

**Unterschiede in der TGF- β -vermittelten Signaltransduktion
in aktivierten hepatischen Sternzellen unterhalb der Smad2-Phosphorylierung**

Frank Berg

Unterschiede in der TGF- β -vermittelten Signaltransduktion
in aktivierten hepatischen Sternzellen unterhalb der Smad2-Phosphorylierung

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Frank Berg

aus

Düsseldorf

Berichter: Herr Privatdozent
Dr.rer.nat. Steven Dooley

Herr Universitätsprofessor
Dr.med. Dipl.-Biochem. Siegfried Matern

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Mai 2003

**Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.**

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
sowie Klinisch-Chemischen Zentrallabor
der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med., Prof. h. c. (RCH) A. M. Gressner)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Leberfibrose/Leberzirrhose	3
1.2	Hepatische Sternzellen (HSC)	4
1.3	TGF- β	6
1.4	TGF- β -Signalweg / Smad-Proteine	6
1.5	Expression TGF- β -abhängiger Zielgene	10
2	Arbeitshypothesen	11
3	Material und Methoden	12
3.1	Zellen und Materialien in der Zellkultur	12
3.2	RNA-Isolierung	15
3.3	Northern-Blot	18
3.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	21
3.5	Protein-Isolierung	25
3.6	Western-Blot-Analyse	27
3.7	Transfektion von Zellen	32
3.8	TGF- β -abhängige Wachstumsinhibition	35
4	Ergebnisse	36
4.1	TGF- β -abhängige Smad2-Phosphorylierung	36
4.2	(CAGA) ₉ -MLP-Luc Regulation in Abhängigkeit von TGF- β	38
4.3	TGF- β -abhängige Smad7-Expression	40
4.4	TGF- β -Effekte auf das Zellwachstum	46
4.5	Regulation der Typ I Kollagen-mRNA-Expression	48

4.6	TGF- β -Effekte auf die Degradation der extrazellulären Matrix	51
4.7	Smad7-Überexpression in den Zellen	55
4.8	Einfluß von Smad7- und dominant negativ Smad3-/Smad4-Expression auf TGF- β -Zielgene	57
4.9	Smad3-Aktivität in CFSC und HSC-T6	61
5	Diskussion	63
5.1	Wachstumsinhibition	63
5.2	Regulation der Typ I Kollagen-Expression	64
5.3	Einfluß von Smad7 und konstitutiv phosphoryliertem Smad3	64
5.4	TIMP-1- und PAI-1-Expression	65
5.5	Therapeutische Aspekte	66
6	Zusammenfassung	68
7	Literatur	70
8	Danksagung	79

1 Einleitung

1.1 Leberfibrose/Leberzirrhose

Die Fibrogenese der Leber gilt als das Hauptmerkmal der Leberzirrhose, welche der irreparable Endzustand verschiedener chronischer Lebererkrankungen ist. Die Symptomatik reicht dabei von uncharakteristischen Allgemeinbeschwerden, portale Hypertension, Leberinsuffizienz bis hin zur hepatischen Enzephalopathie mit Leberausfallkoma. Auch das hepatozelluläre Karzinom kann auf der Grundlage einer bestehenden Leberzirrhose entstehen.

Die Entwicklung der Leberfibrose stellt eine Reaktion auf eine chronische Leberschädigung dar.

Hierbei sind der chronische Alkoholabusus und die Virushepatitis als die wichtigsten Ursachen zu nennen. Stoffwechselkrankheiten (Galaktosämie, α 1-Proteinaseinhibitor-Mangel) bzw. Speicherkrankheiten (Hämochromatose, Morbus Wilson) sind äthiologisch eher selten. Im Laufe der Fibrogenese kommt es zu einer gesteigerten Produktion der extrazellulären Matrix, auch ändert sich deren Zusammensetzung. Dabei beobachtet man in erster Linie einen Anstieg des Kollagengehaltes in der Leber, vor allem des Typ-I und Typ-IV Kollagens. Der Pathomechanismus beginnt mit einer Schädigung des Leberparenchyms, darauf werden die in der Leber angesiedelten Makrophagen, auch Kupffer-Zellen genannt, sowie aus dem Blut einwandernde Monozyten aktiviert. Diese setzen im weiteren Verlauf eine Vielzahl von inflammatorischen Zytokinen, wie vor allem *transforming growth factor* (TGF)- β / α , *tumor necrosis factor* (TNF)- α , *platelet derived growth factor* (PDGF), *fibroblast growth factor* (FGF) und *epidermal growth factor* (EGF) frei, die dann u.a. die Aktivität der hepatischen Sternzellen (HSC) beeinflussen.

Diese hepatischen Sternzellen sind dann für die Ausbildung der Fibrose von entscheidender Bedeutung.

1.2 Hepatische Sternzellen (HSC)

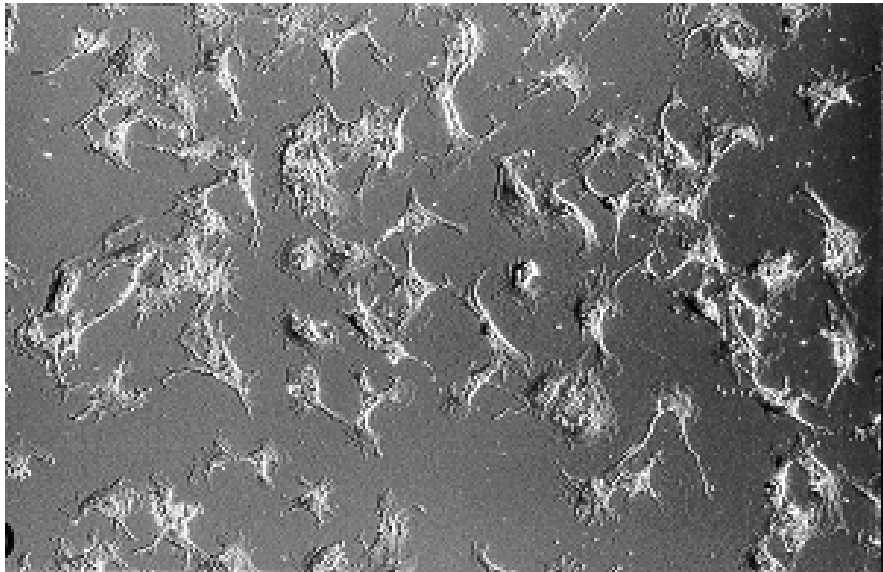
Die hepatischen Sternzellen (HSC), auch als Ito-Zellen oder Fettspeicherzellen (FSC) bekannt, sind in der Leber im perisinusoidalen Raum (Disse-Raum) lokalisiert. Die Zellen zeichnen sich durch charakteristische, große Fettvakuolen aus, die der physiologischen Speicherung von Retinoid (Vitamin A) dienen.

1.2.1 Aktivierung von HSC

Die Aktivierung und Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen (HSC) sind wichtige Schritte in der Fibrogenese der Leber. Dabei entwickeln die hepatischen Sternzellen einen Phänotyp ähnlich dem von Myofibroblasten. Weitere Merkmale von aktivierten HSC sind: vermehrte Produktion von extrazellulärer Matrix, eine erhöhte Proliferationsrate und Kontraktilität, verstärkte Ausbildung des rauen endoplasmatischen Retikulums, sowie Verlust der retinoidspeichernden Fettvakuolen.

Eine Aktivierung von HSC läßt sich auch *in vitro* durch Kultivierung frisch isolierter Zellen auf Plastik beobachten. Es wird postuliert, daß ursächlich für diese Transdifferenzierung in erster Linie eine erhöhte Expression des Zytokins TGF- β in der Leber ist [37]. Dabei kommt es während der Aktivierung von HSC zu einer gesteigerten endogenen TGF- β -Produktion, welche dann in einer autokrinen Signalwirkung resultiert [18, 19].

A



B

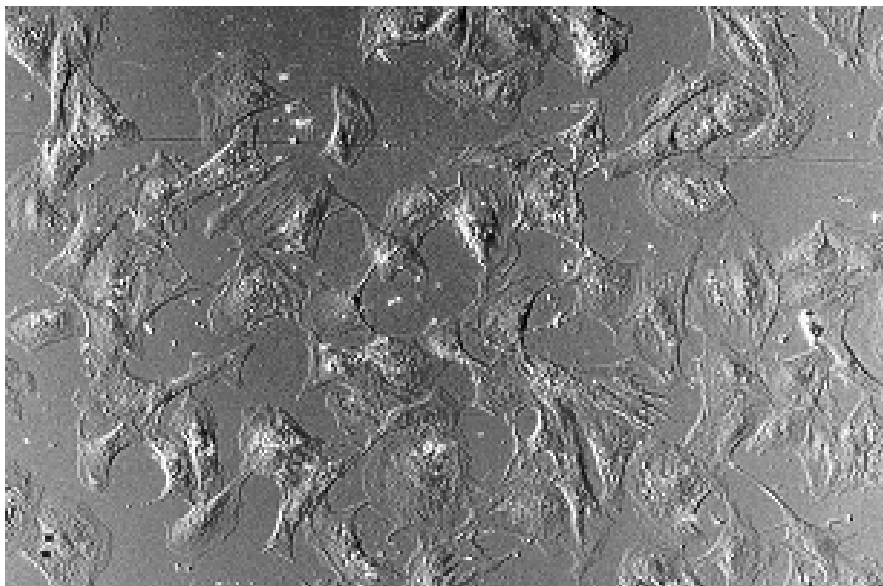


Abb. 1 A/B: Aktivierung und Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen

A: ruhende hepatische Sternzellen, 3 Tage alt.

B: aktivierte hepatische Sternzellen, 10 Tage alt.

1.3 Transforming-Growth-Factor (TGF)- β

TGF- β ist ein multifunktionelles Zytokin, welches in fünf verschiedenen Isoformen (TGF- β 1-5) bekannt ist. Nur die Isoformen 1-3 kommen in Säugetieren vor, wobei die codierenden Gene dieser Isoformen auf verschiedenen Chromosomen liegen. Das Gen für TGF- β 1 liegt in der Region 19q13, das für TGF- β 2 in der Region 1q41 und das für TGF- β 3 in der Region 14q24.

TGF- β ist ein Wachstumsfaktor und wird zusammen mit Activin, Inhibin, den BMP's und der Müller'schen inhibitorischen Substanz in eine Familie eingeordnet.

Die drei Isoformen von TGF- β werden in fast allen Zellen gebildet, wobei zuerst ein biologisch inaktives Vorläufermolekül entsteht. Dieses Vorläufermolekül lagert an der Zelloberfläche der TGF- β sezernierenden Zellen, mit Verbindung zur extrazellulären Matrix. Die aktivierte TGF- β Isoform entspricht dem C-terminalen Ende des jeweiligen Vorläufermoleküls.

Die Mitglieder der TGF- β Familie haben auf eine Vielzahl verschiedener Zelltypen eine biologische Wirkung. So nehmen sie Einfluß auf Zellwachstum, Differenzierung, extrazelluläre Matrixproduktion und Apoptose. Physiologisch spielt das Zytokin vor allem in der Wundheilung und der Modulation des Immunsystems eine wichtige Rolle [14].

1.4 TGF- β -Signalweg

Die Wirkung von TGF- β auf die Zielzelle wird über Rezeptoren in der Zellmembran vermittelt, welche eine extrazelluläre Domäne zur Bindung des Liganden, eine transmembranäre und eine zytoplasmatische, Serin/Threonin-Kinase-tragende Domäne besitzen. TGF- β bindet zuerst an den Typ II Rezeptor, welcher dann durch seine Kinasedomäne den Typ I Rezeptor (in seiner GS-Domäne) phosphoryliert und somit aktiviert. Es entsteht vorübergehend ein Komplex aus Rezeptor I und II. Ohne den Typ II Rezeptor ist eine Bindung des Liganden an den Typ I Rezeptor offenbar nicht möglich [14].

1.4.1. Smad-Proteine

Eine Reihe von zytoplasmatischen Proteinen können jetzt mit den Rezeptoren in Interaktion treten. Als die wichtigste Gruppe ist hier die Familie der Smad-Proteine zu nennen.

Smads sind Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 42 kDa und 60 kDa. Charakteristisch für die Smad-Proteine ist das Vorhandensein von zwei homologen Domänen, jeweils am Amino- und Carboxy-Ende, welche als MH1 bzw. MH2 (*mad homology domains*) bezeichnet werden [14]. Nach ihren funktionellen Eigenschaften werden die Smads in drei Gruppen eingeteilt: Rezeptor-aktivierte „R-Smads“ (Smad1, Smad2, Smad 3, Smad5, Smad8), „Co-Smads“ (Smad4) und inhibitorische Smads „I-Smads“ (Smad6, Smad7) [83].

Aus der Gruppe der R-Smads sind für den TGF- β Signalweg vor allem Smad2 und Smad3 von Bedeutung. Die Aktivierung der R-Smads durch den Typ I Rezeptor erfolgt durch Phosphorylierung von zwei Serinresten am Carboxy-Ende. Smad2 und Smad3 bilden dafür, über ihre MH2 Domäne, einen Komplex mit dem Membran-assoziierten Protein SARA (*smad-anchor for receptor activation*), wodurch die Annäherung der R-Smads an die Kinase des Typ I Rezeptors vermittelt wird [83, 85]. Die phosphorylierten R-Smads (Smad2 und Smad3) oligomerisieren dann mit dem Co-Smad4 und der so entstandene Smad-Proteinkomplex geht in den Zellkern, um dort auf DNA-Ebene die Genexpression zu beeinflussen. Interessanterweise kann Smad4 nur im Komplex mit R-Smads in den Zellkern gelangen, wohingegen die R-Smads auch ohne Smad4 in den Nucleus translokieren können. Smad4 ist dennoch weniger als Transporter anzusehen, sondern eher an der Regulation der Genexpression beteiligt [83].

Smad3 und Smad4 können, im Gegensatz zu Smad2, im Zellkern über ihre MH1 Domäne selbstständig an spezifische DNA-Sequenzen binden und auf diese Weise die Transkription beeinflussen. Eine solche DNA-Sequenz wird auch als SBE (*smad-binding Element*) bezeichnet und beinhaltet ein 5'CAGAC'3 Motiv; auch *CAGA-box* genannt [83]. Die *CAGA-box* ist in den Promotoren verschiedener TGF- β -Zielgene lokalisiert. Es ist bekannt, daß eine Reihe von Transkriptionsfaktoren mit den TGF- β -aktivierten Smads an verschiedenen Promotoren interagieren. So, beispielsweise Smad3 mit c-Jun [20-22], ATF-2 [23], TFE3 [24-27], [28,29], LEF1/TCF [30] und dem Vitamin D3 Rezeptor [31]. Dies erklärt wie TGF- β die Transkription von

verschiedenen Zielgenen regulieren kann. Angesichts der komplexen Interaktionen der TGF- β -aktivierten Smads ist es deshalb gut nachvollziehbar, daß TGF- β über verschiedene Signalwege die Genexpression beeinflussen kann.

Die I-Smads (Smad6/7) antagonisieren den TGF- β Signalweg, indem sie die Phosphorylierung der R-Smads bzw. die Bindung an den Rezeptorkomplex verhindern [85]. So läßt sich durch Überexpression von Smad7 in der Zelle die TGF- β -Signaltransduktion über die Smad-Proteine blockieren und somit auch einige typische TGF- β -Effekte, wie z.B. Wachstumsinhibition [88] oder SBE-Aktivierung. Dabei wird die Transkription der I-Smads durch TGF- β selbst induziert, sodaß hier ein negativer *feedback*-Regulationsmechanismus vorliegt.

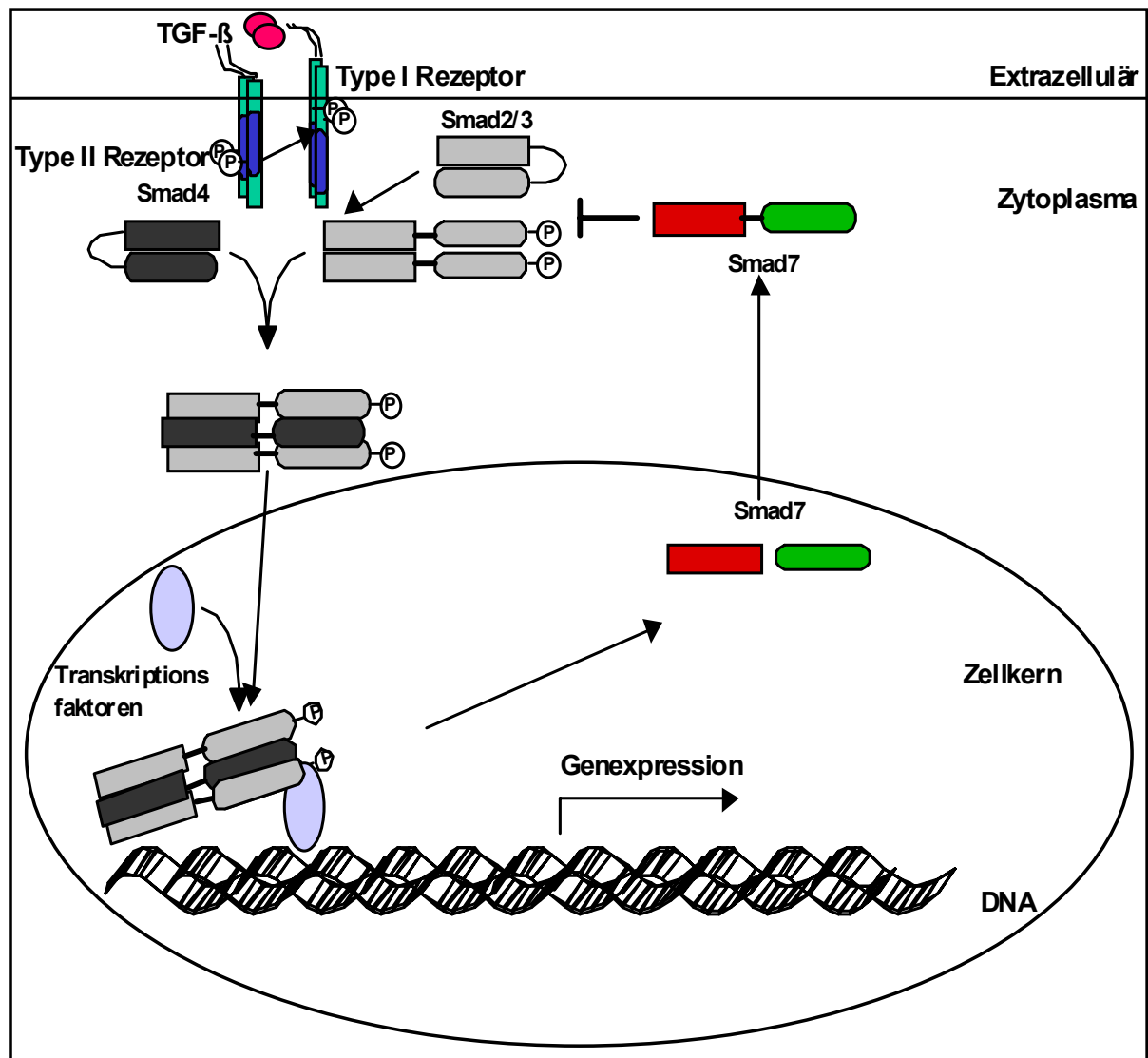


Abb. 2: Schematische Darstellung der TGF-β-Signaltransduktion in der Zelle.

1.5 Expression TGF- β -abhängiger Zielgene

TGF- β ist kein leberspezifisches Zytokin. Es kommt praktisch im ganzen Körper vor und gilt als multifunktionell.

Wir interessieren uns hier in erster Linie, für die Regulierung TGF- β -abhängiger Zielgene, welche in einem Zusammenhang mit der Fibrogenese der Leber stehen. Dabei rücken vor allem Komponenten der extrazellulären Matrix in den Vordergrund, wie Kollagen (Typ I, III, IV, VII), Fibronectin, Elastin und Aktin. Diese werden im Laufe der Fibrogenese von den durch TGF- β aktivierten HSC vermehrt gebildet. Insbesondere die gesteigerte Expression des Typ I Kollagens spielt für die Entstehung der Fibrose eine wichtige Rolle. Typ I Kollagen besteht aus zwei α 1-Ketten und einer α 2-Kette, diese Ketten werden von verschiedenen Genen codiert. Mögliche Unterschiede in der TGF- β -abhängigen Expression und Regulation dieser Gene sind für uns von besonderem Interesse.

TGF- β nimmt auch Einfluß auf die Expression von Faktoren, die eine Rolle bei der Degradation der extrazellulären Matrix spielen, wie PAI-1 (*plasmin activator inhibitor-1*) oder TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase-1*). PAI-1 ist ein Enzym, welches zur *Serinproteinase-Inhibitor*-Familie gehört. Es reguliert verschiedene Faktoren, wie uPA (*urokinase-type plasminogen activator*) oder TPA (*tissue plasminogen activator*), und führt so zu einer verminderten proteolytischen Aktivität [82].

TIMP-1 wirkt profibrotisch indem es verschiedene Matrix-Metalloproteinasen (MMP-1, MMP-2) inhibiert. Sowohl PAI-1 als auch TIMP-1 werden in aktivierten hepatischen Sternzellen vermehrt exprimiert. Weiter ist bekannt, daß TGF- β regulatorisch in den Zellzyklus eingreift. TGF- β -abhängige Änderungen hinsichtlich des Proliferationsverhaltens von HSC, im Zuge ihrer Aktivierung, sind deshalb ebenfalls Gegenstand der Untersuchungen.

2 Arbeitshypothesen

Obwohl es heute zunehmende Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen TGF- β , Aktivierung von hepatischen Sternzellen und Entstehung der Leberfibrose gibt, bleiben weiter wichtige Fragen unbeantwortet.

Dabei ist der intrazelluläre Signalweg von TGF- β hin zur Expression bestimmter Zielgene von besonderem Interesse. In den letzten Jahren ist es gelungen die TGF- β -Rezeptoren und die Smad-Proteine als deren intrazelluläre Mediatoren zu identifizieren.

Offen ist jedoch in wie weit dieser Signalweg für die verschiedenen TGF- β -Effekte generalisiert ist. TGF- β ist als Zytokin, welches in fast allen Körperzellen synthetisiert wird, in vielfältige physiologische Funktionen involviert. Deshalb ist es im Hinblick auf Therapieansätze wichtig, die Signalwege genau zu kennen, um entsprechend spezifisch z.B. die Fibrogenese blockieren zu können, ohne dabei in physiologische Abläufe wie die Wundheilung oder Immunmodulation einzugreifen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die TGF- β -Signaltransduktion in erster Linie anhand von zwei etablierten Zelllinien, CFSC und HSC-T6, untersucht. Beide Zellclone repräsentieren dabei aktivierte HSC. Sie exprimieren Desmin, *smooth muscle actin*, *glial acidic fibrillary protein*, und zeigen einen Phänotyp ähnlich dem von MFB. Die Zelllinie CFSC entstand aus spontan immortalisierten HSC, welche zuvor aus einer zirrhotischen Rattenleber isoliert wurden. HSC-T6 wurden durch Transfektion, mit dem „SV 40 large T antigen“, aus aktivierten HSC einer nicht zirrhotischen Rattenleber etabliert.

