplexe erhalten durch die Sulfatgruppe eine gleichmäßig verteilte negative Ladung und wandern nach Anlage von konstantem Gleichstrom in Richtung Anode. Dies erfolgt je nach Größe unterschiedlich schnell, die jeweiligen Proteine stellen sich entlang der Laufspur in Banden dar.



<p><b>1. SDS-Gelelektrophorese</b>  Wandern des Probenlysats in Richtung Kathode durch die definierte Porenstruktur des Gels  → Auftrennung der Proteine nach Größe</p>	<p><b>2. Blotting</b>  Übertragen der nach Größe aufgetrennten Proteine des Gels auf eine PVDF-Membran  → Es folgt die Antikörperbeschichtung</p>
---	---

**Abbildung 7: Schema SDS-PAGE Western Blot**

Ein SDS-Polyacrylamidgel besteht dabei gewöhnlich aus einem normierten Sammelgel und einem 8 bis 12% Acrylamid enthaltenden Trenngel. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 3.1.2 angegeben.

	<u>Trenngel 8%</u>	<u>Trenngel 10%</u>	<u>Trenngel 12%</u>	<u>Sammelgel</u>
H <sub>2</sub> O	4,4ml	4ml	3,6ml	2,2ml
Upper Tris (0,5M TRIS, 0,4% SDS)	-	-	-	0,5ml
Lower Tris (1,5M TRIS, 0,4% SDS)	2ml	2ml	2ml	-
Acrylamid	1,6ml	2ml	2,4ml	0,8ml
APS	32µl	32µl	32µl	20µl
Temed	4µl	4µl	4µl	4µl

Das Gel wurde in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer (BIO-RAD) gespannt. Die mit Probenpuffer versetzten Versuchsproben wurden neben einer Markerspur mit Proteinanteilen definierter Größe (5µl Bench Mark™) in die Taschen pipettiert. Es wurden konstante 15mA pro Gel für 60-90 Minuten angelegt, das Bromphenolblau in den Proben diente der visuellen Orientierung für die durchwanderte Distanz im Gel. Anschließend erfolgte eine horizontale Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran durch Anlage von konstantem Gleichstrom von 100V für 90 Minuten. Dann wurden die PVDF-Membranen in 1xTBST 3% BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht geblockt, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen abzudecken.

### 3.2.2.3 Antikörperbeschichtung und Auswertung

Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran mit dem erforderlichen Erstantikörper, der gegen das spezifische Zielprotein gerichtet ist, für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1xTBST wurde der entsprechende Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf die Blots gegeben. Dieser ist gegen den nicht variablen Strukturteil des an das Zielprotein gebundenen Erstantikörpers gerichtet, welcher für das Tier aus dem er gewonnen wurde charakteristisch ist. Es wurde mit aus Hasen oder Mäusen gewonnenen Erstantikörpern gearbeitet. Zur Auswertung wurde pro Blot 0,5ml Enhanced Chemiluminescence Lösung, kurz ECL verwendet. Das an den Zweitantikörper gebundene Enzym konvertiert nun das Luminolsubstrat zu einer chemolumineszenten Substanz, welches geeignetes Filmmaterial (Hyperfilm GE Healthcare) belichtet und gebundenen Erstantikörper anzeigt. Über ebenfalls abgebildete Orientierungspunkte wurden die Banden des Größenmarkers übertragen, die gesuchten Proteine der Zielbanden wurden durch die Laufhöhe identifiziert. Verwendet wurden folgende Antikörper, angesetzt in 1xTBST 0,1% BSA 0,1% NaN<sub>3</sub>.

Zielstruktur	Vertrieb	aus	Verdünnung
<b>Primärantikörper</b>			
alpha SMA	Sigma-Aldrich	mouse	1:2000
Tubulin	Sigma-Aldrich	mouse	1:10.000
Active p38 (pp38)	Promega	rabbit	1:2000
p38 alpha	NEB, Cell Signalling	rabbit	1:1000
Total p38	NEB	rabbit	1:1000
Pecam-1	Santa Cruz Biotech.	rabbit	1:5000
Caveolin-1	BD Pharmingen	rabbit	1:5000
Phospho-Smad2	NEB, Cell Signalling	rabbit	1:5000
Total Smad 2/3	Chemicon	rabbit	1:2000
Active Smad 2/3	Zymed/Zytomed	rabbit	1:2000
Vinculin	Sigma-Aldrich	mouse	1:1000
pERK	Promega	rabbit	1:2000
totalERK	Santa Cruz	rabbit	1:1000
<b>Sekundärantikörper</b>			
goat anti mouse-HRP	Jackson Immuno Research		1:20.000
goat anti rabbit-HRP	SIGMA/ JIR		1:10.000
Ziege anti-Maus Alexa Fluor 488	MoBiTec		
Ziege anti-Kaninchen Alexa Fluor 633	MoBiTec		

### 3.2.2.4 Immunpräzipitation

Ziel dieser Methode ist die spezifische Anreicherung von Proteinen aus Lysaten. Das zu untersuchende Protein wird mittels eines spezifischen Antikörpers gebunden. Die Protein-Antikörper-Komplexe werden anschließend über den konstanten Strukturteil der Antikörper an Protein-A gebunden, welches wiederum an Sepharose gekoppelt ist. Durch Zentrifugation können derart an Sepharose gebundene Proteine aus dem Zelllysat abgetrennt werden. Der Nachweis so gewonnener Proteine erfolgt mittels SDS-PAGE. Versuchsweise wurde das Protokoll zur Immunpräzipitation für Caveolin, einem Strukturprotein der Zellmembran, das in HTF exprimiert ist, erprobt.

### 3.2.3 Auswertung auf mRNA-Ebene

Mit Hilfe der polymerase chain reaction, kurz PCR, lassen sich geringe DNA-Mengen vervielfältigen. Die nach Stimulation transkribierte messenger ribonucleic acid, kurz mRNA, der Zielgene wird nach Ernte aus Versuchszellen in stabile complementary DNA, kurz cDNA, umgeschrieben. Anschließend wird die gesuchte Gensequenz spezifisch repliziert. Hierzu sind sogenannte Primer nötig. Dies sind flankierende, zum Zielgen komplementäre kurze Oligonucleotide, die sich bei definierter Temperatur an die jeweiligen Enden der Sequenz anlagern.

Es wurde mit folgenden Primersequenzen für die entsprechenden Zielgene gearbeitet.

<u>Zielgen</u>	<u>Sequenzen</u>
hGADD45 $\beta$	Forward: AGGAAGGCTAGCTAGCTCTGTGGGAAGGTTTTGG
(h=human)	Reverse: AGGAAGTCTAGACCCCGATGGTCCTCGTGGG
mGADD45 $\beta$	Forward: CTGGTCGCACGGGAAGG
(m=Maus)	Reverse: GCTCCACCGCGGCAGTCACC
hHPRT	Forward: GACCAGTCAACAGGGGACAT
	Reverse: ACACTTCGTGGGGTCCTTTT
mHPRT	Forward: GATCAGTCAACGGGGGACAT
	Reverse: ACACTTCGTGGGGTCCTTTT
$\alpha$ SMA	Forward: CTGTTCCAGCCATCCTTCAT
	Reverse: CCGTGATCTCCTTCTGCATT
PAI-1	Forward: CAACGTGGTTTTCTCACCT
	Reverse: TCTGTGGTGCTGATCTCGTC
beta-Actin	Forward: ACCCACACTGTGCCATCTA
	Reverse: CGGAACGCGTCATTGCC

Folgendes PCR-Standardprogramm mit 30 Zyklen hat sich bewährt.

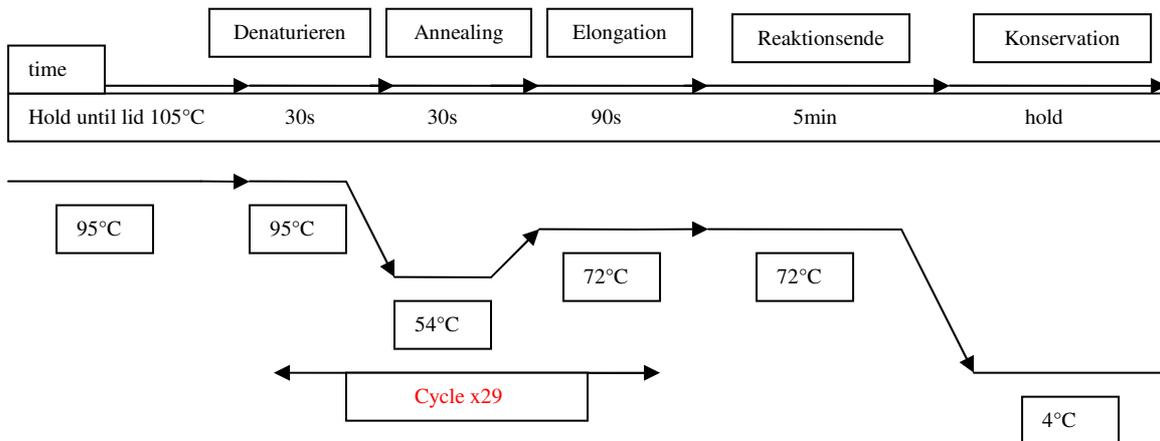


Abbildung 8: PCR-Standardprogramm

### 3.2.3.1 RNA-Ernte und PCR-vorbereitende Probenaufbereitung

Vorbereitend zur Arbeit auf DNA- /RNA- Ebene wurden die Versuchszellen dicht gesät. Die Zellernte erfolgte mit Hilfe des „total RNA purification kit“ (RNeasy, Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Es konnte bei Bedarf ein DNA-Verdau (RNase free DNase, Qiagen) angeschlossen werden. Die Konzentrationsmessung der isolierten RNA erfolgte photometrisch. Hierbei korreliert der Adsorptionskoeffizient bei 260nm Wellenlänge mit der RNA-Konzentration. Die Reinheit der Probenextrakte lässt sich über die Berechnung des Absorptionskoeffizienten von 260nm zu 280nm Wellenlänge, wobei Letztere vornehmlich die Proteinkonzentration angibt, bestimmen. Ein Verhältnis von  $E_{260}/E_{280} > 1,6$  wird für eine „reine“ RNA-Präparation gefordert. Nun folgte die Generierung der cDNA. Oligo-dT oder random- Primer wurden mit 500ng isolierter RNA und dNTPs in ddH<sub>2</sub>O auf Eis angesetzt und für 15 Minuten auf 65°C erhitzt. Anschließend wurden der Reaktionspuffer (5xfirst strand Buffer, 0,1 DTT, RNAsin (Invitrogen)) und die Reverse Transkriptase (SSRT) zugegeben und für 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Nachdem die Zell-RNA nun isoliert und in stabilere cDNA umgeschrieben war, wurde zur Vervielfältigung des gewünschten Abschnittes die PCR eingesetzt. Zur Erleichterung der Aufteilung der Inhaltsstoffe auf die Proben wurde ein sogenannter Mastermix erstellt.

<u>PCR-Mastermix</u>	1x [ $\mu$ l]	5x [ $\mu$ l]
ddH <sub>2</sub> O	17,25	86,25
10xBuffer (Qiagen)	2,5	12,5
25mM MgCl <sub>2</sub> (Qiagen/ Promega)	1,5	7,5
10mM dNTPs (Promega)	0,5	2,5
Primer sense [20 $\mu$ M]	0,5	2,5
Primer antisense [20 $\mu$ M]	0,5	2,5
taq-Polymerase (Promega)	0,25	1,25

### 3.2.3.2 PCR-Auswertung

Um die replizierten DNA-Abschnitte zu visualisieren erfolgte die Darstellung im 1,8%igen Agarose-Gel. Die Agarose wurde in 1xTAE-Puffer erhitzt und vor der Polymerisierung mit Ethidiumbromid 1:20.000 versetzt. In nach dem Aushärten gebildete Kammtaschen wurden die mit Ladepuffer (Bromethanolblau mit Glycerin) vermischten Versuchsproben gegeben. Nach Anlegen von 75V Gleichstrom wandeten die negativ geladenen Nukleotide mit größenabhängiger Schnelligkeit durch das Gel zur Anode. Als Orientierung bezüglich zurückgelegter Strecke diente das im Ladepuffer enthaltene Bromphenolblau. Die Komplexierung des unter ultraviolettem Licht fluoreszierenden Ethidiumbromids mit der DNA ermöglichte die Darstellung der Banden mittels UV-Lampe. Die Identifikation der Banden erfolgte über Höhen- und somit Größenvergleich mit den Banden einer ebenfalls aufgetragenen Markerspür. Die Banden des Markers stellen sich in 50bp-Schritten (bp = Basenpaare) dar.

### 3.2.3.3 Quantitative PCR

Diese Methode erlaubt die quantitative Messung von mRNA-Transkripten. Zur Normierung erfolgt der Abgleich mit einem konstant exprimierten Strukturgen: In dieser Arbeit wurden Transkripte von HPRT-1 (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1) und  $\beta$ -Actin genutzt. Durch die Normierung zu diesen Strukturgenen können Schwankungen in Versuchszellzahl, Erntequalität und Probenaufbereitung kontrolliert werden. Ein fluoreszierender Farbstoff lagert sich in die PCR-Produkte ein, gemessen wird die Fluoreszenz der Proben. Die Zykluszahl, bei der eine exponentielle Fluoreszenz- und somit Produktzunahme messbar wird, lässt auf die zugrunde liegende Menge der Zielsequenz schließen. Die Berechnung in Relation zum Signal des Strukturgens lässt einen probenübergreifenden Signalvergleich zu. Das genaue

Pipettieren und Arbeiten auf Eis ist von Bedeutung, der Idealstandard wurde durch Alteration der Aneling-Temperatur und der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration erarbeitet. Die auf die Amplifikationsphase folgende Schmelzphase, während derer die PCR-Produkte bei zunehmender Temperatur denaturiert werden, dient als Qualitätskontrolle.

