

Die Bedeutung von Ceramid und der sauren Sphingomyelinase für die intestinale und hepatische Matrixdegradation



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der naturwissenschaftlichen
Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

Die Bedeutung von Ceramid und der sauren Sphingomyelinase für die intestinale und hepatische Matrixdegradation



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der naturwissenschaftlichen
Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Jessica Bauer

01/2010

aus Wald-Michelbach

Promotionsgesuch eingereicht am:

13.01.2010

Die Arbeit wurde angeleitet von:

PD Dr. med. Florian Obermeier, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg

PD Dr. rer. nat. Thomas Langmann, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Regensburg

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. rer. nat. Thomas Dresselhaus
1. Gutachter (1. Prüfer):	PD Dr. rer. nat. Thomas Langmann
2. Gutachter (2. Prüfer):	PD Dr. med. Florian Obermeier
3. Prüfer:	Prof. Dr. med. Richard Warth
Ersatzprüfer:	Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Sterner

Dissertation

durchgeführt von April 2006 bis Dezember 2009

am Institut für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg

unter Anleitung von

PD Dr. med. Florian Obermeier

Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg

und

PD Dr. rer. nat. Thomas Langmann

Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Regensburg

**Für meine Mama
und meine Schwester**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	13
1.1	Aufbau des menschlichen Darms.....	13
1.2	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	14
1.3	Das Mosaik-Modell und Lipid Rafts in der Plasmamembran	17
1.4	Sphingolipide und Phospholipide	19
1.4.1	Bioaktive Lipide und deren Einfluss auf die Entzündungsreaktion.....	20
1.4.2	Phosphatidylcholin und Lysophosphatidylcholin.....	22
1.5	Struktur und Biosynthese von Ceramid	22
1.5.1	Ceramid-vermittelte Signalwege.....	23
1.5.2	Ceramid und die Bedeutung für chronisch entzündliche Darmerkrankungen	26
1.6	Aktivierung des Sphingomyelinase-Signalweges	26
1.6.1	Saure Sphingomyelinase	27
1.7	Matrix Metalloproteinasen.....	29
1.7.1	Matrix Metalloproteinase-1	31
1.7.2	Matrix Metalloproteinasen und chronisch entzündliche Darmerkrankungen	32
1.7.3	Die Bedeutung der MMPs für Invasion und Metastasierung	33
1.7.4	Transkriptionelle Regulierung der MMP-Genexpression	34
2	Arbeitsziel.....	35
3	Material und Methoden.....	37
3.1	Material	37
3.1.1	Herkunft von Material und Geräten	37
3.1.2	Herkunft von Chemikalien, Enzymen, Zytokinen und Verbrauchsmaterial	37
3.1.3	Fertigkombinationen von Biochemikalien (Kits)	40
3.1.4	Standards und Marker	40

3.1.5	Antikörper	40
3.1.6	Primer und Sonden.....	41
3.1.7	Plasmide	42
3.1.8	Puffer und Lösungen.....	42
3.2	Methoden	45
3.2.1	Zellkultur.....	45
3.2.2	Arbeiten mit DNA.....	47
3.2.3	Arbeiten mit RNA.....	51
3.2.4	Arbeiten mit Mäusen	53
3.2.5	Massenspektrometrie	58
3.2.6	Western Blot.....	59
3.2.7	ELISA.....	62
3.2.8	FACS <i>fluorescence activated cell sorting</i>	64
3.2.9	Vitalitätsassay	65
3.2.10	ASM-Aktivitätsassay	65
3.2.11	Migrations- und Invasionssassay.....	66
3.2.12	Statistik	68
4	Ergebnisse	69
4.1	Die Produktion von MMP-1 nach Stimulation mit IL-1β ist abhängig von der sauren Sphingomyelinase	69
4.1.1	Erhöhte Expression von MMP-1 und MMP-10 mRNA in Caco-2 intestinalen Epithelzellen (IEZ) nach Stimulation mit exogener Sphingomyelinase (SMase) .	69
4.1.2	Ceramidbildung durch die exogene Sphingomyelinase erhöht in Caco-2 IEZ die Sekretion von MMP-1	69
4.1.3	ASM-defiziente Hautfibroblasten zeigen keinen Anstieg der MMP-1 Produktion von MMP-1 nach Stimulation mit IL-1 β	71
4.1.4	Transfektion mit dem Expressionsplasmid pJK-ASM rekonstituiert die MMP-1 Produktion nach Stimulation mit IL-1 β	74
4.1.5	Die ASM hat Einfluss auf die ERK Phosphorylierung nach IL-1 β Stimulation, aber nicht auf die p38MAPK Phosphorylierung.....	78

4.2	Pharmakologische Inhibition der ASM durch Imipramin blockiert die Produktion von MMP-1 in IEZ und Kolon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF)	81
4.2.1	Die pharmakologische Inhibition der ASM durch das trizyklische Antidepressivum Imipramin reduziert die MMP-1 Produktion nach Stimulation mit IL-1 β und TNF.	81
4.2.2	Imipramin reduziert die Phosphorylierung von ERK1/2 nach Stimulation mit IL-1 β	84
4.2.3	Aktivitätsabhängige Serumkonzentration von MMP-1 bei CU und MC Patienten	85
4.3	Veränderung der bioaktiven Lipide bei experimenteller muriner Kolitis in verschiedenen Kolutismodellen	87
4.3.1	Lipidveränderungen und Ceramidbildung bei chronischer DSS Kolitis	87
4.3.2	Lipidveränderungen und Ceramidbildung im CD4 ⁺ CD62L ⁺ Transferkolutismodell ..	89
4.3.3	Induzierte DSS Kolitis bei ASM knock-out Mäusen.....	90
4.3.4	Lipidveränderungen bei chronischer DSS Kolitis in Balb/c Mäusen nach Zugabe von Lecithin im Futter	91
4.4	Einfluss von Ceramid und Imipramin auf die Produktion von MMP-1 und die Invasion von hepatischen Sternzellen und der Tumorzelllinie HepG2	94
4.4.1	Stimulation mit verschiedenen Zytokinen induziert die MMP-1 Produktion in hepatischen Sternzellen und wird durch Imipramin gehemmt.....	94
4.4.2	Die Inkubation mit Imipramin verhindert eine vermehrte Invasion von hepatischen Sternzellen und HepG2 Zellen.....	98
5	Diskussion	104
5.1	Die Produktion von MMP-1 nach Stimulation mit IL-1β ist abhängig von der sauren Sphingomyelinase	104
5.2	Die Pharmakologische Inhibition der ASM durch Imipramin blockiert die Produktion von MMP-1 in IEZ und Kolon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF)	107
5.3	Veränderung der bioaktiven Lipide bei experimenteller muriner Kolitis in verschiedenen Kolutismodellen	110

5.4	Einfluss von Ceramid und Imipramin auf die Produktion von MMP-1 und die Invasion von hepatischen Sternzellen und der Tumorzelllinie HepG2	113
6	Zusammenfassung.....	117
7	Ausblick	118
8	Literaturverzeichnis.....	120
9	Anhang	138
10	Danksagung.....	141
11	Erklärung	142

Abkürzungen

AK	Antikörper
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
ASM	saure Sphingomyelinase
ASM ^{-/-}	ASM-defiziente Fibroblasten
ASM ^{+/+}	humane Hautfibroblasten
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CLPF	Colon Lamina-Propria Fibroblasten
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dextran Natriumsulfat (<i>dextran sulphate sodium</i>)
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (<i>enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>)
ERK 1/2	<i>extracellular signal regulated kinase 1/2</i>
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fötales Rinderserum (<i>Fetal calf serum</i>)
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
h	Stunde(n)
HCC	<i>hepatic cellular carcinoma</i> , HepG2 Zellen
HSC	hepatische Sternzellen (<i>hepatic stellate cells</i> , ITO Zellen)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IEZ	intestinale Epithelzellen
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
LPC	Lysophosphatidylcholin

M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
n	Anzahl der Experimente
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
p	statistischer P-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PC	Phosphatidylcholin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
SM	Sphingomyelin
SMase	Sphingomyelinase
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>sideward scatter</i>)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen/Minute
ÜN	über Nacht
µl	Mikroliter
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Aufbau des menschlichen Darms

Der menschliche Darm stellt mit einer Oberfläche von ca. 300 m² die größte Kontaktfläche des Körpers dar. Die Oberfläche der Darmschleimhaut ist damit etwa 50-mal größer als die der Haut und erfüllt zwei gegensätzliche Funktionen, die sich auch im Aufbau der Darmwand widerspiegeln: Zum einen ist sie für die Resorption von Nährstoffen verantwortlich, zum anderen muss sie sich und den ganzen Organismus vor einer permanenten Exposition mit Verdauungsenzymen, Nahrungsantigenen, pathogenen Keimen und Bakterien sowie vor deren Eindringen aus dem Darmlumen in die Mukosa und die Zirkulation schützen.

Die Darmwand besteht aus Schleimhaut oder *Mukosa* (Epithel, *Lamina Propria*, *Lamina Muscularis Mucosae*), *Submukosa*, *Muscularis Propria* und *Serosa*. Zum Darmlumen wird die *Mukosa* durch die Epithelzellschicht begrenzt, die auf einer Basalmembran fixiert ist. Den größten Teil der *Mukosa* stellt die *Lamina Propria* dar, welche aus Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Kapillaren und extrazellulärer Matrix besteht. An die *Lamina Propria* schließt sich als letzte Schicht der *Mukosa*, die *Lamina Muscularis Mucosae* an, auf die dann die *Submukosa* folgt. Die *Lamina Muscularis Mucosae* ist eine etwa 5-Zellen-dicke Schicht von glatten Muskelzellen und spielt bei der Darmmotilität eine wesentliche Rolle. Die *Submukosa* besteht aus einem losen Maschenwerk von dünnen Kollagenfibrillen, die die *Mukosa* mit der *Muscularis Propria* verbindet und Blutgefäße und Lymphbahnen zur *Muscularis* führt (Abbildung 1.1). Die Darmwand wird durch die *Serosa* begrenzt, die beim Dünndarm durch das Mesenterium an der hinteren Bauchwand befestigt ist (Mesenterialwurzel). Die vorherrschenden Bindegewebsproteine im Darm sind Kollagene, die von mesenchymalen Zellen wie glatten Muskelzellen und Fibroblasten produziert werden. Sie werden von mesenchymalen Zellen wie glatten Muskelzellen und Fibroblasten produziert. Dabei handelt es sich vor allem um Kollagen des Typs I und III (1).