3 Material und Methoden

3.1. Zellen und Materialien in der Zellkultur

3.1.1 HSC-T6

Zur Herstellung dieser Zelllinie, wurden FSC (*fat storing cells*) aus einer normalen, nicht zirrhotischen Rattenleber isoliert. Diese Zellen sind dann 15 Tage nach Ausplattierung mit dem „SV 40 large T antigen“ transfiziert worden und es entwickelte sich der immortalisierte Zellklon HSC-T6.

Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. S. Friedman, Mount Sinai School of Medicine, New York, überlassen.

3.1.2 CFSC

Die Zelllinie stammt aus FSC, welche aus einer (durch CCl₄ induzierten) zirrhotischen Rattenleber isoliert wurden und nach Ausplattierung spontan immortalisierten.

Sie wurden freundlicherweise von Dr. M. Rojkind, Albert Einstein College of Medicine, New York, zur Verfügung gestellt.

Beide Zelllinien besitzen die Eigenschaften von aktivierten HSC bzw. Myofibroblasten und zeigen zudem einen stabilen Phänotyp.

HSC-T6 und CFSC zeigen auch über vielfache Passagen keine Veränderungen in Bezug auf:

1. Morphologie
2. Proliferationsrate
3. mRNA Expression von:
 - 3.1 Extrazellulären Matrix Komponenten
 - 3.2 Zytokinen

3.1.3 Verwendete Kulturmedien, Chemikalien, Zytokine, Gefäße

Kulturmedium

- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; GIBCO-BRL, Karlsruhe)
- + 2 mM L-Glutamin (ICN Biomedicals, Aurora, USA)
- + 100 units/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin-G (Sigma, Deisenhofen)
- + 10% FKS (Fötale Kälberserum, Boehringer, Ingelheim)

- HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*), ohne Kalzium/Magnesium (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich)
- Trypsin- EDTA, (GIBCO-BRL)

Zytokine

- TGF-β: humanes, rekombinantes TGF-β1, (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA)

Kulturgefäße im Zellkulturlabor

- Kulturflaschen (Greiner Labortechnik, Kremsmünster, Österreich)
- Petrischalen (10 cm²), (Greiner Labortechnik)
- 6/12-well-Microtiterplatten (Becton/Dickinson, www.bd.com)

3.1.4 Kultivierung und Passage von CFSC

CFSC werden entweder in Petrischalen oder Kulturflaschen bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Bevor die Monolayerkulturen konfluent zugewachsen sind, wird eine Passagierung vorgenommen, um die Zellen ständig im proliferierenden Zustand zu halten. Dies ist etwa alle 2-3 Tage notwendig. Die Zellen werden dann im Verhältnis 1:5 bis 1:6 aufgeteilt und mit 15 ml Kulturmedium pro 10 cm² Petrischale/Kulturflasche neu ausgesät.

Um die Zellen zu passagieren, geht man wie folgt vor: Das Medium der zu passagierenden Petrischale/Kulturflasche wird mit einer Pipette abgesaugt. Dann

wäscht man die Zellen 3 x mit 15 ml HBSS, um das restliche fötale Kälberserum abzuspülen, welches das Trypsin in seiner Wirkung inhibieren würde. Im nächsten Schritt werden 2 ml Trypsin/HBSS (37°C) zupipettiert. Die Zellen werden dann für 10-15 Minuten im Kulturschrank inkubiert. Trypsin ist eine Endopeptidase und spaltet Proteine der extrazellulären Matrix; auf diese Weise lösen sich die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes ab. Dies ist nach ca. 10-15 Minuten der Fall und ist mikroskopisch an der abgerundeten Form der Zellen zu erkennen. Die Trypsin/HBSS-Zellsuspension wird dann abpipettiert und in Kulturmedium (37°C) suspendiert. Die Zellen können nun neu ausplattiert werden. Vor Stimulationsversuchen ist jedoch eine Zellzahlbestimmung mittels einer Neubauer-Zählkammer erforderlich.

3.1.5 Kultivierung von HSC-T6

Die Kultivierung von HSC-T6 unterscheidet sich nicht wesentlich von der, der CFSC. Die Zelllinie HSC-T6 hat jedoch eine längere Kulturzeit, das bedeutet die Zellen sind erst ca. 5 Tage nach der letzten Passage annähernd konfluent zugewachsen, wobei dann eine Aufspaltung pro Petrischale von 1:30 möglich ist. Die Passagierung verläuft analog der von CFSC.

3.1.6 Stimulation mit TGF- β

Die in Kultur befindlichen Zellen werden abtrypsinisiert (3.1.4) und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dann werden je ca. 900.000 Zellen pro Petrischale (10 cm²) ausgesät, wobei zu jedem Stimulationsansatz eine Kontrolle mitgeführt wird. Nach etwa 36 Stunden sind die Zellen zu 70 bis 80% konfluent zugewachsen. Das Medium wird jetzt abgesaugt und jeweils 15 ml „Hungermedium“ (0,5% FKS) auf jede Petrischale zupipettiert. Die Zellen werden für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert und dann das Medium erneut abgesaugt. Es folgt die Stimulation mit 5 ng/ml TGF- β , wobei 5 ml Hungermedium je Petrischale hinzugegeben werden. Ein Ansatz TGF- β -stimulierter Zellen und die jeweils zugehörige Kontrolle (Zellen zu gleichen Bedingungen kultiviert aber nicht TGF- β -stimuliert) werden zu folgenden Zeitpunkten nach Stimulationsbeginn gestoppt:

0 Min., 30 Min., 60 Min., 90 Min., 4 Std., 8 Std., 12 Std., 24 Std., 48 Std., 72 Std..

Das Medium wird abgesaugt und die Zellen werden dreimal mit HBSS gespült. Zur RNA-Isolierung gibt man je 1 ml TRIzol (Gibco BRL), zur Proteinisolierung je 200 µl Lysis-Puffer (3.5.2) auf jede Petrischale. Die Zellen werden dann mittels eines Zellschabers akgekratzt und bis zur weiteren Bearbeitung bei –70°C weggefroren.

3.2 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgt mittels TRIZOL (Gibco BRL), einem Fertig-Reagenz zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe. Da es sich bei Trizol um ein phenolhaltiges Reagenz handelt, wird unter einem geeigneten Abzug gearbeitet. Die Zellen werden wie unter (1.1.6) beschrieben mit einem Zellschaber abgeerntet, nachdem zuvor 1 ml Trizol auf je eine 10 cm² Petrischale pipettiert worden ist. Im nächsten Schritt homogenisiert man die Zellen mittels eines Mixers, um so die Zellmembranen zu zerstören und die intrazelluläre RNA in die Suspension freizusetzen. 0,2 ml Chloroform werden zupipettiert, die Suspension wird kurz (15 Sek.) per Hand leicht geschüttelt und dann für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 12.000 x g (Biofuge15R, Heraeus) und 4 °C. Durch das hinzugefügte Chloroform, mit nachfolgender Zentrifugation, ist die Suspension in drei Phasen getrennt worden. In eine untere, organische, rotfarbige Phenol-Chloroformphase, eine Zwischenphase und in eine obere, wässrige Phase. Die RNA befindet sich ausschließlich in der oberen, wässrigen Phase, welche etwa 60% der eingesetzten Menge des Trizol-Reagenz ausmacht. Diese wird vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Präzipitation der RNA gibt man nun 0,5 ml Isopropyl-Alkohol hinzu. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Suspension für weitere 10 Min. bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Es entsteht ein RNA-Pellet auf dem Boden des Zentrifugenröhrchens. Die Suspension wird vorsichtig abgekippt und es folgt ein Waschschrift, indem das RNA-Pellet in 1 ml 75% Ethanol durch vortexen gelöst wird. Nach erneuter Zentrifugation für 5 Min. bei 7.500 x g und 4°C hat sich wieder ein RNA-Pellet gebildet. Nach Abkippen des Ethanols wird das RNA-Pellet in RNase-freiem A. dest. gelöst. Die RNA-Probe kann bei –70 °C eingefroren und aufbewahrt werden.

3.2.1 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration wird durch Extinktionsmessung mit einem Photometer bestimmt. Es wird je 1 µl Probe (Eluat) mit 49 µl RNase freiem A. dest. verdünnt, dann wird die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gegen den Leerwert gemessen. 1 OD 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die Ratio gibt die Reinheit der RNA an und errechnet sich aus dem Quotient der Extinktion 260 nm/280 nm. Saubere RNA hat eine Ratio von 1,7-2,0.

3.2.2 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Um die Intaktheit der Gesamt-RNA zu überprüfen, werden die RNA-Proben auf einem 1% igen Agarose-Formaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Ansetzen des Agarosegels:

0,6 g Agarose (SeaKem), werden in 6,0 ml 10x MOPS-Puffer und 54 ml H₂O suspendiert. Es folgt ein kurzes Aufkochen der Suspension in der Mikrowelle bis eine schlierenfreie Lösung entsteht. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C werden unter dem Abzug 10 ml Formaldehyd (37%) zupipettiert. Formaldehyd hält die RNA in denaturiertem Zustand und inaktiviert RNasen. Das Gel kann jetzt gegossen werden. Die Suspension wird dazu ca. 0,4 bis 0,5 cm hoch in eine nach oben offene Kassette gegossen, deren Boden eine Glasplatte bildet. Dann wird von oben eine Auftragsschablone angelegt, deren Zähne bis ca. 1mm über die Glasplatte reichen. Wenn das Gel erstarrt ist, entfernt man die Auftragsschablone zusammen mit den vier Seitenwände der Glasplatte. Das Gel, welches nun frei auf der Glasplatte liegt, wird jetzt in eine Flachbett-Elektrophoresekommer gesetzt und der Laufpuffer (1X MOPS) bis ca. 0,5 cm über die Geloberfläche hinzugegeben.

1,5 bis 3,5 µl der RNA-Probe werden mit 18,5 µl des Auftragspuffers (3.2.3) vermischt und dann für 10–15 Min., bei 55–65 °C im Wasserbad denaturiert. Bis zum Gelauftrag werden die Proben auf Eis gestellt.

Elektrophorese:

Die RNA-Proben werden in die Geltaschen pipettiert und eine Spannung von 80 – 120 V (5 – 10 V pro cm Gellänge) wird für 1 –2 Stunden angelegt. Die Proben laufen von der Kathode zur Anode. Durch den in dem Auftragspuffer enthaltenen Bromphenolblau-Farbstoff kann die Trennstrecke der Proben auf dem Gel abgelesen werden. Wenn die erwünschte Laufstrecke erreicht ist, wird das Gel auf einem UV-Transilluminator (254 nm) ausgewertet.

Bei intakter Gesamt-RNA erkennt man nun zwei Banden, die 18S- und 28S-Fraktion der ribosomalen RNA, wobei die 28S-Bande intensiver sein sollte.

3.2.3 Lauf-/Ladepuffer

Laufpuffer:

MOPS-SDS	20x konzentriert	
- MOPS	1,0 M	104,6 g
- Tris-Base	1,0 M	60,6 g
- SDS	69,3 mM	10,0 g
- EDTA	20,5 mM	3,0 g
- ad 500 ml Aqua dest		

Auftragspuffer:

2,0 µl 10x MOPS
1,0 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, 1:10 verdünnt)
10 µl Formamid deionisiert (bei –20 °C gelagert)
3,5 µl Formaldehyd (37 %)
2,0 µl Bromphenolblau-Ladepuffer

- Zusammensetzung:
 - 0,09 % Bromphenolblau
 - 0,09 % Xylene Cyanol
 - 60 % Glycerol
 - 60 mM EDTA

3.3 Northern-Blot

Für eine Northern-Blot-Analyse werden 15-20 µg RNA der zu untersuchenden Probe in einer Gelelektrophorese aufgetrennt.

Die Isolierung der RNA, sowie die Konzentrationsbestimmung und elektrophoretische Auftrennung erfolgen wie vorstehend beschrieben.

3.3.1 Blotten auf Nylonmembran

Das Northern-Gel wird für 2 x 5 Min. in 25 mM Phosphatpuffer (pH 6,5) inkubiert. Eine Wanne mit 25 mM Phosphatpuffer (pH 6,5) wird vorbereitet und mittels einer Glasplatte, welche auf der Wanne liegt, wird eine Brücke gebildet. Ein Streifen Whatman-Papier wird auf Gelbreite zurechtgeschnitten, in Phosphatpuffer getränkt und so auf die Glasplatte gelegt, daß Kontakt mit der Pufferwanne besteht. Jetzt kann das Gel auf dem Streifen Whatman-Papier positioniert werden. Um das Gel herum legt man 1 cm breite Parafilmstreifen und auf das Gel eine zurechtgeschnittene Nylonmembran. Zur Vervollständigung des Blottes werden auf die Nylonmembran noch 3 Streifen Whatman-Papier, sowie ein Satz Papiertücher gelegt und mit einem Gewicht von ca. 500 g beschwert. Es wird für mindestens 12 Stunden geblottet.

Nach Abbau des Blottes schwenkt man dann die Nicht-RNA-Seite der Nylonmembran für 1 Min. in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,2). Anschließend wird die Membran zwischen zwei Streifen Whatman-Papier kurz angetrocknet und mit der RNA-Seite nach oben im UV-Stratalinker durch *crosslinking* behandelt, um die RNA fest an die Nylonmembran zu binden.

3.3.2 Markierung der radioaktiven Sonde

Die Markierung erfolgt nach dem Protokoll von GIBRO BRL mit dem Random Primer Labeling Kit.

25 ng DNA werden in 18 µl Aqua dest. gelöst und anschließend im Wasserbad bei 100°C denaturiert.

Auf Eis wird dann der Nukleotid-Puffer-Mix zupipettiert; dieser besteht aus

2 µl dGTP

2 µl dTTP

2 µl dATP

15 µl Random Primer Puffer Mix

5 µl Aqua dest.

sowie im Isotopenlabor

5 µl [³²P]dCTP

1 µl Klenow-Enzym

Der Ansatz wird 1 Stunde bei 25°C inkubiert.

Anschließend wird die Markierungsreaktion durch Zugabe von 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) abgestoppt. Die nicht inkorporierten Nukleotide werden von der radioaktiv-markierten DNA-Probe mittels einer Aufreinigungssäule (Stratagene, www.stratagene.com) getrennt.

3.3.3 Prähybridisierung

Zuerst wird die geblottete Nylonmembran mit Aqua dest. angefeuchtet, dann mit der RNA-Seite nach innen in die Hybridisierungsröhre gelegt.

Es folgt die Zugabe einer auf 65 °C erwärmten Prähybridisierungslösung. Der Ansatz wird für mindestens 30 Min. im Hybridisierungssofen inkubiert.

3.3.4 Hybridisierung

Die radioaktive Sonde wird für 10 Min. im kochenden Wasserbad denaturiert und dann in die Hybridisierungsröhre gegeben.

Die Hybridisierung erfolgt für mind. 18 Std. bei 65 °C.

3.3.5 Waschen der Nylonmembran

Nach dem Abschütten der radioaktiven Sonde folgen drei Waschschritte.

1. 50 ml 250 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) + 2,5 ml 20% SDS für 15 Min. bei 65 °C
2. 50 ml 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) + 2,5 ml 20% SDS für 15 Min. bei 65 °C
3. 50 ml 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) + 2,5 ml 20% SDS für 15 Min. bei 65 °C

Die Nylonmembran wird dann aus der Hybridisierungsröhre genommen, kurz in Aqua dest. geschwenkt und in Plastikfolie eingeschweißt.

3.3.6 Belichtung und Entwicklung des Filmes

Die Membran wird in eine Belichtungskassette geklebt, ein Röntgenfilm aufgelegt und bis zur Entwicklung des Filmes bei –80 °C inkubiert.

3.3.7 Materialien

DNA Primer siehe 3.4.4

DNA Labeling System (GIBCO-BRL)

Klenow Fragment (GIBCO-BRL)

$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham/Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Gene Screen-Hybridisierungs-Lsg. (100 ml)

- 500 mM Phosphatpuffer (pH 7,2)	100 ml
- 7 % SDS	7 g
- 1 mM EDTA	0,037g

3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine hochempfindliche *in vitro* Methode zum Nachweis kleiner Mengen bestimmter Nucleinsäureabschnitte. Dabei findet mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase eine zyklische DNA-Neusynthese des zu untersuchenden DNA-Segmentes statt. Es werden zwei Primeroligonukleotide (*forward* und *reverse*) verwendet, welche die zu untersuchende DNA-Sequenz flankieren. Desweiteren bedarf es der vier Desoxyribonucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Reaktionsschritten:

1. Denaturierung der DNA durch Erhitzen auf Temperaturen $>90^{\circ}\text{C}$ ($90-99^{\circ}\text{C}$), (Denaturierung)
2. Anlagerung der Primer an die DNA durch Absenken der Temperatur ($40-68^{\circ}\text{C}$), (*annealing*)
3. Elongation des Komplementärstranges ($60-72^{\circ}\text{C}$), (Extension)

Durch jeden Zyklus kommt es zu einer Verdopplung der DNA-Fragmente und somit zu einer annähernd exponentiellen Zunahme der von den Primern flankierten DNA-Sequenz. Die Anzahl der Zyklen kann vorher festgelegt werden und liegt in der Regel zwischen 20 und 40.

3.4.1 Real-time PCR (*Real-time polymerase-chain-reaction*)

Für die in dieser Arbeit zu untersuchenden DNA-Segmente ist nicht nur deren Nachweis erforderlich, sondern auch eine Quantifizierung in den verschiedenen Proben. Eine solche Quantifizierung ist mit einer normalen PCR jedoch nur möglich, solange die PCR Reaktion sich im linearen Bereich der Amplifikationseffizienz befindet. Dies ist bei einer normalen PCR schwer zu überprüfen. Man müsste praktisch nach jedem Zyklus ein Aliquot aus der Reaktion entnehmen und auf ein Gel auftragen. Eine solche Überprüfung entfällt bei dem hier benutzten Light Cycler

System (Roche), welches die Amplifikation des PCR Produktes nach jedem Zyklus auf einem Monitor (*real-time*) anzeigt.

Dabei erfolgt die Detektion durch Fluoreszenzmessung, welche in Intervallen durchgeführt wird. Die eingesetzten Glaskapillaren, in denen sich die Proben befinden, dienen hierbei als Küvetten.

Dabei wird folgendes Meßprinzip angewendet:

Die spezifische Detektion von PCR-Produkten wird durch Verwendung von Hybridisierungsproben ermöglicht; unspezifische Produkte und Primerdimere werden nicht detektiert.

Zu einem Standard-PCR-Ansatz werden zusätzlich zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Hybridisierungsproben) zugefügt, welche zwischen den beiden Primern in räumlicher Nähe zueinander (1-5 Nukleotide Abstand) an die Ziel-DNA binden. Diese Hybridisierungsproben sind mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (z. B. Fluorescein, LC Red 640).

Die Detektion basiert auf dem FRET-Prinzip ("*fluorescence resonance energy transfer*"). Binden die beiden Hybridisierungsproben an der gesuchten Ziel-DNA in räumlicher Nähe und regt man gleichzeitig das Fluorescein der ersten Hybridisierungsprobe an, emittiert dieses keine Fluoreszenz, sondern überträgt die Energie auf den benachbarten zweiten Fluoreszenzfarbstoff (LC Red 640). Dieser emittiert nun rote Fluoreszenz, deren Intensität in Summe direkt proportional der Menge an Ziel-DNA ist. Die Messung des Signals erfolgt einmal pro Zyklus nach dem *Primer-annealing* (zu diesem Zeitpunkt sind beide Hybridisierungsproben an die Ziel-DNA gebunden und es erfolgt ein Energietransfer). Ungebundene Hybridisierungsproben geben aufgrund der fehlenden räumlichen Nähe (diffundieren frei in der Lösung) kein Signal. Dieses System erlaubt, den Verlauf der PCR ohne Zeitverzögerung *online* am Rechner zu verfolgen. Die zyklischen Temperatureinstellungen werden durch Aufheizen bzw. Abkühlen von Luft erreicht. Durch den Einsatz von Luft für eine schnelle Temperaturregulierung und das Verwenden von Glaskapillaren mit einem hohen Oberflächen/Volumen-Quotienten wird die Dauer für einen PCR-Zyklus auf unter 30 Sek. reduziert.

3.4.2 Umschreiben der RNA in cDNA

Durch eine Reverse Transkriptase (Qiagen, Hilden) wird die in der Gesamt-RNA enthaltene mRNA in cDNA umgeschrieben. Bei den folgenden Arbeiten werden alle Reagenzien und RNA-Proben auf Eis gesetzt, um Degradation zu verhindern.

Es wird 1 µg je RNA-Probe zusammen mit 2 µg Oligo-dT Primer (Roche) in ein 0,5ml Eppendorfgefäß pipettiert und mit RNase-freiem H₂O auf ein Volumen von 14 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wird dann zur Denaturierung der RNA für 10 Min. bei 70°C im Thermocycler (Biometra, Göttingen) inkubiert. Anschließend werden die Proben kurz zentrifugiert.

Auf Eis wird folgender Reaktionsmix angesetzt und zu jeder RNA-Probe zupipettiert:

dNTP Mix	10 mM	2,0 µl
RNase Inhibitor (10 units / µl)		1,0 µl
Reverse Transkriptase		1,0 µl
<u>10x Puffer RT</u>		2,0 µl
- Zusammensetzung:		
	250 µl 1 M Tris×Cl, pH 8.2	
	250 µl 1 M KCl	
	30 µl 1 M MgCl ₂	
	470 µl H ₂ O	

Es entsteht ein Gesamtvolumen von jeweils 20 µl je RNA-Probe, welches nochmals gut gemischt und für 20 Sek. zentrifugiert wird. Es folgt eine weitere Inkubation der Proben im Thermocycler. Ein geeignetes Programm durchläuft drei Phasen:

- | | | |
|------------------------|------|---------|
| 1. Hybridisierung | 25°C | 10 Min. |
| 2. Synthese der cDNA | 42°C | 60 Min. |
| 3. Enzym-Denaturierung | 95°C | 5 Min. |

Die cDNA kann sofort für die PCR eingesetzt oder bei -70°C eingefroren werden.

3.4.3 Versuchsdurchführung RT-PCR

Von jeder zu untersuchenden cDNA-Probe werden genau 2 µl (entspricht 100 ng Gesamt-RNA) abpipettiert und mit 8 µl RNase-freiem Aqua dest. verdünnt, sodaß ein Probenansatz von 10 µl entsteht. Für jede cDNA-Probe wird eine dreifache Bestimmung durchgeführt. Als Referenz wird hier ein externer Standard mit einer Konzentration von 50 µg/µl cDNA verwendet.