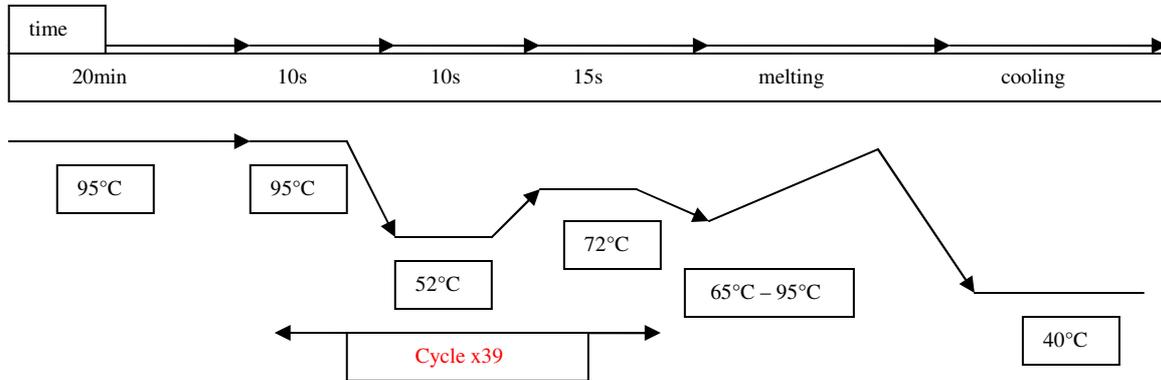


Abbildung 9: Standardprogramm quantitative PCR

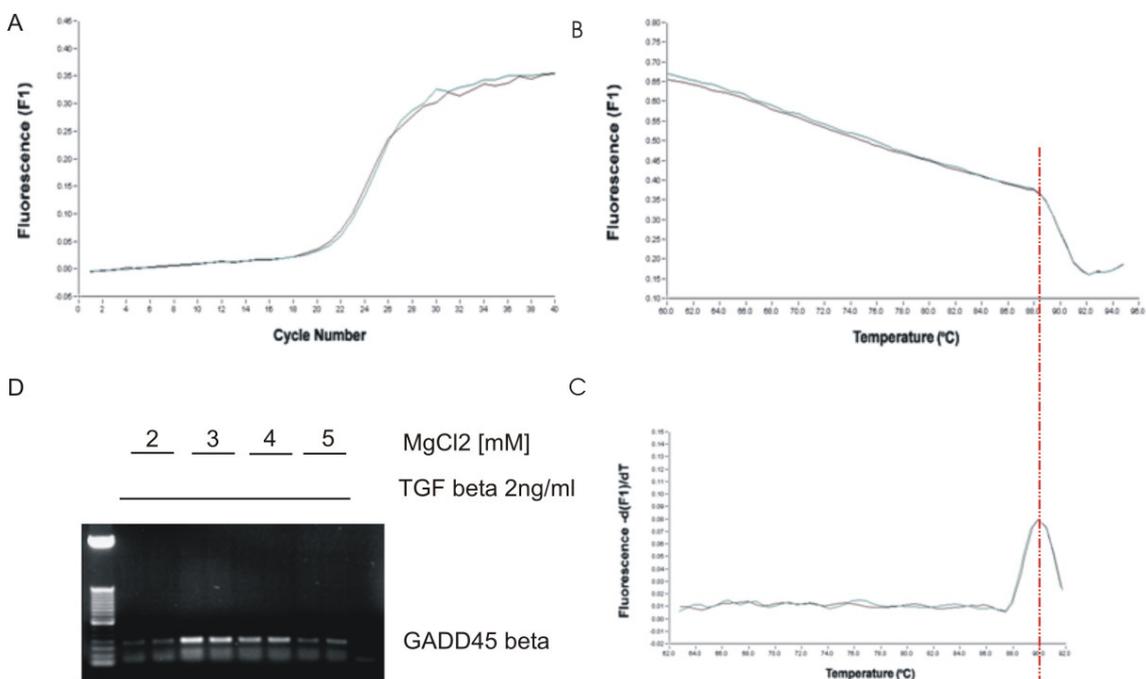
Mastermix quantitative PCR	1x [μl]	5x [μl]
ddH <sub>2</sub> O (UltraPure™, Invitrogen)	11,75	58,75
10xBuffer (15mM MgCl <sub>2</sub> , Qiagen)	2	10
25mM MgCl <sub>2</sub> (Qiagen) → 3mM	1,2	6
10mM dNTPs	0,5	2,5
Primer sense [20yM]	0,5	2,5
Primer antisense [20yM]	0,5	2,5
SYBR Green 1:200 → 1:2000	1,05	5,25
FITC (Fluorescein-5-isothiocyanat) 1:2000	0,2	1
HotStartTaq® DNA Polymerase (Qiagen)	0,3	1,5

Die folgenden Abbildungen zeigen Beispiele für die Auswertung der qPCR in Diagrammform. Es wurde hierbei mit Proben stimulierter S3T3-Zellen gearbeitet. Die Vervielfältigungen der Zielsequenz GADD45β und Struktursequenz HPRT1 erfolgten für verschiedene MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen. Die Ergebnisse der Doppelbestimmungen zeigen eine gute Reproduzierbarkeit der Methode. Die Titration der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration ergab beste Ergebnisse für 3mM MgCl<sub>2</sub>.

Die s-förmige Kurve der Fluoreszenzmessung wird ausgewertet bezüglich der Zykluszahl, bei der ein Anstieg des Fluoreszenzsignals über die Hintergrundfluoreszenz erfolgt. Dies ist die so genannte Schwellenzykluszahl (threshold level). Nach Abgleich

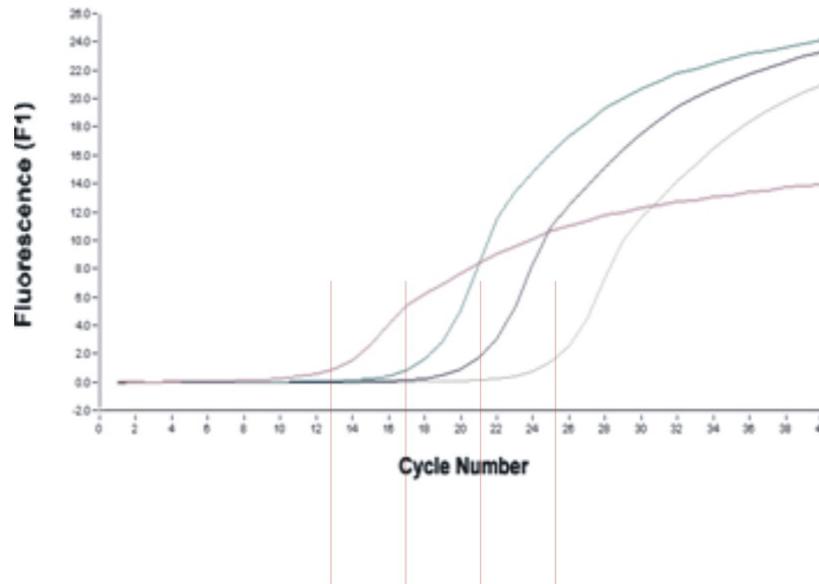
mit dem Signal des aus derselben Probe vervielfältigten Stukturgens lässt sich die Menge der mRNA des jeweils untersuchten Zielgens berechnen. Ein weiterer Qualitätsparameter ist die erreichte maximale Fluoreszenzintensität, welche Schlüsse auf die Effizienz der PCR zulässt. Im Diagramm wird die Fluoreszenz (F1) der Produkte zu Zeit des Zyklus x dargestellt (Abbildung 10: A). Die Schmelztemperatur, also die Temperatur bei der doppelsträngige DNA in Einzelstränge zerfällt, ist abhängig von der Länge der DNA-Stränge. In der Schmelzkurve für GADD45 $\beta$  zeigte sich ein singulärer steiler Kurvenabfall ab etwa 89°C (Abbildung 10: B). In der 1. Ableitung der Schmelzkurve nach der Temperatur stellt sich die Schmelztemperatur als lokales Maximum (melting peak) dar und kann in dieser Darstellungsform besonders gut identifiziert werden. Das Maximum für das GADD45 $\beta$ -PCR-Produkt lag bei etwa 90°C (Abbildung 10: C).

Zur Objektivierung können die Proben nach erfolgter qPCR über ein Standard-Agarose-Gel dargestellt werden, um die Produkte zu visualisieren und die Identifikation durch Größenbestimmung zu bestätigen. Hierbei stellte sich das Produkt der mGADD45 $\beta$ -Primer bei etwa 180bp dar (Abbildung 10: D). Angemerkt sei, dass die Testung der hGADD45 $\beta$ -Primer ein stabiles Endprodukt in Darstellung bei etwa 145bp ergab.



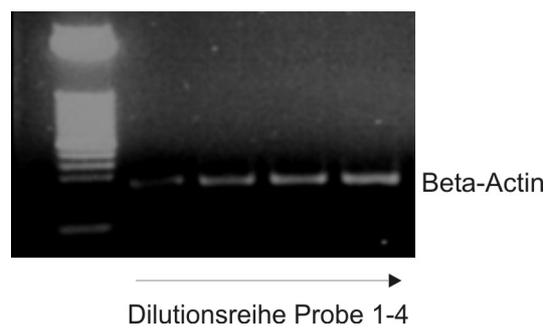
**Abbildung 10: (A) GADD45 $\beta$  Threshold level, ab Zykluszahl 21 exponentielle Produktzunahme, (B) Melting Curve GADD45 $\beta$ , (C) Melting Peak GADD45 $\beta$ , singulärer Peak zeigt Freiheit von Nebenprodukten (D) Produktvisualisierung im Agarose-Gel mGADD45  $\beta$  bei 180bp**

Es wurde die Messgenauigkeit der Quantifikationsmethode untersucht: Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe der Proben angesetzt und die jeweilige Schwellenzykluszahl bestimmt. Es zeigt sich eine equidistante Zunahme der Zykluszahl bei steigender Verdünnung, was für eine Linearität des Detektionssystems spricht.



**Abbildung 11: Verdünnungsreihe quantitative PCR  $\beta$ -Actin mit equidistanter Zunahme des treshold level bei zunehmender Dilutionsstufe**

Die Darstellung im EtBr-Agarose-Gel dient der weiteren Qualitätskontrolle und zeigt das Vorliegen des PCR-Produkts, hier von  $\beta$ -Actin bei einer Größe von etwa 100bp.



**Abbildung 12: Darstellung des  $\beta$ -Actin-Produkt bei 100bp im Agarosegel**

Adäquate Austestung verschiedener Annealing-Temperaturen und Primer- sowie Polymerase-Vergleiche ergaben die jeweiligen Idealbedingungen für die GADD45 $\beta$ , HPRT1-, und  $\alpha$ SMA-Primer. Somit konnten die komplexeren Versuche durchgeführt werden.

### 3.2.4 Vektoren, Klonieren und Transfektion

Ziel dieser Methodik ist das Einbringen von DNA Fragmenten in Versuchszellen, die dann in den Zellen in mRNA transkribiert und, sofern es sich um Protein-kodierende Sequenzen handelt, in Proteine translatiert werden. Hierdurch können gezielt einzelne Proteine vermehrt oder auch vermindert synthetisiert werden. Durch gezielte Manipulation von an der Signalverarbeitung beteiligten Proteinen kann die Bedeutung derer näher untersucht werden.

In dieser Arbeit wurden verschiedenen Ansätze gewählt: Zum Einen sollten die Effekte durch Überexpression von GADD45 $\beta$  in S3T3 und HTF auf die Transdifferenzierung zu Myofibroblasten betrachtet werden. Eine Stimulus-unabhängige Zelldifferenzierung zu Myofibroblasten nach GADD45 $\beta$ -Expression gäbe einen Hinweis für eine bedeutende Rolle von GADD45 $\beta$  für die ansonsten TGF- $\beta$ -induzierte Transdifferenzierung. Als zweiter Ansatz sollten die Auswirkungen des Einbringens eines sogenannten „Antisense-Konstrukts“ beobachtet werden. Hierbei werden zu GADD45 $\beta$ -mRNA komplementäre Sequenzen genutzt. Überexprimierte antisense-Fragmente können sich an die GADD45 $\beta$ -mRNA anlagern und dadurch die Translation blockieren. Die Plasmidkonstrukte wurden in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe Sebald der Abteilung Physiologische Chemie II des Biochemischen Instituts der Universität Würzburg erzeugt. Nach enzymatischer Ligation der Inserts mit dem Plasmid über entsprechende Schnittstellen erfolgte die Vektorvermehrung in E.coli-Stämmen. Die Identifikation transfizierter Bakterienklone gelang über plasmidgetragene Ampicillin-Resistenz, die Isolation der Vektoren erfolgte nach Standardprotokoll (maxiPrep, Qiagen Plasmid Purification). Es wurde mit folgenden Primern gearbeitet:

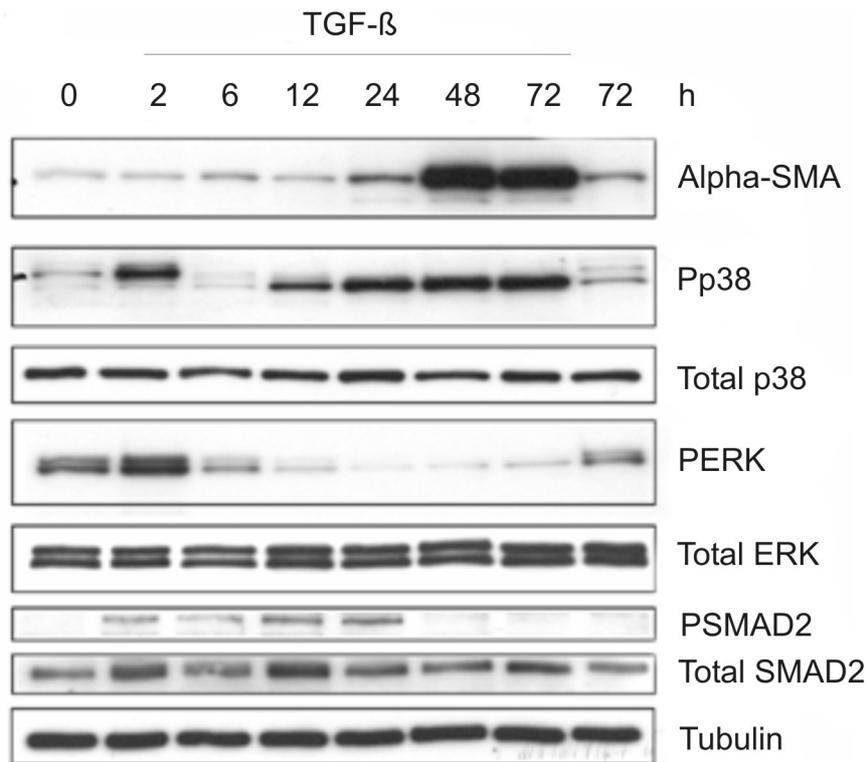
GADD45 $\beta$ / NHE I / forward	AGGAAGGCTAGCTAGCTCTGTGGGAAGGTTTT GG	66°C
GADD45 $\beta$ / XBA I / reverse	AGGAAGTCTAGACCCCGATGGTCCTCGTGGG	66°C
antisense full length vorne/ r (XBA I)	AGGAAGTCTAGATAGCTCTGTGGGAAGGTTTT GG	66°C
antisense full length hinten/ f (NHE I)	AGGAAGGCTAGCCCCGATGGTCCTCGTGGG	66°C
antisense short Mitte vorne/ f (NHE I)	AGGAAGGCTAGCCCCAACCCGACCCATCCCG	66°C
antisense short Mitte hinten/ r (XBA I)	AGGAAGTCTAGACGCCTGGAAGAGCCACGGC	66°C



## 4. Ergebnisse

### 4.1. Biphasische p38-Aktivierung in HTF durch TGF- $\beta$ 1

Zunächst wurde die Wirkung von TGF- $\beta$  auf HTF in Zellkultur in Hinblick auf die  $\alpha$ SMA-Synthese sowie die Aktivierung verschiedener Signalwege betrachtet. Hierfür wurden HTF mit 2ng/ml TGF- $\beta$ -1 stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten von 2 bis 72 Stunden Proteinextrakte angefertigt. Mittels Western Blot wurde der Zeitverlauf der TGF- $\beta$ -vermittelten Induktion von SMA untersucht. Als Kontrollen dienten unstimulierte HTF zu Versuchsbeginn und -ende. Des Weiteren wurde die Aktivierung der MAPK ERK und p38 sowie der SMAD-Signalweg analysiert, indem die Phosphorylierung entsprechender Signalmoleküle mittels phospho-spezifischer Antikörper detektiert wurde. Die Gleichmäßigkeit der jeweils geladenen Proteinmenge wurde durch die gleich bleibend starke Tubulinbande bzw. Signalmoleküle der einzelnen Proben bestätigt.