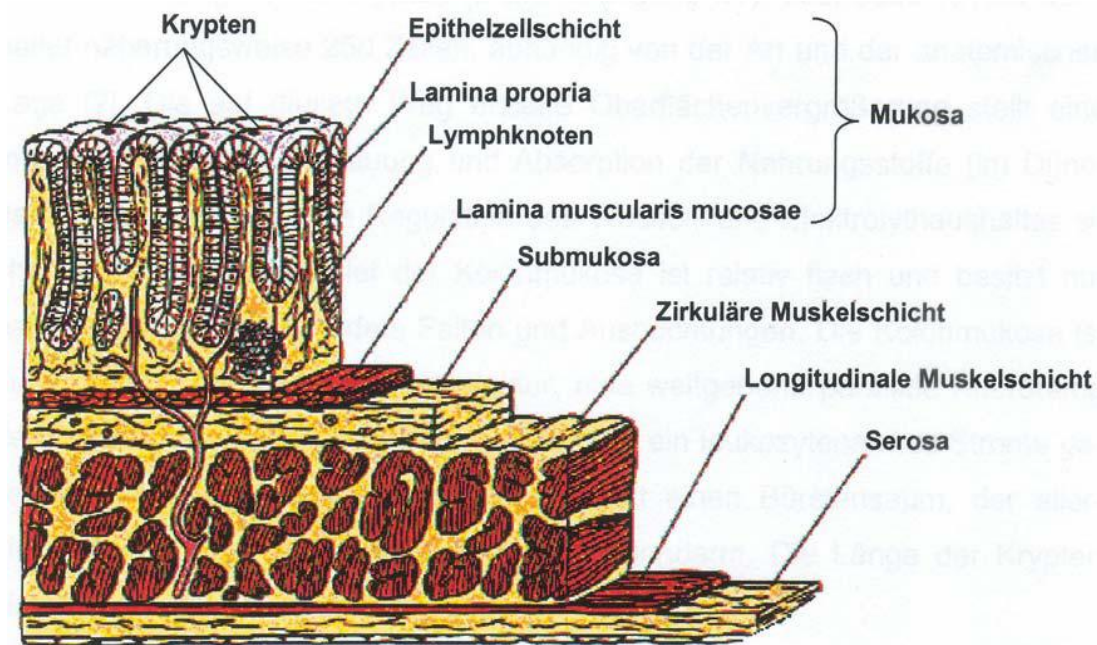


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Kolonmukosa. Erklärungen siehe Text.

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Zu den chronisch verlaufenden entzündlichen Darmerkrankungen (CED) zählen der Morbus Crohn (MC) und die Colitis ulcerosa (CU), an denen insbesondere junge Menschen zwischen dem 20. und dem 40. Lebensjahr erkranken. Allerdings gibt es zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr einen weiteren Anstieg der Neuerkrankungsrate. Frauen sind dabei fast dreimal häufiger betroffen als Männer (2, 3). Bei einer Prävalenz in Deutschland von 250-500/100.000 Einwohnern leiden derzeit ca. 300.000 Bundesbürger an CED.

Es konnten regionale Unterschiede gezeigt werden. Die höchste Inzidenz an CED wird in Nord- Amerika und Europa beobachtet. In Süd-Amerika, Asien und Afrika kommen hingegen wesentlich weniger Fälle vor, jedoch mit steigender Tendenz. Zudem werden neben den geographischen auch ethnische Unterschiede verzeichnet. In den USA sind Kaukasier deutlich häufiger betroffen als Afroamerikaner, letztere wiederum häufiger als Asiaten.

Die Ätiologie der CED ist bisher noch nicht vollständig verstanden. Es spielen viele Faktoren bei der Erkrankung eine Rolle. Es wird deswegen bei CED von einer komplexen Erkrankung gesprochen. Beide Erkrankungen gehen mit einem Verlust der Mukosa-Integrität, verminderter Resorptionsleistung und verstärkter Sekretion

bzw. Exkretion von Flüssigkeit einher. Unterschiede zwischen MC und CU bestehen hinsichtlich makroskopischen und histologischen Erscheinungsbildes sowie im Verteilungsmuster. Während eine CU Erkrankung auf das Kolon beschränkt bleibt, kann beim MC der gesamte Gastrointestinaltrakt vom Mund bis zum Anus betroffen (Abbildung 1.2).

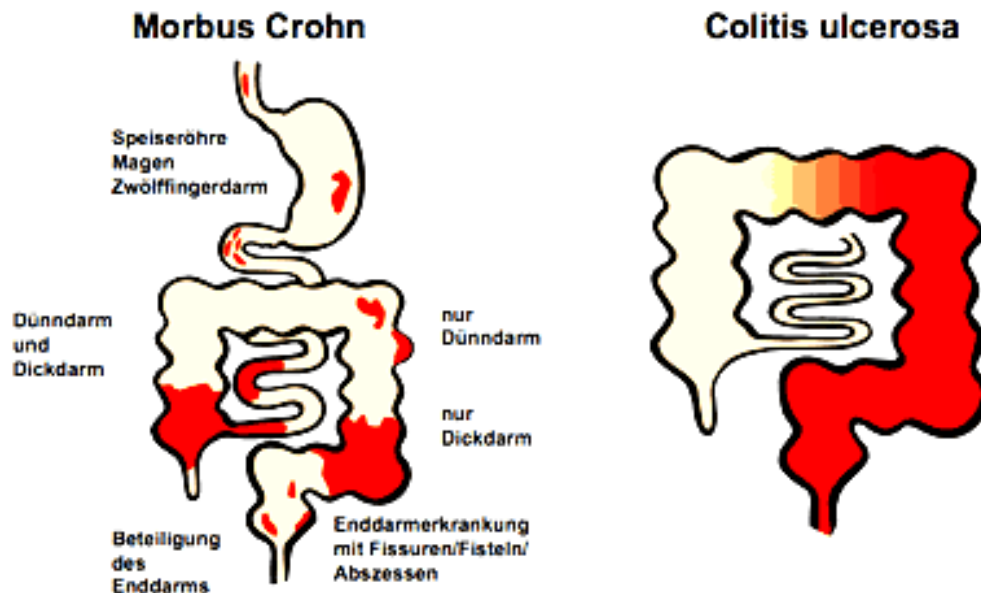


Abbildung 1.2: Lokalisation der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa. Quelle: www.kompetenznetz-ced.de

Charakteristisch für den MC ist, dass nur einzelne Darmsegmente krankhaft verändert sind und zwischen ihnen gesunde Abschnitte liegen. Besonders häufig sind der letzte Abschnitt des Dünndarms (terminales Ileum), die Übergangsregion vom Dünndarm in den Dickdarm (Ileozökalregion) und das Kolon verändert. Das Zusammenspiel von mikrobieller Darmflora und intestinalem Immunsystem sowie Ernährungsgewohnheiten stellen bei der Entstehung von CED einen wichtigen Faktor dar (4-6). Im Gastrointestinaltrakt finden Immunreaktionen auf pathogene Substanzen statt, während gleichzeitig Antigene aus der Nahrung sowie physiologische Bakterienflora toleriert werden. Beim gesunden Menschen wird durch den ständigen Kontakt der *Lamina propria* mit Antigenen eine milde, genau regulierte chronische Entzündung aufrechterhalten. Kommt es zu einer Permeabilitätsstörung des Darmepithels, gerät die Regulation aus dem Gleichgewicht. Vor dem Hintergrund

einer genetischen Disposition und unter Einfluss exogener Faktoren kann dieses Ungleichgewicht in eine CED münden. Rauchen ist ebenfalls ein wichtiger Risikofaktor für einen aggressiven Krankheitsverlauf und das Rezidiv bei MC. Bei einer CU-Erkrankung hat das Rauchen in mehreren Studien hingegen einen protektiven Effekt auf die Krankheitsmanifestation gezeigt (5).

Andere Befunde deuten bei beiden Erkrankungen auf eine besondere Rolle von genetischen und auch immunologischen Faktoren. So gilt eine positive Familienanamnese als Risikofaktor bei MC. Aus familiären Untersuchungen und Konkordanzstudien an Zwillingen kann auf eine genetische Prädisposition für MC geschlossen werden. Monozygote Geschwister haben bei Erkrankung ihres Zwillings ein 15-35-fach erhöhtes Risiko an MC zu erkranken als die Durchschnittsbevölkerung (6, 7). Durch Kopplungsanalysen konnten unter anderem Risikoregionen auf den Chromosomen 12 und 16, sowie weitere potentielle Regionen auf den Chromosomen 3, 7 und 11 im Zusammenhang mit einer MC Erkrankung identifiziert werden. So treten bei MC-Patienten gehäuft Varianten (*single nucleotide polymorphisms* (SNP)) von NOD2/CARD15 auf dem Chromosom 16 auf (8, 9). Das NOD2/CARD15 Protein erkennt zytoplasmatisch Bestandteile der Bakterienwand, die Muramyl-dipeptide (MDP) und interagiert mit der Kinase RICK/RIP2 (*RIP-like interacting caspase-like apoptosis-regulatory protein kinase/receptor interacting protein2*). Diese bindet den IKK-Komplex 1 (8), der für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B über die Phosphorylierung und Degradierung des endogenen NF- κ B-Inhibitors I κ B- α verantwortlich ist (10). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine heterozygote Mutation zu einem doppelten bis vierfachen Risiko führt, einen MC zu entwickeln. Homozygote bzw. mehrere *compound* heterozygote NOD2-Mutationen steigern das Risiko um das 20 – 40-fache (11, 12). Die Annahme einer Barrierestörung im Intestinum konnte bei Patienten mit MC durch das vermehrte Auffinden von intrazellulären Bakterien in intestinalen Epithelzellen und in tieferen Schichten der Mukosa bestätigt werden (12). Bei Patienten kann diese erhöhte Permeabilität schon lange vor dem Auftreten der ersten Krankheitssymptome nachgewiesen werden (12-15). Interessanterweise lassen sich diese Beobachtungen nicht nur auf eine mukosale Entzündungsaktivität zurückführen, sondern sind auch mit einer genetischen Prädisposition verbunden, da Verwandte von CED-Patienten eine höhere intestinale Permeabilität im Vergleich zur Normalbevölkerung aufweisen (4, 15).