Der Standard wird in Doppel-Bestimmung in folgenden Verdünnungen eingesetzt:

- 1 : 1 verdünnt mit RNase freiem Wasser
- 1 : 2,5 verdünnt mit RNase freiem Wasser
- 1 : 5 verdünnt mit RNase freiem Wasser
- 1 : 10 verdünnt mit RNase freiem Wasser

Pipettierschema für den Primer-Mix:

LC-DNA	2	µl
MgCl ₂	2,4	µl
Hybridisierungsprobe x	2,5	µl
Hybridisierungsprobe Lc	2,5	µl
Primer <i>rev</i>	20	pmol
Primer <i>for</i>	20	pmol
RNase freies H ₂ O	add 17	µl

Es entsteht ein Primer-Mix von 17 µl pro Probe, welcher in entsprechender Menge (3 x je Probe, 2 x je Standard, 1 x Leerwert) angesetzt wird.

Dann werden zuerst 17 µl Primer-Mix und danach 3 µl Probenansatz/Kontrolle in eine nur nach oben offene Light Cycler-Kapillare (3.4.3) pipettiert. Die Kapillaren werden mit Plastikkappen verschlossen und für 30 Sek. zentrifugiert, sodaß sich der Primer/Probenansatz im unteren Teil der Kapillare befindet. Dann werden diese in ein Karussell eingelegt, welches Platz für 32 Kapillaren bietet. Die RT-PCR wird mittels des Light Cycler-Systems der Firma Roche durchgeführt.

3.4.4 Materialien

cDNA Synthesis Kit, (Roche, Mannheim)

LightCycler™ Capillaries, Roche

LightCycler™ , Roche

Primer:

Ratte Col1A2: 422 bp Fragment

Ratte Col 1A2 *for*: 5'-AACAGGACTTCTTCGGAACCAC-3';

Ratte Col 1A2 *rev*: 5'-CATTTGCACCACTTGTGGCTTC-3';

Hybridisierungsproben: 5'-LC 640-GGGAGGAACGAAAATGAGGCTGG CAAAGA;

5'- ACGAATGCTGAATCTAGAGAGGAGAGAATCTGGG-X; X = Fluoreszein

Ratte Smad7: 117 bp Fragment

Ratte Smad7 *for*: 5'GGAGTCCTTTCCTCTCTC-3';

Ratte Smad7 *rev*: 5'-GGCTCAATGAGCATGCTCAC-3';

Hybridisierungsproben: 5'-LC 640-AACCTGTTGTAT TGCAGATTTGGGACTTGCTG-Ph; 5'-AAGCACTACGATGCTAAATTTCCG ATGAG-X; X = Fluoreszein

3.5 Protein-Isolierung

Die Zellen, aus denen Proteine isoliert werden sollen, werden wie unter (3.1.6) beschrieben mit HBSS gewaschen. Anschließend gibt man 200 µl Lysis-Puffer + Proteinase-Inhibitor auf jede 10 cm² Petrischale. Die Zellen werden dann mittels eines Zellschabers isoliert und die Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß überführt. Um die intrazellulären Proteine in Suspension zu bringen, ist es notwendig die Zellmembranen zu zerstören. Dies geschieht mechanisch, indem die Zellsuspension mittels einer Insulinspritze und einer 25G Kanüle 5 bis 6 mal aufgezogen wird. Das homogenisierte Zelllysate wird für mindestens 120 Min. auf Eis gestellt, dann wird 15 Min. bei 15.000 x g und 4°C zentrifugiert (Biofuge15R, Heraeus). Zellreste wie Membranen, Zytoskelett, RNA, DNA, ect. bilden auf dem Boden des Eppendorfgefäßes ein Pellet, während die Proteine sich in dem klaren Lysis-Puffer

über dem Pellet befinden. Dieser wird in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Das Proteinlysate wird aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren.

3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wird mittels des DC Protein-Tests (Bio-Rad, München) ermittelt; gemessen wird dabei eine von der Proteinkonzentration abhängige Farbentwicklung. Das System basiert auf einer Reaktion der Proteine mit einer alkalischen Kupfer-tartrat-Lösung (Reagenz A, 3.5.2) und dem Folin-Reagenz (Reagenz B, 3.5.2). Die Farbentwicklung vollzieht sich in zwei Schritten: Die Umsetzung erfolgt zwischen Protein und Kupfer in einem alkalischen Medium und die Reduktion des Folin-Reagenzes durch kupfergebundenes Protein. Dabei wird umso mehr Folin-Reagenz reduziert und somit Farbstoff produziert, je mehr Protein in der Probe enthalten ist. Die Messung des Farbsignals erfolgt photometrisch bei 690 nm Wellenlänge.

Durchführung

Zuerst werden je 20 µl Reagenz S (3.5.2) mit 1 ml Reagenz A versetzt. Es entsteht das Arbeitsreagenz A'.

Es wird ein Proteinstandard von 3 µg/µl verwendet; dieser wird in folgenden Verdünnungen eingesetzt:

1 : 1

1 : 2,5

1 : 5

Für die Proben, Standards und den Leerwert wird jeweils eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Als Leerwert wird der Reporter-Lysis-Puffer+Proteinaseinhibitor verwendet.

Dann werden je 5 µl Probe/Standard/Leerwert in die Fächer einer Mikrotiterplatte (3.5.2) pipettiert, danach je 25 µl Arbeitsreagenz A' und je 200 µl Reagenz B hinzugegeben. Es wird für 15 Min. unter leichtem Schütteln inkubiert.

Nach 15 Min. kann die Absorption bei 690 nm gemessen werden. Anhand der Proteinstandards wird eine Standardkurve erstellt, mit der die Konzentration jeder Probe abgelesen werden kann.

3.5.2 Material

Reporter-Lysis-Puffer 5x (Promega)

50 x Protease-Inhibitor-Cocktail:

- eine Tablette Complete™ (Roche) in 1ml Aqua dest. lösen.

Proteinstandard

Protein-Test-Standard II, Bio-Rad, (Rinder-Serum-Albumin), in 10 ml H₂O gelöst, ergibt eine Proteinkonzentration von 3 µg/µl.

DC Protein-Test, Bio-Rad, bestehend aus:

- Reagenz A, 250 ml
- Reagenz B, 1000 ml
- Reagenz S, 5 ml

Microtiter®-Platten, Greiner Labortechnik

3.6 Western-Blot-Analyse

Der Western-Blot dient dem Nachweis spezifischer Proteine aus einem komplexen Proteingemisch. Die Proteine werden in einem Gelträger im elektrischen Feld ihrer Größe entsprechend aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und somit immobilisiert. Der Nachweis des Proteins erfolgt durch einen spezifischen ersten Antikörper. Der proteingebundene erste Antikörper wird dann durch einen zweiten Antikörper detektiert, welcher radioaktiv markiert oder an ein Enzym (Peroxidase) gekoppelt ist.

3.6.1 Gelelektrophorese

Mit Hilfe einer Gelelektrophorese werden die Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Die Protein-Proben werden dafür mit einem Probenpuffer versetzt und mit H₂O, je nach verwendetem Gel, auf ein Volumen von 20 µl (NuPage 4-12%, Bis-Tris Gel) bzw. 30 µl (4-12%, Tris-Glycine Gel) angesetzt. Dieser Ansatz wird zur Denaturierung der Proben für 5 Min. bei 95°C inkubiert, nachfolgend 5 Min. zentrifugiert und bis zum Auftragen in die Geltaschen auf Eis gestellt. Das Gel wird in eine Novex-Mini-Cell-Elektrophoresekammer eingesetzt; zuvor wird der Taschenkamm gezogen und die Taschen 3 mal mit dem Laufpuffer gewaschen. Dann füllt man den Laufpuffer in die Elektrophoresekammer. Das Gel sollte ca. 0,5 cm überschichtet sein. Anschließend werden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Bei jedem Gel wird ein Benchmark-Proteinstandard mit aufgetragen. Der Benchmark-Proteinstandard besteht aus 10 Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 10 und 200 kDa. Dabei sind die Proteine jeweils mit einem blauen bzw. pinken Farbstoff gekoppelt. So können später mögliche Banden einem Molekulargewicht zugeordnet werden. Die Elektrophorese kann gestartet werden. Laufpuffer, Höhe der angelegten Spannung und somit die Elektrophoresedauer richten sich nach dem verwendeten Gel. Anhand des mitgeführten Benchmark-Proteinstandards kann die Auftrennung verfolgt werden.

3.6.2 Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membran

Nach der Auftrennung der Proteine durch die Gelelektrophorese erfolgt die Übertragung auf eine Nitrocellulose-Membran durch elektrophoretisches Blotten. Schon während der Gelelektrophorese wird die Nitrocellulose-Membran für 5 Min. in 30% Methanol inkubiert und anschließend für mindestens 5 Min. in Towbin-Transferpuffer äquilibriert. Das Gel wird nach dem Ende der Elektrophorese ebenfalls für 5 Min. in Towbin-Transferpuffer gelegt und somit gewaschen. Es werden drei Filterpapiere (Whatman, 0,75 mm dick) auf Gelgröße zurechtgeschnitten, in Transferpuffer getränkt und aufeinander gelegt. Darauf plziert man dann das Gel und auf dem Gel wiederum die Nitrocellulose-Membran. Der Blotaufbau wird vervollständigt, indem wieder drei Filterpapiere (Whatman) in Transferpuffer getränkt

und oben auf die Nitrocellulose-Membran gelegt werden. Die Übertragung findet mittels eines vertikalen Puffertanks statt. Der Blotaufbau wird mit der Gelseite zur Kathode und der Membranseite zur Anode in einer Blotting-Kassette in den Puffertank eingelegt. Der Puffertank befindet sich bei 4°C im Kühlraum. Es wird 120 Min. bei 100 V geblottet.

3.6.3 Proteinnachweis durch Antikörper

Nach dem Blotten wird die Nitrocellulose-Membran aus der Blotting-Kassette genommen, in eine geeignete Schale gelegt und für 5 Min. in TBST (3.6.5) gewaschen. Die Schale steht dabei, wie auch bei den folgenden Schritten, auf einer Wippe und wird mit einer Frequenz von 30 x pro Minute geschwenkt. Dann inkubiert man die Membran für eine Stunde in 5% Milchpulver/TBST (3.6.5). Auf diese Weise werden die freien Bindungsstellen an der Nitrozellulose-Membran blockiert und eine unspezifische Bindung des zur Detektion verwendeten Antikörpers verhindert. Es folgt eine zweistündige Inkubation mit dem ersten proteinspezifischen Antikörper in einer Verdünnung 1 : 2000 in 5% Milchpulver/TBST. Danach wird die Membran 2 x mit TBST und 3 x mit TBS für je 5 Min. gewaschen und mit dem zweiten Peroxidasegekoppelten Antikörper für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgt ein erneutes Waschen der Membran mit 2 x TBST und 3 x mit TBS.

3.6.4 Detektion durch Lumineszenz

Luminol/Enhancer-Lösung und Peroxid-Lösung (3.6.5) werden zu gleichen Teilen miteinander versetzt und auf die Proteinseite der NC-Membran pipettiert, sodaß diese vollständig mit Lösung bedeckt ist. Nach einer Inkubationszeit von 5 Min. läßt man die Membran abtropfen und legt sie in eine Plastikfolie. Die Lumineszenz wird am Lumino Imager (Roche) gemessen. Die Expositionszeit liegt in der Regel zwischen 1 bis 10 Min., abhängig von der Intensität der Signale.

3.6.5 Material

Transfermembran

Nitrocellulose-Membran, 0,45 µm, (Schleicher & Schüll, Dassel)

Antikörper, Reagenzien

Anti-Flag® M2 Monoclonaler-Antikörper, (Sigma, Deisenhofen)

Anti-Smad2 (Kaninchen), Polyclonal, (Zymed® Laboratories, San Francisco, USA)

Anti-PAI-1 Antikörper (C20; Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg)

Anti-TβRI Antikörper (V22, Santa Cruz Biotechnology Inc.)

Anti Smad7 Antikörper (N19, Santa Cruz Biotechnology Inc.)

Anti Smad2/3 Antikörper (Santa Cruz Biotechnology Inc.)

Anti Ziege Peroxidase-gekoppelter Antikörper (Santa Cruz Biotechnology Inc.)

Anti Kaninchen Peroxidase-gekoppelter Antikörper (Santa Cruz Biotechnology Inc.)

Anti Maus Peroxidase-gekoppelter Antikörper (Santa Cruz Biotechnology Inc.)

SuperSignal® West Dura *Luminol/Enhancer Solution* (Pierce; Bonn)

SuperSignal® West Dura *Stable Peroxide Solution* (Pierce)

Trenngele und Lauf-/Probenpuffer:

NuPage™4-12% Bis-Tris Gel, 1,0mm x 10 well (Novex™; www.novex.com)

Probenpuffer: *NuPAGE™ LDS Sample Buffer* (4x) (Novex™)

Laufpuffer: *MOPS SDS Running Buffer* (20x) (Novex™)

4-12% Tris-Glycine Gel, 1,5mm x 10well (Novex™)

Probenpuffer: *LDS Sample Buffer* (6x) (Novex™)

Laufpuffer: Tris-Glycine-SDS Puffer 10x

TBS:

- 10 mM Tris pH 8,0
- 150 mM NaCl

TBST:

- 10 mM Tris pH 8,0
- 150 mM NaCl
- 0,05% Tween 20

Transferpuffer nach Towbin

- Tris 25 mM
- Glycine 192 m
- Methanol 20 %
- pH 8,3
- 3,03 g Tris und 14,4 g Glycine in 500 ml Aqua dest. lösen, 200 ml Methanol hinzugeben und auf 1 l Aqua dest. auffüllen

3.7 Transfektion von Zellen

Bei der Transfektion handelt es sich um eine Methode zur Einschleusung heterologer DNA in eine Zielzelle.

Es wird zwischen einer transienten und stabilen Transfektion unterschieden. In beiden Fällen wird die DNA in den Zellkern übertragen, wobei sie bei der transienten Transfektion aber nicht in die Chromosomen der Zielzelle eingebaut wird, wie dies bei der stabilen Transfektion der Fall ist. In den hier durchgeführten Experimenten wurde ausschließlich mit der transienten Transfektion gearbeitet.

3.7.1 Adenovirale Konstrukte

Die adenoviralen Konstrukte für Smad7, DNSmad3 und DNSmad4 sowie den konstitutiv aktiven TGF- β Rezeptor I wurden freundlicherweise von A. Moustakas, Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Schweden, zur Verfügung gestellt. Materialien und Techniken zur Herstellung der adenoviralen Konstrukte sind in [9; 10] beschrieben. Unter optimalen Bedingungen wird eine Infektion von nahezu 100% der Zellen erreicht.

Um einen ausreichend großen Arbeitsstock von Adenoviren zu erhalten, erfolgt zuerst eine Amplifikation der fertigen Viren in HEK 293 Zellen. Dafür werden ca. 1.000.000 HEK 293 Zellen in kollagenbeschichteten Kulturschalen ausgesät und in 10% FKS Komplettmedium kultiviert. Nach 24 Stunden sind die Zellen 50-60% konfluent und es erfolgt ein Mediumwechsel auf 5% FKS Medium, wobei die Menge des Kulturmediums entscheidend für den späteren Virustiter ist. Je weniger Medium eingesetzt wird, desto höher wird der Virustiter. In diesem Fall verwendet man 5 ml pro Kulturschale. Eine Stunde später erfolgt die Infektion mit dem jeweiligen Virusstock. In den folgenden 2-3 Tagen kommt es zu einer zunehmenden Ablösung der Zellen von den kollagenbeschichteten Kulturschalen. Dies geschieht, da die Adenoviren die Zellen über einen Integrinrezeptor infizieren, an den auch das Typ I Kollagen bindet. Mit zunehmender Infektionsrate wird dieser Rezeptor internalisiert und somit die Anheftung der Zellen an die Kollagenbeschichtung gelöst. Sind alle Zellen komplett abgelöst, wird das Medium mit den Zellen in sterile Eppendorfgefäße

aliquotiert. Um die Zellmembranen zu zerstören und so die intrazellulär-befindlichen Viren in Suspension zu bringen, werden die Aliquots 5x hintereinander in flüssigem Stickstoff gefroren und sogleich im 37°C Wasserbad aufgetaut.

Darauf wird für 10 Minuten bei 5.000 UpM zentrifugiert, der virale Überstand abpipettiert, erneut aliquotiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

3.7.2 Transfektion von CFSC und HSC-T6

Die Transfektion/Infektion der etablierten Zelllinien mit den verschiedenen Konstrukten erfolgt stets nach der gleichen Vorgehensweise.

200.000 Zellen werden in 6-*well*-Mikrotiterplatten ausgesät und in Komplettmedium kultiviert. Nach 18 Stunden sind die Zellen am Boden der Mikrotiterplatte angewachsen.

Adenovirale Infektion:

Nach dem Absaugen des Mediums erfolgt die Infektion der Zellen. Dabei wird jeweils eine M.O.I. (*multiplicity of infection*) von 50 gewählt.

Transfektion mit dem FuGene System

Die Transfektion mit Plasmid-DNA erfolgt mit dem FuGene6-System nach Gebrauchsprotokoll (Roche Diagnostic, Co.).

Verschiedene Promotor/Reportergen-Konstrukte werden eingesetzt, um ihre TGF- β -abhängige Regulierung zu untersuchen. Das murine COL1A1 Konstrukt pColCAT2 ist ausführlich in [46] beschrieben. Das PAI-1 Promotor-Konstrukt p3TPlux wurde freundlicherweise von Dr. J. Massagué, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, bereitgestellt. Der (Ratte) Smad7 Promotor wurde in unserem Labor von Stopa et al. [27] kloniert.

Nach der Infektion/Transfektion werden die Zellen für 2 Tage in Komplettmedium belassen, dann für 8 Stunden auf 0,5% FKS-Medium gesetzt und mit 5 ng/ml TGF- β stimuliert. Nach weiteren 14 Stunden Kultivierung in 0,5% FKS-Medium werden die Zellen wie unter (3.1.6) beschrieben geerntet.

3.7.3 Reporter-Tests

Um die Genexpression bzw. Promotoraktivität zu messen, wird die zu untersuchende Sequenz mit einem Reporter-Gen gekoppelt. Die von diesem Konstrukt gebildeten Reporterproteine regeln dann geeignete Substratmoleküle enzymatisch zur Lumineszenz an. Die Stärke der Lichtintensität wird in einem Luminometer gemessen und lässt Rückschlüsse auf die Promotor-Aktivität der untersuchten Sequenz zu. Die gemessene Aktivität muß gegen die Transfektionseffizienz relativiert werden, dazu erfolgt eine Cotransfektion mit Renilla Luciferase (pRLCMV, Promega).

3.7.3.1 Luciferase-Test

Die aus Glühwürmchen gewonnene Luciferase besitzt den Vorteil einer praktisch nicht vorhandenen Hintergrundaktivität, da die meisten Spezies keine Luciferase besitzen. Desweiteren besteht ein bis zu acht Größenordnungen linear bleibender Meßbereich.

Protokoll (Luciferase-Test-System, Promega; www.promega.com)

1. Zellen isolieren mittels 1x Reporter Lysis Puffer (400 µl/60 mm Kulturschale)
2. 15 Sek. vortexen und 2 Min. bei 15.000 x g, 4°C zentrifugieren
3. 20 µl Zelleextrakt mit 100 µl Luciferase-Test-Reagenz mischen
4. Lumineszenzmessung, 1 Sek. mittels 1450 Microbeta Wallac Jet

3.8 TGF- β -abhängige Wachstumsinhibition

5.000 Zellen CFSC bzw. 2.500 Zellen HSC-T6 werden zur Dreifach-Bestimmung in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 16 Stunden Kultivierung in Komplettmedium erfolgt ein erster Mediumwechsel. Die Zellen werden für weitere 8 Stunden in DMEM/ 10% FKS belassen und dann für 16 Stunden in DMEM/ 0,5% FKS kultiviert. Das Medium wird abgesaugt und TGF- β , in 0,1% BSA/DMEM, wird in folgenden Konzentrationen zupipettiert: 5000, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1.0 pg/ml. Nach 1 Stunde wird nochmals Medium hinzugegeben, sodaß eine Konzentration von 0,5% FKS vorliegt. Nach weiteren 8 Stunden Inkubation folgt die Zugabe von BrdU (Brom-desoxy-uridin) in einer Konzentration von 5×10^{-5} M. Nach Gebrauchsprotokoll (*5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit; Roche Diagnostics*) werden die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, 1 Stunde mit dem Antikörper inkubiert und mit PBS gewaschen. 100 μ l/well Substrat werden zupipettiert, die Reaktion mit 1N H₂SO₄ gestoppt und die BrdU-Inkorporation mittels ELISA bei 450nm gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 TGF- β -abhängige Smad2-Phosphorylierung

TGF- β vermittelt seine Signalwirkung auf eine bestimmte Zielzelle durch Bindung an Membranrezeptoren.

Nach der Bindung an den TGF- β -Rezeptor Typ II, folgt die Phosphorylierung und somit Aktivierung des Rezeptor Typ I. Dieser wiederum phosphoryliert Smad2 an einem SSVS Motiv am Carboxy-terminalen Ende und überführt das Smad2-Protein somit in die aktivierte Form. Während primäre, ruhende HSC noch stark auf TGF- β -Stimulation reagieren, werden sie im Laufe der Aktivierung zu Myofibroblasten TGF- β -insensitiv [38]. In der vorliegenden Arbeit wird die TGF- β -Signaltransduktion in zwei permanenten Zelllinien untersucht und mit primären HSC verglichen. Diese Zelllinien zeigen viele Eigenschaften von aktivierten HSC.

CFSC und HSC-T6 Zellkulturen, welche unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden, wurden für verschiedene Zeitintervalle mit TGF- β stimuliert, um ihre Responsivität auf TGF- β zu untersuchen. Es sollte gezeigt werden, ob und wann die Phosphorylierung von Smad2 einsetzt, wie lange sie andauert und ob es Unterschiede in der Zeitkinetik zwischen den Zelllinien gibt.

Hierzu sind Protein-Lysate aus CFSC, HSC-T6, MFB und primären HSC isoliert worden. Diese wurden mittels Westernblot mit Primärantikörpern gegen phosphoryliertes-Smad2 analysiert.

In CFSC, HSC-T6 und primären HSC wird Smad2 transient durch TGF- β -Behandlung phosphoryliert. Die Smad2-Aktivierung hält bis etwa 90 Minuten nach Stimulationsbeginn an. Transdifferenzierte MFB sind wie erwartet nicht mehr TGF- β -sensitiv und Smad2 wird entsprechend nicht phosphoryliert.