**Abbildung 14: TGF- $\beta$ -Effekte auf verschiedene Kaskadenvertreter im Zeitverlauf**

Die Zunahme der  $\alpha$ SMA-Bandenstärke nach 48 und 72 Stunden TGF- $\beta$ -1-Stimulation verdeutlicht die induzierte Transdifferenzierung der HTF zu Myofibroblasten. Für die verschiedenen Signalmoleküle wurde die aktivierte phosphorylierte Form zu vorhandener Grundform im Probenlysat vergleichend dargestellt.

Der ERK-Signalweg wird während den ersten Stunden nach TGF- $\beta$  Stimulation vorübergehend aktiviert, der SMAD-Signalweg für die ersten 24 Stunden. Beide Signalwege werden nicht dauerhaft aktiviert

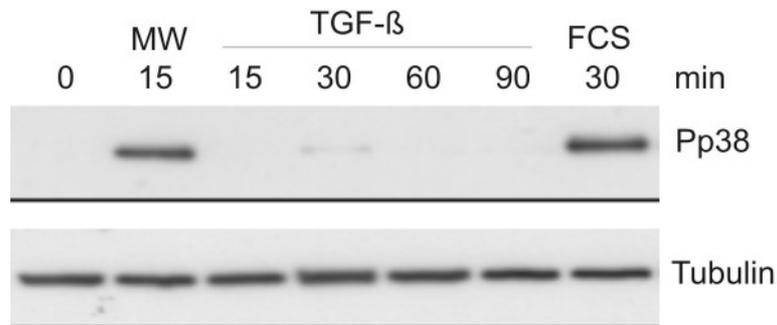
Im Gegensatz zum ERK- und SMAD-Signalweg zeigt sich beim p38-Signalweg eine biphasische Aktivierung durch TGF- $\beta$ -1. Die Banden der Früh- und Spätaktivierung stellen sich in verschiedener Höhe dar. Die frühe Aktivierung des p38-Signalwegs in den ersten 2 Stunden bildet sich hierbei höher ab. Sie geht der SMA-Expression zeitlich weit voraus. Die Spätaktivierung von p38, die sich in einer tieferen Bande abbildet, beginnt nach 12 Stunden und bleibt bis zum Versuchsende erhalten. Diese späte Aktivierung steht in einem zeitlichen Zusammenhang mit der  $\alpha$ SMA-Expression.

#### 4.2 Frühe p38-Aktivierung

Bei einigen Versuchen fiel eine artifizielle Aktivierung des p38-Signalwegs durch mechanische Stimulation wie z.B. durch Mediumwechsel auf. Es ist demnach zwischen verschiedenen Formen der Aktivierung des p38-Signalweges zu unterscheiden. Folgendes Experiment macht dies deutlich: HTF wurden für 12 Stunden serumdepriviert, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Es wurde ein regulärer Mediumwechsel mit vorgewärmtem serumfreien Medium durchgeführt und 15 Minuten später Proteinextrakte erstellt (Abbildung 15 Spur 2). Es folgten Ansätze, bei denen die Zellkulturschalen nur geschwenkt (Spur 3), vorsichtig etwas TGF- $\beta$ -Stammlösung unter Schwenken zupipetiert (Spuren 4 bis 6) oder Mediumwechsel mit serumhaltigen Medium (10%) durchgeführt wurden (Spur 7). Die Proteinernte erfolgte zu den angegebenen Zeiten.

Man erkennt, dass eine starke mechanische Stimulation der Zellen wie z.B. durch einen Mediumwechsel zu einer schnell einsetzenden Phosphorylierung von p38 führt, das Hinzufügen von TGF- $\beta$  ohne mechanische Stimulation jedoch keine p38-Aktivierung innerhalb der ersten 90 Minuten bewirkt. Ein direkter Vergleich der Proteinextrakte mit den Extrakten des zuvor beschriebenen Experimentes ergab, dass die mechanisch

induzierte p38-Aktivierung mit der initialen „oberen p38-Bande“ des vorrangegangenen Experimentes identisch ist. Demnach kann es sich bei der beobachteten frühen TGF- $\beta$ -induzierten Phosphorylierung von p38 um ein mechanisch bedingtes Artefakt handeln.



**Abbildung 15: Western Blot pP38 – Frühaktivierung in HTF**

#### 4.3 Späte p38-Aktivierung

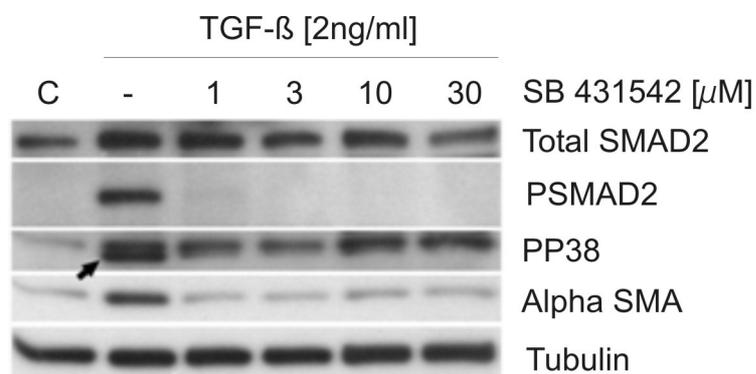
Die späte Aktivierung von p38, die zwölf Stunden nach TGF- $\beta$ -Stimulation zu beobachten war, hielt über die gesamte weitere Beobachtungszeit an und ging der vermehrten Expression von  $\alpha$ SMA um einige Stunden voraus. In verschiedenen Experimenten zeigte sich diese späte Aktivierung als Doppelbande und es galt festzustellen, ob beide Banden tatsächlich durch Aktivierung des TGF- $\beta$ -Rezeptors ausgelöst werden.

##### 4.3.1 TBR-I-Blockade durch SB431542

Um die spezifische Abhängigkeit der jeweiligen Banden von der Stimulation durch TGF- $\beta$  zu untersuchen, wurde der TGF- $\beta$ -Rezeptor I durch SB431542, einen potenten und selektiven Inhibitor des TGF- $\beta$ -Rezeptors Typ I (TBR-I) gehemmt. Die Konzentrationen für SB431542 wurden entsprechend der Literatur eher im unteren Wirkungsbereich gewählt, toxische Effekte wurden mikroskopisch nicht beobachtet [Mori et al. 2004, Laping 2002]. Die Stimulation der HTF mit TGF- $\beta$  erfolgte für 24 Stunden.

Der Rückschluss auf TGF- $\beta$  als primäres Stimulans für die Transdifferenzierung von HTF zu kontraktile Myofibroblasten bestätigt sich in diesem Experiment: Die TGF- $\beta$ -

induzierte SMA-Expression wird durch Blockade des Signals auf Rezeptorebene mittels SB431542 ab einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  unterdrückt. Die Aktivierung von SMAD2 bleibt nach TBR-I-Blockade aus. Der pP38-Nachweis zeigt die charakteristische Doppelbande in der TGF- $\beta$ -stimulierten Probe. Sowohl in der unstimulierten Leerprobe als auch nach TBR-I-Blockade mit verschiedenen Konzentrationen von SB431542 bleibt die Darstellung der tiefen p38-Bande aus, nicht jedoch die der höheren Bande. Dies legt eine Induktion der tiefen p38-Bande (Abb. 16 Pfeilmarkierung) durch TGF- $\beta$  nahe, welche die Aktivierung einer bestimmten p38-Isoform verkörpern könnte.



**Abbildung 16: Effekte der TBR-I-Blockade auf HTF**

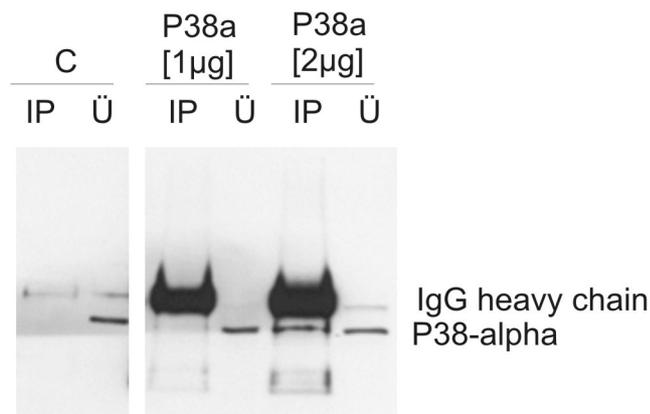
#### 4.3.2 Charakterisierung der tiefen pP38-Bande durch Immunpräzipitation (IP)

In weiteren Experimenten wurde versucht, die untere TGF- $\beta$  assoziierte p38-Bande mittels Immunpräzipitation näher zu charakterisieren. Aufgrund der schnellen Wanderungsgeschwindigkeit in der Gelelektrophorese kam die leichteste p38-Isoform p38 alpha für die tiefe p38-Bande in Frage. HTF wurden für 48 Stunden mit TGF- $\beta$  stimuliert, so dass eine deutliche Phosphorylierung der tiefen p38-Bande vorlag. Es erfolgte eine Immunpräzipitation mittels eines p38alpha-Antikörpers in zwei verschiedenen Konzentrationen. Weiterhin wurde ein Aliquot des Überstandes nach Zentrifugation des Sephadrose-Immunpräzipitat-Aggregats asserviert und jeweils neben den präzipitierten Proteinextrakten aufgetragen. Der anschließende Westernblot erfolgte mit dem auch für die Präzipitation verwendeten p38alpha-Antikörper als Primärantikörper. In den Überständen konnte jeweils p38alpha nachgewiesen werden, bei den Immunpräzipitaten führte nur die Verwendung von  $2\mu\text{g}$  p38alpha-Antikörper

zur Immunpräzipitation. Eine deutliche Anreicherung des nachzuweisenden Proteins, wie es eigentlich durch eine Präzipitation erreicht werden sollte, konnte nicht erzielt werden. Leider steht kein für die Anwendung zur Immunpräzipitation als geeignet getesteter p38alpha-spezifischer Antikörper zur Verfügung.

In den Immunpräzipitaten lässt sich wie zu erwarten die schwere Kette des präzipitierenden Antikörpers bei etwa 46kD beobachten (Abbildung 17 Spur 3, 5).

Ferner konnte in den Präzipitaten kein phosphoryliertes p38 nachgewiesen werden. Es ist allerdings nicht bekannt, ob der p38alpha-spezifische Antikörper gleiche Affinitäten für die phosphorylierte und die dephosphorylierte Form von p38 hat. Es ist letztlich auch nicht sicher, ob es sich bei der tieferen p38-Bande wirklich um die alpha-Isoform des Proteins oder um die Splicevariante einer anderen p38-Isoform handelt. Leider hatte sich auch der phospho-spezifische p38-Antikörper in Vorversuchen nicht für eine Immunpräzipitation bewährt.



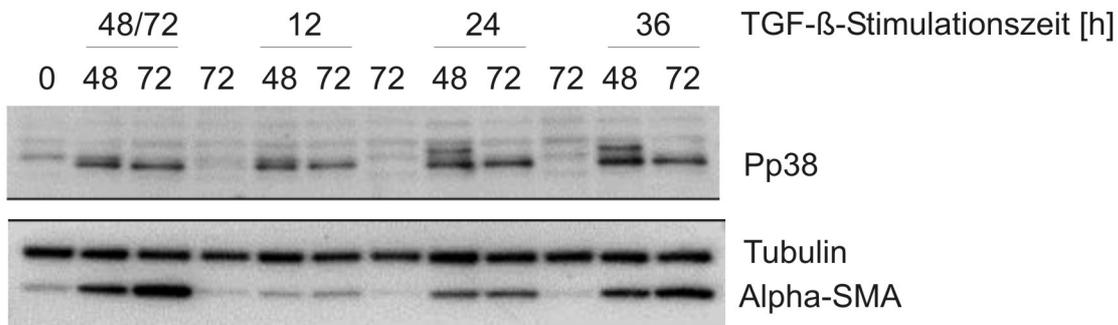
**Abbildung 17: Western Blot p38 $\alpha$  1:1000 - Immunpräzipitation p38 $\alpha$**

#### 4.4 TGF- $\beta$ -Expositionsdauer bestimmt die $\alpha$ SMA-Expression

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob für die Transdifferenzierung eine dauerhafte Stimulation mit TGF- $\beta$  notwendig ist oder eine vorübergehende Stimulation mit TGF- $\beta$  ausreicht um nachfolgende intrazelluläre Regelmechanismen zu starten, welche dann ein autonomes Fortsetzen der Transdifferenzierung vorantreiben.

Hierfür wurden vier Zeitreihen angefertigt. Bei der Ersten wurde eine dauerhafte Stimulation mit TGF- $\beta$  durchgeführt, bei der Zweiten bis Vierten erfolgte nur eine

zeitweise Stimulierung für 12, 24 oder 36 Stunden. Daran anschließend wurde das Stimulationsmedium durch serumfreies Medium ersetzt. Die Proteinernte erfolgte jeweils nach 48 und 72 Stunden, wobei nach 72 Stunden auch eine unstimulierte Kontrolle geerntet wurde.