Bedingt durch die entzündlichen Veränderungen und deren Folgen an der Darmwand kommt es beim MC zu verschiedenen Symptomen wie Malabsorption, krampfartigen Schmerzen, Diarrhöen und Gewichtsverlust. Abszesse, Fisteln und Fissuren können als perianale Veränderungen erscheinen. Des Weiteren können Stenosen, Strikturen sowie Perforationen mit darauffolgender Peritonitis auftreten. Bei einer CU-Erkrankung sind die Hauptsymptome blutig-schleimige Diarrhöen, rektale Blutungen, Ulzerationen und Tenesmen. Es können ebenfalls Perforationen mit anschließender Peritonitis aber auch toxisches Megakolon bis hin zum häufig multifokalen, spät diagnostizierbarem Kolonkarzinom entstehen.

Bei beiden Erkrankungen sind jedoch auch Manifestationen außerhalb des Darmes, so genannte extraintestinale Veränderungen, möglich. Diese können sich z.B. in Form von Gelenkentzündungen (Arthritis), Anämie sowie in Entzündungen der Augen, der Haut, der Gallenwege und der Leber (primär sklerosierende Cholangitis) äußern.

1.3 Das Mosaik-Modell und Lipid Rafts in der Plasmamembran

1972 entwickelten Singer und Nicholson das klassische Mosaik-Modell der Zellmembran (16). Nach diesem Modell ist die Doppellipidschicht eine zweidimensionale Lösung gerichteter Lipide und globulärer Proteine. Lipide und integrale Membranproteine können lateral ungehindert in die Lipidmatrix diffundieren (laterale Diffusion), sofern dies nicht durch spezifische Wechselwirkungen unterbunden wird. Lipide, also Phospho- und Glykolipide, können neben der lateralen Diffusion noch eine transversale Diffusion, den so genannten *Flipflop* ausführen, welcher aber viel langsamer abläuft. Eine dritte Klasse der Lipide, das Cholesterin, in großen Mengen am Membranaufbau beteiligt, erhöht die Viskosität der Membran. Zusätzlich kann die Fluidität durch Variation der Doppelbindungsanzahl und Länge der Fettsäurereste reguliert werden. Höhere Temperaturen, kurze Fettsäurereste und viele Doppelbindungen erhöhen ebenfalls den Grad der Fließfähigkeit (16).

1988 wurde von Kai Simons das Modell überarbeitet und es entstand das Modell der Lipid Rafts (17, 18). Es gibt in der Plasmamembran bestimmte Bereiche, in denen sich spezielle Lipide in höherer Konzentration anlagern als in der übrigen Membran. Lipid Rafts ordnen sich als flüssigkristalline Phase an. Das Beobachten der Lipid Rafts

ist aufgrund ihrer geringen Größe im Lichtmikroskop schwierig, jedoch mittels der Fluoreszenzmikroskopie möglich. Benutzt werden z.B. Farbstoffe, wie Laurdan oder kopfmarkierte Farbstoffe wie Texas Red, die sich zwischen den Domänen aufgrund ihrer Größe bevorzugt in der ungeordneten Phase einlagern (Abb. 1.3).

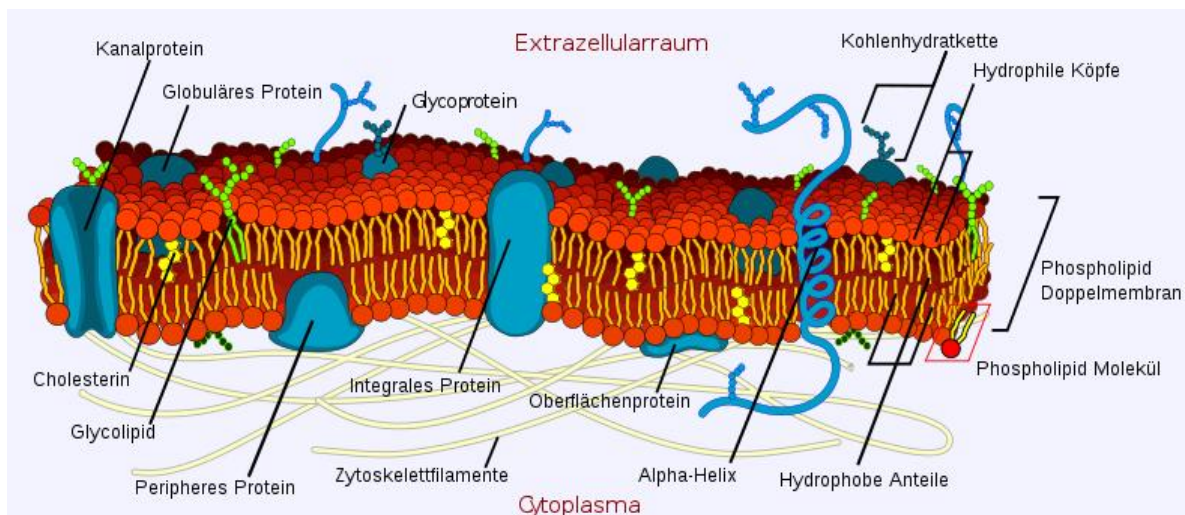


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Zellmembran. Erklärung im Text.

Lipid Rafts sind Mikrodomänen der Plasmamembran, die reich an Sphingolipiden und Cholesterin sind (17, 19, 20). Die biologische Membran besteht aus drei verschiedenen Lipiden: den Sphingolipiden, Cholesterin und den Glycophospholipiden.

Charakteristisch für Sphingolipid- und Cholesterinreiche Domänen sind deren Unlöslichkeit in nichtionischen Detergenzien bei niedrigen Temperaturen. Aus diesem Grund werden sie auch als *detergent-insensitive-glycosphingolipid-enriched microdomains* (DIGs) bezeichnet (20). Die Lipid Rafts enthalten ansässige Glycophosphatidylinositol-verankerte (GPI-*anchored*) Proteine; doppelt acylierte Proteine wie z.B. Tyrosin-Kinasen der Src-Familie, G-alpha Untereinheiten der heterotrimeren G Proteine und endotheliale *Nitric Oxid Synthase* (eNOS); Cholesterin-gekoppelt und Palmitat-verankerte Proteine wie Hedgehog (21) und transmembrane Proteine (22).

Cholesterin stabilisiert die Lipid Rafts dadurch, dass es die Lücken zwischen den langen und massigen Glycerolsphingolipiden auffüllt. Durch pharmakologische

Extraktion des Cholesterins beispielsweise mit Methyl- β -cyclodextrin oder durch das Antibiotikum Filipin können die Lipid Rafts zerstört werden. Die starke Interaktion und die hohe Konzentration von den Sphingolipiden und Cholesterin in der Plasmamembran führen zur Bildung von Mikrodomänen (20). Diese Mikrodomänen sind reich an Ceramid und beeinflussen die Signaltransduktion, u.a. weil sie die Eigenschaften besitzen, Rezeptormoleküle zu rekrutieren (23). Vielfältige Stimuli führen zu einer Freisetzung von Ceramid wie CD95 (24-29), CD28 (30), TNF (31-33), CD40 (34), DR5 (35), CD5 (36), LFA-1 (37), Fc γ RII (38), CD20 (39), der interleukin-1 (IL-1) Rezeptor (40), der *platelet-activating factor* (PAF) (41), Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* (42), *Staphylococcus aureus* (43), *Neisseria gonorrhoeae* (44), Sindbis virus (45), Rhinovirus (46); oder die Behandlung mit Gammastrahlung (47, 48), UV-Licht (49, 50), Doxorubicin (51), Cisplatin (52), Resveratrol (53), Thalidomid (54) und Entwicklungsprozesse.

Einige Pathogene benötigen Sphingolipide und Cholesterin, um eine Säugetierzelle zu infizieren (55). Das Aerolysintoxin (56), das Cholera toxin (57) und Shigatoxin (58) dringen über Lipid Rafts in die Säugetierzelle ein. Lipid Rafts sind auch bei Erkrankungen durch Prionen, Alzheimer und Krebs involviert (59).

1.4 Sphingolipide und Phospholipide

Sphingolipide und Phospholipide sind wichtige Bestandteile der Zellmembran und gehören zur Verbindungsklasse der polaren Membranlipide.

Phospholipide sind phosphorhaltige, amphiphile Lipide. Sie setzen sich aus einem hydrophilen Kopf und zwei hydrophoben Kohlenwasserstoffschwänzen zusammen. Phospholipide bilden in Wasser eine Lipiddoppelschicht, das sogenannte Liposom. Die häufigsten in einer Zellmembran auftretenden Phospholipide sind Phosphatidylcholin (auch Lecithin; PC), Lysophosphatidylcholin (LPC), Phosphatidylethanolamin (auch Kephalin; PE), Phosphatidylserin und Sphingomyelin (Tabelle 1.1). Phospholipide gliedern sich aufgrund ihres chemischen Aufbaus in zwei Gruppen, die Phosphoglyceride und die Sphingolipide (60).