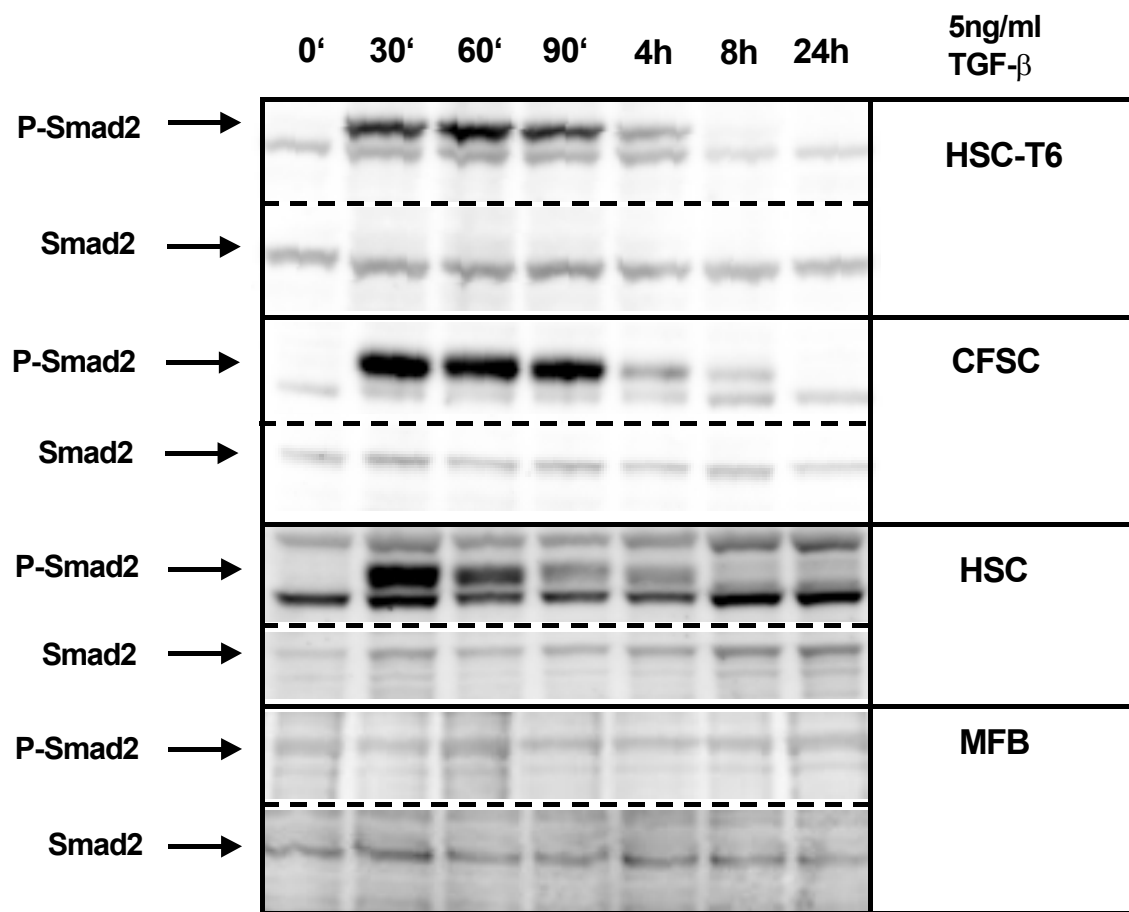


Abb. 1: TGF- β -vermittelte Smad2-Phosphorylierung in primär kultivierten HSC, transdifferenzierten MFB, CFSC und HSC-T6.

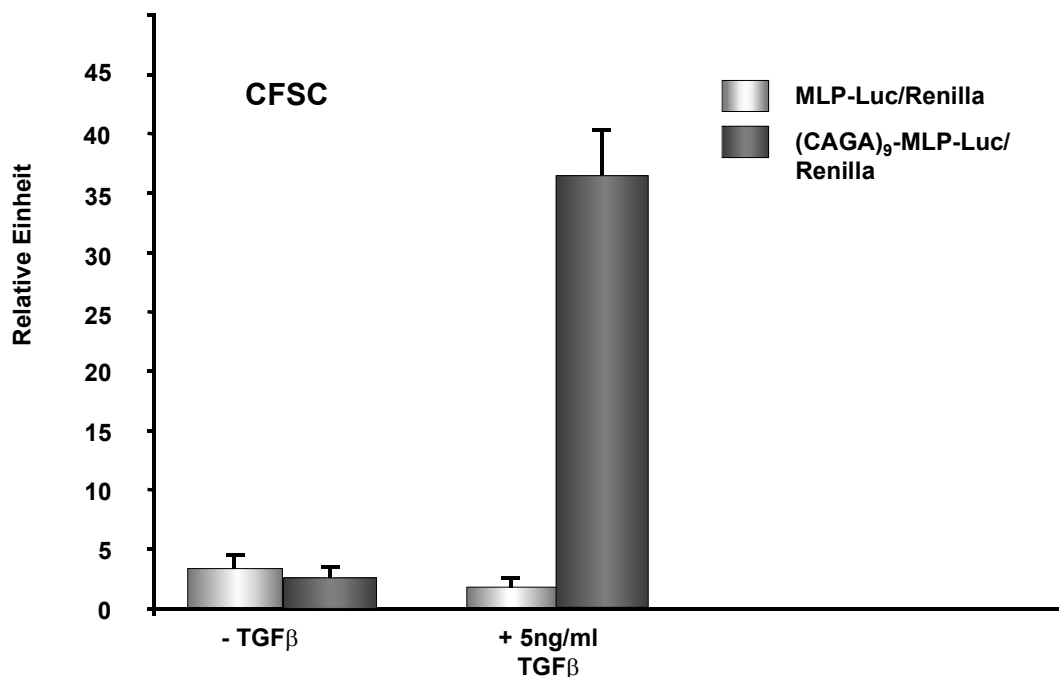
Monolayerkulturen (70-80 % konfluent) wurden für 8 Stunden in Kulturmedium mit 0,5% FKS belassen, anschließend mit 5 ng/ml TGF- β stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt. 40 μ g Proteinlysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und im Western-Blot-Verfahren mit Primärantikörpern gegen P-Smad2 untersucht.

4.2 (CAGA)₉-MLP-Luc Regulation in Abhängigkeit von TGF- β

Die auch als SBE (*smad binding element*) bezeichnete CAGA-Box ist eine DNA-Sequenz, welche in der Promotorregion verschiedener TGF- β -Zielgene vorkommt. Im folgenden sind CFSC und HSC-T6 transient mit einem (CAGA)₉-MLP-Luc Plasmid transfiziert worden. Das Plasmid enthält dabei 9 Kopien des SBE, gekoppelt mit einer TATA-Box und der Initiatorsequenz eines adenoviralen Promotors (MLP, *major late promotor*).

Die Luciferaseaktivität stieg TGF- β -abhängig in CFSC um das 9 bis 10 fache an und in HSC-T6 etwa um den Faktor 3,5 bis 4. Zellen, welche mit einem Kontrollplasmid transfiziert wurden, zeigten keinen Effekt. Aus diesen Ergebnissen läßt sich schlußfolgern, daß Smad-Komplexe, welche nach Bindung des Liganden durch den TGF- β -Rezeptor aktiviert wurden, an spezifische DNA-Sequenzen bestimmter Zielgene binden können. CFSC reagieren dabei stärker als HSC-T6. Das Ergebnis steht in Korrelation mit der TGF- β -abhängigen Smad2-Phosphorylierung.

2A



2B

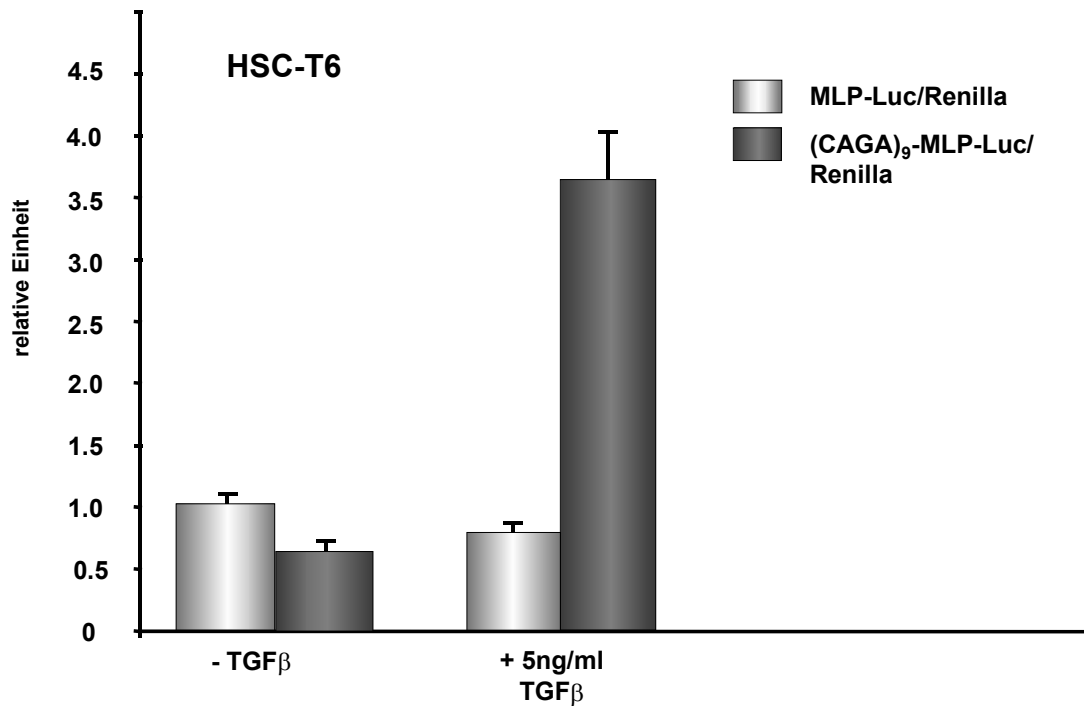


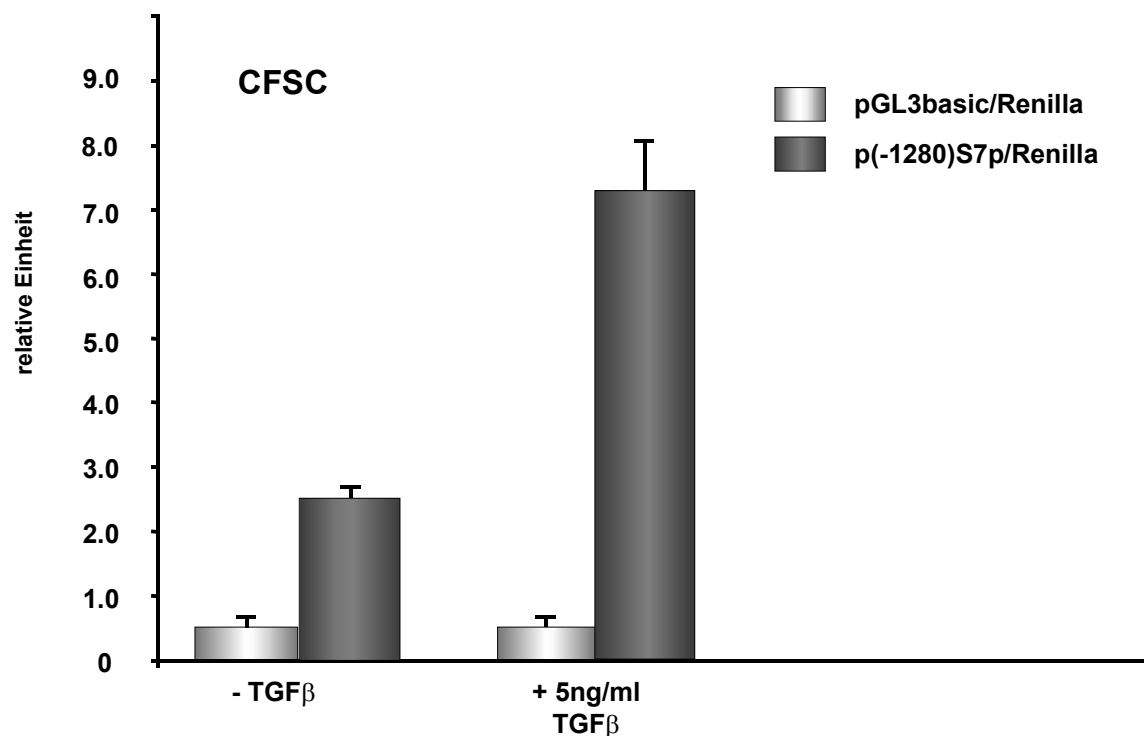
Abb. 2 A/B: TGF- β -abhängige Stimulation von (CAGA)₉-MLP-Luc in CFSC (A) und HSC-T6 (B).

Beide Zelllinien wurden transient transfiziert, wobei 2 μ g/5ml (CAGA)₉-MLP-Luc Reporter-DNA und als Kontrollvektor (pGL3-MLP-Luc) verwendet wurden. Dann folgte eine 8 Std. Kultivierung in 0,5% FKS/Kulturmedium und anschließend eine Stimulation mit TGF- β für 14 Std.. Die TGF- β -Effekte wurden durch Messung der Luciferaseaktivität analysiert. Es sind 3 unabhängige Versuche durchgeführt worden. Um die Transfektionseffizienz zu ermitteln wurde mit pRLCMV (Renilla Luciferase) cotransfiziert. Kontrollzellen wurden ebenso mit den Plasmiden transfiziert, aber nicht mit TGF- β stimuliert.

4.3 TGF- β -abhängige Smad7-Expression

Eine der Auswirkungen der TGF- β -Signaltransduktion ist die Aktivierung von Smad7, einem Protein aus der Familie der inhibitorischen Smads. Dieses ist in der Lage die Phosphorylierung von Smad2/3 durch den Rezeptor Typ I zu blockieren. Der Promotor des Smad7-Gens enthält eine evolutionär stark konservierte Sequenz. In dieser TGF- β -abhängig regulierten Region sind SBE, E-Box, AP1- und SP1-Erkennungsstelle lokalisiert. Um den Effekt von TGF- β auf die Aktivität des Smad7-Promotors in CFSC und HSC-T6 zu untersuchen, wurden die Zellen mit einem Luciferase-Reporter-Plasmid (p(-1280)-Smad7prom-luc) [27] transfiziert. In beiden Zelllinien zeigte das Konstrukt eine TGF- β -unabhängige Basalaktivität, welche durch TGF- β noch jeweils signifikant gesteigert werden konnte.

3A



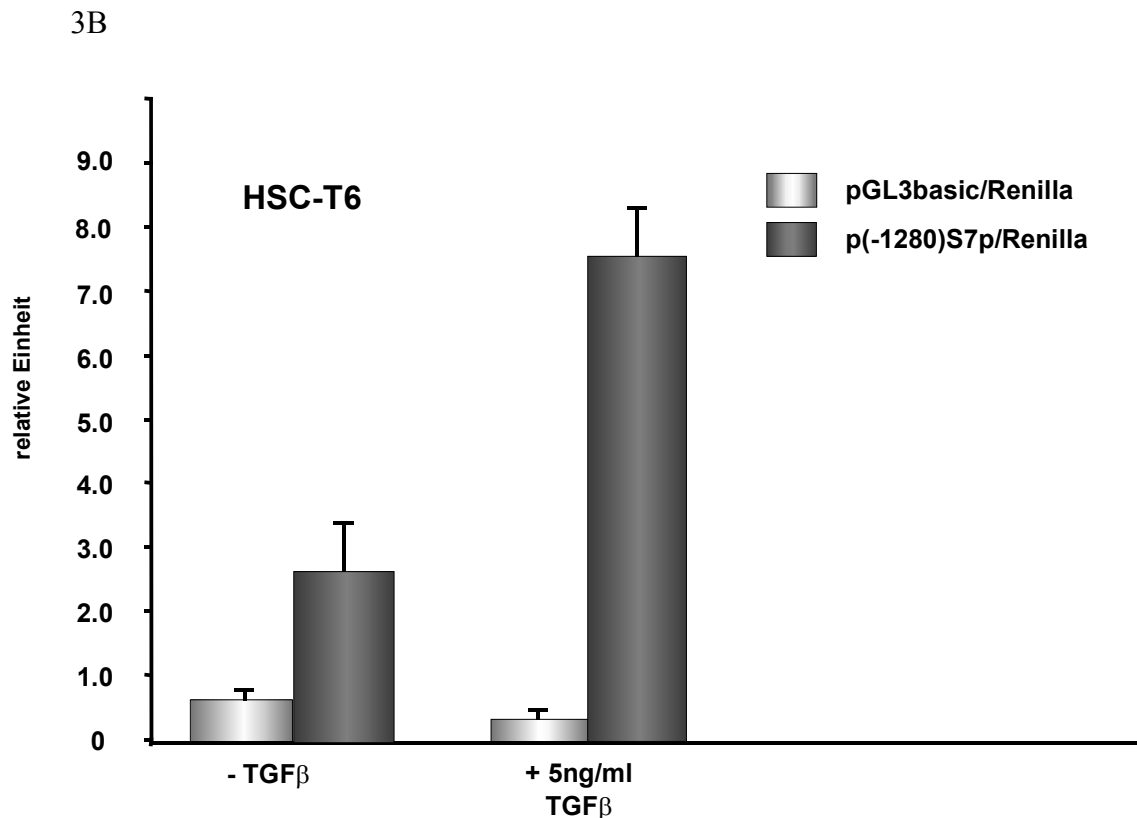


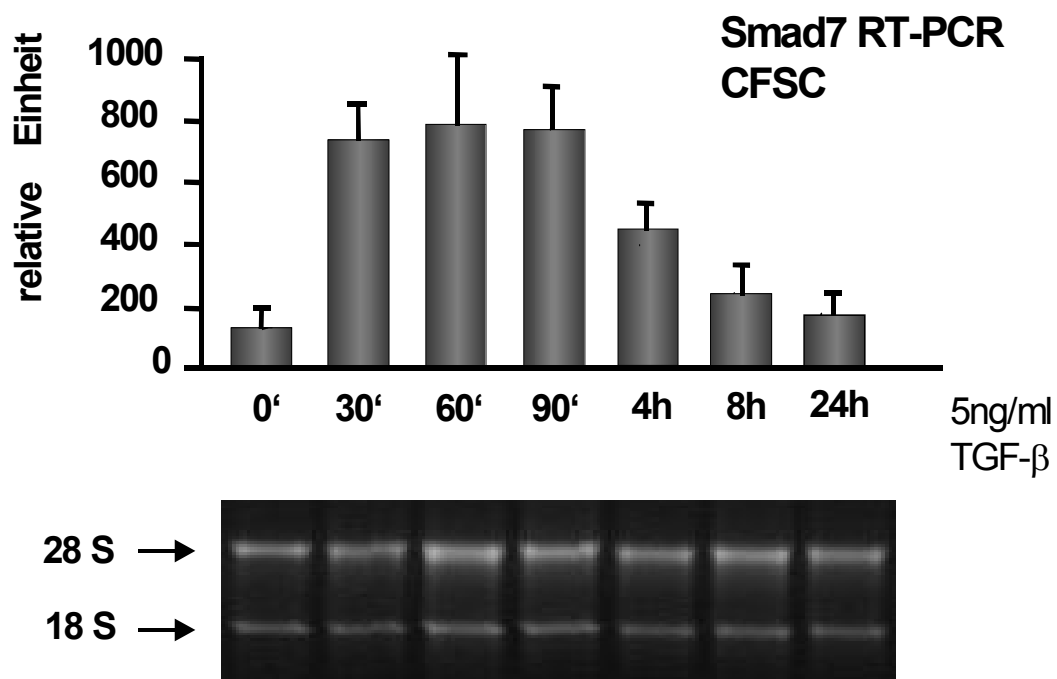
Abb. 3 A/B: TGF- β -Effekte auf die Regulation des Smad7-Promotors in CFSC (A) und HSC-T6 (B).

Beide Zelllinien wurden transient transfiziert, wobei 2 μ g/5ml p(-1280)-Smad7prom-luc Reporter-DNA und als Kontrollvektor pGL3basic verwendet wurden. Die transfizierten Zellen sind für 8 Std. auf 0,5% FKS/Medium gesetzt worden, mit 5 ng/ml TGF- β behandelt und 14 Std. später gestoppt worden. Proteine wurden isoliert und die Luciferaseaktivität gemessen. Die Transfektionseffizienz wurde mittels Cotransfektion mit pRLCMV (Renilla Luciferase) bestimmt.

Um zu untersuchen, in wie weit die endogene mRNA-Expression von Smad7 durch die Stimulation mit TGF- β beeinflusst wird, wurden Messungen mittels einer quantitativen *real-time* RT-PCR durchgeführt. Dabei sind spezifische Smad7-Primer (Ratte) und Hybridisierungsproben zur Detektion eingesetzt worden (siehe 3.4).

In beiden Zelllinien konnte TGF- β -abhängig die mRNA-Expression von Smad7 transient gesteigert werden. Das Maximum lag bei 60 Minuten nach Stimulation mit TGF- β . Vergleicht man diese Daten mit den Ergebnissen aus den Western-Blot-Analysen mit Primärantikörpern gegen P-Smad2, so zeigt sich eine sequenzielle Abhängigkeit der Smad7-Expression auf mRNA-Ebene von der vorangegangenen Smad2-Phosphorylierung.

3C



3D

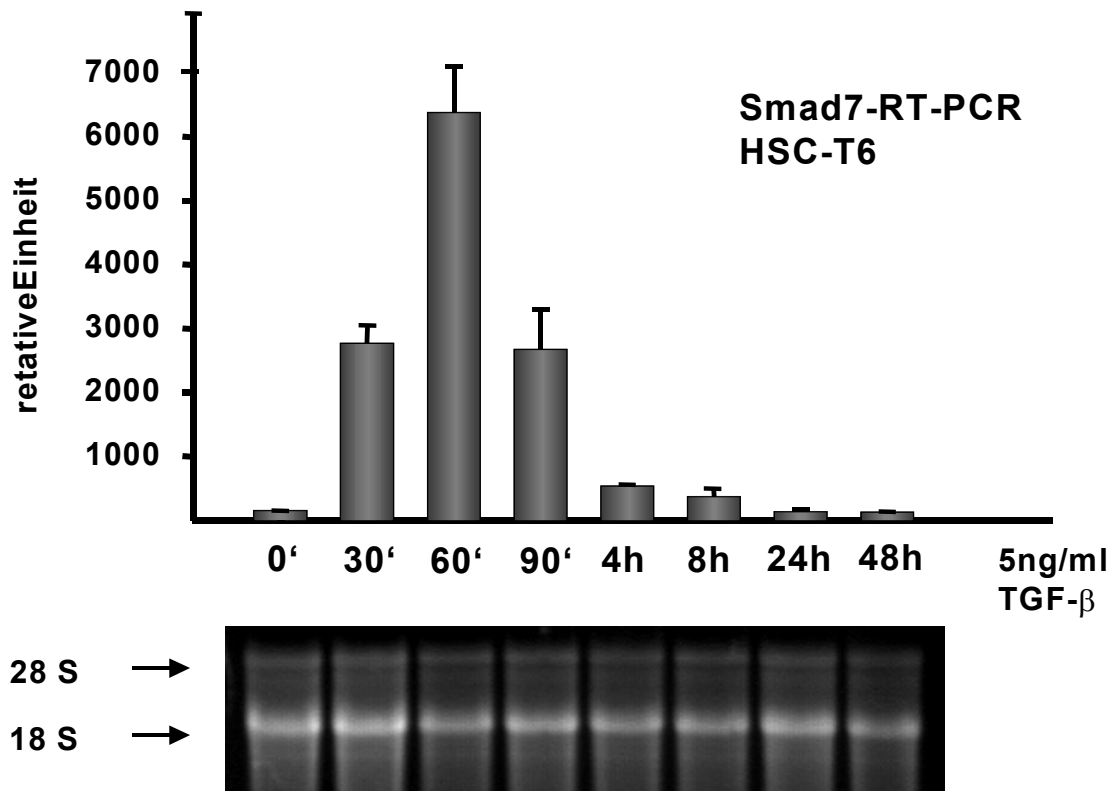


Abb. 3 C/D: Smad7-Expression auf mRNA-Ebene nach Stimulation mit TGF- β in CFSC (C) und HSC-T6 (D).