**Abbildung 18: Western Blot – Abwaschversuch**

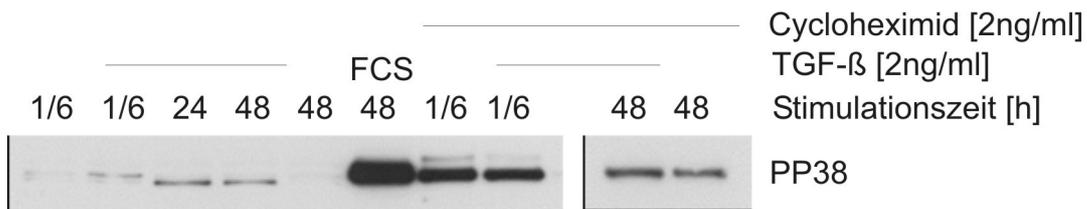
Die Detektion von pP38 zeigt die Aktivierung durch TGF- $\beta$ -1 in allen stimulierten Proben. In den länger (72 Stunden) TGF- $\beta$ -exponierten Zellen deutet sich eine leicht verstärkte Aktivierung, insbesondere des kleineren Proteins der Doppelbande an. Auch eine kurzzeitige TGF- $\beta$  Stimulation für 12 Stunden scheint für eine anhaltende Aktivierung von p38 auszureichen, die auch 60 Stunden nach Entfernen von TGF- $\beta$  noch nachweisbar ist. Anders die Synthese von SMA, die mit der Dauer der TGF- $\beta$ -Exposition kontinuierlich zunimmt. Die auch durch kurze TGF- $\beta$ -Stimulation erzielte anhaltende p38-Aktivierung scheint demnach für die Expression von SMA alleine nicht auszureichen. Entsprechend scheinen weitere Signalwege von Bedeutung zu sein, die einer anhaltenden TGF- $\beta$ -Stimulation bedürfen.

#### 4.5 Bedeutung der Proteinbiosynthese für die TGF- $\beta$ -induzierte SMA-Transkription

In weiteren Versuchen sollte evaluiert werden, ob für die TGF- $\beta$ -induzierte SMA-Expression die Synthese weiterer zwischengeschalteter Regulatorproteine notwendig ist. Hierfür wurde die Proteinsynthese mittels des Translationshemmers Cycloheximid unterbunden. Da hierdurch auch die Proteintranslation von SMA behindert wurde, wurde die Menge an SMA-mRNA durch quantitative PCR gemessen.

#### 4.5.1 Translationshemmer Cycloheximid aktiviert p38

Zunächst wurde der Einfluss von Cycloheximid auf die TGF- $\beta$ -induzierte p38-Aktivierung mittels Western Blot analysiert (Abbildung 19). HTF wurden mit 2ng/ml Cycloheximid oder Kontrollmedium behandelt und 10 Minuten, 24 und 48 Stunden nach zusätzlicher Gabe von TGF- $\beta$ -1 (außer in den Kontrollproben) geerntet.



**Abbildung 19: Western Blot pP38 – Effekt Cycloheximid**

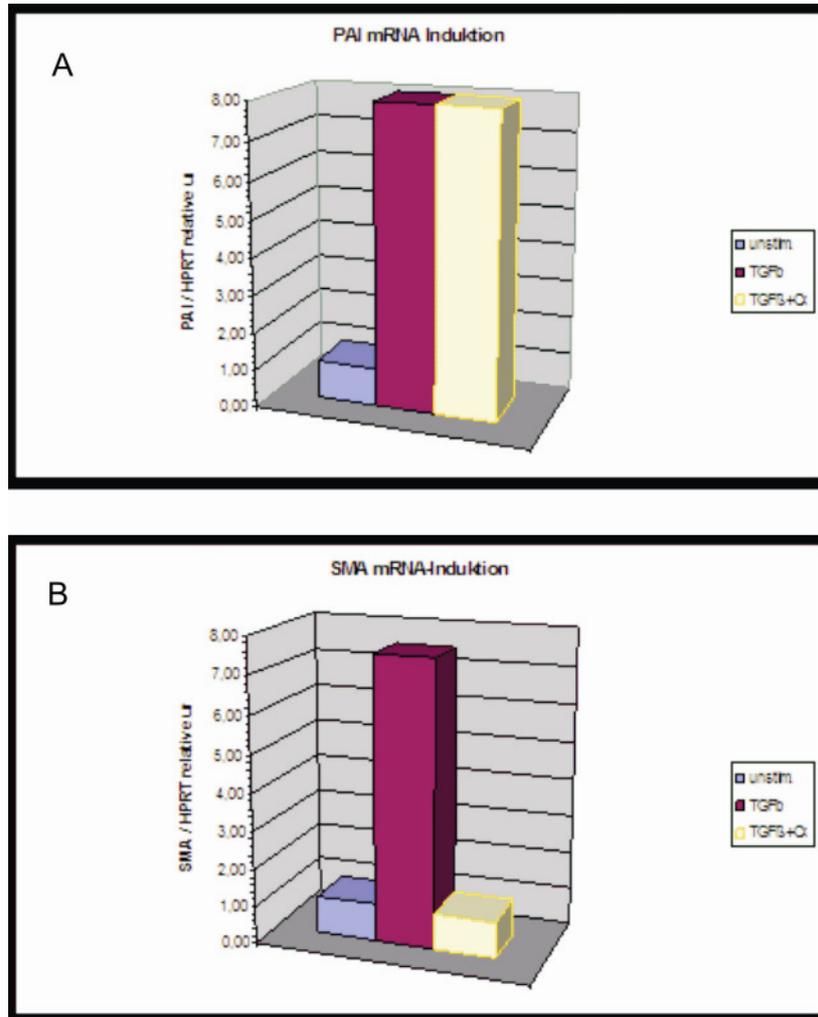
Der pP38-Nachweis zeigt bei den Proben ohne Cycloheximid die bereits zuvor beschriebene Aktivierung der „tiefen“ p38-Bande durch TGF- $\beta$ -1 nach 24 und 48 Stunden. Cycloheximid alleine führt zu einer schnellen und dauerhaften Aktivierung von p38 unabhängig von TGF- $\beta$ , weshalb durch den beschriebenen Versuchsaufbau nicht auf Abhängigkeit der TGF- $\beta$ -induzierten p38-Aktivierung von Proteinbiosynthese geschlossen werden kann.

Mikroskopisch ergab sich kein Hinweis auf einen vermehrt toxischen Effekt von Cycloheximid in einem Konzentrationsbereich zwischen 1 und 10 ng/ml. Für die weiteren Versuche mit Auswertung auf mRNA-Ebene wurde daher in der Regel eine Konzentration von 2 ng/ml gewählt.

#### 4.5.2 Cycloheximid verhindert die $\alpha$ SMA-mRNA-Induktion nach TGF- $\beta$ -Stimulation

Im Folgenden wurde die Bedeutung der Proteinbiosynthese für die TGF- $\beta$  induzierte SMA-mRNA-Expression untersucht. Als Kontrollexperiment wurde der Einfluss von Cycloheximid auf die TGF- $\beta$ -induzierte Transkription von Plasminogen Acitvator Inhibitor 1 (PAI-1) betrachtet, da PAI-1 ein direkt durch den TGF- $\beta$ -/ SMAD-Signalweg reguliertes Gen ist und insofern nicht auf die Synthese weiterer Mediatorproteine angewiesen sein sollte [Kesi-Oja et al. 1988].

Hierfür wurden S3T3-Fibroblasten für eine Stunde mit dem Translationshemmer Cycloheximid vorinkubiert und anschließend für 24 Stunden mit TGF- $\beta$  stimuliert. Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte mittels quantitativer PCR, wobei der Nachweis von HPRT-1 zur Normierung genutzt wurde.



**Abbildung 20: PAI-mRNA-Induktion durch TGF-  $\beta$  trotz Translationshemmung (A), Hemmung der  $\alpha$ SMA-mRNA-Induktion nach Translationshemmung (B)**

TGF- $\beta$  bewirkt einen starken Anstieg der PAI-1-mRNA, was durch Cycloheximid nicht beeinträchtigt wird (Abbildung 20: A). Im Gegensatz hierzu findet sich bei Analyse der SMA-mRNA zwar ein deutlicher Anstieg nach TGF- $\beta$  Stimulation, dieser kann durch Cycloheximid jedoch vollständig gehemmt werden (Abbildung 20: B). Die vermehrte Transkription von SMA-mRNA nach TGF- $\beta$ -Exposition benötigt somit eine intakte

Proteinbiosynthese, was auf einen neu zu synthetisierenden Mediator im Signalweg der TGF- $\beta$ -induzierten SMA-Expression hinweist.

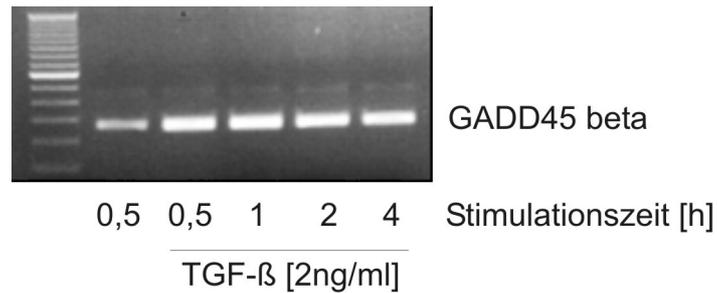
Zur Qualitätskontrolle wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hier zeigte sich jeweils nur ein Produkt erwarteter Größe, es ergab sich kein Hinweis auf unspezifische Amplifikation oder Primerdimere.

#### 4.6 GADD45 $\beta$ als Kandidatenmolekül zur Vermittlung der TGF- $\beta$ -induzierten Spätaktivierung von p38

Wie zuvor erwähnt ist GADD45 $\beta$  als Signalmolekül einer verzögerten p38-Aktivierung nach TGF- $\beta$  Stimulation beschrieben [Takewaka et al. 2002]. Die vorangegangenen Experimente deuteten auf die Existenz eines Solchen neu zu synthetisierenden Bindegliedes auch bei der TGF- $\beta$ -induzierten p38-Aktivierung im Rahmen der Fibroblastentransdifferenzierung hin. Weitere Versuche widmeten sich der möglichen Bedeutung von GADD45 $\beta$  in der Rolle eines Zwischenboten auf dem Wege der TGF- $\beta$ -vermittelten HTF-Transdifferenzierung.

##### 4.6.1 Qualitativer Nachweis von GADD45 $\beta$

Zunächst wurden Primer für GADD45 $\beta$  etabliert. Die genomische Sequenz von GADD45 $\beta$  wurde von der Ensembl-Datenbank bezogen und Intron-überspannende Primer mittels der Web-basierten Software Primer3 [<http://primer3.sourceforge.net>] entworfen. Nun wurden aus HTF und S3T3 (unstimuliert oder mit TGF- $\beta$  für verschiedene Zeitintervalle stimuliert) mRNA-Extrakte gewonnen und diese nach PCR auf die Präsenz von GADD45 $\beta$ -mRNA untersucht. Die Gelelektrophorese zeigte jeweils das zu erwartende PCR-Amplifikat (Abbildung 21). Weitere Amplifikate, welche auf unspezifische Reaktionen oder Primer-Dimere hindeuten könnten, wurden nicht beobachtet.



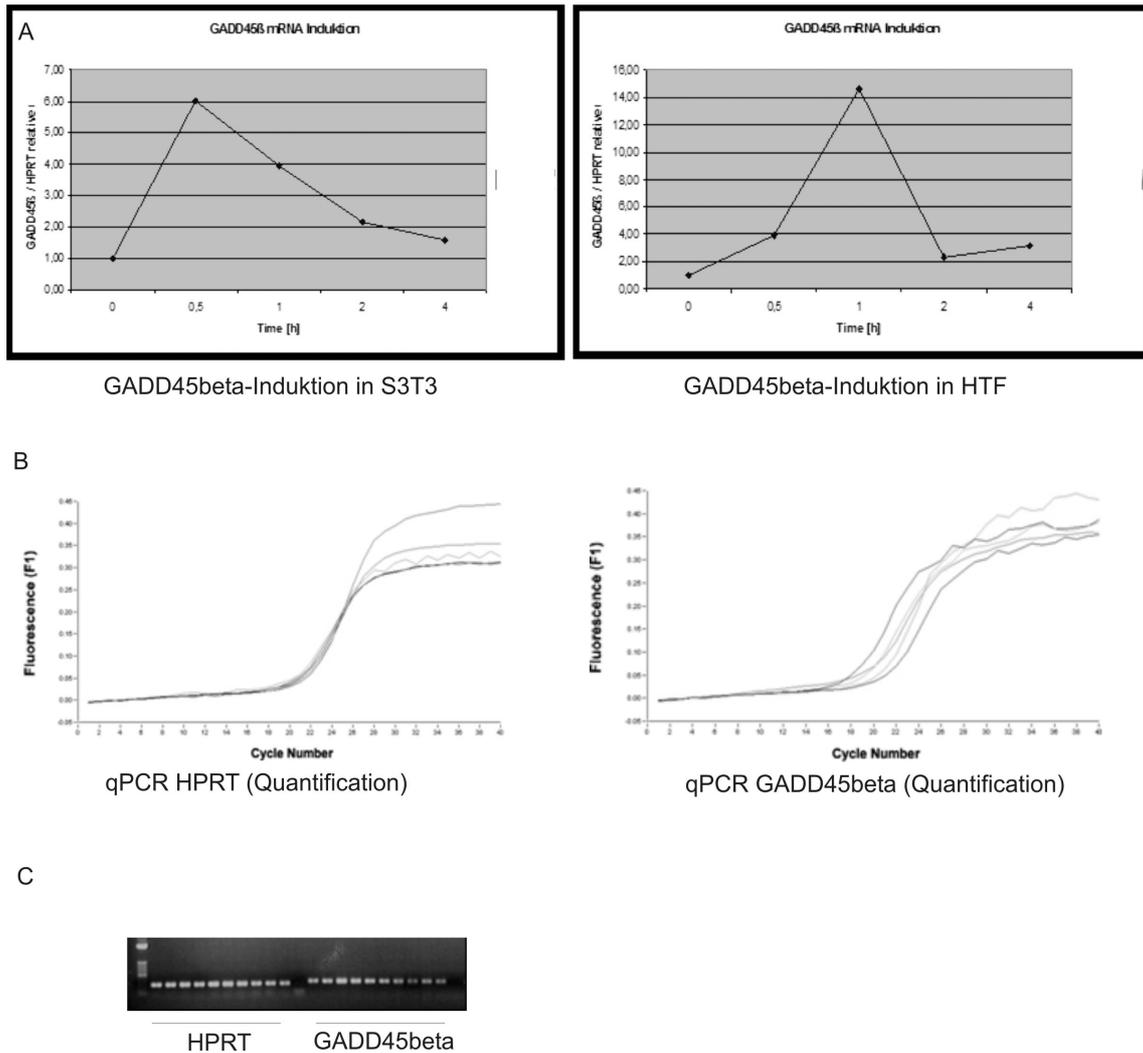
**Abbildung 21: Qualitativer Nachweis von GADD45 $\beta$  in HTF nach TGF- $\beta$ -Stimulation**

#### 4.6.2 Zeitverlauf der GADD45 $\beta$ -Induktion nach TGF- $\beta$ 1-Stimulation

Für eine quantitative Analyse der GADD45 $\beta$ -Transkription in Hinsicht auf den Zeitverlauf wurden nun die neu etablierten Primer eingesetzt.