Sphingolipide leiten sich im Gegensatz zu den Phospholipiden vom Sphingosin ab. Sie setzen sich in Säugetierzellen chemisch aus dem langkettigen Aminoalkohol Sphingosin, einer polaren Kopfgruppe und einer Acylgruppe, wie eine Fettsäure, die über eine Amid-Bindung mit dem C2-Atom des Sphingosins verbunden ist, zusammen. Das Sphingosinrückgrat ist über einen Phosphatrest durch eine Esterbindung mit einer geladenen Gruppe wie Serin, Ethanolamin oder Cholin verbunden. Handelt es sich bei der Kopfgruppe um einen oder mehrere Zucker, erfolgt die Bindung ohne einen Phosphatrest direkt am Sphingosin-Rückgrat mittels einer glykosidischen Bindung. Sphingolipide kommen vermehrt in Nervengewebe vor und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung. Die Entdeckung der Hemmung von Proteinkinase C (PKC) durch Sphingosin führte zu der Erkenntnis, dass Sphingolipide als *second messenger* fungieren (61).

Es gibt drei Haupttypen von Sphingolipiden: Ceramide und die daraus abgeleiteten Sphingomyeline und Glycosphingolipide. Ceramide sind die einfachste Gruppe der Sphingolipide, ihr Rest wird nur durch ein Wasserstoffatom gebildet. Sie sind nur ein Sphingosinmolekül, das durch eine Amidbindung an eine Fettsäure gebunden ist.

1.4.1 Bioaktive Lipide und deren Einfluss auf die Entzündungsreaktion

Lipide können als Signalmoleküle wirken, die die Eigenschaft haben, eine physiologische Reaktion auszulösen. Ein Ungleichgewicht des Lipidmetabolismus führt zu einer Krankheitsprogression u.a. bei chronischen Entzündungsreaktionen, bei Autoimmunkrankheiten, Allergien, Krebs, Arteriosklerose, Hypertonie, Herzhypertrophie, stoffwechsel- und degenerativen Krankheiten (62). Viele der Lipidsignale, deren modifizierende Enzyme und nachgeschaltete Ziele regulieren verschiedene Krankheiten.

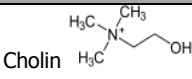
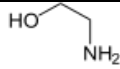
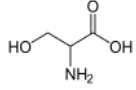
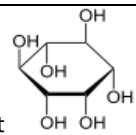
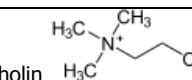
Name	Polare funktionelle Gruppe
Phosphatidylcholin	 Cholin
Phosphatidylethanolamin	 Ethanolamin
Phosphatidylserin	 Serin
Phosphatidylinositol	 Inosit
Sphingocholine	 Cholin
Glykolipide	Monosaccharide Oligosaccharide

Tabelle 1.1: Die verschiedenen Phospholipide und deren polare Gruppen.

Bioaktive Lipide wie z. B. Eicosanoide (63), Phosphoinositide, Sphingolipide und Fettsäuren kontrollieren wichtige zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Apoptose, Stoffwechselprozesse und Migration.

Sphingolipide wie Ceramid, Ceramid-1-Phosphat und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) spielen eine entscheidende Rolle bei der Entzündungsregulation. Diese beinhalten die Aktivierung von pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Zelltypen und die Induktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2), der Hauptproduzent des pro-inflammatorischen Prostaglandins (64, 65). Jedes Sphingolipid wird anders aktiviert. Der Anstieg von Ceramid führt in der Plasmamembran zu Ceramid-reichen Domänen, welche Signalkomplexe anreichern. S1P agiert mittels G-Protein gekoppelten S1P Rezeptoren (66).

Aus diesem Grund könnten Lipide zusammen mit den assoziierten Enzymen und Rezeptoren als Medikamente für die Behandlung von Entzündungsreaktionen eingesetzt werden.

1.4.2 Phosphatidylcholin und Lysophosphatidylcholin

Phosphatidylcholin (PC) oder auch Lecithin und Lysophosphatidylcholin (LPC) sind mit einem Anteil von ca. 90 % die größte Gruppe der Phospholipide in der Plasmamembran (67-69). PC ist verantwortlich für die Herstellung einer protektiven hydrophoben Oberfläche und spielt eine große Rolle bei der mukosalen Abwehr. Eine fehlerhafte PC-Schicht wirkt negativ auf die Entwicklung von Entzündung und Ulzeration (70). Dieser Effekt wurde auch bei Menschen mit viraler Immundefizienz und *Helicobacter pylori* Infektion gezeigt. Die Pathogenese mit *H. pylori* zeigt sich in der Schädigung der Phospholipid Barriere und führt zu einer erhöhten Phospholipase Aktivität (71-74). In Mucusproben des Dickdarms bei Patienten mit CU konnte gezeigt werden, dass die PC und LPC Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Kontrollen oder Patienten mit MC signifikant reduziert vorliegt (75). In intestinalen Perfusionsstudien bei der Ratte wurde außerdem gezeigt, dass PC nur im Jejunum und Ileum und nur geringfügig im Kolon sezerniert wird (76). Die Autoren vermuten, dass es durch den geringen Anteil von PC im Mucus, zu einer chronisch inflammatorischen Funktionsstörung des Kolons kommt (75). In der intestinalen Epithelzelllinie Caco-2 Zellen wurde deutlich, dass PC auch eine anti-inflammatorische Wirkung besitzt (77). Bei LPC zeigt sich eine regulatorische Antwort auf die Entzündungszellen in der Mukosa und es führt zu einer Reduzierung der Entzündung. Für LPC konnte außerdem gezeigt werden, dass es in humanen Monozyten die Produktion von IL-1 β induziert (78). Diese Daten lassen erkennen, dass die Konzentrationen von PC und LPC im Kolon für die Verminderung der Entzündungsreaktion von Bedeutung ist.

1.5 Struktur und Biosynthese von Ceramid

Ceramid besteht aus Sphingosin, einem C₁₈-Aminoalkohol, der durch eine Amidbindung an eine Fettsäure gebunden ist. Dieser Fettsäurerest besitzt zwischen 16-24 Kohlenwasserstoffatomen (79) (Abbildung 1.4)

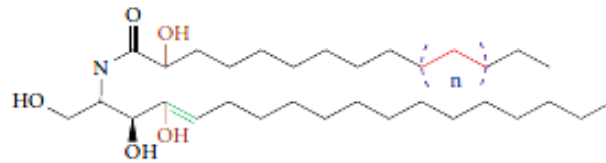


Abbildung 1.4: Chemische Formel von Ceramid. Nach Kolesnick *et al.*, 2000

Die Freisetzung von Ceramid und damit die Erhöhung der zellulären Ceramidkonzentration kann auf drei verschiedenen Wegen erfolgen:

Durch die Hydrolyse von Sphingomyelin mittels Sphingomyelinasen, die *de novo*-Synthese oder der Synthese von Glycosphingolipiden (80).

Die *de novo* Synthese beginnt mit der Kondensation von L-Serin und Palmitoyl-Coenzym A zu 3-Dehydrosphinganim. Dieser Schritt wird durch die Serin-Palmitoyl-Transferase katalysiert. Die 3-Dehydrosphinganim-Reduktase katalysiert nachfolgende Reaktion zu D-*erythro*-Sphinganim. Die langkettige Fettsäure wird mittels der Sphinganim-Acyltransferase (Ceramid-Synthase) auf die Aminogruppe transferiert, wodurch D-*erythro*-Dihydroceramid entsteht (81). Zuletzt fügt eine Desaturase eine trans 4,5-Doppelbindung ein, so dass Ceramid entsteht. Limitierender Faktor für die Neusynthese sind die Vorkommen von Serin und Palmitinsäure und die Enzymaktivitäten aller beteiligten Enzyme. Die Ceramidbildung findet im endoplasmatischen Retikulum statt (82), anschließend werden Glycosphingolipide und Phosphosphingolipide im Golgi-Apparat gebildet (83). Nachfolgend gelangen die Sphingolipide mittels Membranvesikel an die Zelloberfläche.

Der zweite Weg läuft über die Hydrolyse des membranintegrierten Sphingomyelins durch Sphingomyelinasen ab (84) und wird im Kapitel 1.6 näher erläutert.

Der dritte Weg, der Salvage Weg, läuft über die Ceramid abbauenden Enzyme Sphingomyelin-Synthase, Glycosylceramid- bzw. Galactosylceramid Synthase, Ceramidase oder Ceramid-Kinase im Endo-Lysosom ab (85, 86) (Abbildung 1.5).

1.5.1 Ceramid-vermittelte Signalwege

Es sind bis zum heutigen Zeitpunkt verschiedene Targetproteine von Ceramid bekannt (Abbildung 1.6). Im Folgenden werden die wichtigsten Signalwege näher beschrieben.