Aus Gesamt-RNA umgeschriebene mRNA wurde eingesetzt in einer Light Cycler *real-time* quantitativen RT-PCR-Analyse, mit spezifischen Smad7-Primern und Hybridisierungsproben (siehe 3.4). Die Proben sind zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation mit TGF- β gestoppt worden. Der Zeitpunkt 0 Minuten gilt als Kontrolle. Ein repräsentatives RNA-Agarosegel zeigt die RNA-Banden der verschiedenen Proben. Die Intensität der rRNA-Banden wurde mittels *Lumi Imager* (Roche) densitometrisch ausgewertet, um gleiche Ladungsmengen RNA je Probe sicherzustellen.

Auch im Northern-Blot-Verfahren konnte ein Anstieg der Smad7 mRNA-Expression nach TGF- β -Stimulation nachgewiesen werden.

3E

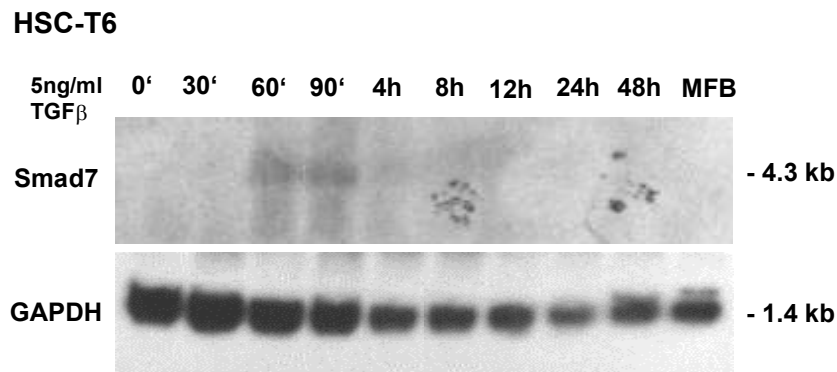


Abb. 3 E: Northern-Blot-Analyse der Smad7 mRNA-Expression in HSC-T6.

HSC-T6 (70-80% konfluent) wurden für 8 Std. in Kulturmedium mit 0,5% FKS kultiviert, mit 5 ng/ml TGF- β stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt. 20 μ g der isolierten Gesamt-RNA sind in einer Northern-Blot-Analyse mit Smad7-Hybridisierungsproben (Ratte) untersucht worden. GAPDH wurde als Ladungskontrolle benutzt.

Nachdem bereits mittels quantitativer RT-PCR und Northern-Blot-Analyse die gesteigerte Transkription des Smad7-Genabschnitts in Abhängigkeit von TGF- β gezeigt werden konnte, wurde im folgenden das Smad7-Protein in der Westernblot-Analyse nachgewiesen. Es wurden Proteinlysate aus HSC-T6 und CFSC sowie Primärantikörper gegen Smad7 verwendet. In HSC-T6 zeigte sich eine transiente Smad7-Expression nach TGF- β -Behandlung. Der Maximalwert wurde 4 Std. nach Stimulationsbeginn gemessen.

In einem gleichen Versuch mit Proteinlysaten aus CFSC konnten nur schwache Smad7-Proteinbanden detektiert werden, der relativ niedrigen Smad7-Expression auf mRNA-Ebene (Abb 3C) entsprechend.

3 F/G

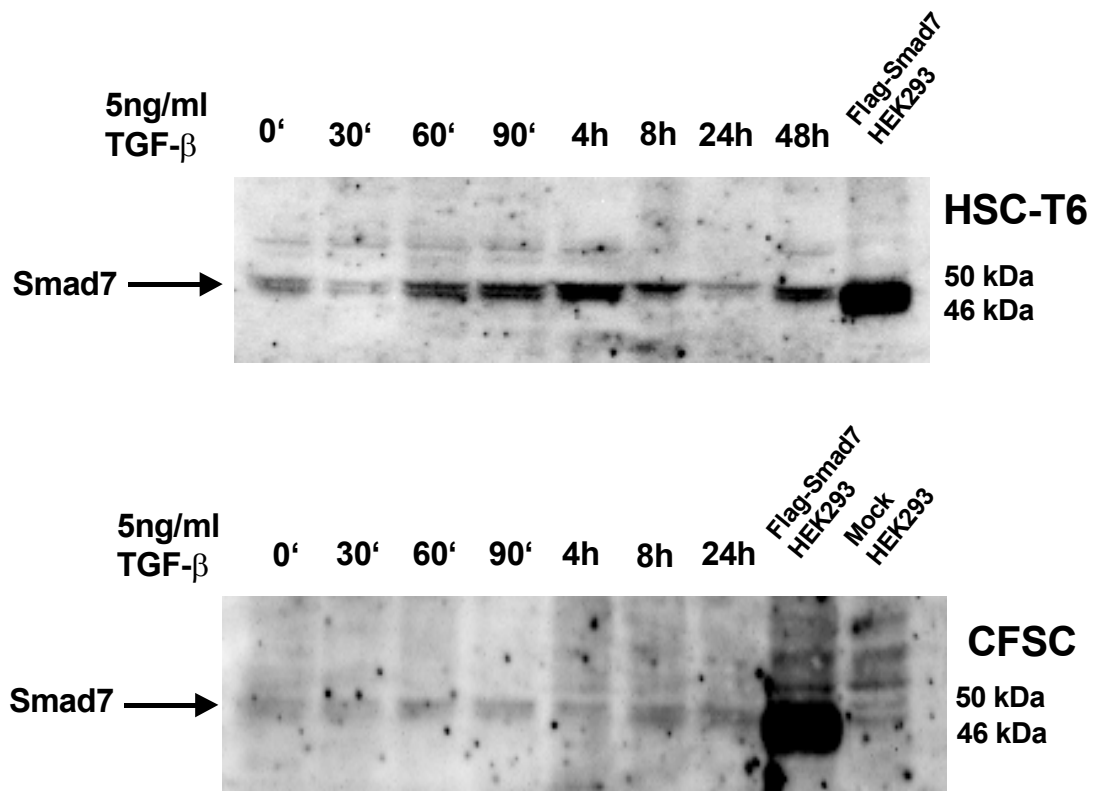


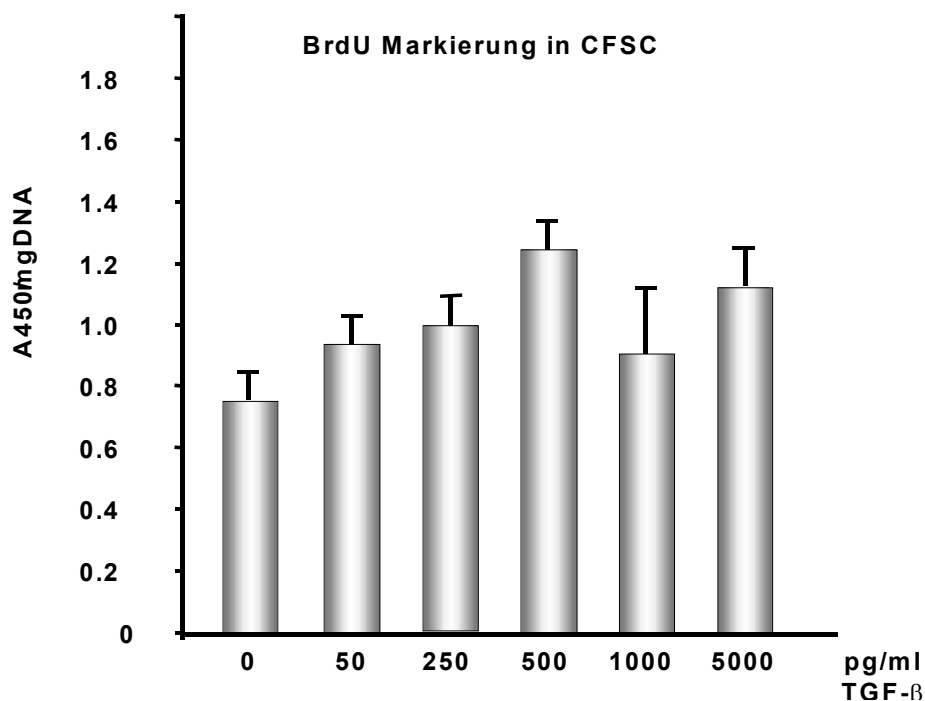
Abb. 3 F/G: Western-Blot-Analyse mit Primärantikörpern gegen Smad7. Monolayerkulturen (80% konfluent) wurden für 8 Stunden in Kulturmedium mit 0,5% FKS kultiviert; anschließend mit 5 ng/ml TGF- β stimuliert und nach 14 Std. zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt. 40 μ g Proteinlysate sind elektrophoretisch aufgetrennt und im Western-Blot-Verfahren untersucht worden.

Als Positivkontrolle wurden Proteinlysate aus HEK293-Zellen aufgetragen, welche mit einem Flag-Smad7-exprimierenden Konstrukt transfiziert worden waren.

4.4 TGF- β -Effekte auf das Zellwachstum

Neben seiner Funktion als Stimulator der ECM-Gen-Expression, fungiert TGF- β auch als potenter Tumorsuppressor. Das Zytokin reguliert das Wachstumsverhalten von Zellen möglicherweise durch einen Einfluß auf die Expression und Funktion verschiedener Komponenten der Zellzyklusmaschinerie. Ab einem bestimmten Punkt in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, wie z.B. in der Tumorgenese, entziehen sich die Zellen der TGF- β -abhängigen Wachstumshemmung. Verschiedene Studien [52] deuten darauf hin, daß TGF- β über unterschiedliche Signalwege Zellwachstum und Genexpression regulieren kann. Ähnlich wie bei Tumorzellen verhält es sich auch bei der Transdifferenzierung von HSC. Während primär kultivierte HSC durch TGF- β in ihrem Wachstum gehemmt werden, entziehen sich transdifferenzierte MFB dieser Wachstumshemmung. Mittels BrdU-Markierung in CFSC und in HSC-T6, wurde die DNA-Synthese unter TGF- β -Stimulation gemessen. Das Ergebnis zeigt, daß sich sowohl CFSC als auch HSC-T6 wie transdifferenzierte MFB verhalten und entsprechend nicht durch TGF- β in ihrem Wachstum gehemmt werden. Die durch TGF- β -vermittelte Signaltransduktion über die Smad2-Phosphorylierung, welche in beiden Zelllinien nachgewiesen werden konnte, hat demnach wohl keinen Einfluß auf den Zellzyklus und das Wachstumsverhalten der Zellen.

4 A



4 B

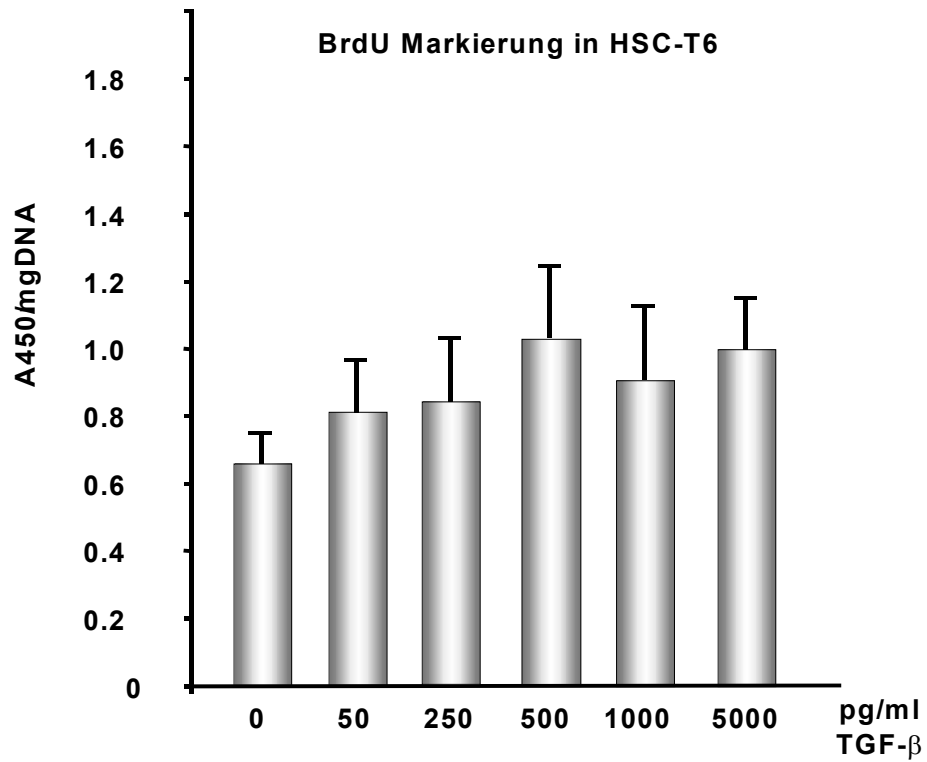


Abb 4 A/B: CFSC und HSC-T6 zeigen sich resistent gegen TGF- β -abhängige Wachstumsinhibition.

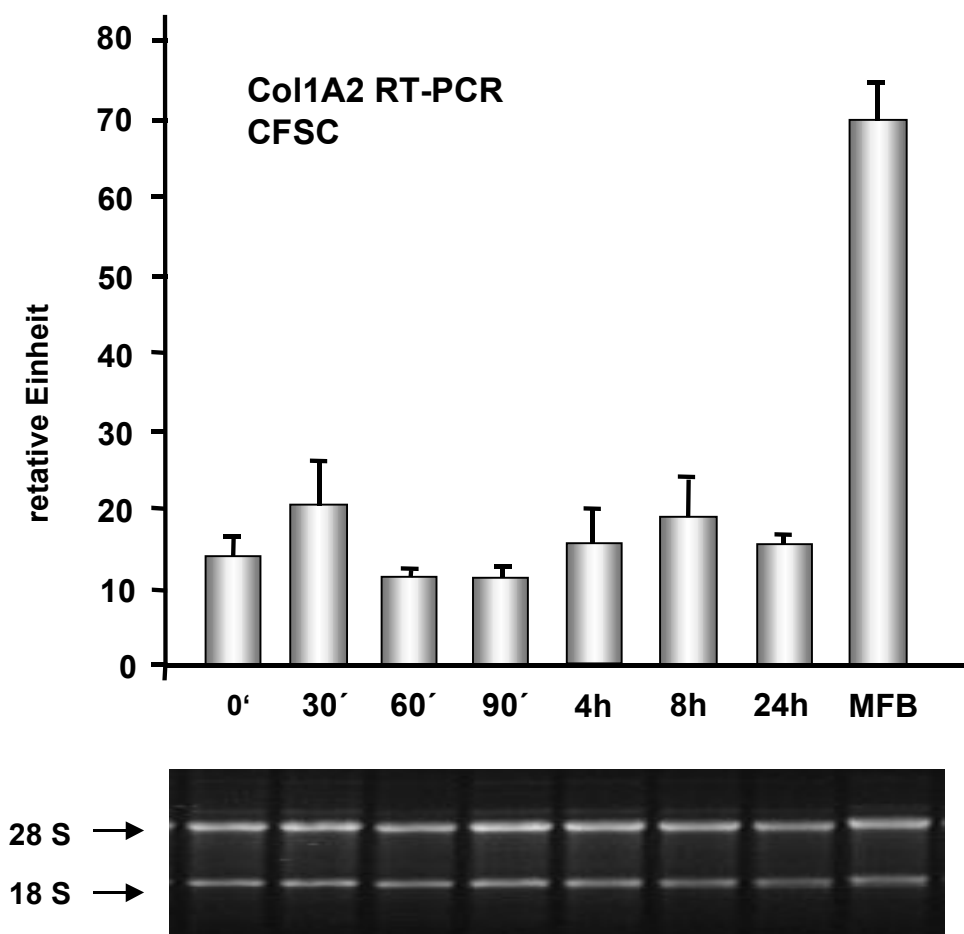
Monolayerkulturen (80 % konfluent) wurden mit verschiedenen Konzentrationen TGF- β stimuliert und anschließend mit BrdU behandelt (s. 3.8). 16 Std. später wurde die BrdU-Inkorporation mittels ELISA gemessen.

4.5 Regulation der Typ I Kollagen mRNA Expression

Im Zuge der durch TGF- β induzierten Fibrogenese kommt es zu einer gesteigerten Synthese extrazellulärer Matrixkomponenten. Dabei steigt insbesondere die Expression des Typ I Kollagens an.

Das Typ I Kollagen besteht aus zwei α 1-Ketten und einer α 2-Kette, welche von unterschiedlichen Genen codiert werden. In dieser Arbeit ist die TGF- β -abhängige Expression eines α 1-Ketten-Gens (Col1A1) und eines α 2-Ketten-Gens (Col1A2) in CFSC und HSC-T6 untersucht worden. In einer RT-PCR-Analyse, mit spezifischen Col1A2-Primern und Hybridisierungsproben, konnte keine TGF- β -regulierte Expression in CFSC und HSC-T6 gefunden werden. Aus der RT-PCR geht ebenfalls hervor, daß im Vergleich mit transdifferenzierten MFB, in CFSC und HSC-T6 deutlich weniger Col1A2 exprimiert wird.

5 A



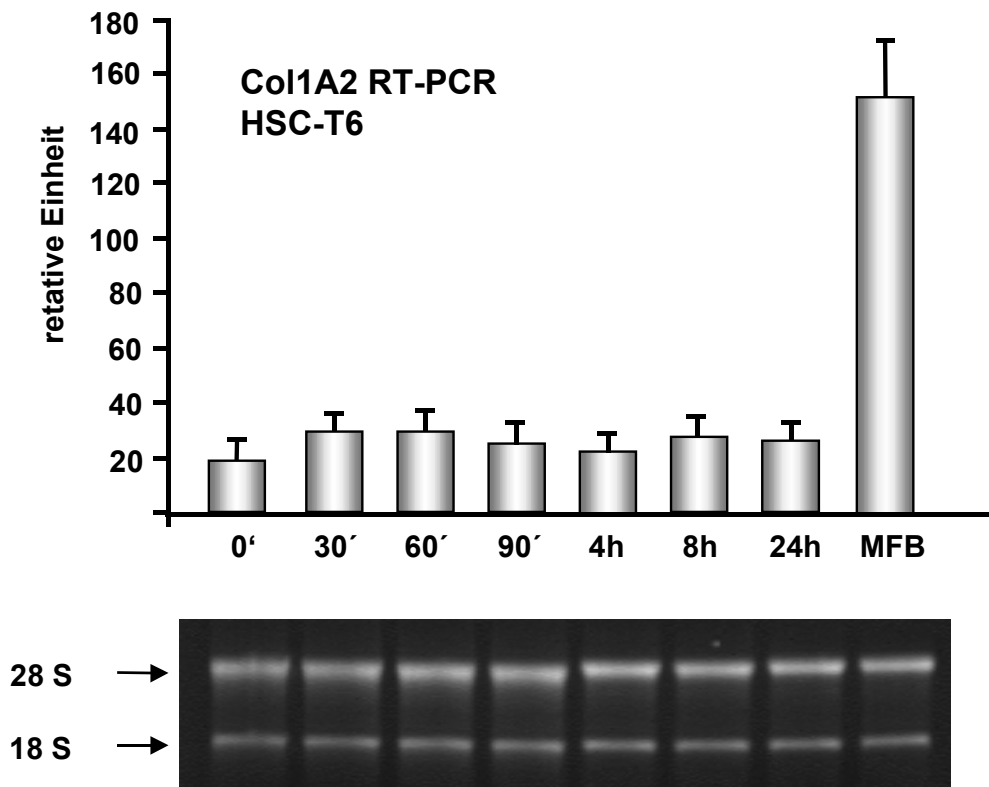


Abb 5 A/B: Col1A2 mRNA-Expressionsanalyse in CFSC (A) und HSC-T6 (B) mittels RT-PCR.

Gesamt-RNA, isoliert aus TGF- β -behandelten Monolayern (3.1.6), wurde spektralphotometrisch bestimmt. Die Mengenverhältnisse wurden durch ein RNA-Agarosegel mit densitometrischer Auswertung der 28S- und 18S-rRNA-Banden kontrolliert (unterer Teil der Abb.). RNA aus MFB diente als Positivkontrolle. Die RT-PCR ist mit spezifischen Col1A2-Primern und Hybridisierungsproben durchgeführt worden (siehe 3.4).

Zur Analyse der Col1A1-Genexpression wurden HSC-T6 transient mit einem Reporterplasmid (pGCol2) transfiziert. Dieses enthält 2.200 bp 5'-flankierende Promotorsequenz des Col1A1-Gens. Auch hier zeigte sich unter Stimulation mit TGF- β nur ein leichter Anstieg der Reporterogenaktivität.

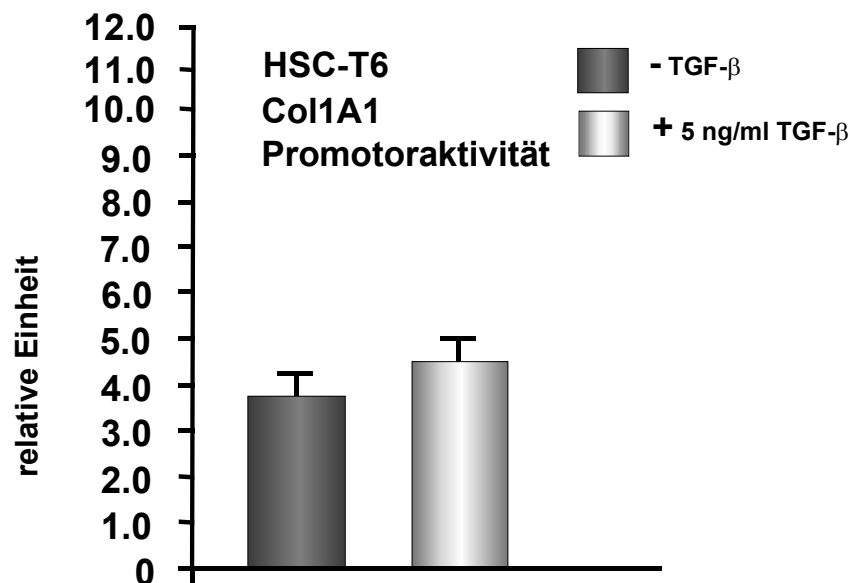


Abb. 5 C: Col1A1 Promotorstudie in Abhängigkeit von TGF-β.

CFSC wurden mit 500 ng/ml Col1A1-Promotor/Reporterplasmid transfiziert und für 8 Std. in 0,5% FKS/Kulturmedium kultiviert; dann mit 5 ng/ml TGF-β behandelt und 14 Std. später gestoppt. Proteine wurden isoliert und die Luciferaseaktivität gemessen. Die Transfektionseffizienz ist mittels einer Cotransfektion mit pRLCMV (Renilla Luciferase) bestimmt worden.