Sowohl in murinen S3T3-Zellen als auch in HTF bewirkt TGF- $\beta$  eine Vermehrung der GADD45 $\beta$ -Transkription innerhalb von 30 bis 60 Minuten auf das 6fache (S3T3) bzw. auf das 14fache (HTF) der Kontrolle (Abbildung 22: A). Wohl noch wichtiger erscheint der zeitliche Verlauf, da diese Induktion nur für wenige Stunden anhält und sich nach 2 bis 4 Stunden bereits wieder weitgehend zurückgebildet hat. Zur Qualitätskontrolle sind hier noch die Fluoreszenzkurven der GADD45 $\beta$ -PCR und der zur Normierung verwendeten HPRT-PCR (Abbildung 22: B), sowie die jeweiligen Gelelektrophoresen der PCR-Amplifikate (Abbildung 22: C) dargestellt.

Zusammenfassend zeigt sich eine signifikante GADD45 $\beta$ -Induktion innerhalb einer Stunde nach TGF- $\beta$ -1-Stimulation in beiden Zellsystemen (S3T3 und HTF).



**Abbildung 22: (A) Quantitative GADD45 $\beta$ -Expression nach TGF- $\beta$ -Stimulation in S3T3/ HTF, (B) qPCR-Qualitätskontrollen für HPRT und GADD45 $\beta$  und (C) Produktvisualisierung im Gel**

#### 4.6.3 GADD45 $\beta$ -Transfektionsversuche

Nun sollte die direkte Bedeutung von GADD45 $\beta$  für die TGF- $\beta$ -induzierte Transdifferenzierung ermittelt werden. Hierfür wurde die Transfektion von GADD45 $\beta$  und GADD45 $\beta$ -antisense-Konstrukten geplant. Mittels ektopter Expression einer GADD45 $\beta$ -antisense-mRNA kann ein spezifisches Abfangen der endogenen GADD45 $\beta$ -mRNA und somit weitgehende Elimination derer und konsekutiv des entsprechenden Proteins erzielt werden [Nakamura et al. 2004]. In solch modifizierten Zellen sollten die Auswirkungen auf die TGF- $\beta$ -induzierte Transdifferenzierung analysiert werden. In einem zweiten Ansatz sollte eine Überexpression von GADD45 $\beta$

erfolgen und die entsprechenden Effekte auf die HTF betrachtet werden. Ein prinzipielles Problem bei der Überexpression oder Verwendung von antisense-Konstrukten ist die Tatsache, dass hierdurch das physiologische Milieu der Zelle gestört wird und eine methodisch bedingte Beeinflussung von Signalmechanismen nicht sicher auszuschließen ist. Aufgrund einer trotz Austesten mehrerer Transfektionsmethoden geringen Transfektionseffizienz in die primären HTF konnten bei beiden Ansätzen keine aussagekräftigen Resultate erzielt werden. Eine mögliche Alternative für zukünftige Arbeiten stellt eine virale Transfektion dar [Arias et al. 2002, 2003].

## **5. Diskussion**

Ziel dieser Arbeit war es, die durch TGF- $\beta$  ausgelöste Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten näher zu untersuchen. Hierbei lag der Schwerpunkt auf den an diesem Prozess beteiligten intrazellulären Signalwegen, insbesondere in Bezug auf die p38 MAPK. Die verhältnismäßig lange Zeit von 2 bis 3 Tagen von der Stimulation der Zellen mit TGF- $\beta$  bis zum Auftreten von Anzeichen der Transdifferenzierung – biochemisch entsprechend der de-novo-Expression von  $\alpha$ SMA sowie morphologisch der Ausbildung von SMA-enhaltenden Stressfasern – ließen einen komplexen Regulationsmechanismus vermuten. Die vorgestellten Experimente zielten darauf ab, Grundzüge dieser Regulation zu charakterisieren. Insbesondere wurde ein bereits in anderen Zellsystemen beschriebener Mechanismus der verzögerten indirekten Aktivierung von p38 über GADD45 $\beta$  [Takewaka et al. 2002] an menschlichen Tenonfibroblasten überprüft. Dabei machte die Etablierung und Verbesserung von Methoden einen wesentlichen Teil dieser Promotionsarbeit aus, insbesondere die Optimierung der Zellstimulation und die Etablierung einer quantitativen RealTime-PCR für GADD45 $\beta$ .

Zunächst wurde der Vorgang der Transdifferenzierung von HTF zu Myofibroblasten nach Stimulation mit TGF- $\beta$  in vitro im Zeitverlauf examiniert. Eine Zunahme der Expression zellulärer Markerproteine wie  $\alpha$ SMA wurde innerhalb von 48 bis 72 Stunden nach Stimulationsbeginn beobachtet.

Erstmals wurde die TGF- $\beta$ -induzierte SMA-Expression in einem in-vivo-Modell bei Ratten beschrieben, welchen TGF- $\beta$  subkutan injiziert wurde. In diesen subkutanen Fibroblasten wurde entsprechender Effekt nach sieben Tagen gesehen [Desmouliere et al. 1993]. Den Zeitverlauf beschrieben zuerst Serini et al., die in humanen subkutanen Fibroblasten eine  $\alpha$ SMA-Expression drei Tage nach TGF- $\beta$ -Stimulation beobachteten [Serini et al. 1999]. Im Einklang hiermit zeigte sich eine deutliche Zunahme von  $\alpha$ SMA-exprimierenden Fibroblasten in einem Wundheilungsmodell der Ratte nach vier bzw. sieben Tagen in Abhängigkeit von der mechanischen Belastung der Wunde [Hinz et al. 2001-1/ 2001-2]. TGF- $\beta$  bewirkt in verschiedenen Zellarten eine myofibroblastäre Transdifferenzierung: beispielsweise in Trabekelmaschenwerkszellen [Tamm et al.

1996], hepatischen Sternzellen [Gressner et al. 2002] und Fibroblasten der Lunge [Thannikal et al. 2003] und des Gaumens [Yokozeki et al. 1997.]. Hierbei wurde eine verstärkte SMA-Expression frühestens nach 24 Stunden, oft auch erst nach zwei oder drei Tagen beobachtet, so dass es sich bei dem Transdifferenzierungsprozess unabhängig vom verwendeten Zelltyp um einen zeitlich prolongierten komplexen Prozess handelt.

Als Nächstes wurden einzelne Signalwege mit potentieller Beteiligung am Transdifferenzierungsprozess der HTF betrachtet.

Es zeigte sich eine biphasische Phosphorylierung von p38 nach TGF- $\beta$ -1-Exposition. Einer vorübergehenden frühen Aktivierung innerhalb der ersten Stunde folgte eine zweite späte Aktivierung nach etwa 12 Stunden, die bis zu 72 Stunden anhielt. Der Zeitverlauf lässt einen Zusammenhang der zweiten, nachhaltigen p38-Aktivierung mit der nach 24 Stunden beginnenden Expression von  $\alpha$ SMA vermuten. Inhibitoren der Kinaseaktivität von p38 konnten die TGF- $\beta$ -induzierte Expression von  $\alpha$ SMA in HTF hemmen, was die Bedeutung dieses Signalwegs unterstreicht [Meyer-ter-Vehn et al. 2006-1].

ERK wurde durch TGF- $\beta$  rasch einsetzend für zwei bis vier Stunden aktiviert. Ähnliche Ergebnisse fanden sich für den SMAD2-Signalweg, wengleich hier eine bis zu 24 Stunden anhaltende Aktivierung beobachtet wurde. Der Zeitverlauf weist nicht auf eine direkte Verknüpfung der ERK- und SMAD2-Aktivierung mit der  $\alpha$ SMA-Expression in diesem Zellsystem hin (Kap. 4.1).

Die Aktivierung von p38 durch TGF- $\beta$  wurde an unterschiedlichen Zelltypen in verschiedenen zeitlichen Verläufen beschrieben: Goldberg et al. untersuchten die Bedeutung von p38 und ERK1/2 in der TGF- $\beta$ -1-vermittelten Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette im Rahmen der Permeabilitätssteigerung von pulmonalem arteriellem Endothel [Goldberg et al. 2002]. Die Autoren beobachteten eine rasch einsetzende p38-Phosphorylierung innerhalb von 30-60 Minuten, die zeitlich mit der MLC-Phosphorylierung korrelierte. Durch Hemmung der p38-Kinaseaktivität mit dem spezifischen Inhibitor SB203580 konnte die TGF- $\beta$ -induzierte MLC-Phosphorylierung unterbunden werden. U0126, ein Inhibitor der ERK-Kinaseaktivität war hingegen ohne

Einfluss auf die MLC-Phosphorylierung in diesem System. Weitere Arbeiten berichten über die Beteiligung von p38 an der durch TGF- $\beta$ -induzierten vermehrten Synthese von Collagen I. Kimoto et al. beschrieben die Induktion der Transkription von Typ I Collagen in humanen retinalen Pigmentepithelzellen durch TGF- $\beta$ -2 [Kimoto et al. 2004]. In diesen Zellen aktivierte TGF- $\beta$  die Kinase ERK vorübergehend innerhalb von 30 Minuten nach Stimulation. P38 wurde innerhalb von 30 Minuten nachhaltig für bis zu 24 Stunden aktiviert. Auch hier wurden TGF- $\beta$ -vermittelten Effekte durch p38-Inhibitoren gehemmt, während ERK-Inhibitoren keinen Einfluss zeigten. Tsukada et al. untersuchten den Verlauf der Aktivierung von p38 und SMAD in Kupfferschen Sternzellen der Leber innerhalb von 2 Stunden nach TGF- $\beta$ -Exposition. Die Inhibition von beiden Signalwegen führte zu einer Verminderung der TGF- $\beta$ -induzierten Synthese von Collagen I und SMA [Tsukada et al. 2005].

Im Gegensatz zu unseren Daten fanden Kapoun et al. an Lungenfibroblasten in einem Rattenmodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zwar eine wesentliche Rolle für TGF- $\beta$ , jedoch hatte der p38-Inhibitor SD-282 hier keinen Einfluss auf die Fibroblastentransdifferenzierung und Kollagensynthese [Kapoun et al. 2006].

In der durch TGF- $\beta$  angestoßenen Transdifferenzierung von epithelialen zu mesenchymalen Zellen (EMT) konnte allerdings wiederum eine Bedeutung von p38 nachgewiesen werden [Yu et al. 2002, Bakin et al. 2002, Bhowmick et al. 2001]. Ähnlich unseren Ergebnissen wurde eine persistierende Aktivierung von p38 beschrieben [Yu et al. 2002], wenngleich anders als bei unseren Experimenten keine verschiedenen Isoformen von p38 beobachtet wurden und die Aktivierung von p38 spätestens nach zwei Stunden eintrat. Der zuerst genannte Unterschied könnte auf die in der vorliegenden Arbeit optimierten Versuchsbedingungen zurückzuführen sein, was uns einen hohen Auftrennungsgrad bei 40kD-schweren Proteinen erlaubte. Möglicherweise wurden auch bei anderen Autoren verschiedene p38-Isoformen aktiviert, diese jedoch aufgrund mangelnder Trennschärfe als eine Bande gewertet. Weiterhin untersuchten die meisten genannten Arbeiten nur relativ kurze Zeitintervalle der p38-Aktivierung. Die längsten Analysen erstreckten sich über 24 Stunden, oft bezogen sich die Experimente aber auch nur auf Zeiträume bis zu zwei Stunden, wenngleich die beobachteten Endpunkte wie EMT, Fibroblastentransdifferenzierung oder vermehrte Kollagensynthese frühestens nach 24 Stunden eintraten.

Zusammenfassend wurde in verschiedenen Zellarten eine Aktivierung des p38-Signalweges durch TGF- $\beta$  beschrieben, welche häufig länger andauerte und oft mit einer Reorganisation des Zytoskeletts wie bei Transdifferenzierung oder EMT, sowie der vermehrten Synthese von Matrixproteinen wie Kollagen assoziiert war. Dies unterstützt in Zusammenschau mit der beschriebenen Kinetik der Vorgänge in unseren Experimenten die Hypothese einer führenden Rolle von p38 auf dem Wege der Transdifferenzierung von HTF zu Myofibroblasten.

Als Stress-assoziierte Kinase kann p38 durch eine Vielzahl von Einflüssen aktiviert werden: In verschiedenen Versuchen zeigte sich, dass selbst ein Wechsel des Zellkulturmediums genügte, um eine rasch einsetzende kurzfristige p38-Phosphorylierung innerhalb der ersten Stunde zu erzeugen (Kap. 4.2). Dies verwundert nicht, wenn man sich an die ursprüngliche Entdeckung von p38 erinnert: es wurde als Hyperosmolarity Gene 1 (HOG1) in Hefe kloniert, welches im Rahmen der Osmoregulation bei Kontakt mit hyperosmolaren Umgebungen aktiviert wird [Brewster et al. 1993]. Betont sei, dass ein Wechsel des Zellkulturmediums jedoch nicht zur Expression von  $\alpha$ SMA führte.

Bei der Analyse des p38-Signalweges ist somit insgesamt große Sorgfalt angezeigt, da viele Faktoren zu einer Phosphorylierung von p38 führen können. Breitere Aussagekraft konnte durch genaue Auftrennung der Proteine im Bereich um 40kD in der SDS-Elektrophorese erzielt werden: es zeigte sich, dass mechanischer Stress zu Aktivierung einer großen langsam laufenden p38-Isoform führte, während die Phosphorylierung einer kleinen schneller laufenden p38-Isoform in unseren Versuchen nur nach mindestens 12 Stunden TGF- $\beta$  Stimulation beobachtet wurde (Kap. 4.1).

Eine genaue Zuordnung der einzelnen Banden zu verschiedenen p38-Isoformen war beabsichtigt, jedoch aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht erfolgreich (Kap. 4.3.2). Es sind die p38-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  mit unterschiedlichem Molekulargewicht bekannt, zudem können unterschiedliche Splicevarianten gebildet werden. [Lee et al. 1994, Jiang et al. 1996/ 1997]. P38 alpha, die kleinste p38-Isoform, könnte der „unteren“ späten p38-Bande entsprechen. P38 alpha wird gehäuft mit

Differenzierungsprozessen in Verbindung gebracht [Coulthard et al. 2009], was mit unseren Daten in Einklang stünde.

Um in unserem Zellsystem die Bedeutung der verschiedenen Banden von p38 weiter zu klären, wurden die Effekte einer Blockade des TBR-I durch SB431542 (Kap.4.3.1) analysiert.

Hierbei zeigte sich, dass die früh aktivierte p38-Isoform der „höheren“ Bande auch nach TBR-I-Blockade aktiviert werden kann. Die so aktivierte schwerere p38-Isoform war jedoch in unseren Versuchen nie mit einer  $\alpha$ SMA-Expression assoziiert.

Durch die TBR-I-Blockade blieben die Aktivierung von SMAD2, der kleineren p38-Isoform und die  $\alpha$ SMA-Expression aus. Dies war ein weiterer Hinweis für die Bedeutung der späten Aktivierung der leichten p38-Isoform für die Umsetzung des über TBR-I vermittelten TGF- $\beta$ -Signals für die Transdifferenzierung von HTF.