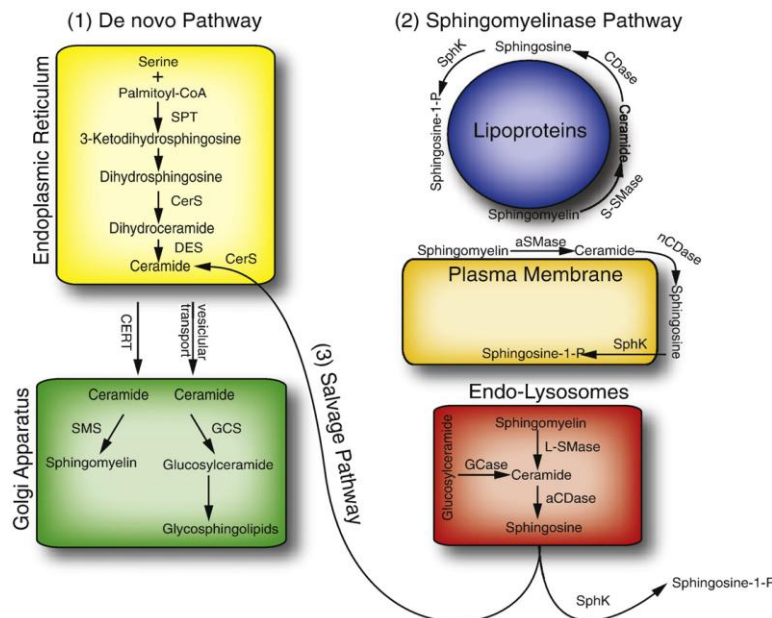


Abbildung 1.5: Spingolipidmetabolismus. (1) Die *De novo* Synthese von Ceramid im endoplasmatischen Retikulum. Ceramid wird danach zum Golgi Apparat transportiert mittels vesikulären Transport oder Ceramid Transfer Protein (CERT). (2) Sphingomyelinweg. Die Hydrolyse des Sphingomyelin durch die saure Sphingomyelinase an der Plasmamembran oder im Endolysosom. (3) Der Salvage Weg. Nähere Erklärungen im Text.

SPT: Serin-Palmitoyltransferase; CerS: (dihydro)Ceramid-Synthase; DES: Dihydroceramid Desaturase; CERT: Ceramid Transferprotein; SMS: Sphingomyelin-Synthase; GCS: Glucosylceramid-Synthase; aSMase: saure Sphingomyelinase; S-SMase: sekretorische Sphingomyelinase; L-SMase: lysosomale Sphingomyelinase; Gcase: Glucosylceramidase; aCDase: saure Ceramidase; nCDase: neutrale Ceramidase; SphK: Sphingosin-Kinase. Nach Jenkins et al., 2009 (86)

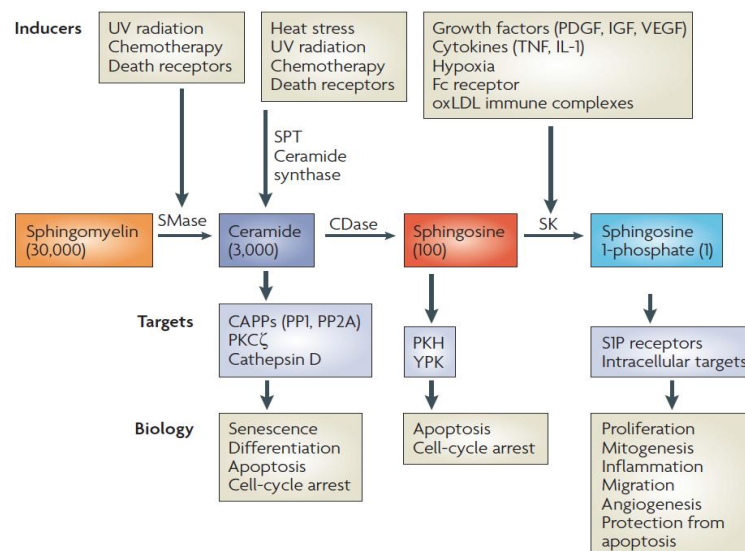


Abbildung 1.6: Überblick über die Rolle der Spingolipide. Das Schema zeigt die Beteiligung der bioaktiven Lipide Ceramid, Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) in der zellbiologischen Reaktion. Nähere Erklärungen im Text.

CAPP: Ceramid-aktivierende Ser-Thr Phosphatase; IGF: Insulin-like Wachstumsfaktor; IL-1: Interleukin-1; oxLDL: *oxidized low-density lipoprotein*; PDGF: *platelet-derived growth factor*; PKC, Proteinkinase C; PKH: PKB Homologon; TNF: *tumour necrosis factor*; VEGF: vaskulärer Endothel Wachstumsfaktor; YPK: *yeast protein kinase*. Nach Hannun und Obeid, 2008 (87)

Die Ceramid-aktivierte Protein-Phosphatase (CAPP) wird nur spezifisch durch Ceramid stimuliert und gehört zur Familie der Serin/Threonin Protein-Phosphatase 2A (88).

Sie ist in die apoptotische Antwort der Zelle und in die Hemmung des Zellwachstums involviert. Die Proliferationshemmung erfolgt über die Suppression des Onkogens *c-myc* (89). Die CAPP dephosphoryliert das Retinoblastom-Genprodukt führt zu einer Inaktivierung des Onkogens *c-myc* und somit zur Zellwachstumshemmung (90).

Die Ceramid-aktivierte Protein Kinase (CAPK) ist ein 97kDa großes, membrangebundenes Protein (91) und gehört zur Familie der Prolin-gerichteten Serin/Threonin-Kinasen (92). Sie wird durch TNF, IL-1 β , bakterielle Sphingomyelinasen und Ceramid-Analoga aktiviert (93) und ist der Kinase-Suppressor von Ras (80). CAPK leitet dann den Signalweg weiter, der zur Proliferation und Entzündung führt. Der TNF Rezeptor besitzt eine *neutral SMase activating domain* (NSD), welche an das Protein FAN koppelt, welches wiederum an die neutrale SMase bindet. Dadurch wird Ceramid durch die Sphingomyelin Hydrolyse aktiviert und nachfolgend führt dies zu einer CAPK-Stimulation (94). CAPK aktiviert Raf-1, welches die *mitogen activated protein kinases* (MAPK) stimuliert und nachfolgend Phospholipase A₂ aktiviert (95). Die Phospholipase A₂ führt zur Freisetzung der Arachidonsäure aus Phosphatidylcholin wodurch es zur Entzündungsreaktion kommt (96, 97).

Die Proteinkinase C-Isoformen (PKC) α , δ und ϵ werden durch Ceramid inaktiviert, indem sie von der Plasmamembran in das Zytosol transloziert werden (98). Diese Inaktivierung ist für die Apoptose-Induktion durch Ceramid wichtig, ohne die es zu einer Blockierung der Apoptose kommt (99). Die Isoform PKC ζ wird durch Ceramid zur Autophosphorylierung angeregt und führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (100).

Die Phospholipase D (PLD) ist für den intrazellulären Vesikeltransport wichtig (101). Der Vesikeltransport wird durch die Hemmung der PLD über Ceramid unterbunden (102, 103). Die Ceramid-induzierte Apoptose geht mit einer niedrigen PLD-Aktivität einher (104).

Die Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) oder auch *jun nuclear kinase* (JNK), gehören zur MAPK Superfamilie und werden für die stress-vermittelte Apoptose benötigt. Die Apoptose kann durch ionisierende Strahlung oder Hitzeschockproteinen eingeleitet werden, welche unter Umgehung der TNF I oder Fas-Rezeptoren direkt

die SMasen aktiviert (105). Des Weiteren führt die Stimulation der SAPK zu einer Aktivierung von NF- κ B, sowie AP-1 und der daraus resultierenden Einleitung der Apoptose (103).

1.5.2 Ceramid und die Bedeutung für chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Bei der Pathogenese von CED besteht eine gestörte Immunantwort mit konsekutivem Epithelzellverlust. Viele pro-inflammatorische Zytokine und Rezeptoren wie TNF, CD95, IL-1 β oder PAF sind an der Entzündungsreaktion beteiligt. Für die Epithelzellapoptose spielen Rezeptoren, wie der TNF-Rezeptor, eine große Rolle (106, 107) und eine Stimulation der intestinalen Epithelzellen durch TNF oder CD95 führt zu einer Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-8 (108).

Viele der bei CED relevanten Signalmoleküle bewirken eine Aktivierung von Sphingomyelinasen (SMasen). Neben Rezeptoren der TNF-Familie induzieren mitunter inflammatorische Mediatoren wie IL-1 (109, 110), INF- γ (111) oder PAF (112) eine Aktivierung der ASM. IL-1 führt zu einer vermehrten Ceramidbildung, ohne jedoch Apoptose zu induzieren (109, 110). Exogene SMasen bewirken außerdem eine Permeabilitätserhöhung, wie es auch im entzündeten Darm der Fall ist (113).

1.6 Aktivierung des Sphingomyelinase-Signalweges

Die Hydrolyse des membrangebundenen Sphingomyelins durch Sphingomyelinasen (SMasen) spielt wegen seiner Schnelligkeit und leichten Regulierbarkeit die größte Bedeutung bei der Regulation des zellulären Ceramidspiegels (114). Die Enzymfamilie ist aufgrund des Phospholipase-C-ähnlichen Hydrolysemechanismus' eines einzigen Substrates, des Sphingomyelins, funktionell definiert (115). Bis heute konnten sechs verschiedene Arten von SMasen in Säugersystemen charakterisiert werden (116). Diese unterscheiden sich nicht nur durch ihr pH-Optimum und ihre Kofaktoren, sondern auch durch die Lokalisation, Aktivierungsmechanismen und Beteiligung an verschiedenen zellulären Prozessen (Abbildung 1.6):

Die lysosomale Zn^{2+} -unabhängige saure SMase (pH 4,5-5) ist in fast allen Geweben präsent. Eine genetische ASM-defizienz ist bei der Niemann-Pick'schen Erkrankung Typ A und B bekannt (117-120).

Die im Serum sezernierte Zn^{2+} -abhängige saure SMase (pH 4,5-5) (121).

Die zytosolische Mg^{2+} -unabhängige neutrale SMase, die ihr Optimum bei pH 7,4 erreicht (122).

Die Plasmamembran gebundene Mg^{2+} -abhängige SMase (123) und die alkalische SMase (pH 9) (124).

Die bakterielle Sphingomyelinase-Phospholipase C kann in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Das sogenannte α -Toxin von *Clostridium perfringens* (125) und das Produkt des *plc* Gens von *Listeria monocytogenes* (126). Beide können Phosphatidylcholin und Sphingomyelin, als auch andere Glycerophospholipide als Substrat benutzen (127, 128). Beide Enzyme sind strukturell zu der Phospholipase C von *Bacillus cereus* zugeordnet.