In einem Northern-Blot-Experiment wurden je 20 µg Gesamt-RNA, isoliert aus CFSC, drei Tage alten primären HSC und transdifferenzierten MFB eingesetzt. Ähnlich wie in der Promotorstudie (Abb 5 C/D) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Col1A1 mRNA-Expression zwischen TGF-β stimulierten und nicht stimulierten CFSC. Gleiches gilt auch für primäre HSC und transdifferenzierte MFB. Während ruhende HSC offensichtlich nur sehr wenig Col1A1 mRNA exprimieren, bilden CFSC und transdifferenzierte MFB jeweils große Mengen Col1A1 mRNA [siehe Dr. Arbeit von Jens Westhoff und beiliegende Publikation (Berg et al.)].

Die Untersuchungen bezüglich der Typ I Kollagen Expression zeigten zusammenfassend folgende Ergebnisse:

1. In ruhenden, primären HSC findet sich keine TGF- β -abhängige Col1A1 mRNA-Expression. Hingegen konnte in früheren Studien gezeigt werden, daß Col1A2 mRNA unter TGF- β -Behandlung induziert wird.
2. In CFSC und transdifferenzierten MFB wird Col1A1 mRNA zu etwa gleichen Mengen gebildet, die Col1A2 Expression ist jedoch in MFB signifikant höher als in CFSC.

4.6 TGF- β -Effekte auf die Degradation der extrazellulären Matrix

Neben der verstärkten Expression der ECM kommt es im Laufe der Fibrogenese auch zu Veränderungen in Bezug auf die Degradation von ECM-Komponenten. So werden TGF- β -abhängig bestimmte Enzyme (TIMP-1, PAI-1) vermehrt gebildet, welche einen hemmenden Einfluß auf die Degradation der ECM haben. TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase-1*) ist ein solches Enzym und wird im Zuge der Aktivierung von HSC verstärkt exprimiert. Es konnte bereits gezeigt werden, daß TGF- β TIMP-1 direkt über Smad3 induzieren kann [58]. Die TGF- β -abhängige TIMP-1 mRNA-Expression wurde in CFSC untersucht. Dabei ist ein 1kb TIMP-1-Fragment in einer Northern-Blot-Analyse eingesetzt worden. Die Untersuchung ergab, daß in CFSC nur geringe Mengen TIMP-1 mRNA exprimiert werden, verglichen mit einer starken Expression in MFB. Da TGF- β keinen Einfluß auf die Expression in CFSC nimmt, wird TIMP-1 offensichtlich in den untersuchten Zelllinien nicht durch TGF- β reguliert.

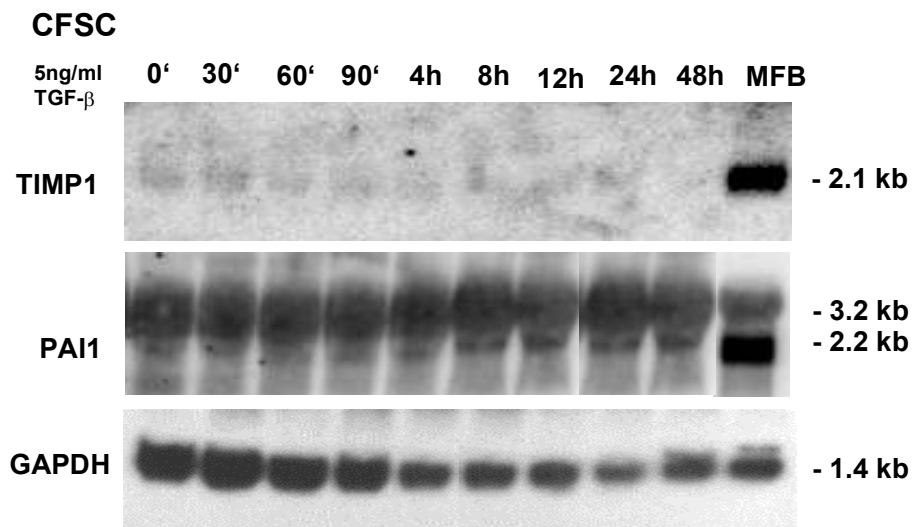


Abb. 6A: Northern-Blot-Analyse der TIMP-1 und PAI-1 mRNA-Expression in CFSC. CFSC (70-80% konfluent) wurden für 8 Std. in Kulturmedium mit 0,5% FKS belassen, mit 5 ng/ml TGF- β stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt. 20 μ g der isolierten Gesamt-RNA sind in einer Northern-Blot-Analyse mit spezifischen TIMP-1- bzw. PAI-1-Hybridisierungsproben eingesetzt worden. GAPDH wurde als Ladungskontrolle mit aufgetragen.

PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor*) ist ein weiteres Enzym, welches in die Degradation der ECM eingreift. PAI-1 zeigt einen profibrotischen Effekt, indem es verschiedene ECM-degradierende Enzyme inhibiert. TGF- β ist in der Lage in primären HSC eine vermehrte PAI-1-Synthese zu induzieren [60], welche dann in transdifferenzierten MFB auf einem hohen Level aufrecht erhalten wird [59].

Um den Einfluß der TGF- β -Signaltransduktion auf die PAI-1 Expression in CFSC zu untersuchen, wurde zunächst Gesamt-RNA in Northern-Blot- und Proteinlysate in Western-Blot-Analysen untersucht. In der Northern-Blot-Analyse zeigte sich ca. 4

Std. nach TGF- β -Behandlung ein Anstieg der PAI-1 mRNA auf Höhe der 2.2 kb Bande (Abb 6A). In MFB wurde PAI-1 erwartungsgemäß stark exprimiert. Auf Proteinebene fand sich eine konstitutive PAI-1-Expression in unbehandelten CFSC, welche unter TGF- β Stimulation nach 12 Std. noch anstieg.

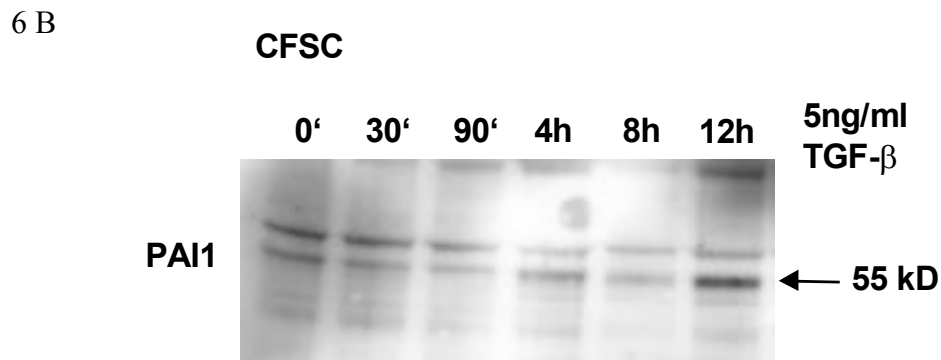
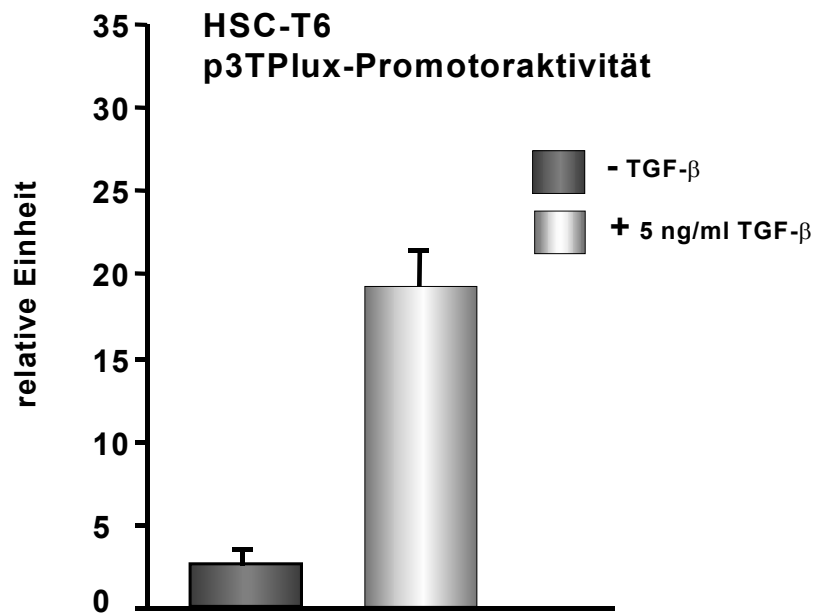


Abb. 6 B: PAI-1 Expression auf Proteinebene in CFSC.

CFSC wurden mit 5 ng/ml TGF- β stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt. Je 25 μ g Proteinlysate sind im Western-Blot-Verfahren mit Antikörpern gegen PAI-1 analysiert worden. Die PAI-1-Bande ist bei 55 kD mit einem Pfeil markiert.

In einer weiteren Untersuchung wurde die TGF- β -abhängige Promotoraktivität des PAI-1-Gens in CFSC und HSC-T6 erforscht. Aus der Literatur ist bekannt, daß es verschiedene TGF- β -regulierte Motive im Promotor des PAI-1-Gens gibt [24, 53, 61, 62, 63]. In unserem Fall wurde das Promotorkonstrukt p3TPlux verwendet. CFSC und HSC-T6 wurden mit p3TPlux und pRLCMV transfiziert, mit TGF- β stimuliert und die Aktivität des Reportergens gemessen. Wie in Abb. 6 C/D ersichtlich, stieg die Luciferaseaktivität in beiden Zelllinien unter TGF- β -Behandlung an.

6 C



6 D

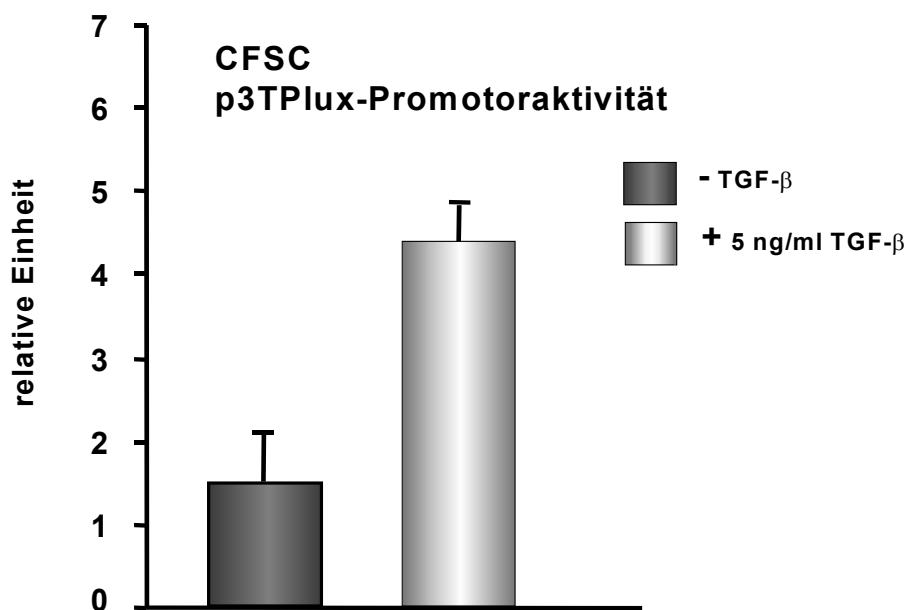


Abb. 6 C/D: TGF- β -Effekte auf die PAI-1 Promotoraktivität in CFSC und HSC-T6. Beide Zelllinien wurden mit 500 ng/ml p3TPlux transfiziert und für 8 Std. in 0,5% FKS/Kulturmedium belassen, dann mit 5 ng/ml TGF- β behandelt und 14 Std. später gestoppt. Proteine wurden isoliert und die Luciferaseaktivität gemessen. Die Transfektionseffizienz ist mittels Cotransfektion mit pRLCMV (Renilla Luciferase) bestimmt worden.

4.7 Smad7-Überexpression in den Zellen

Smad7 ist ein potentieller Antagonist von TGF- β . Um die inhibitorische Wirkung des Smad7-Proteins auf die intrazelluläre Signalvermittlung von TGF- β zu untersuchen, erfolgte eine Überexpression von Smad7 in den Zellen. Dafür sind die Zellen mit einem adenoviralen Konstrukt (Ad5.CMV-flag-S7 Δ E1/ Δ E3) transfiziert worden, welches Flag-Smad7 exprimiert. Dem Flag-Smad7-Gen ist dabei ein CMV (Zytomegalie-Virus) Promotor vorgeschaltet.

In einem Vorversuch sind verschiedene Titer der Adenoviren zur Infektion von CFSC und HSC-T6 eingesetzt worden. Dabei sollte ein möglichst optimaler Titer gefunden werden, wobei die Zellen einerseits keiner zu hohen Konzentration von Adenoviren ausgesetzt sind und andererseits eine effiziente Infektion erreicht wird. CFSC und HSC-T6 wurden dafür mit einer M.O.I. von 1, 10, 50 und 100 infiziert und 24 bzw. 48 Stunden nach Infektionsbeginn gestoppt. Die Smad7-Expression ist dann mittels Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen Smad7 untersucht worden.

7 A

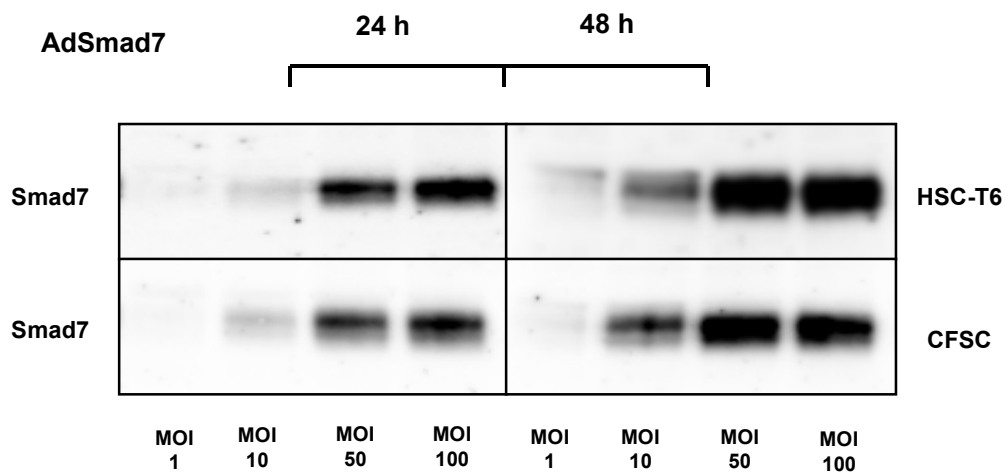


Abb 7 A: Western-Blot-Analyse der ektopischen Smad7-Expression in HSC-T6 und CFSC.

Zellen wurden mit Adenoviren verschiedener M.O.I. (*multiplicity of infection*) infiziert und 24 oder 48 Std. später gestoppt. Je 20 μ g Proteinlysate sind in einem Western-Blot-Verfahren mit Primärantikörpern gegen Smad7 untersucht worden.

Eine effiziente Transfektion zeigte sich in beiden Zelllinien bei einer M.O.I. von 50 und 100 nach 48 Stunden jeweils mit stärkerer Intensität der Smad7-Bande als nach 24 Stunden. Nach diesen Ergebnissen sind für die weiteren Studien mit Smad7 eine M.O.I. von 50 und eine Infektionsdauer von 24 Stunden festgelegt worden.

Die inhibitorische Wirkung von Smad7 auf die TGF- β -abhängige Smad2-Phosphorylierung ist in Abb. 7B dargestellt. CFSC und HSC-T6 wurden mit Smad7 transfiziert bzw. unbehandelt belassen und jeweils mit TGF- β stimuliert. In beiden Zelllinien konnte die Smad2-Aktivierung durch eine Smad7-Überexpression blockiert werden.

7 B

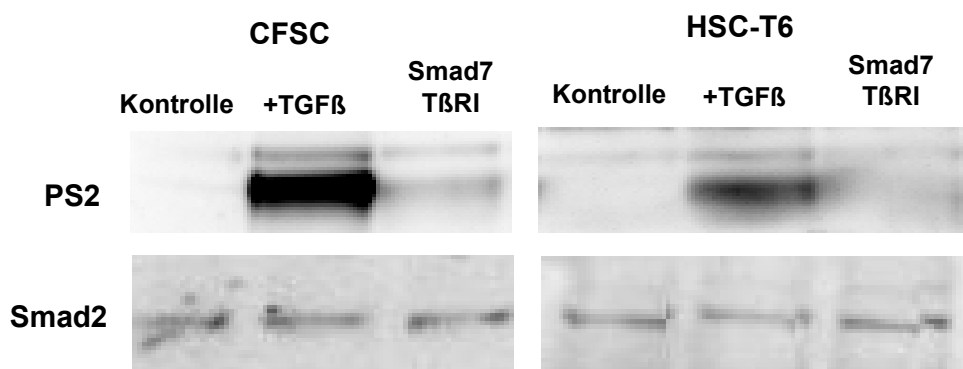


Abb. 7 B: Inhibition der Smad2-Aktivierung durch ektopische Smad7-Überexpression. Je 250.000 CFSC bzw. HSC-T6 sind mit AdSmad7 (M.O.I. 50) für 24 Stunden infiziert bzw. als Kontrolle nicht infiziert worden. Die Zellen wurde für 24 Stunden in 0,5% FKS/Kulturmedium kultiviert und z.T. für 16 Stunden mit TGF- β stimuliert. Je 20 μ g Proteinlysate sind im Western-Blot-Verfahren mit Primärantikörpern gegen P-Smad2 analysiert worden.

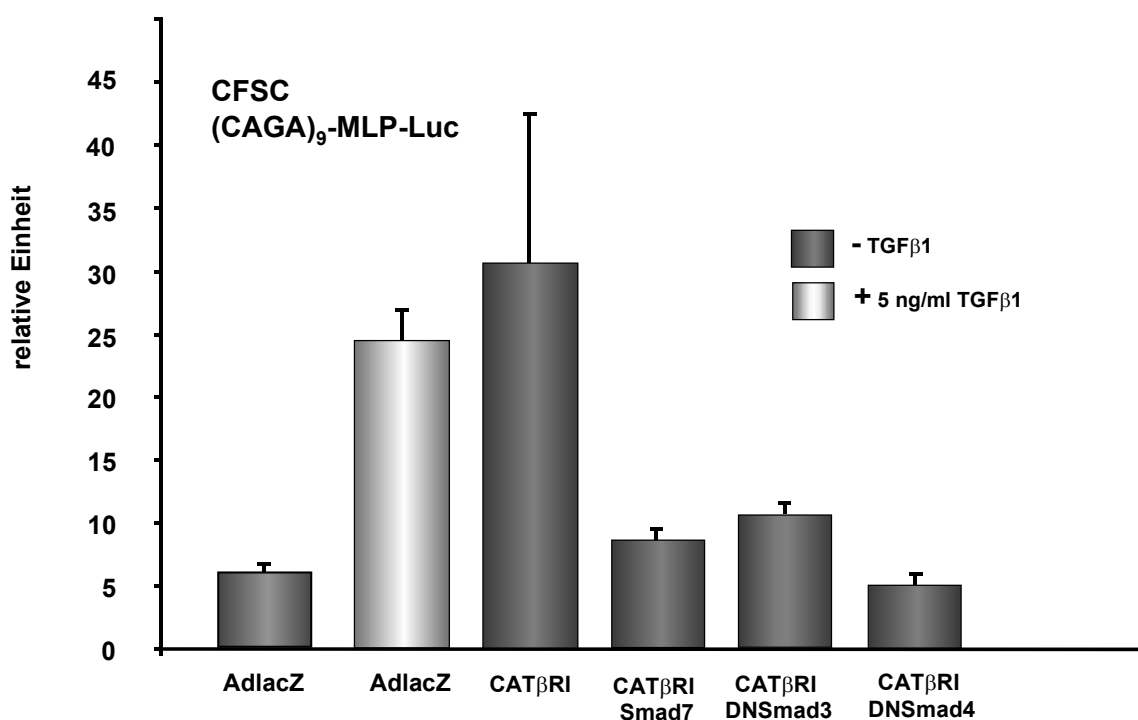
4.8 Einfluß von Smad7- und dominant negativ Smad3-/Smad4-Expression auf TGF- β Zielgene

Um die Regulation TGF- β -abhängiger Zielgene detaillierter zu untersuchen, erfolgte neben der Smad7-Überexpression auch eine ektopische Expression von dominant negativem Smad3 (dnSmad3) und Smad4 (dnSmad4), sowie einem konstitutiv-aktiven TGF- β -Rezeptor Typ I (CA-T β RI) in der Zelle. Kontrollzellen wurden mit Adenoviren transfiziert, welche das LacZ-Gen exprimieren. Der Transfektionserfolg wurde jeweils mittels Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen die verschiedenen rekombinanten Proteine nachgewiesen.

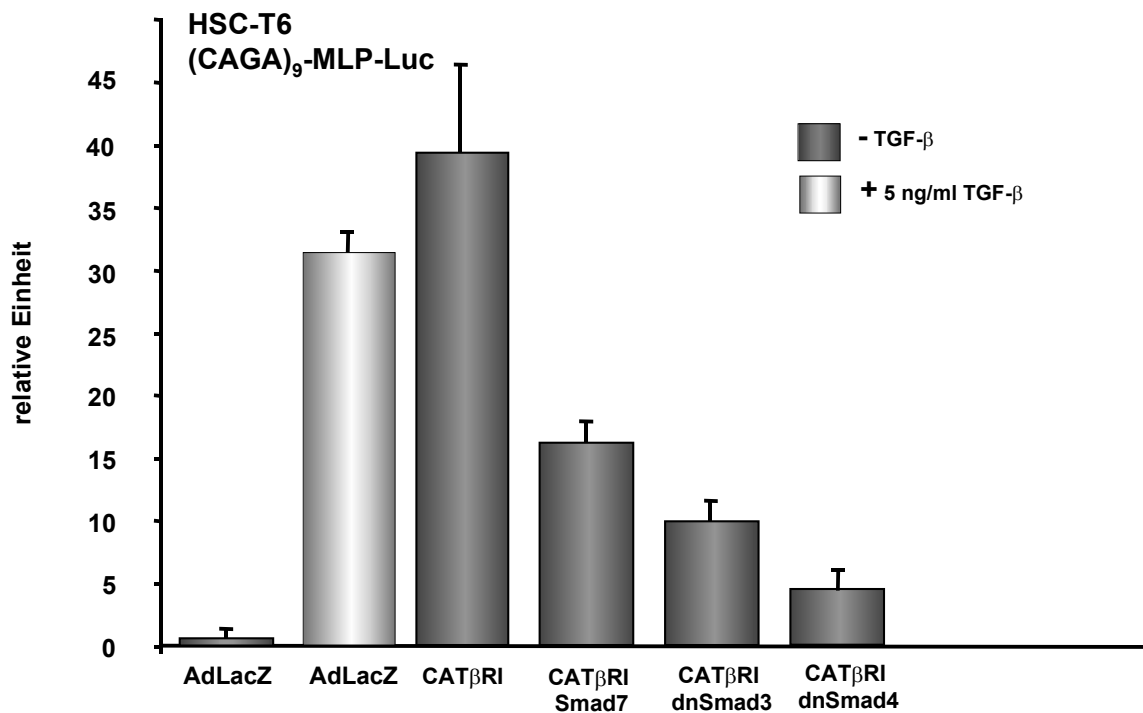
Abb. 8 A/B zeigt die Effekte der verschiedenen Reporterkonstrukte auf die Aktivität von (CAGA)₉-MLP-Luc. Die ektopische Expression des konstitutiv-aktiven TGF- β Typ I Rezeptors und TGF- β -Stimulation unterscheiden sich dabei kaum in ihrer Wirkung auf die Zielzelle.