In einem weiteren Ansatz wurde der Frage nachgegangen, wie lange die Stimulation mit TGF- $\beta$  andauern muss, um eine Transdifferenzierung zu initiieren. Für die Aktivierung der „unteren“ p38-Bande genügten 12 Stunden TGF- $\beta$ -Exposition, während eine robuste Expression von  $\alpha$ SMA mindestens 24 bis 36 Stunden Stimulationsdauer benötigte (Kap. 4.4). Die bisherigen Ergebnisse ließen sowohl für die Aktivierung der „unteren“ p38-Bande als auch für die Transdifferenzierung an sich eine komplexe Regulation vermuten, z.B. über die Synthese weiterer Signalproteine. Nachdem sich eine späte Aktivierung von p38 für die TGF- $\beta$ -induzierte Transdifferenzierung in HTF als wichtig erwiesen hatte, galt es zu untersuchen, welche vorgeschalteten Signale die p38-Spätaktivierung auslösen. Der p38-Signalweg stellte bislang eine notwendige, aber noch nicht hinreichende Bedingung für die Transdifferenzierung von HTF dar.

Durch eine generelle Blockade der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid sollten die Abläufe genauer differenziert werden.

Die Transkription von Plasminogen Activator Inhibitor Gen 1 (PAI-1) nach TGF- $\beta$ -Exposition, einem bekannten immediate early gene nach TGF- $\beta$ -Stimulation [Lund et al. 1987, Kutz et al. 2006, Allen et al. 2005, Vayalil et al. 2007] wurde durch Cycloheximid nicht beeinflusst. Demgegenüber wurde die TGF- $\beta$ -induzierte  $\alpha$ SMA-

mRNA-Transkription durch Hemmen der Proteinbiosynthese auf Kontrollniveau reduziert (Kap. 4.5.2). Ein zwischengeschaltetes, nach TGF- $\beta$ -Exposition synthetisiertes Mediatorprotein scheint also notwendig für eine robuste  $\alpha$ SMA-Expression (siehe auch Abbildung 6 Pfad 2, Denkschema Kap. 2). Da Cycloheximid per se zu einer starken Aktivierung von p38 und somit auch der „unteren“ p38-Bande führte (Kap. 4.5.1), konnte durch diesen Ansatz nicht geklärt werden, inwiefern auch die TGF- $\beta$ -induzierte p38-Aktivierung abhängig von zwischengeschalteter Proteinsynthese ist.

Als möglicher Kandidat für ein zwischengeschaltetes Mediatorprotein kam unter anderem GADD45 $\beta$  in Frage. Takekawa et al. 2002 beschrieben eine Aktivierung von p38 eine Stunde nach Stimulation mit TGF- $\beta$ -1 in Pankreas-Epithelzellen, die nach zwei Stunden ein Maximum erreichte [Takekawa et al. 2002]. Die Aktivierung von p38 durch TGF- $\beta$  setzte eine intakte SMAD-Signalgebung voraus, was die Analyse von Pankreasepithelzellen mit defekter TGF- $\beta$ -assoziiierter SMAD-Signalübertragung ergab. Weiterhin bewirkte TGF- $\beta$  in diesem Zellsystem einen Anstieg der GADD45 $\beta$ -Expression. GADD45 $\beta$  ist als Aktivator für MTK1, eine MAP Kinase Kinase Kinase des p38-Signalweges beschrieben [Takekawa et al. 1998]. Gezielte Inhibition dieser Expression mittels antisense-Plasmid-Konstrukten belegte eine wesentliche Beteiligung von GADD45 $\beta$  an der TGF- $\beta$ -induzierten p38-Aktivierung. Analog erfolgt die ebenfalls p38-abhängige TGF- $\beta$ -induzierte Synthese des Matrixproteins Byglycan in Pankreasepithelzellen über GADD45 $\beta$  [Ungefroren et al. 2005]. Einen weiteren Hinweis für die Verknüpfung von GADD45 $\beta$  mit dem p38-Signalweg lieferten GADD45 $\beta$ -knock-out Mäuse: hier ließ sich eine Reduktion der hypertrophen Zone des Knorpels feststellen [Ijiri et al. 2005]. Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass GADD45 $\beta$  über die Aktivierung des p38-Signalweges im Rahmen der Synthese von Kollagen 10a1 mitverantwortlich ist [Tsuchimochi et al. 2010].

Vor diesem Hintergrund untersuchten wir GADD45 $\beta$  als Kandidatenprotein zur Vermittlung der TGF- $\beta$ -induzierten Spätaktivierung von p38 in HTF. Tatsächlich konnten wir die Transkription von GADD45 $\beta$  in HTF qualitativ (Kap. 4.6.1) und quantitativ nachweisen: TGF- $\beta$  bewirkte eine rasche Zunahme der Transkription mit

Erreichen eines Maximums innerhalb der ersten vier Stunden nach TGF- $\beta$ -Stimulation sowohl in S3T3 als auch in HTF (Kap. 4.6.2). In Hinblick auf den Zeitverlauf der Expression kommt GADD45 $\beta$  damit als Mediatorprotein im Rahmen der TGF- $\beta$ -induzierten Myofibroblastentransdifferenzierung in Frage: GADD45 $\beta$  könnte als Zwischenbote durch die in HTF rasch einsetzende SMAD2-Aktivierung induziert werden, was die Phosphorylierung dieser Signalmoleküle mit der p38-Spätaktivierung verbinden würde [Takekawa et al. 2002, Major et al. 2004, Yoo et al. 2003].

Zur weiteren Klärung der Rolle von GADD45 $\beta$  sollten Überexpressionsexperimente mit einem sense- und antisense- Ansatz dienen. Die Auslösung von Transdifferenzierungsvorgängen durch zellinterne Überexpression von GADD45 $\beta$  in HTF ohne externe TGF- $\beta$ -Exposition würde für eine wesentliche Mediatorfunktion von GADD45 $\beta$  sprechen. Die Blockade der Transdifferenzierung durch spezifische Hemmung von GADD45 $\beta$  mittels antisense-Plasmiden wäre ein wesentlicher Hinweis auf die funktionelle Bedeutung von GADD45 $\beta$  und eine potentielle therapeutische Möglichkeit zur Transdifferenzierungs- und damit Vernarbungshemmung in humanen Tenonfibroblasten. Im Tierversuch zeigte die Blockade von p38 durch Überexpression dominant-negativer p38-Konstrukte eine verminderte Vernarbung nach Konjunktivalverletzungen bei Mäusen. Die topische Applikation eines adenoviralen Vektors verminderte die Expression von TypI-Collagen,  $\alpha$ SMA, Fibronectin, CTGF und MCP-1 [Yamanaka et al. 2007]. Die Transfektion entsprechender Plasmide war jedoch für unsere primären HTF durch die beschriebene Methodik nicht erfolgreich. Ein möglicher weiterer Ansatz wäre der Einsatz eines viralen Vektors, wodurch in Pankreasepithelzellen durch das Einbringen von GADD45 $\beta$ -antisense-Konstrukten die p38-Spätaktivierung gehemmt werden konnte [Takekawa et al. 2002, Ungefroren et al. 2004].

Als Angriffspunkt für eine spezifische Modulation der TGF- $\beta$ -getriebenen Vernarungsreaktion lassen die vorliegenden Ergebnisse somit neben einer Hemmung der p38-Signalkaskade auch eine Modulation von GADD45 $\beta$  möglich erscheinen.

## **6. Zusammenfassung**

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine zentrale Rolle des p38-Signalweges für die Übermittlung der TGF- $\beta$ -induzierten Transdifferenzierung humaner Tenonfibroblasten hin. Die Transdifferenzierung der HTF ist durch die nach 48 Stunden einsetzende Expression von Markerproteinen wie  $\alpha$ SMA, der vermehrten Synthese von Matrixproteinen wie Collagen I $\alpha$ 1 und Fibronectin sowie Veränderungen der Zellmorphologie charakterisiert.

Im Rahmen der Arbeit wurde die Aktivierung der p38 MAPK im Zeitverlauf betrachtet und verschiedene Aktivierungsformen von p38 herausgearbeitet: Die schnell einsetzende Aktivierung einer „hohen“ schweren p38-Isoform war meist nicht durch TGF- $\beta$  an sich, sondern vielmehr durch eine mechanische Stimulation der Zellen bei Mediumwechsel zur Zugabe des Wachstumsfaktors bedingt. Demgegenüber war eine späte nach etwa 12 Stunden zu beobachtende Aktivierung einer „tiefen“ leichten p38-Isoform streng von der TGF- $\beta$ -Stimulation sowie einem funktionsfähigen TGF- $\beta$ -Rezeptor Typ I abhängig. Diese p38-Spätaktivierung ist zeitlich mit der TGF- $\beta$ -induzierten  $\alpha$ SMA-Expression assoziiert.

Da die TGF- $\beta$ -induzierte  $\alpha$ SMA-Transkription durch Blockade der Proteinbiosynthese verhindert wird und eine zeitliche Lücke bis zur relevanten p38-Spätaktivierung besteht, ist offenbar die Synthese eines Zwischenboten notwendig. Als möglicher Kandidat für einen solchen Intermediator kam nach Literaturlage GADD45 $\beta$  in Frage: GADD45 $\beta$  konnte schließlich sowohl qualitativ als auch quantitativ nach TGF- $\beta$ -Exposition in HTF nachgewiesen werden: Es wird mit einem deutlichen Maximum innerhalb der ersten Stunde für einige Stunden synthetisiert.

Die beobachtete rasche SMAD2-Aktivierung in HTF, die in keinem direkten zeitlichen Zusammenhang zur  $\alpha$ SMA-Expression steht, könnte verantwortlich für die Induktion von GADD45 $\beta$  sein und damit über Aktivierung von p38 zur Transdifferenzierung der Tenonfibroblasten zu Myofibroblasten beitragen.

Für den weitergehenden Nachweis der Bedeutung von GADD45 $\beta$  ist dessen spezifische Blockade durch antisense-Überexpression mittels viralen Vektoren oder RNA-Interferenz anzustreben.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass GADD45 $\beta$  neben der p38 MAPK ein potentielles Ziel zur therapeutischen Modulation der TGF- $\beta$ -vermittelten Transdifferenzierung von humanen Tenonfibroblasten darstellen kann.

Insgesamt ist zu betonen, dass ein besseres Verständnis der zellinternen Abläufe und eine genauere Charakterisierung der relevanten Signalkaskaden neue hoffnungsvolle Ansatzpunkte zur Vernarbungshemmung nach Trabekulektomie eröffnen.

*Man kommt nur langsam vorwärts in der Erkenntnis der Wahrheit, was nicht verhindert, dass man darin Fortschritte macht.*

*Jean-Jacques Rousseau (1712 - 1778)*

## **7. Literaturverzeichnis**

1. Abreu J.G., Ketpura N.I., et al.: Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat. Cell Biol.* Vol.4-8 (2002) 599-604
2. Addicks E.M., Quigley H.A., et al.: Histologic characteristics of filtering blebs in glaucomatous eyes. *Arch. Ophtal.* Vol.101-5 (1983) 795-798
3. Alexandrow M.G., Moses H.L.: Transforming growth factor- $\beta$  and cell cycle regulation. *Cancer Res.* Vol.55 (1995) 1452-1457
4. Allen R.R., Qi L., Higgins P.J.: Upstream Stimulatory Factor Regulates E Box-Dependent PAI-1 Transkription in Human Epidermal Keratinocytes. *J. Cell. Physiol.* Vol. 203 (2005) 156-165
5. Amanullah A., et al.: Cell survival and a Gadd45-factor deficiency. *Nature* Vol.424 (2003) 741-742
6. Arias M., Lahme B., van de Leur JE., Gressner A.M., Weiskirchen R.: Adenoviral Delivery of an Antisense RNA Complementary to the 3' Coding Sequence of Transforming Growth Factor  $-\beta$ 1 Inhibits Fibrogenic Activities of Hepatic stellate cells. *Cell Growth Differ.* Vol.13 (2002) 265-273
7. Arias M., Sauer – Lehnen S., Treptau J., Janoschek N., Theuerkauf I., Buettner R., Gressner A.M., Weiskirchen R.: Adenoviral expression of a transforming growth factor  $-\beta$ 1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile – duct ligated rats. *BMC Gastroenterology* Vol. 3 (2003) 29
8. Arora P.D., McCulloch C.A.: Dependence of collagen remodelling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J. Cell Physiol.* Vol.159-1 (1994) 161-175
9. Attisano L., Wrana J.L.: Smads as transcriptional co-modulators. *Cell* Vol.12 (2000) 235-243
10. Attisano L., Lee-Hoeflich S.T.: The Smads. *Genome Biol.* Vol.2-8 (2001) Review 3010.1-3010.8
11. Ashcroft G.S., Yang X. et al.: Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat. Cell Biol.* Vol.1-5 (1999) 260-266

12. Bakin A.V., Rinehart C., Tomlinson A.K., Arteaga C.L.: p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGF $\beta$ -mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J. Cell Sci.* Vol.115 (2002) 3193-3206
13. Bategay E.J., Raines E.W., et al.: TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* Vol.63-3 (1990) 515-524
14. Bhowmick N.A., Zent R. et al.: integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *J. Biol Chem.* Vol.276-50 (2001) 46707-46713
15. Blobe G.C., Schiemann W.P., et al.: Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl J. Med.* Vol.342-18 (2000) 1350-1358
16. Border W.A., Noble N.A.: Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* Vol.331-19 (1994) 1286-1292
17. Branton M.H., Kopp J.B.: TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect.* Vol.1-15 (1999) 1349-65
18. Brewster J.L., de Valoir T. et al: An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* Vol.259 (1993) 1760-1763
19. Burt D.W., Law A.S.: Evolution of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily. *Prog. Growth Factor Res.* Vol.5 (1994) 99-118
20. Chang L., Karin M.: mammalian kinase signaling cascades. *Nature* Vol. 410 (2001) 37-40
21. Chen S.J., Yuan W., et al.: Stimulation of type I Collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3. *J. Invest. Dermatol.* Vol.112-1 (1999) 49-57
22. Chen Z., Clark S., Birkeland M., et al.: Induction and superinduction of growth arrest and DNA damage gene 45 (GADD45)  $\alpha$  and  $\beta$  messenger RNAs by histone deacetylase inhibitors trichostatin A (TSA) and butyrate in SW620 human colon carcinoma cells. *Cancer Lett.* Vol.188 (2002) 127-140
23. Chi H., Lu B., Takekawa M., Dabis R.J., Flavell R.A.: GADD45 $\beta$  / GADD45y and MEKK4 comprise a genetic pathway mediating STAT4 -independent IFN $\gamma$  production in T cells. *EMBO J.* Vol.23 (2004) 1576-1586