Bei der Hydrolyse von Sphingomyelin durch die verschiedenen SMasen entsteht Phosphorylcholin und Ceramid. Das geladene Phosphorylcholin wird in das wässrige Milieu entlassen und das freigesetzte Ceramid bleibt innerhalb der Zellmembran. Dort wirkt es als *second messenger* bei zellulären Prozessen wie Differenzierung, Proliferation, Apoptose oder Inflammation.

Die Hydrolyse von Sphingomyelin durch die SMasen kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Ein Auslöser ist zellulärer Stress, der durch UV-Strahlung, Oxidantien, Zytostatika, radioaktive Strahlung oder Hitzeschock induziert werden kann (23), ein anderer ist die rezeptorvermittelte Stimulation. Zu den extrazellulären Stimulanzen zählt man u.a. INF- γ , TNF, IL-1, CD95, CD40 oder der PAF Rezeptor (23). Weitere Stimulanzen wurden in Kapitel 1.3 näher erläutert. Diese Auslöser bewirken dann eine transiente oder permanente Erhöhung des endogenen Ceramidspiegels.

1.6.1 Saure Sphingomyelinase

In dieser Arbeit wurde insbesondere die saure Sphingomyelinase (ASM) und ihr Einfluss auf inflammatorische Reaktionen durch Ceramidbildung näher untersucht.

Die ASM führt zu einer Hydrolyse von Sphingomyelin zu Phosphorylcholin und Ceramid.

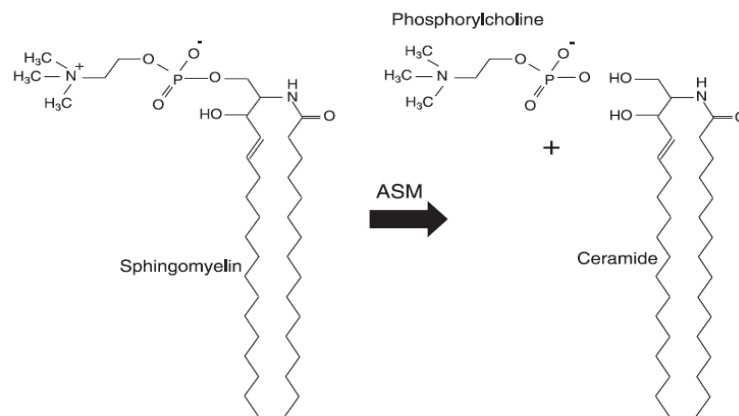


Abbildung 1.7: Sphingomyelindegradation durch die ASM: Sphingomyelin wird durch die ASM, eine Phosphodiesterase, zu Ceramid und Phosphorylcholin hydrolysiert. Nach Smith und Schuchman 2008 (129).

Verschiedene Rezeptoren wie der TNF- (130) und IL-1 Rezeptor aktivieren die ASM (24, 28) und das entstehende Ceramid führt u.a. zu einer Verdrängung von Cholesterin aus den Lipid Rafts (131). Durch die Tendenz der Ceramidmoleküle zur Selbstaggregation kommt es zu einer Verschmelzung der Lipid Rafts zu Ceramidreichen Membranplattformen (132). Diese Plattformen weisen eine hohe Dichte von Rezeptoren mit deren Effektormolekülen auf und erlauben somit eine effiziente Oligomerisierung der Rezeptoren. Eine ASM-Defizienz oder die Extraktion von Cholesterin aus Lipid Rafts führt zu einer ineffizienten Signalweiterleitung (132).

Die ASM wird mit der Ceramid-vermittelten Apoptose in Verbindung gebracht (32). Dies wird durch verschiedene genetische Modelle belegt. Patienten mit Niemann-Pick'scher Erkrankung leiden an genetischer Defizienz der ASM (120). Diese reichern bevorzugt im Gehirn, Leber und Milz Sphingomyelin an. Die Lymphoblasten der Patienten weisen eine defekte apoptotische Antwort auf. Nach Gamma-Bestrahlung zeigen die Lymphoblasten im Gegensatz zu den Kontrollzellen keine Ceramid-Erhöhung und somit auch keine Apoptose. Transgene ASM *knock-out* Mäuse haben im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen eine verminderte Apoptoserate nach Induktion durch UV-Strahlung, ionisierende Strahlung, Hitzeschock und reaktive Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species* (ROS)) (48). Glykosyliertes Ceramid in Form von komplexen Gangliosiden wird in den Lysosomen durch spezifische saure Hydrolasen und anschließend durch Cerebrosidasen zu Ceramid abgebaut. Glycosphingolipide erreichen durch Endozytose die lysosomale Membran und werden

in das Lysosol abgeschnürt. In diesen Lysosolen findet die Degradation von Ceramid durch die ASM statt (133). Dieser Mechanismus ist für die Signaltransduktion nur in geringem Maße von Bedeutung. Jedoch führt eine Störung der Degradation zu Glycosphingolipidosen wie beispielsweise die Tay-Sachs-Krankheit oder der Krabbe'schen Erkrankung. Bei diesen Erkrankungen ist der lysosomale Abbau der Glycosphingolipide gestört (134).

1.7 Matrix Metalloproteinasen

Die Matrix Metalloproteinasen (MMPs), auch Matrixine genannt, sind zinkabhängige Endopeptidasen. Sie werden als Präpro-Enzyme synthetisiert und mit wenigen Ausnahmen als inaktive Pro-MMP sezerniert. Die MMPs spielen für den Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix (EZM) eine entscheidende Rolle. Sie sind unter anderem an der Entwicklung, Morphogenese, Gewebereparatur und dem Gewebeumbau beteiligt (135). Unkontrollierter Umbau der EZM führt zu pathologischen Prozessen wie z. B. rheumatoide Arthritis, Lungenemphysem, Atherosklerose, Ulzerationen, Fibrosierung, Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung (136).

Primär als inaktive Proenzyme sezerniert, müssen die Moleküle zunächst einer proteolytischen Spaltung unterzogen werden. Dadurch kommt es zur Bildung der aktiven MMP, welche von der Verfügbarkeit eines Zink-Kations abhängt. Dieses Zink-Kation ist an der inaktiven Form über einen Cysteinrest gebunden.

Bis heute sind im Menschen 28 verschiedene MMPs identifiziert worden und diese besitzen 24 verschiedene MMP Gene, wobei das MMP-23 als Duplikat vorliegt. Die Expression ist transkriptionell kontrolliert durch inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen (137). Des Weiteren ist die Aktivierung der MMPs durch deren endogene Inhibitoren, den *tissue inhibitors of metalloproteinases* TIMPs und α_2 -Makroglobulin, reguliert. Die TIMPs sind endogene Inhibitoren der MMPs und das Gleichgewicht zwischen beiden in der Zelle ist eine wichtige Komponente für den EZM Umbau (135). Wenn das Gleichgewicht in der Zelle gestört ist, kommt es zu pathologischen Prozessen.

Anhand ihrer Substratspezifität und strukturellen Homologie kann man die MMPs in fünf verschiedene Subgruppen einordnen, die **Kollagenasen** (MMP-1, -8, -13 und -18), **Gelatinasen** (MMP-2 und -9), **Stromelysine** (MMP-3, -7, -10 und -11), **Elastasen** (MMP-12) und andere (MMP-19, -20, -23, -26, -27 und 28) (138). Diese Klassifikation orientiert sich an den klassischen Substraten der MMPs. Nach neueren Erkenntnissen werden die nachfolgenden MMPs in neue Gruppen eingeteilt. Die MMPs MMP-7 und -26 zählen zur Gruppe der Matrilysine und MMP-14, -15, -16 und -24 zu den Membran-Typ MMPs (Abbildung 1.8).

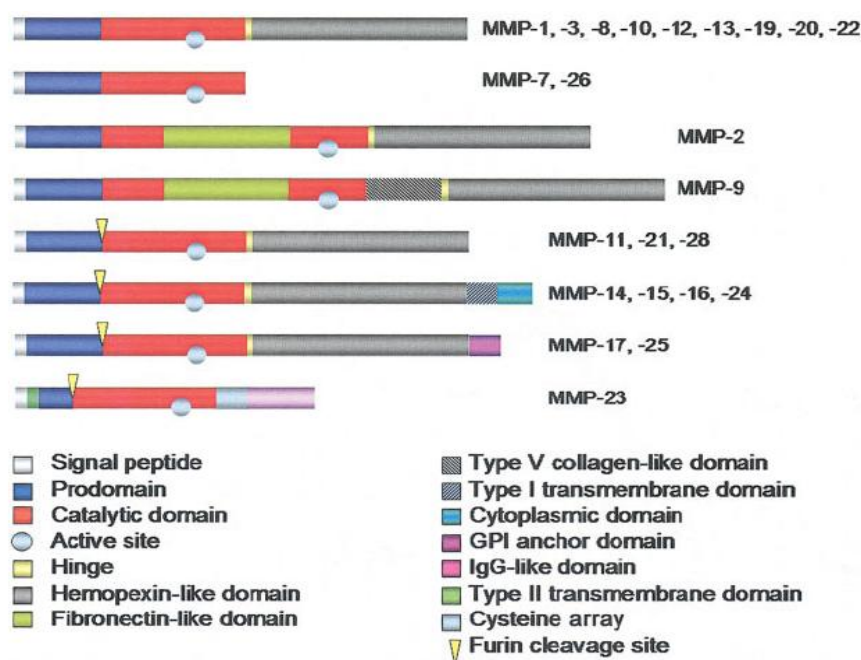


Abbildung 1.8: Domänenstrukturen der verschiedenen MMPs. Alle MMPs haben eine ähnliche Domänenstruktur mit einer Pro- und einer Prädomäne. Viele MMPs besitzen außerdem eine additional Domäne wie die Hämoexin Region. Nach Lemaitre and D'Armiento, 2006 (139).