Eine Überexpression von Smad7, dnSmad3 und dnSmad4 reduziert jeweils die Reporterogenaktivität in beiden Zelllinien; dnSmad4 ist dabei interessanterweise effektiver als dnSmad3 und Smad7.

8 A



8 B



8 C

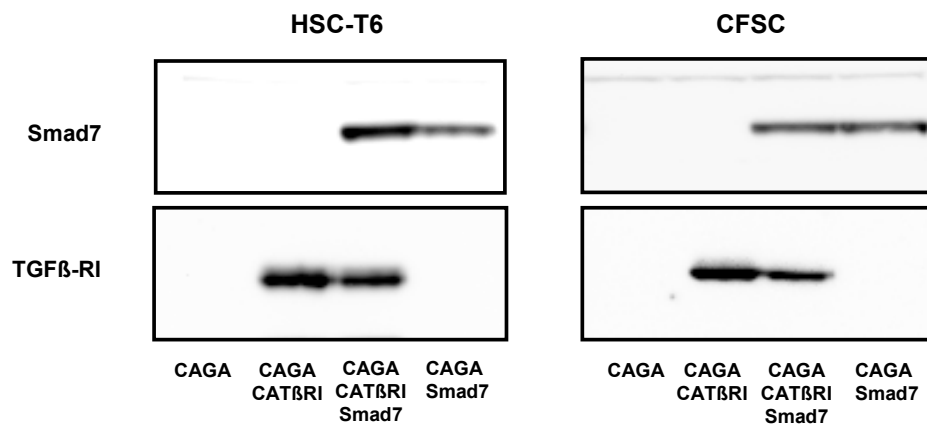


Abb 8 A/B: Effekte der CAT β RI-, dnSmad3-, dnSmad4-, und Smad7-Expression auf (CAGA)₉MLP-Luc in CFSC und HSC-T6.

Beide Zelllinien wurden mit adenoviralen Konstrukten je mit einer M.O.I. von 50 infiziert. Die Aktivität der Reportergene ist jeweils durch Lumineszenzmessung bestimmt worden. C: Die erfolgreiche Expression der rekombinanten Proteine wurde mittels Western-Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Die Aktivität des Col1A1 Promotors konnte in CFSC durch dnSmad4 um etwa 50% reduziert werden, dnSmad3 und Smad7 hatten keinen signifikanten Einfluß.

8 D

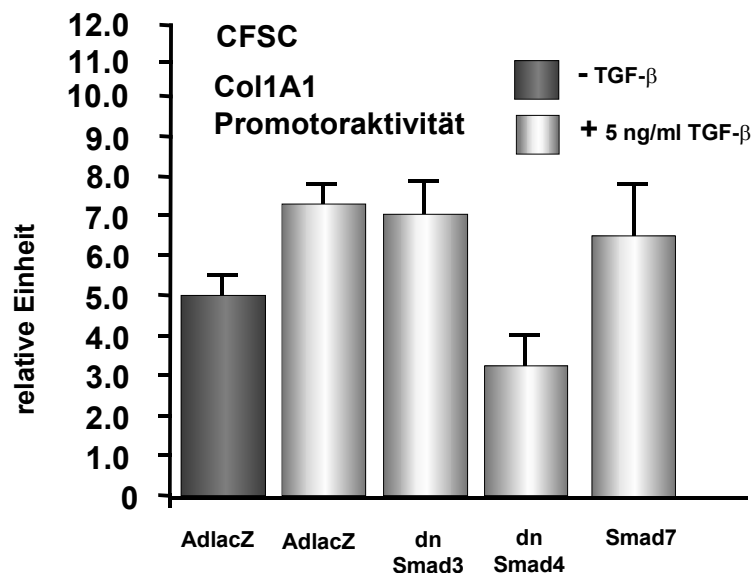
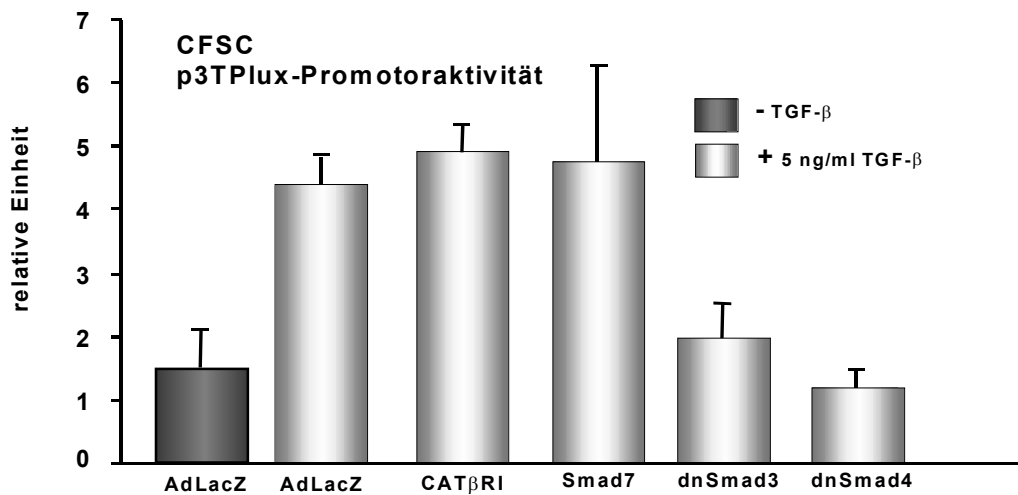


Abb. 8 D: Col1A1 Promotoraktivität bei CAT β RI-, dnSmad3-, dnSmad4-, und Smad7-Expression in CFSC.

CFSC wurden mit 500 ng/ml Col1A1-Promotor/Reporterplasmid transfiziert und für 8 Std. in Kulturmedium mit 0,5% FKS belassen. Dann ist mit 5 ng/ml TGF- β stimuliert und 14 Std. später der Versuch gestoppt worden. Eine ektopische Expression von dnSmad3/4 und Smad7 wurde durch zusätzliche Infektion mit Adenovieren (M.O.I. 50) erreicht. Proteine wurden isoliert und die Luciferaseaktivität gemessen. Die Transfektionseffizienz ist mittels Cotransfektion mit pRLCMV (Renilla Luciferase) bestimmt worden.

Die PAI-1 Promotoraktivität wurde durch dnSmad3 und dnSmad4 Expression deutlich runterreguliert. Smad7-Überexpression zeigte dagegen keinen inhibitorischen Effekt.

8 E



8 F

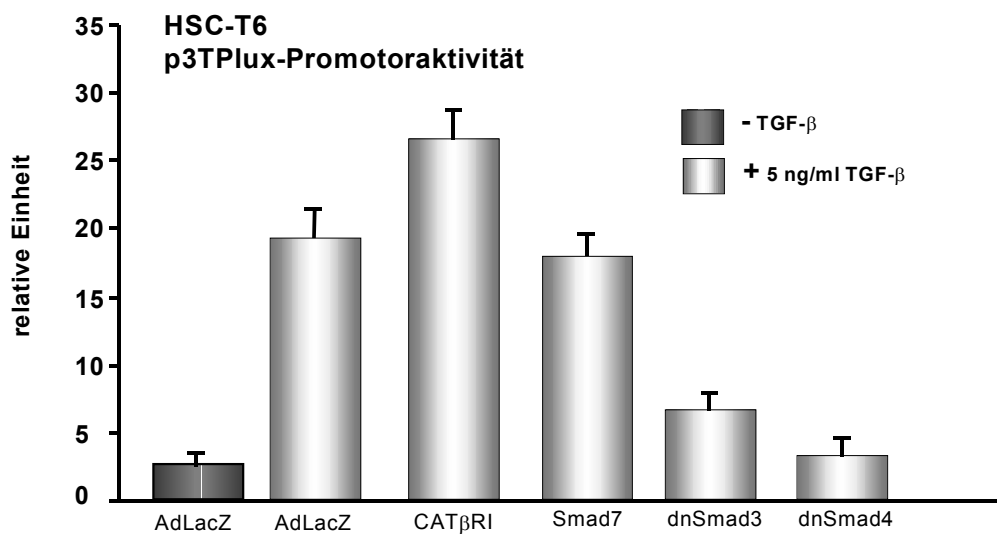


Abb. 8 E/F: Effekte der CAT β RI-, dnSmad3-, dnSmad4-, und Smad7-Expression auf den PAI-1 Promotor p3TPlux in CFSC und HSC-T6.

Monolayerkulturen sind mit 500 ng/ml p3TPlux transfiziert und z.T. mit adenoviralen Konstrukten (M.O.I. 50) infiziert worden. Proteinlysate wurden isoliert und die Luciferaseaktivität gemessen. Die Transfektionseffizienz wurde mittels Cotransfektion mit pRLCMV (Renilla Luciferase) bestimmt.

Blockiert man den TGF- β -Signalweg durch ektopische Expression von dnSmad3 und dnSmad4, werden entsprechend auch die TGF- β -vermittelten Effekte auf (CAGA)₉ und den PAI-1 Promotor geblockt. Smad7 zeigt aber nur eine inhibitorische Wirkung auf die (CAGA)₉MLP-Luc Aktivität, nicht dagegen auf p3TP-lux und Col1A1.

4.9 Smad3-Aktivität in CFSC und HSC-T6

Ebenso wie das Smad2-Protein ist Smad3 ein Mediator, über den das TGF- β -Signal vom Rezeptor in den Zellkern vermittelt wird. Im folgenden wurde die Smad3-Expression und Phosphorylierung in CFSC, HSC-T6 und primär kultivierten HSC untersucht. Dafür sind Antikörper gegen phosphoryliertes Smad1 verwendet worden, die gleichzeitig mit phosphoryliertem Smad3 kreuzreagieren. Desweiteren wurde mit polyklonalen Antikörpern gegen Smad2/3 gearbeitet. In primären HSC stieg die Smad3-Phosphorylierung nach Behandlung mit TGF- β stark an (mit Maximum nach 1 Std.). Durch ektopische Expression von Smad7 in 3 Tage alten HSC konnte diese TGF- β -abhängige Aktivierung blockiert werden.

Im Gegensatz dazu fand sich in CFSC und HSC-T6 ein permanentes P-Smad3 Signal, unabhängig von TGF- β -Behandlung und auch durch Smad7-Überexpression nicht blockierbar.

9 A

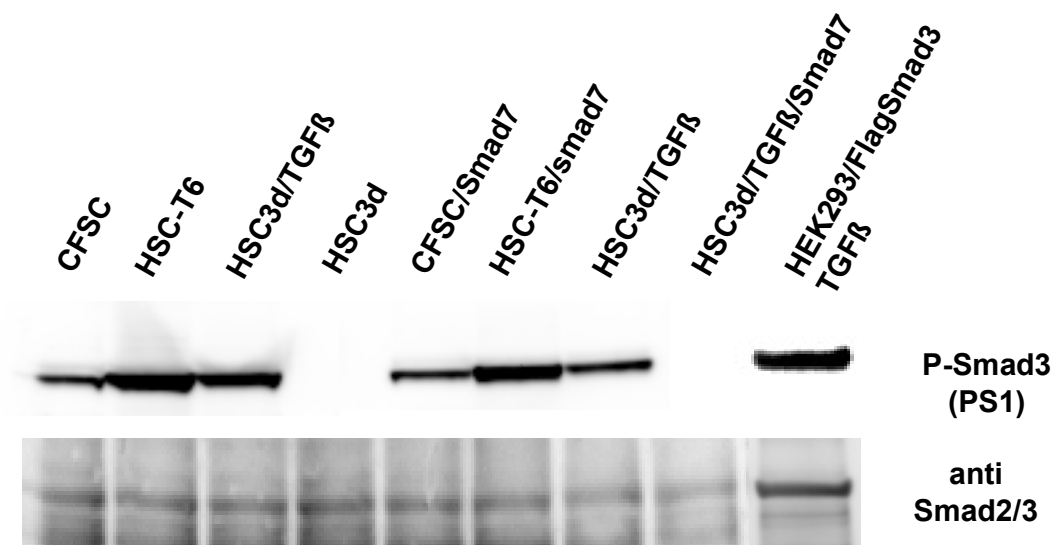


Abb 9 A: TGF- β abhängige und unabhängige Smad3-Phosphorylierung in aktivierten HSC (CFSC/HSC-T6) und primären HSC.

40 μ g Proteinlysate von primären HSC, CFSC und HSC-T6 wurden TGF- β stimuliert oder unbehandelt im Western-Blot-Verfahren eingesetzt. Zusätzlich ist jeder Zelltyp in einem Ansatz mit einem adenoviralen Smad7-Konstrukt infiziert worden. Zur P-Smad3 Immundetektion wurde ein spezifisches Antiserum gegen P-Smad1 verwendet, welches mit P-Smad3 kreuzreagiert. Ein parallel durchgeführter Western-Blot ist mit spezifischen Antikörpern gegen Smad2/3 inkubiert worden.

5 Diskussion

Die Aktivierung und Transdifferenzierung von ruhenden hepatischen Sternzellen, hin zu proliferierenden und fibrotischen Myofibroblasten ist ein wichtiger Schritt in der Pathogenese der Leberfibrose. Diese Aktivierung ist unter anderem durch das Zytokin TGF- β induzierbar. Es ist bekannt, daß in aktivierten HSC große Mengen TGF- β gebildet werden. Die Rolle der autokrinen TGF- β -Stimulation von HSC während der Fibrogenese ist im Detail jedoch noch unklar.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der TGF- β -Signaltransduktion, welche in aktivierten HSC verschiedene Zielgene reguliert und vermehrt exprimiert. Dabei wurde mit zwei von aktivierten HSC etablierten Zelllinien (CFSC, HSC-T6), sowie mit primären HSC und transdifferenzierten MFB gearbeitet. Untersuchungen bezüglich der TGF- β RI vermittelten Smad2-Phosphorylierung, Aktivierung von (CAGA)₉-MLP-Luc und der Smad7-Expression zeigten, daß CFSC und HSC-T6 im Gegensatz zu *in vitro* transdifferenzierten MFB noch TGF- β -sensitiv sind. Diese Zellen waren somit besonders geeignet, die Effekte von TGF- β in aktivierten hepatischen Sternzellen zu untersuchen.

5.1 Wachstumsinhibition

Wie auch von vielen Tumorzelltypen bekannt ist, zeigten sich CFSC und HSC-T6 trotz des intakten Signalwegs über die Smad-Proteine resistent gegen eine TGF- β -abhängige Wachstumsinhibition. Dies läßt vermuten, daß die verschiedenen Funktionen von TGF- β wie z.B. Immunmodulation, Wachstumssuppression oder Induktion der ECM-Synthese über unterschiedliche Signaltransduktion reguliert werden. Verschiedene Studien bestätigen diese Annahme. So konnte in einem anderen Versuch gezeigt werden, daß ein abgeschnittener und somit funktionsloser TGF- β Typ II Rezeptor mit einem Verlust der TGF- β -vermittelten Wachstumsinhibition einhergeht, wobei die TGF- β -abhängige PAI-1 Aktivierung jedoch unbeeinflusst blieb [35].

5.2 Regulation der Typ I Kollagen Expression

Typ I Kollagen ist der Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix und es gilt heute als gesichert, daß aktivierte HSC für die vermehrte Produktion in der Leber verantwortlich sind. Die Col1A2-Sequenz enthält ein TGF- β gesteuertes Element, welches in der Lage ist mit einem Komplex aus Smad-Proteinen und GC-Box assoziierten Faktoren zu interagieren [64]. In Übereinstimmung mit diesem Befund konnte auch ein TGF- β -induzierter Anstieg der Col1A2 mRNA-Expression in primären HSC gezeigt werden [37]. In transdifferenzierten MFB bleibt die Kollagen-Expression konstitutiv hochreguliert und ist dabei weder durch TGF- β zu steigern, noch durch TGF- β Antagonisten (LAP, anti- TGF β Antikörper) zu reduzieren [37]. Diese Daten zeigen, daß die Kollagen-Expression in MFB von TGF- β unabhängig geworden ist und dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit, in Bezug auf CFSC und HSC-T6, bestätigt werden. Die TGF- β Rezeptoraktivierung und Smad2-vermittelte Signaltransduktion hatten weder Effekte auf die Col1A1- noch Col1A2-mRNA-Expression, und auch der Col1A1 Promotor konnte nur geringfügig aktiviert werden. Desweiteren wurde die Col1A1 Promotoraktivität durch ektopische Expression von Smad7 und dnSmad3 nur geringfügig gesenkt, konnte aber durch dnSmad4 Überexpression um ca. 50% runterreguliert werden.

Angesichts dieser Ergebnisse folgern wir, daß nur ein Teil der Col1A1 Promotoraktivität/Expression über den Smad3/Smad4 Komplex reguliert wird. Dieser Anteil, welcher hier dann ca. 50% ausmacht, ist über die Inhibition des Smad3/Smad4-Komplexes durch dnSmad4 blockierbar. An der kompletten Regulierung der Col1A1-Expression wäre(n) dann noch einer anderer bzw. andere Signalwege beteiligt.

5.3 Einfluß von Smad7 und konstitutiv phosphoryliertem Smad3

Es ist interessant, daß in beiden Zelllinien, CFSC und HSC-T6, konstitutiv phosphoryliertes Smad3 gefunden wurde. Eine Smad7-Überexpression hatte dabei keinen Einfluß auf die Smad3-Phosphorylierung. Dies wäre dann auch die Erklärung, weshalb die Smad7-Expression nicht in die Regulation des Col1A1-Promotors

eingreift. Daraus würde folgen, daß die Kollagen-Expression u.a. über aktiviertes Smad3 reguliert wird, welches nicht durch Smad7 inhibiert werden kann.

Auch ist bislang nicht bekannt, über welchen Mechanismus die konstitutive Smad3-Aktivierung erfolgt. Behandlung mit TGF- β zeigte keinen Einfluß. Die vom Liganden unabhängige Anwesenheit von P-Smad3 läßt auf eine Rolle von Smad3 in der Fibrogenese schließen. Dies würde zum einen den profibrotischen Effekt von TGF- β , vermittelt über Smad3-Aktivierung, erklären und zum anderen den Verlust der TGF- β -Sensitivität in transdifferenzierten MFB [38,39]. Diese Hypothese unterstützend konnte gezeigt werden, daß in MFB im Vergleich mit primären HSC eine vermehrte Smad3 mRNA-Expression vorliegt [39]. Studien mit Smad3 *knock out* Mäusen bestätigen ebenfalls den profibrotischen Einfluß von Smad3. So wurde 72 Stunden nach CCl₄-Behandlung von Smad3 *knock out* Mäusen eine Induktion der Col1A1- und Col1A2-mRNA gemessen, die nur 42% bzw. 64% der Induktion in Wildtyp Mäusen entsprach [68]. Gleiche Daten fanden sich für die *in vitro* aktivierten HSC der *knock out* Mäuse und auch die Proliferationsrate dieser HSC war, im Vergleich zu HSC aus Wildtyp Mäusen, gesteigert.

Diese Daten lassen vermuten, daß Smad3 für eine maximale Typ I Kollagen-Expression und für den wachstumsinhibitorischen Effekt von TGF- β notwendig ist.

5.4 TIMP-1 und PAI-1 Expression

Neben einer gesteigerten Synthese der extrazellulären Matrix (ECM), spielt auch die Inhibition von EZM-degradierenden Enzymen eine wichtige Rolle in der Fibrogenese. TIMP-1 und PAI-1 sind zwei Enzyme mit einem solch inhibitorischen Potential auf degradierende Enzyme. Für TIMP-1 wurde beschrieben, daß es in zirrhotischen Lebern um den Faktor 5 hochreguliert wird [71]. Eine Analyse der TIMP-1-mRNA-Expression in aktivierten HSC (CFSC, HSC-T6), zeigte keine Regulation durch TGF- β -Behandlung. Neben Typ I Kollagen liegt also hier ein weiteres als TGF- β -*target* definiertes Gen vor, dessen Expression im Zuge der HSC-Aktivierung zwar hochreguliert wird, so wie es aussieht jedoch ohne einen Einfluß von TGF- β .

Im Gegensatz zu TIMP-1 und Typ I Kollagen konnte die PAI-1 Expression auf mRNA- und Proteinebene durch TGF- β gesteigert werden. Promotorstudien mit

p3TPlux zeigten zusätzlich eine signifikante TGF- β -abhängige Aktivitätssteigerung, vergleichbar mit der von (CAGA)₉-MLP-Luc. Durch Expression des konstitutiv aktiven TGF- β Rezeptor Typ I (CAT β RI) wurden gleiche Effekte wie unter TGF- β -Stimulation erzielt. In einem weiteren Versuch zeigte sich, daß dnSmad3 und dnSmad4 in der Lage waren die TGF- β -induzierte p3TPlux, sowie (CAGA)₉-MLP-Luc Aktivität signifikant zu reduzieren. dnSmad4 war dabei jeweils effektiver als dnSmad3, was auch hier durch die bereits konstitutiv vorliegende Aktivierung von Smad3 erklärt werden kann. Ein interessantes Ergebnis ist, daß Smad7 die (CAGA)₉-MLP-Luc Aktivität blockieren kann, aber ohne Effekt auf p3TPlux bleibt. In einer anderen Studie mit Keratinozyten ist dagegen von einer Antagonisierung der TGF- β -abhängigen p3TPlux-Aktivierung durch Smad7 berichtet worden. Es ist deshalb anzunehmen, daß der PAI-1 Promotor p3TPlux in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich durch TGF- β reguliert wird. Eine wichtige Rolle spielt dabei das Vorliegen verschiedener Transkriptionsfaktoren. Alle beschriebenen Funktionen auf die Genexpression vermitteln die Smad-Proteine in Kooperation mit Transkriptionsfaktoren [17-20]. Für einige dieser Proteine (Evi [72], TGIF [73], Ski [74-76]) konnte bereits detailliert aufgeklärt werden, wie sie die TGF- β -vermittelte Transkriptionsaktivität, in Interaktion mit Smad3, steigern oder inhibieren können.

5.5 Therapeutische Aspekte

Es gibt bereits länger Überlegungen der Fibrogenese der Leber über Blockierung der TGF- β -abhängigen Smad-Aktivierung entgegenzuwirken. Dazu bestehen verschiedene mögliche Ansätze, wie beispielsweise eine Smad7-Überexpression, Anti-TGF- β -Therapien mit Antikörpern oder löslichem TGF- β Rezeptor Typ II. So wurde in einem *in vivo* Experiment (Ratte) durch Infektion mit einem adenoviralen Vektor ein inaktiver TGF- β Rezeptor Typ II exprimiert. Die durch Dimethylnitrosamine induzierte Leberfibrose konnte in den infizierten Tieren signifikant reduziert werden [10]. In einem anderen Experiment konnte durch Smad7-Überexpression in Mäusen die Induktion einer Lungenfibrose durch Bleomycin verhindert werden [89].