24. Clark R.A.F., McCoy G.A., Folkvord J.M., McPherson J.M.: TGF- $\beta$ 1 stimulates cultured human fibroblasts to proliferate and produce tissue-like fibroplasia: a fibronectin matrix-dependent event. *J. Cell. Physiol.* Vol. 170 (1997) 69-80
25. Coleman A., Brigatti L.: The Glaucomas. *Minerva Med.* Vol.92-5 (2001) 365-79
26. Connor T.B.Jr., Roberts A.B. et al.: Correlation of fibrosis and transforming growth factor-beta type 2 levels in the eye. *J. Clin. Invest.* Vol.83-5 (1998) 1661-1666
27. Cordeiro M.F., Reichel M.B., Gay J.A., D'Esposito F., Alexander R.A., Khaw P.T.: Transforming Growth Factor- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, and - $\beta$ 3 In Vivo: Effects on Normal and Mitomycin C-Modulated Conjunctival Scarring. *IOVS* Vol.40-9 (1999-1)1975-1982
28. Cordeiro M.F., Gay J.A., Khaw P.T.: Human Anti-Transforming Growth Factor- $\beta$ 2 Antibody: A New Glaucoma Anti-Scarring Agent. *IOVS* Vol.40-10 (1999-2) 2225-2234
29. Cordeiro M.F., Bhattacharya S.S., Schultz G.S., Khaw P.T.: TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, and - $\beta$ 3 in Vitro: Biphasic Effects on Tenon's Fibroblast Contraction, Proliferation and Migration. *IOVS* Vol.41-3 (2000) 756-763
30. Cordeiro M.F., Mead A., Ali R.R., Alexander R.A., Murray S., Chen C., York-Defalco C., Dean N.M., Schultz GS, Khaw P.T.: Novel antisense oligonucleotides targeting TGF- $\beta$  inhibit in vivo scarring and improve surgical outcome. *Gene Ther.* Vol.10 (2003) 59-71
31. Cordeiro M.F.: Role of transforming growth factor  $\beta$  in conjunctival scarring. *Clin. Sci.* Vol.104 (2003) 181-187
32. Coulthard L.R., White D.E. et al.: p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends Mol. Med.* Vol.15-8 (2009) 369-379
33. Daniels J.T., Schultz G.S., Blalock T.D., Garrett Q., Grotendorst G.R., Dean N.M., Khaw P.T.: Mediation of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1-Stimulated Matrix Contraction by Fibroblasts. *Am. J. Path.* Vol.163-5 (2003) 2043-2052
34. Denissova N.G., Pouponnot C. Long J., He D., Liu F.: Transforming growth factor - inducible independent binding of SMAD to the SMAD7 promotor. *PNAS* Vol.97 (2000) 6397-6402
35. Derynck R., Zhang Y.E.: Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* Vol.425 (2003) 577-584

36. Desmouliere A., Geinoz A., Gabbiani F., Gabbiani G.: Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Induces alpha-Smooth muscle Actin Expression in Granulation Tissue Myofibroblasts and in Quiescent and Growing Cultured Fibroblasts. *J. Cell. Biol.* Vol.122 (1993) 103-111
37. Desmouliere A., Chaponnier Ch., Gabbiani G.: Tissue repair, contraction and the myofibroblast. *Wound Repair Regen.* Vol.13-1 (2005) 7-12
38. Dugina V., Fontao L., Chaponnier Ch., Vasiliev J., Gabbiani G.: Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *J. Cell Sci.* Vol.114 (2001) 3285-3296
39. Edlund S., Bu s., Schuster N., et al.: Transforming Growth Factor-  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ )-induced Apoptosis of Prostate Cancer Cells involves Smad7-dependent Activation of p38 by TGF- $\beta$ -activated Kinase1 and Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 3. *Mol. Cell Biol.* Vol.14 (2003) 529-544
40. Edlund s., Lee S.Y., Grimsby S., et al.: Interaction between Smad7 and  $\beta$ -Catenin: Importance for Transforming Growth Factor  $\beta$ -Induced Apoptosis. *Mol. Cell Biol.* Vol.25-4 (2005) 1475-1488
41. Furukawa F., Matsuzaki K., Mori S., Tahashi Y., et al.: p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myfibroblasts. *Hepatology* Vol. 38 (2003) 879-89
42. Gabbiani G., Chaponnier C., Huttner I.: Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. *J. Cell Biol.* Vol.76 (1978) 561-568
43. Goldberg P.L., et al.: p38 MAPK activation by TGF- $\beta$ 1 increases MLC phosphorylation and endothelial monolayer permeability. *Am. J. Physiol.* Vol.282 (2002) 146-154
44. Grehn F.: *Augenheilkunde*. Springer, 30. Auflage (2008)
45. Gressner, A. M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K., and Dooley, S.: Roles of TGF in hepatic fibrosis. *Front. Biosc.* Vol.7 (2002) 793–807
46. Grinnell F.: Fibroblasts, myofibroblasts and wound contraction. *J. Cell. Biol.* Vol.124-4 (1994) 401-404
47. Grinnell F.: Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol.* Vol. 13 ( 2003) 264-269

48. Han J., Richter B., Li Z., Kravchenko V., Ulevitch R.J.: Molecular cloning of human p38 MAP kinase. *Biochim Biophys Acta.* (1995) 224-227
49. Hanafusa H. et al.: Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor- $\beta$ -induced gene expression. *J. Biol. Chem.* Vol.274 (1999) 27161-27167
50. Hinz B., Mastrangelo D., Iselin D.E., Chaponnier C. and Gabbiani G.: Mechanical Tension Controls Granulation Tissue Contractile Activity and Myofibroblast Differentiation. *Am. J. Pathol.* Vol. 159 (2001-1) 1009-1020
51. Hinz B., Celetta G., Tomasek J.J., Gabbiani G., Chaponnier Ch.: Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity. *Mol. Biol. Cell* Vol. 12 (2001-2) 2730-2741
52. Hocevar B.A., Brown T.L., Howe P.H.: TGF- $\beta$  induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, SMAD4-independent pathway. *EMBO J.* Vol.18 (1999) 134-1356
53. Hocevar B.A., Surine A., Xu X.-X., Howe P.H.: The adapter molecule Disabled -2 links the transforming growth factor  $\beta$  receptor to the Smad pathway. *EMBO J.* Vol.11 (2001) 2789-2801
54. Horowitz J.C., Daniel Y.L., et al.: Activation of the Pro-survival Phosphatidylinositol 3-Kinase/ AKT Pathway by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Mesenchymal Cells is Mediated by p38 MAPK-dependent Induction of an Autocrine Growth Factor. *J. Biol. Chem* Vol.279-2 (2004) 1359-1367
55. Hu B., Wu Z., Phan S.H.: Smad3 Mediates Transforming Growth Factor- $\beta$ -Induced  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Expression. *Am. J. Resp. Cell and Mol. Biol.* Vol. 29 (2003) 397-404
56. Ijiri K., Zerbini L. F., Peng H. et al.: Novel Role for GADD45 $\beta$  as a Mediator of MMP-13 Gene Expression during Chondrocyte Terminal Differentiation. *J. Biol. Chem.* Vol. 280 (2005) 38544-38555
57. Itoh S., Itoh F., Goumas M.J., ten Dijke P.: Signaling of transforming growth factor  $\beta$  family members through Smad Proteins. *Eur. J. Biochem.* Vol. 267 (2000) 6954-6967

58. Jester J.V., Huang J., et al.: Transforming growth factor (beta)-mediated corneal myofibroblast differentiation requires actin and fibronectin assembly. *IOVS* Vol. 40.9 (1999) 1959-1967
59. Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, et al. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38 $\beta$ ). *J Biol Chem*. Vol.271 (1996) 17920-6
60. Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, et al. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38 $\delta$ . *J. Biol. Chem*. Vol.272 (1997) 30122-30128
61. Jiang W., Yang C.-Q., Liu W.-W., Wang Y.-Q., He B.-M., Wang J.-Y.: Blockage of transforming growth factor  $\beta$  receptors prevents progression of pig serum –induced rat liver fibrosis. *World J. Gastroenterol*. Vol.10-11 (2004) 1634-1638
62. Kanski J.J. et al.: *Lehrbuch der klinischen Ophthalmologie*. 2. Auflage, Thieme (1996)
63. Kapoun A.M., Gaspar N.J., et al.: Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptor Type 1 (TGF $\beta$ RI) Kinase Activity but not p38 Activation is Required for TGF $\beta$ RI-Induced Myofibroblast Differentiation and Profibrotic Gene Expression. *Mol. Pharm*. Vol.70-2 (2006) 518-531
64. Kasai H., Allen J.T., Mason R.M., Kamimura T., Zhang Z.: TGF- $\beta$ 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir. Res*. Vol. 6:56 (2005)
65. Kesi-Oja J., Raghow J.R. et al.: Regulation of mRNAs for type-1 plasminogen activator inhibitor, fibronectin, and type 1 procollagen by transforming growth factor-beta. Divergent responses in lung fibroblasts and carcinoma cells. *J. Biol. Chem*. Vol. 263-7 (1988) 3111-3115
66. Khaw P.T., Chang L., et al.: Modulation of wound healing after glaucoma surgery. *Curr. Opin. Ophthalmol*. Vol.12-2 (2001) 143-148
67. Khaw P.T., Grehn F.J., et al.: A Multicentre, Double-masked, Randomised, Placebo-Control Study to Evaluate the Efficacy, Safety, and Tolerability of Subconjunctival Injections of 100 $\mu$ g CAT-152 Human Anti-TGF $\beta$ 2 Monoclonal Antibody as an Agent to Modulate Wound Healing Following First Time Trabeculectomy (Study 0102). *ARVO* (2005) Abstract 87/B61

68. Khaw, P. et al.: A phase III study of subconjunctival human anti-transforming growth factor beta(2) monoclonal antibody (CAT-152) to prevent scarring after first-time trabeculectomy. *Ophthalmology* Vol. 114(10) (2007) 1822-30
69. Kimoto K., Nakatsuka K., Matsuo N., Yoshioka H.: p38 MAPK mediates the expression of type I collagen induced by TGF- $\beta$ 2 in human retinal pigment epithelial cells ARPE-19. *IOVS* Vol.45 (2004) 2431-2437
70. Kurosaka H., Kurosaka D., et al.: Transforming growth factor-beta 1 promotes contraction of collagen gel by bovine corneal fibroblasts through differentiation of myofibroblasts. *IOVS* Vol. 39-5 (1998) 699-704
71. Kutz S.M., Higgins C.E., Samarakoon R., Higgins S.P., Allen R.R., Qi L., Higgins P.J.: TGF- $\beta$ 1-induced PAI-1 expression is E box/ USF-dependent and requires ERGF-signaling. *Exp. Cell Res.* Vol. 312 (2006) 1093–1105
72. Lama P.J., Fechtner R.D.: Antifibrotics and Wound Healing in Glaucoma Surgery. *Surv. Ophthalmol.* Vol.48-3 (2003) 314-344
73. Laping N.M., Grygielko E., et al.: Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol. Pharm.* Vol.62.1 (2002) 58-64
74. Lawrence D.A.: Transforming growth factor-  $\beta$ : a general review. *Eur. Cytokine Netw.* Vol.7 14(1996) 363-374
75. Leask A., Abraham D.J.: TGF-beta signalling and the fibrotic response. *Faseb J.* Vol.18-7 (2004) 816-27
76. Lee J.C., Laydon J.T., McDonnell P.C., Gallagher T.F., Kumar S., Green D., et al.: A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* Vol.372 (1994) 739-46.
77. Lee E.H., Joo Ch.-K.: Role of Transforming Growth Factor- $\beta$  in Transdifferentiation and Fibrosis of Lens Epithelial Cells. *IOVS* Vol.40 (1999) 2025-2032
78. Letamendia A., Labbe E., Attisano L.: Transcriptional Regulation by Smads: crosstalk between the TGF- $\beta$  and WNT pathways. *JBJS* Vol.83-A1 (2001) 31-39
79. Li D.Q., Lee S.B., et al.: Differential expression and regulation of TGF-beta 1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-betaRI, TGF-betaRII and TGF-betaRIII in cultured human corneal, limbal, and conjunctival fibroblasts. *Curr. Eye Res.* Vol.19-2 (1999) 154-161

80. Li X., Udagawa N., et al.: p38 Mitogen-activated Protein Kinase Is Crucially involved in Osteoclast Differentiation But Not in Cytokine Production, Phagocytosis, or Dendritic Cell Differentiation of Bone Marrow Macrophages. *Endocrinology* Vol.144-11 (2003) 4999-5005
81. Li J., Campanale N.V. et al.: Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Transforming Growth Factor- $\beta$ 1/Smad Signaling Pathways Modulates the Development of Fibrosis in Adriamycin-Induced Nephropathy. *Am. J. Path.* Vol.169-5 (2006) 1527 – 1540
82. Liu X., Wen F.Q. et al.: Smad3 mediates the TGF-beta-induced contraction of type I collagen gels by mouse embryo fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton* Vol. 54-3 (2003) 248-253
83. Lund L.R. et al.: Transforming growth factor- $\beta$  is a strong and fast acting positive regulator of the level of type-1 plasminogen activator inhibitor m-RNA in WI-38 human lung fibroblasts. *EMBO J.* Vol.6 (1987) 1281-1286
84. Major M.B., Jones D.A.: Identification of a Gadd45 $\beta$  3'Enhancer that mediates SMAD3- and SMAD4- dependent Transcriptional Induction by Transforming Growth Factor  $\beta$ . *J. Biol. Chem.* Vol.279 (2004) 5278-5287
85. Massague J.: The TGF- $\beta$  Family of Growth and Differentiation Factors. *Cell* Vol.49 (1987) 437-438
86. Massagué J. : How cells read TGF- $\beta$  Signals. *Nature, Mol. Cell Biol.* Vol.1 (2000) 169-178
87. Markowitz S.D., Roberts A.B.: Tumor suppressor activity of the TGF- $\beta$  pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev.* Vol7 (1996) 93-102
88. Marquardt D., Lieb W.E., Grehn F.: Intensified postoperative care versus conventional follow-up: a retrospective long-term analysis of 177 trabeculectomies. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* Vol.242 (2004) 106-113
89. McDonald N.Q., Hendrickson W.A.: A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* Vol.73 (1993) 421-424
90. Mead A.L., Wong T.T.L., Cordeiro M.F, Anderson I.K. Khaw P.T.: Evaluation of Anti-TGF- $\beta$ 2 Antibody as a New Postoperative Anti-scarring Agent in Glaucoma Surgery. *IOVS* Vol.44-8 (2003) 3395-3401