Die biologische Aktivität der MMPs ist einer genauen Kontrolle unterworfen, die auf mehreren Ebenen stattfindet: Die Modulation der Transkription, Beeinflussung der mRNA-Stabilität, Aktivierung der Proteinvorstufen und Inhibition durch spezifische und unspezifische Inhibitoren. Diese Steuerung ist bei Zellarten, Geweben und MMPs unterschiedlich.

1.7.1 Matrix Metalloproteinase-1

Matrix Metalloproteinase 1 (MMP-1), auch interstitielle Kollagenase genannt, ist in der Lage, fibrilläres Kollagen der Typen I, II, III und V u.a. spezifisch zu spalten. Humane Fibroblasten Kollagenase (MMP-1) war die erste interstitielle Kollagenase, die aufgereinigt wurde und ist dementsprechend der Prototyp aller interstitielle Kollagenasen (140, 141). MMP-1 ist wie MMP-8, -13 und MMP-14 in der Lage, fibrilläres Kollagen an deren Tripel-Helix Struktur zu degradieren (142). MMP-1 spielt eine entscheidende Rolle bei der physiologischen Remodellierung der EZM. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass MMP-1 nicht nur die EZM reguliert, sondern auch Oberflächenmoleküle und nicht-matrix Substrate wie z.B. IL-1 β (143), *insulin-growth factor binding protein* (IGFBP)-3 (144), *fibroblast growth factor* (FGF) (145), L-Selectin (146), TNF (143) und *stromal cell-derived factor-1* (147) spaltet. Wegen dieser Vielfältigkeit der Substrate ist MMP-1 ein multifunktionales Molekül. Bei der Regulation des *insulin-growth factor* (IGF) degradiert MMP-1 die IGFBPs und dadurch können diese an den IGF binden (142). MMP-1 wird durch Zelltypen des Stütz- und Bindegewebes, Makrophagen, Fibroblasten, Hepatozyten und verschiedene Tumortypen exprimiert und ist in der Umgebung starker EZM-Remodellierung lokalisiert (137). MMP-1 spielt bei physiologischen Prozessen wie der Entwicklung, Gewebe-Morphogenese und Wundheilung eine entscheidende Rolle.



Abbildung 1.9: Molekülstruktur von MMP-1. Das katalytische Zentrum (100-260) ist oben. Die Hämapexin Domäne (276-466) ist unten. Das Calcium-Atom ist Rot und das Zink-Atom Blau dargestellt. Ein spezieller Metalloproteinase Inhibitor ist an der aktiven Seite dargestellt, welches in gelben Bällen dargestellt ist. His218, His222 und His228 sind grün dargestellt und an diese Histidine bindet das Zink. Nach Pardo und Selman, 2004 (142).

MMP-1 ist bei einigen humanen Krankheiten wie Krebs, rheumatoider Arthritis, Lungenemphysemen und Fibrose von Bedeutung und könnte je nach Krankheit durch Inhibition (z.B. Arthritis) oder Stimulation (z.B. Fibrose) zu einem therapeutischen Mittel werden (137, 142).

1.7.2 Matrix Metalloproteinasen und chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Frühere Studien haben gezeigt, dass ein Ungleichgewicht zwischen MMPs and TIMPs bei intestinalen Entzündungen und Gewebe-Degradation eine Rolle spielen. Bei CED scheinen die MMPs an der Entstehung von Ulzerationen und Fisteln beteiligt zu sein (142, 148-150). MMP-3 spielt eine wesentliche Rolle bei der Fistelentstehung bei Patienten mit Morbus Crohn (151). Bei diesen Patienten ist MMP-3 in den Fibroblasten und langen mononuklearen Zellen in der intestinalen Fistel hochreguliert. MMP-1, -9 und TIMP-1 sind bei entzündeten Zellen und in Fibroblasten vermehrt exprimiert, sowie in vaskulären, glatten Muskelzellen und in entzündeten Ulzurations-Regionen (Abbildung 1.10).

Studien haben gezeigt, dass verschiedene MMP Inhibitoren die Gewebeschädigung und die Entzündung im Kolitis-Tiermodell signifikant reduzieren (152-155). Medina *et al.* haben gezeigt, dass der synthetische MMP Inhibitor CGS-27023-A das Ausmaß und den Schweregrad der Epithel-Schädigung verringert und die zelleigene mukosale Reparatur im DSS-Kolitis Modell bei Ratten nicht beeinflusst (153). In Histologien konnte man erkennen, dass es zu einer geringeren Infiltration der inflammatorischen Zellen, vor allem von Neutrophilen, kommt und eine niedrigere Mukosaschädigung zu beobachten ist, wenn MMPs inhibiert worden sind (156).

Bei Patienten mit Colitis ulcerosa konnte gezeigt werden, dass MMP-1 vermehrt auf mRNA-Ebene in der zerstörten Mukosa des Kolons zu finden ist (157). Dies führt wiederum bei diesen Patienten zu Ulzerationen. Arihiro *et al.* haben gezeigt, dass MMP-1 bei den ersten Schritten der Ulzuration eine Rolle spielt (158).

Diese Daten verweisen auf Möglichkeiten, CED Patienten mit MMP-Inhibitoren zu behandeln.

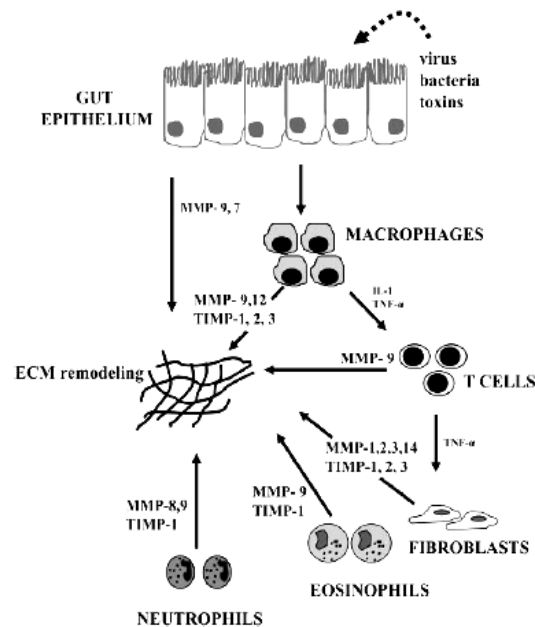


Abbildung 1.10: Zusammenfassung der verschiedenen Zelltypen, die MMPs und TIMPs im Darm produzieren. Luminale Viren, Bakterien oder Toxine können u.a. eine immunologische Antwort auslösen und verschiedene Zellen, wie z.B. Makrophagen, Fibroblasten und Leukozyten schütten dann Zytokine wie IL-1 β und TNF aus. Inflammatorische Reaktionen lösen ein Ungleichgewicht zwischen den MMPs und TIMPs aus und es kommt zur Zerstörung der extrazellulären Matrix. Nach Medina *et al.*, 2003 (159).

1.7.3 Die Bedeutung der MMPs für Invasion und Metastasierung

MMPs besitzen die Fähigkeit, Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin und CD44 von der Zelloberfläche zu entfernen, wodurch das invasive Verhalten steigert wird. Die MMP Inhibition führt zur Blockierung der Metastasierung. Der Effekt von MMPs auf die Invasion und Metastasierung geht auf verschiedene Mechanismen zurück:

Die Degradation der Matrixbarriere, die Proteolyse von Zell-Matrix-Adhäsionsmolekülen oder die Freisetzung migrationsstimulierender Matrixfragmente oder inflammatorischen Zytokinen.

Die MMPs sind am Prozess der Tumordissemination beteiligt, da die Expression von MMPs mit dem Tumorstadium korreliert (160). MMP-1 ist in fast allen Stadien von Krebs umfangreich hochreguliert und es besteht eine negative Korrelation zwischen der Expression und dem Überleben (161). In diesem Zusammenhang könnten MMPs als Ziel für therapeutische Strategien dienen, indem die Enzymaktivität oder deren Synthese blockiert wird. (142).

1.7.4 Transkriptionelle Regulierung der MMP-Genexpression

Viele Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflussen die Expression der MMPs (162-167). Eine stimulierende Wirkung auf MMP-1, -2, -9 und -13 besitzen die Zytokine IL-1 β (168, 169) und TNF (169, 170). Für MMP-2, -9 und -13 ist jedoch die Induzierbarkeit stark zelltypabhängig. In einigen Zelltypen kommt es zur Steigerung der mRNA-Synthese oder mRNA-Stabilisierung, in anderen Zellen führt die Stimulation entweder zur Sekretionssteigerung bei gleich bleibendem mRNA-Spiegel, oder es kommt zu keiner Veränderung (135, 137).

Auf MMP-Proteinebene steuern regulatorische Elemente in der Promotorregion die Aktivität der Transkription. An die regulatorischen Gensequenzen binden spezifische Transkriptionsfaktoren und beeinflussen so die Expression. Der wichtigste Transkriptionsfaktor gehört zur Familie der AP-1 Transkriptionsfaktoren, welches an das AP-1-Element bindet. Dieses Element ist in der Promotorregion vieler MMPs vorhanden und steigert die Transkriptionsrate (171, 172).

Die DNA-Bindungseigenschaften und das Aktivierungspotential der Transkriptionsfaktoren werden durch den Phosphorylierungsgrad bestimmt, die durch die mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAPK) reguliert werden.

Man unterscheidet drei verschiedene MAPK-Signalkaskaden:

Der *extracellular-regulated kinase* 1/2 (ERK1/2) Signalweg, der durch eine Anzahl verschiedener Mitogene und Phorbolester aktiviert wird. Im Gegensatz dazu werden die Januskinase (JNK)/ *stress-activated protein kinase* (SAPK) und p38MAPK durch Stress und inflammatorische Zytokine induziert. Alle drei Signalwege kommunizieren untereinander und teilen sich einige Effektorproteine. Alle drei Signalkaskaden sind an der MMP Regulation beteiligt (173-175).