Angesichts der vielfältigen Funktionen von TGF- β (Immunmodulation, Wundheilung, ect.) ist es jedoch wünschenswert, spezifisch die profibrotischen Effekte zu blockieren. Deshalb ist es wichtig, die genauen Regulationsmechanismen der in die Fibrose involvierten Komponenten (Smads, Kollagen, TIMP, PAI) zu kennen. Weiter konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die Wirkung von TGF- β und Smad-Proteinen auch vom jeweiligen Zelltyp abhängig ist. Das Ziel ist deshalb eine spezifische und somit möglichst nebenwirkungsarme Therapie der Fibrogenese zu entwickeln, ohne dabei die jeweils physiologischen, vorteilhaften Effekte von TGF- β zu antagonisieren.

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der TGF- β -Signaltransduktion in aktivierten hepatischen Sternzellen (CFSC und HSC-T6). Über Smad-Proteine werden die Effekte von TGF- β in der Zelle vermittelt und ein profibrotisches Potential in HSC aktiviert. Die Regulation der einzelnen Komponenten, die in Zusammenhang mit der Fibrogenese stehen, sollten hierbei näher untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, daß in CFSC und HSC-T6 eine TGF- β -abhängige Smad2-Phosphorylierung erfolgt und dadurch zeitversetzt verschiedene Zielgene wie Smad7, (CAGA)₉-MLP-Luc und PAI-1 aktiviert werden.

Die TIMP-1 Expression erfolgte in den untersuchten Zellen nicht mehr in Abhängigkeit von TGF- β -Behandlung und auch die Smad7-Überexpression konnte sie nicht hemmen. Desweiteren sind beide Zelllinien resistent gegenüber TGF- β -vermittelter Wachstumsinhibition, obwohl der Signalweg über die Smad-Proteine intakt ist.

Die Kollagen-Expression in den aktivierten HSC konnte weder durch TGF- β gesteigert, noch durch Überexpression von Smad7 runterreguliert werden. Der Promotor für die Col1A1 Kette des Typ I Kollagens läßt sich jedoch durch Expression von Smad4 zu ca. 50 % in seiner Aktivität senken.

Von besonderem Interesse ist, daß in beiden Zelllinien konstitutiv aktiviertes Smad3 gefunden wurde. Ein Zusammenhang mit der Typ I Kollagen-Expression ist anzunehmen, da P-Smad3 gemeinsam mit Smad4 einen Komplex bildet, der zusammen mit anderen Faktoren TGF- β -Zielgene reguliert. Die gesteigerte Präsenz von aktiviertem Smad3 scheint daher für die Aufrechterhaltung des fibrotischen Potentials in HSC von Bedeutung zu sein.

Im Gegensatz zu TIMP-1 wurde die PAI-1 Expression/ Promotoraktivität durch TGF- β hochreguliert. Interessant in diesem Zusammenhang ist, daß Smad7 als klassischer Gegenspieler von TGF- β , keinen inhibitorischen Einfluß auf die Aktivität des PAI-1 Promotor p3TPlux hat. Dagegen konnte gezeigt werden, daß Smad7 sowohl die TGF- β -abhängige Smad2-Phosphorylierung als auch die (CAGA)₉-MLP-Luc Aktivität

inhibiert. Dies deutet auf ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren hin, welches bei der Regulation verschiedener TGF- β -Zielgene von unterschiedlicher Bedeutung ist.

7 Literatur

- [1] Friedman, S.L. (2000) Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275: 2247-50.
- [2] Gressner, A.M. (1994) Perisinusoidal lipocytes and fibrogenesis. *Gut* 35: 1331-3.
- [3] Gressner, A.M. and Bachem, M.G. (1995) Molecular mechanisms of liver fibrogenesis--a homage to the role of activated fat-storing cells. *Digestion* 56: 335-46.
- [4] Friedman, S.L., Yamasaki, G. and Wong, L. (1994) Modulation of transforming growth factor beta receptors of rat lipocytes during the hepatic wound healing response - Enhanced binding and reduced gene expression accompany cellular activation in culture and in vivo. 269: 10551-10558.
- [5] Li, D. and Friedman, S.L. (1999) Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 14: 618-33.
- [6] Schuppan, D., Strobel, D. and Hahn, E.G. (1998) Hepatic fibrosis - therapeutic strategies. *Digestion* 59: 385-90.
- [7] Border, W.A. and Noble, N.A. (1994) Mechanisms of disease: transforming growth factor-beta in tissue fibrosis. *N.Engl.J.Med* 331: 1286-1292.
- [8] Friedman, S.L. (1999) The virtuosity of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 117: 1244-1246.
- [9] Qi, Z., Atsuchi, N., Ooshima, A., Takeshita, A. and Ueno, H. (1999) Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proc Nat Acad Sci Usa* 96: 2345-2349.
- [10] Ueno, H., Sakamoto, T., Nakamura, T., Qi, Z., Atsuchi, N., Takeshita, A., Shimizu, K. and Ohashi, H. (2000) A soluble transforming growth factor beta receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfunction in rats. *Hum Gene Ther* 11: 33-42.
- [11] Ueki, T. et al. (1999) Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nature Med* 5: 226-230.
- [12] Okuno, M., Akita, K., Moriwaki, H., Kawada, N., Ikeda, K., Kaneda, K., Suzuki, Y. and Kojima, S. (2001) Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF-beta. *Gastroenterology* 120: 1784-800.

- [13] Massague, J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67: 753-91.
- [14] Heldin, C.H., Miyazono, K. and Tendijske, P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465-471.
- [15] Derynck, R., Zhang, Y. and Feng, X.H. (1998) Smads: Transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 95: 737-740.
- [16] Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M.J. and Ten Dijke, P. (2000) Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 267: 6954-67.
- [17] Massague, J. and Wotton, D. (2000) Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J* 19: 1745-54.
- [18] Miyazono, K. (2000) Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. *J Cell Sci* 113: 1101-9.
- [19] Wrana, J.L. (2000) Regulation of Smad activity. *Cell* 100: 189-92.
- [20] Zhang, Y. and Derynck, R. (1999) Regulation of Smad signalling by protein associations and signalling crosstalk. *Tr Cell Biol* 9: 274-279.
- [21] Liberati, N.T., Datto, M.B., Frederick, J.P., Shen, X., Wong, C., Rougierchapman, E.M. and Wang, X.F. (1999) Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proc Nat Acad Sci Usa* 96: 4844-4849.
- [22] Qing, J., Zhang, Y. and Derynck, R. (2000) Structural and functional characterization of the transforming growth factor-beta -induced Smad3/c-Jun transcriptional cooperativity. *J Biol Chem* 275: 38802-12.
- [23] Sano, Y., Harada, J., Tashiro, S., Gotoh-Mandeville, R., Maekawa, T. and Ishii, S. (1999) ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 274: 8949-57.
- [24] Hua, X.X., Liu, X.D., Ansari, D.O. and Lodish, H.F. (1998) Synergistic cooperation of TFE3 and Smad proteins in TGF- beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene. *Gene Develop* 12: 3084-3095.
- [25] Hua, X.X., Miller, Z.A., Wu, G., Shi, Y.G. and Lodish, H.F. (1999) Specificity in transforming growth factor beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene: Interactions of promoter DNA, transcription factor mu E3, and Smad proteins. *Proc Nat Acad Sci Usa* 96: 13130-13135.

- [26] Hua, X., Miller, Z.A., Benchabane, H., Wrana, J.L. and Lodish, H.F. (2000) Synergism between transcription factors TFE3 and Smad3 in transforming growth factor-beta-induced transcription of the Smad7 gene. *J Biol Chem* 275: 33205-8.
- [27] Stopa, M., Anhuf, D., Terstegen, L., Gatsios, P., Gressner, A.M. and Dooley, S. (2000) Participation of Smad2, Smad3, and Smad4 in transforming growth factor beta (TGF-beta)-induced activation of Smad7. THE TGF-beta response element of the promoter requires functional Smad binding element and E- box sequences for transcriptional regulation. *J Biol Chem* 275: 29308-17.
- [28] Feng, X.H., Lin, X. and Derynck, R. (2000) Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *Embo J* 19: 5178-93.
- [29] Pardali, K., Kurisaki, A., Moren, A., ten Dijke, P., Kardassis, D. and Moustakas, A. (2000) Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 275: 29244-56.
- [30] Labbe, E., Letamendia, A. and Attisano, L. (2000) Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell- specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8358-63.
- [31] Yanagisawa, J. et al. (1999) Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science* 283: 1317-21.
- [32] Feng, X.H., Zhang, Y., Wu, R.Y. and Derynck, R. (1998) The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes Dev* 12: 2153-63.
- [33] Janknecht, R., Wells, N.J. and Hunter, T. (1998) TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes Dev* 12: 2114-9.
- [34] Topper, J.N., DiChiara, M.R., Brown, J.D., Williams, A.J., Falb, D., Collins, T. and Gimbrone, M.A., Jr. (1998) CREB binding protein is a required coactivator for Smad-dependent, transforming growth factor beta transcriptional responses in endothelial cells [published erratum appears in Pto Natl Acad Sci U S A 1998 Oct 13;95(21):12735]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9506-11.

- [35] Chen, R.H., Ebner, R. and Derynck, R. (1993) Inactivation of the type II receptor reveals two receptor pathways for the diverse TGF-beta activities. *Science* 260: 1335-1338.
- [36] McCaffrey, T.A., Consigli, S., Du, B.H., Falcone, D.J., Sanborn, T.A., Spokojny, A.M. and Bush, H.L. (1995) Decreased type II/type I TGF-beta receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions - Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF- beta 1. 96: 2667-2675.
- [37] Dooley, S., Delvoux, B., Lahme, B., Mangasser-Stephan, K. and Gressner, A.M. (2000) Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 31: 1094-1106.
- [38] Dooley, S., Delvoux, B., Streckert, M., Bonzel, L., Stopa, M., ten Dijke, P. and Gressner, A.M. (2001) Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 502: 4-10.
- [39] Dooley, S., Streckert, M., Delvoux, B. and Gressner, A.M. (2001) Expression of Smads during in vitro transdifferentiation of hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 554-62.
- [40] Greenwel, P., Rubin, J., Schwartz, M., Hertzberg, E.L. and Rojkind, M. (1993) Liver fat storing cell clones obtained from a CCl4-cirrhotic rat are heterogeneous with regard to proliferation, expression of extracellular matrix components, interleukin-6, and connexin-43. 69: 210-216.
- [41] Kim, Y., Ratzliff, V., Choi, S.G., Lalazar, A., Theiss, G., Dang, Q., Kim, S.J. and Friedman, S.L. (1998) Transcriptional activation of transforming growth factor beta 1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1 - Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *J Biol Chem* 273: 33750-33758.
- [42] Brodin, G., Tendijck, P., Funa, K., Heldin, C.H. and Landstrom, M. (1999) Increased Smad expression and activation are associated with apoptosis in normal and malignant prostate after castration. *Cancer Res* 59: 2731-2738.
- [43] Knook, D.L., Seffelaar, A.M. and De Leeuw, A.M. (1982) Fat storing cells of the rat liver. Their isolation and purification. *Exp. Cell Res.* 139: 468-471.

- [44] Schäfer, S., Zerbe, O. and Gressner, A.M. (1987) The synthesis of proteoglycans in fat-storing cells of rat liver. *Hepatology* 7: 680-7.
- [45] Piek, E., Westermarck, U., Kastemar, M., Heldin, C.H., Vanzoelen, E.J., Nister, M. and Tendijke, P. (1999) Expression of transforming-growth-factor (TGF)-beta receptors and Smad proteins in glioblastoma cell lines with distinct responses to TGF-beta 1. *Int J Cancer* 80: 756-763.
- [46] Brenner, D.A., Rippe, R.A. and Veloz, L. (1989) Analysis of the collagen alpha 1(I) promoter. *Nucleic Acids Res* 17: 6055-64.
- [47] Engel, M., Theisinger, B., Seib, T., Seitz, G., Huwer, H., Zang, K.D., Welter, C. and Dooley, S. (1993) High levels of nm23-H1 and nm23-H2 messenger RNA in human squamous-cell lung carcinoma are associated with poor differentiation and advanced tumor stages. *Int J Cancer* 55: 375-9.
- [48] Chu, M.L., Myers, J.C., Bernard, M.P., Ding, J.F. and Ramirez, F. (1982) Cloning and characterization of five overlapping cDNAs specific for the human pro alpha 1(I) collagen chain. *Nucleic Acids Res* 10: 5925-34.
- [49] Tokunaga, K., Nakamura, Y., Sakata, K., Fujimori, K., Ohkubo, M., Sawada, K. and Sakiyama, S. (1987) Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers. *Cancer Res* 47: 5616-9.
- [50] Gatsios, P., Haubeck, H.D., Van de Leur, E., Frisch, W., Apte, S.S., Greiling, H., Heinrich, P.C. and Graeve, L. (1996) Oncostatin M differentially regulates tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-3 gene expression in human synovial lining cells. *Eur J Biochem* 241: 56-63.
- [51] Seki, T., Healy, A.M., Fletcher, D.S., Noguchi, T. and Gelehrter, T.D. (1999) IL-1beta mediates induction of hepatic type 1 plasminogen activator inhibitor in response to local tissue injury. *Am J Physiol* 277: G801-9.
- [52] Piek, E., Heldin, C.H. and Ten Dijke, P. (1999) Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *Faseb J* 13: 2105-24.
- [53] Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., Tendijke, P., Huet, S. and Gauthier, J.M. (1998) Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta- inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* 17: 3091-3100.
- [54] Ghosh, A.K., Yuan, W., Mori, Y. and Varga, J. (2000) Smad-dependent stimulation of type I collagen gene expression in human skin fibroblasts by TGF-beta

involves functional cooperation with p300/CBP transcriptional coactivators. *Oncogene* 19: 3546-55.

[55] Hayashida, T., Poncelet, A.C., Hubchak, S.C. and Schnaper, H.W. (1999) TGF-beta 1 activates MAP kinase in human mesangial cells: A possible role in collagen expression. *Kidney Int* 56: 1710-1720.

[56] Chen, S.J., Yuan, W., Lo, S., Trojanowska, M. and Varga, J. (2000) Interaction of smad3 with a proximal smad-binding element of the human alpha2(I) procollagen gene promoter required for transcriptional activation by TGF-beta. *J Cell Physiol* 183: 381-92.

[57] Zhang, Y., Feng, X.H. and Derynck, R. (1998) Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF- beta-induced transcription. *Nature* 394: 909-913.

[58] Verrecchia, F., Chu, M.L. and Mauviel, A. (2001) Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem* 276: 17058-62.

[59] Leyland, H., Gentry, J., Arthur, M.J. and Benyon, R.C. (1996) The plasminogen-activating system in hepatic stellate cells. *Hepatology* 24: 1172-8.

[60] Knittel, T., Fellmer, P. and Ramadori, G. (1996) Gene expression and regulation of plasminogen activator inhibitor type I in hepatic stellate cells of rat liver. *Gastroenterology* 111: 745-754.

[61] Datta, P.K., Blake, M.C. and Moses, H.L. (2000) Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by transforming growth factor-beta -induced physical and functional interactions between smads and Sp1. *J Biol Chem* 275: 40014-9.

[62] Stroschein, S.L., Wang, W. and Luo, K.X. (1999) Cooperative binding of Smad proteins to two adjacent DNA elements in the plasminogen activator inhibitor-1 promoter mediates transforming growth factor beta-induced Smad- dependent transcriptional activation. *J Biol Chem* 274: 9431-9441.

[63] Song, C.Z., Siok, T.E. and Gelehrter, T.D. (1998) Smad4/DPC4 and Smad3 mediate transforming growth factor- beta (TGF-beta) signaling through direct binding to a novel TGF-beta-responsive element in the human plasminogen activator inhibitor-1 promoter. *J Biol Chem* 273: 29287-29290.

[64] Inagaki, Y., Nemoto, T., Nakao, A., Dijke, P., Kobayashi, K., Takehara, K. and Greenwel, P. (2001) Interaction between GC box binding factors and Smad proteins modulates cell lineage-specific alpha 2(I) collagen gene transcription. *J Biol Chem* 276: 16573-9.

- [65] Inagaki, Y., Mamura, M., Kanamaru, Y., Greenwel, P., Nemoto, T., Takehara, K., Ten Dijke, P. and Nakao, A. (2001) Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 187: 117-23.
- [66] Dahler, A.L., Cavanagh, L.L. and Saunders, N.A. (2001) Suppression of keratinocyte growth and differentiation by transforming growth factor beta1 involves multiple signaling pathways. *J Invest Dermatol* 116: 266-74.
- [67] Reisdorf, P., Lawrence, D.A., Sivan, V., Klising, E. and Martin, M.T. (2001) Alteration of transforming growth factor-beta1 response involves down- regulation of Smad3 signaling in myofibroblasts from skin fibrosis. *Am J Pathol* 159: 263-72.
- [68] Schnabl, B., Kweon, Y.O., Frederick, J.P., Wang, X.F., Rippe, R.A. and Brenner, D.A. (2001) The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 34: 89-100.
- [69] Greenwel, P., Inagaki, Y., Hu, W., Walsh, M. and Ramirez, F. (1997) Sp1 is required for the early response of alpha 2(I) collagen to transforming growth factor-beta 1. *J Biol Chem* 272: 19738-19745.
- [70] Inagaki, Y., Truter, S. and Ramirez, F. (1994) Transforming growth factor-beta stimulates alpha 2(I) collagen gene expression through a cis-acting element that contains an Sp1- binding site. 269: 14828-14834.
- [71] Arthur, M.J.P., Iredale, J.P. and Mann, D.A. (1999) Tissue inhibitors of metalloproteinases: Role in liver fibrosis and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 23: 940-943.
- [72] Kurokawa, M., Mitani, K., Imai, Y., Ogawa, S., Yazaki, Y. and Hirai, H. (1998) The t(3;21) fusion product, AML1/Evi-1, interacts with Smad3 and blocks transforming growth factor-beta-mediated growth inhibition of myeloid cells. *Blood* 92: 4003-4012.
- [73] Wotton, D., Lo, R.S., Swaby, L.A. and Massague, J. (1999) Multiple modes of repression by the Smad transcriptional corepressor TGIF. *J Biol Chem* 274: 37105-10.
- [74] Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanai, J., Kusanagi, K., Nemoto, N., Miyazono, K. and Kawabata, M. (1999) c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads. *J Biol Chem* 274: 35269-77.

- [75] Luo, K.X., Stroschein, S.L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S. and Zhou, Q. (1999) The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF beta signaling. *Gene Develop* 13: 2196-2206.
- [76] Sun, Y., Liu, X.D., Eaton, E.N., Lane, W.S., Lodish, H.F. and Weinberg, R.A. (1999) Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signaling. *Mol Cell* 4: 499-509.
- [77] Hanai, J. et al. (1999) Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads - Synergistic induction of the immunoglobulin germline C alpha promoter. *J Biol Chem* 274: 31577-31582.
- [78] Werner, F. et al. (2000) Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem* 275: 36653-8.
- [79] Pardali, E. et al. (2000) Smad and AML proteins synergistically confer transforming growth factor beta1 responsiveness to human germ-line IgA genes. *J Biol Chem* 275: 3552-60.
- [80] Zhang, Y. and Derynck, R. (2000) Transcriptional regulation of the transforming growth factor-beta - inducible mouse germ line Ig alpha constant region gene by functional cooperation of Smad, CREB, and AML family members. *J Biol Chem* 275: 16979-85.
- [81] Verrecchia, F., Pessah, M., Atfi, A. and Mauviel, A. (2000) Tumor necrosis factor-alpha inhibits transforming growth factor-beta /Smad signaling in human dermal fibroblasts via AP-1 activation. *J Biol Chem* 275: 30226-31.
- [82] Zhang, L. P., Takahara, T., Yata, Y., Furui, K., Jin, B., Kawada, N., Watanabe, A. (1999) Increased expression of plasminogen activator and plasminogen aktivator inhibitor during liver fibrogenesis of rats: role of stellate cells. *J of Hepatology* 31: 703-711.
- [83] De Caestecker, M. P., Piek, E., Roberts, A. B. (2000) Role of Transforming Growth Faktor- β Signaling in Cancer. *J. of the National Cancer Institute*, Vol. 92, No. 17: 1388-1402.
- [84] Brenner, D. A., Waterboer, T., Choi, S. K., Lindquist, J. N., Stefanovic, B., Burchardt, E., Yamauchi, M., Gillan, A., Rippe, R. A. (2000) New aspects of hepatic fibrosis. *Hepatology* 2000, 32: 32-38.
- [85] Wrana, J. L., Attiasano, L. (2000) The Smad pathway. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 11: 5-13.

- [86] Ogata, I., Auster, A. S., Matusi, A., Greenwel, P., Geerts, A., D'Amico, T., Fujiwara, K., Kessler, E., Rojkind, M. (1997) Up-Regulation of Type I Procollagen C-Proteinase Enhancer Protein Messenger RNA in Rats with CCl₄-Induced Liver Fibrosis. *Hepatology* 26:611-617.
- [87] Nieto, N., Friedman, S. L., Greenwel, P., Cederbaum, A. I. (1999) CYP2E1-Mediated Oxidativ Stress Induces Collagen Type I Expression in Rat Stellate Cells. *Hepatology* 30:987-996.
- [88] Itho, S., Landström, M., Hermansson, A., Itho, F., Heldin, C. H., Ten Dijke, P. (1998) Transforming Growth Factor β 1 Induces Nuclear Export of Inhibitory Smad7. *J Biol Chem* 273: 29195-29201.
- [89] Nakao A, Fujii M, Matsumura R, Kumano K, Saito Y, Miyazono K, Iwamoto I. (1999) Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Clin Invest* 104(1): 5-11.

Danksagung

Danken möchte ich Dr. Steven Dooley, meinem Doktorvater, für die gute Betreuung dieses Forschungsprojektes.

Auch Herrn Bert Delvoux (simply the best) möchte ich an dieser Stelle danken für seine Unterstützung bei den verschiedenen Experimenten.

Weiter gilt mein Dank Herrn Prof. Gressner, dem Direktor des Institutes für Klinische Chemie und Pathobiochemie der RWTH Aachen, für seine Anregungen und die Bereitstellung von Material und Einrichtungen.

Allen hier nicht genannten Personen die an dieser Forschungsarbeit beteiligt waren.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Frank Berg
Geburtsdatum:	24.03.1975
Geburtsort:	Düsseldorf
Familienstand:	ledig
Konfession:	Röm-Kath.

Schulausbildung

1981 – 1985	Grundschule Yorckstraße in Solingen
1985 – 1995	Gymnasium Vogelsang in Solingen

Studium

04/1996 – 04/1998	Philipps-Universität Marburg
04/1998 – 11/2002	RWTH Aachen
10/2001 – 09/2002	Praktisches Jahr (Klinikum Aachen)
12.11.2002	Abschluß des Medizinstudiums mit der Gesamtnote: Gut
Seit 01.12.2002	Arzt im Praktikum an der Klinik für Kardiologie und Angiologie am Elisabeth-Krankenhaus Essen