91. Meyer-ter-Vehn T., Gebhardt S., Sebald W., et al.: p38 inhibitors prevent TGF- $\beta$ -induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts. IOVS Vol.47 (2006-1) 1500-1509
92. Meyer-ter-Vehn T., Sieprath S., Katzenberger B., Gebhardt S., Grehn F., Schlunck G.: Contractility as a Prerequisite for TGF- $\beta$ -Induced Myofibroblasts Transdifferentiation in Human Tenon Fibroblasts. IOVS Vol.47 (2006-2)
93. Montesano R., Orci L.: Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. PNAS Vol.85-13 (1988) 4894-4897
94. Mori Y., Ishida W., Bhattacharyya S., Li Y., Platanias L.C., Varga J.: Selective Inhibition of Activin Receptor-like Kinase 5 Signaling blocks profibrotic Transforming Growth Factor  $\beta$  Responses in Skin Fibroblasts. Arthritis Rheum. Vol.50-12 (2004) 4008-4021
95. Mutsch Y.A., Grehn F.: Success criteria and success rates in trabeculectomy with and without intraoperative antimetabolites using intensified postoperative care (IPC). Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Vol.238-11 (2000) 884-891
96. Nakamura H., Siddiqui S.S., Shen X., Malik A.B., Pulido J.S., Kumar N.M., Yue B.Y.J.T.: RNA interference targeting transforming growth factor- $\beta$  type II receptor suppresses ocular inflammation and fibrosis. Mol. Vis. Vol.10 (2004) 703-711
97. Nakao A., Imamura T., Souchelnytskyi S. et al.: TGF- $\beta$  receptor-mediated signaling through Smad2, Smad3 and Smad4. EMBO J. Vol. 16 (1997) 5353-5362
98. Pasquale L.R., Dorman-Pease M.E., et al.: Immunolocalization of TGF-beta1, TGF-beta2, and TGF-beta3 in the anterior segment of the human eye. IOVS Vol.34-1 (1993) 23-30
99. Penheiter S.G., Mitchell H., Garamszegi N., Edens M., Doré J.J.E.Jr., Leaf E.B.: Internalization - Dependent and Independent Requirements for Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptor Signaling via the Smad Pathway. Mol. Cell. Biol. Vol.22 (2002) 4750-4759
100. Picht G., Grehn F.: Sickerkissenentwicklung nach Trabekulektomie. Ophthalmologie Vol.95 (1998) 380-387

101. Picht G., Welge-Luessen U., et al.: Transforming growth factor beta 2 levels in the aqueous humor in different types of glaucoma and the relation to filtering bleb development. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* Vol.239-3 (2001) 199-207
102. Quigley H.A., Broman A.T.: The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *BJO Vol.* 90 (2006) 262-267
103. Rahimi R.A., Leof E.B.: TGF- $\beta$  Signaling: A Tale of Two Responses. *J. Cell. Biochem.* Vol.102 (2007) 593-608
104. Raingeaud J., Gupta S. et al.: Pro-inflammatory Cytokines and Environmental Stress Cause p38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation by Dual Phosphorylation on Tyrosine and Threonine. *F. Biol. Chem.* Vol.270 (1995) 420-426
105. Roberts A.B., Sporn M.B.: The transforming growth factor- $\beta$ s. Springer 1990
106. Saika S.: TGF $\beta$  pathobiology in the eye. *Lab. Invest.* Vol. 86 (2006) 106-115
107. Sano Y. et al.: ATF-2 is a common nuclear target of SMAD and TAK1 pathways in transforming growth factor- $\beta$  signaling. *J. Biol. Chem.* Vol.274 (1999) 8949-8957
108. Schmitt-Graff A., Desmouliere A., et al.: Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch.* Vol. 425-1 (1994) 3-24
109. Serini G., Gabbiani G.: Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp. Cell Res.* Vol.250 (1999) 273-283
110. Shah M., Foreman D.M., Ferguson M.W.J.: Neutralisation of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 or exogenous addition of TGF- $\beta$ 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J. Cell Sci.* Vol.108 (1995) 985-1002
111. Shull M.M., Ormsby I., Kier A.B., Pawlowski S., Diebold R.J., Yin M., Allen R., Sidman C., Proetzel G., Calvin D., et al.: Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- $\beta$ 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* Vol. 359 (1992) 639-699
112. Singer A.J., Clark R.A.F.: Cutaneous Wound Healing. *N. Engl. J. Med.* Vol.341-10 (1999) 738-746
113. Spalton D.J., Hitchings R.A., Hunter P.A.: Atlas der klinischen Ophthalmologie. Urban&Fischer (2006), 189ff

114. Strutz F., Zeisberg M., Renziehausen A., Raschke B., Becker V., van Kooten C., Müller G.A.: TGF- $\beta$ 1 induces proliferation in human renal fibroblasts induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int.* Vol.59 (2001), 579-592
115. Takekawa M, Posas F., Saito H.: A human homolog of the yeast Ssk2/ Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways. *EMBO* Vol.16 (1997) 4973-4982
116. Takekawa M, Saito H.: A Family of Stress-Inducible GADD45-like Proteins Mediate Activation of the Stress-Responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* Vol.95 (1998) 521-530
117. Takekawa M., Tatebayashi K., Itoh F., Adachi M., Imai K., Saito H.: Smad – dependent GADD45 $\beta$  expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF $\beta$ . *EMBO* Vol.23 (2002) 6473-6482
118. Tamm E.R., Siegner A. et al.: Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in cultured human and monkey trabecular meshwork. *Exp. Eye Res.* Vol.62-4 (1996) 389-297
119. Thannickal V.J., Lee D.Y. et al.: Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta 1 is dependant on cell adhesion and integrin signalling via focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* Vol. 278-14 (2003) 12384-12389
120. Thylefors B., Negrel A.D.: The global impact of glaucoma. *Bull. WHO* Vol.72-3 (1994) 323-326
121. Tomasek J.J., Gabbiani G., Hinz B., Chaponnier Ch., Brown R.A.: Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. *Nature Review, Mol. Cell Biol.* Vol.3 (2002) 249-263
122. Tsuchimochi K., Otero M., Dragomir C.L. et al.: GADD45beta enhances Col10a1 transcription via the MTK1/MKK3/6/p38 axis and activation of C/EBP-beta-TAD4 in terminally differentiating chondrocytes. *J Biol Chem.* Mar 12 (2010) 8395-8407
123. Tsukada S., Westwick J.K., et al.: SMAD and p38 MAPK Siganling Pathways Independently Regulate  $\alpha$ 1(I) Collagen Gene Epression in Unstimulated and Transforming Growth Factor- $\beta$ -stimulated Hepatic Stellate Cells. *J. Biol. Chem.* Vol.280-11 (2005) 10055-10064

124. Ungefroren H., Groth S., Ruhnke M., Kalthoff H., Gändrich F.: Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Type I Receptor/ ALK5 – dependent Activation of the Gadd45 $\beta$  Gene Mediates the Induction of Biglycan Expression by TGF $\beta$ . *J. Biol. Chem.* Vol.280 (2005) 2644-2652
125. Vayalil P.K., Iles K.E., et al.: Glutathione suppresses TGF- $\beta$ -induced PAI-1 expression by inhibiting p38 and JNK MAPK and the binding of AP-1, SP-1, and Smad to the PAI-1 promoter. *Am. J. Physiol.* Vol.293 (2007) 1281-1292
126. Wimmer I., Grehn F.: Steuerung der Wundheilung nach Glaukomchirurgie. *Ophtalmologie* Vol.99 (2002) 678-682
127. [www.augeninfo.de/leit/leit15c](http://www.augeninfo.de/leit/leit15c)
128. Xu J., Attisano L.: Mutations in the tumor suppressor Smad2 and Smad4 inactivate transforming growth factor  $\beta$  signalling by targeting Smads to the ubiquitin-proteasome pathway. *PNAS* Vol.97-9 (2000) 4820-4825
129. Yamaguchi K., Shirakabe K. et al.: Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* Vol. 270 (1995) 2008-2011
130. Yamaguchi K., Nagai S. et al.: XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signalling pathway. *EMBO* Vol. 18-1 (1999) 179-187
131. Yamanaka O., Saika S., et al.: Inhibition of p38MAP kinase suppresses fibrogenic reaction in conjunctiva in mice. *Mol. Vis.* Vol.15 (2007) 1730-1739
132. Yokozeki M. Moriyama K. et al.: Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Modulates Myofibroblastic Pheotype of Rat Palatal Fibroblasts in Vitro. *Exp. Cell Res.* Vol. 231-2 (1997) 328-336
133. Yoo J., Ghiassi M., et al.: Transforming Growth Factor- $\beta$ -induced Apoptosis Is Mediated by Smad-dependent Expression of GADD45 $\beta$  through p38 Activation. *J. Biol. Chem.* Vol.278-44 (2003) 43001-07
134. Yu L., Hébert M.C., Zhang Y.E.: TGF- $\beta$  receptor-activated p38 MAP kinase mediates SMAD-independent TGF- $\beta$  responses. *EMBO J.* Vol.21 (2002) 3749-3759
135. Zhang K., Rekhter M.D., et al.: Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am. J. Path.* Vol.145-1 (1994) 114-125

**8. Abkürzungsverzeichnis**

$\alpha$ SMA	alpha Smooth Muscle Actin
ALTP	Argon-laser-Trabekuloplastik
APS	Ammoniumsulfat
ARPE-19	Spontaneously arising retinal pigment epithelial Zelllinie
BAMBI	BMP and Activin membrane-bound Inhibitor
BMP	Bone morphogenetic protein
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CAT-152	Humaner monoklonaler Antikörper gegen TGF- $\beta$ 2
cDNA	copy DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTGF	Connective tissue growth factor
Cx	Cycloheximid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxyribonucleotide Triphosphate
Ebox	Genmotiv 5'CACGTG3'
E.coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EMT	Epithelial to mesenchymal transition
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FCS	Fetal Calf Serum
5-FU	5-Fluorouracil
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
GADD45 $\beta$	Growth Arrest DNA Damage-inducible Gene 45 beta
GAM	Goat anti Mouse
GARB	Goat anti Rabbit
h	Stunde
h/mGADD4 $\beta$	Humane/ Maus-GADD45 $\beta$ - Primer
H <sub>2</sub> O	Aqua
HCL	Salzsäure
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HTF	humane Tenonfibroblasten
IGF-1	Insulin-like growth factor
IL-1	Interleukin 1
IM	Intermediator
INF $\gamma$	Interferon gamma
IOD	Intraokulärer Druck
IP	Immunpräzipitation
JNK	Jun N-terminal Kinase
kDa	Kilodalton
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-activated

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumdichlorid
min	Minuten
Mio	Millionen
MKK	Map Kinase Kinase
ml	Milliliter
MLC	Myosin light chain
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MTK, MEKK	MAPK Kinase Kinasen
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NaF	Natriumfluorid
ng	Nanogramm
NLS	Nuclear Localization Signal
Notch 3	Humanes Gen homolog Notch 3 (Drosophila)
PAI 1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
P38	Protein 38
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
PI	Proteinaseinhibitor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POWG	Primäres Offenwinkelglaukom
PVDF	Polyvinylidene Difluorid
qPCR	Quantitative PCR
Rho/Rock	Rho-Familie der GTPasen aus der Ras-Superfamilie
RNA	Ribonucleic acid
s	Sekunde
S3T3	Swiss 3T3- Fibroblasten
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SMAD	Small-size Mothers Against Decapentaplegic
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TAK 1	TGF- $\beta$ -Activated Kinase
TBR I/II	TGF- $\beta$ Rezeptor Typ I oder II
TBST	Tris-buffered Saline Tween-20
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TSA	Trichostatin A
USF	Upstream stimulatory factor
UV	Ultraviolettes Licht
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vol.	Volume (Ausgabe)
WNT	Signalprotein (Wingless – Int1-Gen Drosophila)
XIAP	Human x-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein

## **9. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schema des chirurgischen Procedere der Trabekulektomie.....	2
Abbildung 2: TGF- $\beta$ -induzierte Vorgänge.....	5
Abbildung 3: Schema intrazellulärer Signalkaskaden von TGF- $\beta$ .....	8
Abbildung 4: Photographie HTF in Zellkultur.....	11
Abbildung 5: Transdifferenzierung von Fibroblast zum Myofibroblast.....	11
Abbildung 6: Schema Transdifferenzierungsaktivierung.....	14
Abbildung 7: Schema SDS-PAGE Western Blot.....	19
Abbildung 8: PCR-Standardprogramm.....	22
Abbildung 9: Standardprogramm quantitative PCR.....	24
Abbildung 10: Quantitative PCR GADD45 $\beta$ .....	25
Abbildung 11: Verdünnungsreihe quantitative PCR $\beta$ -Actin.....	26
Abbildung 12: $\beta$ -Actin-Produkt im Agarosegel.....	26
Abbildung 13: Struktur des bakteriellen Plasmids pcDNA3.1+.....	28
Abbildung 14: TGF- $\beta$ -Effekte auf verschiedene Kaskadenvertreter.....	29
Abbildung 15: p38-Frühaktivierung in HTF.....	31
Abbildung 16: Effekte der TBR-I-Blockade auf HTF.....	32
Abbildung 17: Immunpräzipitation p38 $\alpha$ .....	33
Abbildung 18: Western Blot Abwaschversuch.....	34
Abbildung 19: Western Blot pP38 – Effekt Cycloheximid.....	35
Abbildung 20: qPCR PAI und p38 - Effekt Cyloheximid.....	36
Abbildung 21: Qualitativer Nachweis von GADD45 $\beta$ in HTF.....	38
Abbildung 22: Quantitative GADD45 $\beta$ -Expression in S3T3 und HTF.....	39

## Danksagung

An dieser Stelle bleibt zu erwähnen, dass im Rahmen dieser Arbeit auch weitere (für die aufgeführten Ergebnisse nicht relevante) Techniken beobachtet und erlernt werden durften. Dies ermöglichte mir einen Einblick in das weite Feld der Zellforschung und hatte prägenden Einfluss. Für diese wertvolle Erfahrung sei allen Beteiligten meine tiefe Dankbarkeit ausgesprochen:

Zunächst bedanke ich mich bei dem Direktor der Augenklinik der Universität Würzburg Prof. Dr. med. Franz Grehn, dem Referenten und Leiter des ophthalmologischen Forschungslabors Priv.-Doz. Dr. med. Günther Schlunck und dem Koreferenten Prof. Dr. med. Heimo Steffen.

Mein Dank gilt zudem der aufopfernden Betreuung durch Dr. med. Tobias Meyer-ter-Vehn. Auch danke ich für die Unterstützung und freundliche Integration durch die Mitarbeiter des Labors der Augenklinik.

Weiterhin möchte ich mich für die institutsübergreifende Zusammenarbeit und die mögliche Mitbenutzung von Einrichtungen der Forschungsabteilungen der Neurologie und der HNO der Universität Würzburg bedanken. Ich danke der Arbeitsgruppe Prof. Sebald um Dr. Nickel der PC II des biologischen Forschungszentrums der Universität Würzburg am Hubland. Hier erfolgte die Beratung und Anleitung zur Generierung von bakteriellen Plasmiden. Der Arbeitsgruppe Ungefroren der Universitätsklinik Kiel danke ich für die freundliche Bereitstellung der Plasmidvektoren.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die ich über alles liebe und deren grenzenlose Unterstützung mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht hat.