2 Arbeitsziel

Lipid Rafts und deren assoziierte Signalmoleküle besitzen wichtige Funktionen bei der Signaltransduktion und wirken als Botenstoffe für die intrazelluläre Signalübertragung. Besonders Ceramid als primärer Metabolit des Sphingomyelins gilt dabei als hochreaktives, modulierendes Molekül. Ceramid spielt als intrazellulärer Lipidmediator (*second messenger*) eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie der Zelldifferenzierung, der Proliferation, der Apoptose und der Freisetzung inflammatorischer Zytokine (132).

Lipid-basierte Diäten oder pharmakologische Beeinflussung des Lipidmetabolismus stellen potenzielle therapeutische Prinzipien bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen dar. Aus diesem Grund führten wir eine systematische Bestimmung der bioaktiven Lipide bei muriner Kolitis durch und untersuchten die Auswirkungen des *second messengers* Ceramid.

Die Bedeutung der sauren Sphingomyelinase (ASM) und des durch ASM-Aktivierung entstehende Ceramid bei intestinalen inflammatorischen Reaktionen wurde bisher nicht genauer untersucht. Da die ASM durch viele der bei CED relevanten Signalmoleküle aktiviert wird und selbst eine regulatorische Funktion für deren Signaltransduktion besitzt, sollte die Bedeutung der Ceramidbildung bei der intestinalen Entzündungsreaktionen untersucht werden.

TNF-Rezeptoren (TNFR, CD40, CD95) und der IL-1-Rezeptor spielen bei CED eine zentrale Rolle (176-179). Deshalb sollte insbesondere die Bedeutung des Ceramidmetabolismus für die IL-1- und TNF-rezeptorabhängige inflammatorische Reaktion untersucht werden. Es sollte geklärt werden, ob die Ceramidbildung bei der intestinalen Entzündung nur ein Begleitphänomen darstellt, oder ob vermehrt gebildetes Ceramid für bestimmte Signalwege essentiell ist. Langfristig sollte eine Strategie zur Beeinflussung der Ceramid-abhängigen Signaltransduktion entwickelt werden, um die bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bestehenden Veränderungen beeinflussen zu können.

Matrix Metalloproteinasen sind an vielen inflammatorischen Prozessen beteiligt und für die Remodellierung des Gewebes von entscheidender Bedeutung (154, 159). Durch ein Überwiegen der MMP-Aktivität kommt es zu vermehrter Gewebsdestruktion mit der Folge von Metastasierung, Invasion, Tumorwachstum, Fibrosierung,

Fistelbildung und Ulzerationen (154, 159). MMPs werden durch viele Signalmoleküle induziert, die auch bei der ASM Aktivierung eine Rolle spielen. Deswegen sollte untersucht werden, ob die SMase einen Einfluss auf die MMP-Produktion bei intestinalen Epithelzellen und Kolon Lamina Propria Fibroblasten haben.

Ziel dieser Arbeit war es damit, den Einfluss des Ceramidmetabolismus auf die Entzündungsreaktion und die Gewebedestruktion bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu untersuchen und basierend auf diesen Erkenntnissen neue therapeutische Optionen aufzuzeigen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Herkunft von Material und Geräten

Material für die Zellkultur

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
A/G Agarose Beats	Santa Cruz, Heidelberg
Bovine Serum Albumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	PAA, Pasching, Österreich
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
Polypropylenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Trypanblau	Biochrom, Berlin

Material und Geräte für die Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer	EPICS XL-MCL Coulter Immuntech, Krefeld
Biofuge fresco	Heraeus Sepatech, Osterode
Polystyrenröhrchen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Trägerflüssigkeit	Isoton [®] II Coulter Immunotech, Krefeld

3.1.2 Herkunft von Chemikalien, Enzymen, Zytokinen und Verbrauchsmaterial

Chemikalien

Die in den Experimenten dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme sind mit deren Bezugsquellen im folgenden Abschnitt zusammengefasst.

Acrylamid-Bisacrylamid	National Diagnostics, Atlanta, USA
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim

Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Merck, Darmstadt
Futtermischung und Pellets	Ssniff, Soest
HEPES	Merck, Darmstadt
Hyperfilm ECL TM	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
Interleukin-1 β	R&D, Minneapolis, MN, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kollagen I	R&D, Minneapolis, MN, USA
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat (NaPP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonidet P-40 (NP-40)	Boehringer, Mannheim
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNase A	Qiagen, Hilden
Re-Blot-Solution	Chemicon International, Temecula, USA
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sphingomyelinase	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS	Fluka, Buchs
Tris	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tumor Nekrose Faktor (TNF)	Tebu Bio, Offenbach
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim

Verbrauchsmaterial

6-well-Mikrotiterplatten	Costar, Cambridge, Großbritannien
12-well-Mikrotiterplatten	Costar, Cambridge, Großbritannien
96-well-Mikrotiterplatten	Costar, Cambridge, Großbritannien
Nitrozellulosemembranen	Invitrogen, Karlsruhe
Objektträger	SuperFrost® Plus Menzel-Gläser, Braunschweig
Pipetten	Costar, Cambridge, Großbritannien
Polypropylenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Transwell-Platten, 8µm Polycarbonatmembran	NUNC, Roskilde, Dänemark

Sonstige Geräte

Absorptionsspektrometer	Perkin Elmer, Weiterstadt
Analysenwaage, Sartorius analytic A120 S	Sartorius, Göttingen
Elektrophoreseapparatur	Gibco BRL, Eggenstein
ELISA-Reader	MWG Biotech, Denkendorf
Fluoreszenzmikroskop, Leitz DMR	Leica
Millipore Wasser-Filtrationsanlage	Millipore, Eschhorn
pH-Meter	wiss. Tech.Werkstatt, Weilheim
Röntgenentwickler, Curix 60	AFGA
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Videosystem	Visitron Systems, München
Vortex	Heidolph, Kelheim
Waage, Sartorius excellence E1200 S	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge, Biofuge15	Heraeus Sepatech, Hanau
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Hanau

3.1.3 Fertigkombinationen von Biochemikalien (Kits)

Die in dieser Arbeit verwendeten Reagenziensätze von Biochemikalien („Kits“) sind mit deren Bezugsquellen zusammengefasst.

ECL-Plus™ Western Blotting Detection Kit	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
CD4 ⁺ CD62L ⁺ T-Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
FuGene®6 Transfection Reagent	Roche, Penzberg
HotStar PCR Kit	Qiagen, Hilden
MMP-1/TIMP-1 ELISA	R&D Minneapolis, USA
Milliplex MAP Kit Mouse Cytokine	Millipore, Billerica, USA
MMP-1 ELISA	R&D Minneapolis, USA
Promega Reverse Transkriptase Kit	Promega, Mannheim
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNasy Kit	Qiagen, Hilden

3.1.4 Standards und Marker

100 bp DNA Leiter	Gibco BRL, Eggenstein
1 kb DNA Leiter	Gibco BRL, Eggenstein
Precision Plus Protein™ Standards „all blue“	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.5 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in den folgenden Tabellen unter Angabe des Spenderorganismus, des Klons und der Herstellerfirma zusammengefasst.

Primäre Antikörper

Antikörper	Spende- organismus	Klon	Firma
Actin	Maus		Chemicon International, Temecula, USA
ASM	Kaninchen	H-181	Santa Cruz, Heidelberg
CD3	Maus		Gabe von W. Falk, Regensburg
c-myc	Maus	9E10	Gabe von W. Falk, Regensburg
ERK1/2	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
G 8.8	Ratte		Gabe von Dr. U Strauch, Regensburg
Phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
p38MAPK	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Phospho p38MAPK (Thr180/Tyr182)	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Phospho NF- κ B p105 (Ser933)	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA

Sekundär Antikörper

Antikörper	Spender organismus	Firma
Anti-Kaninchen IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Maus IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Ratte IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

3.1.6 Primer und Sonden

GAPDH	Applied Biosystems, Forster City, USA
-------	---------------------------------------

Name	Primer/ Sonde	Sequenz 5' → 3'
MMP-1 Forward	Primer	TTT CAT TTC TGT TTT CTG GCC A
MMP-1 Reverse	Primer	CAT CTC TGT CGG CAA ATT CGT
MMP-1	Sonde	FAM-AAC TGC CAA ATC GGC TTG AAG CTG CT-TAMRA

3.1.7 Plasmide

Die Plasmide pJK und pJK-ASM sind eine Gabe von Prof. Dr. E. Gulbins, Essen

3.1.8 Puffer und Lösungen

Allgemeine Puffer

PBS (10x)

NaCl 80,0 g/l

KCl 2,0 g/l

Na₂HPO₄ x 7 H₂O 21,6 g/l

KH₂PO₄ 2,0 g/l

pH 7,4

DNA-Ladepuffer

Glycerin 5,47 ml

Bromphenolblau 25 mg

Xylencyanol 25 mg

EDTA (0,5 M) 2 ml

ad. 10 ml Aqua bidest.

0,1 % SDS Lysispuffer

25 mM HEPES, pH 7.4

0,1 % SDS

0,5 % Deoxycholat

1 % Triton X-100

10 mM EDTA

125 mM NaCl

10 mM NaF

10 mM Na₃VO₄

10 mM Natriumpyrophosphat

Dazu werden bei Gebrauch

10 µg/ml jeweils Aprotinin und Leupeptin

10 µl/ml PMSF zugegeben

SDS Ladepuffer

2,1 ml 3M Tris-HCl, pH6,8

10 ml Glycerin

11,5 ml 20% SDS

0,4g Bromphenolblau

Ad 50 ml Aqua bidest.

Laufpuffer für die SDS-PAGE

1x SDS Ladepuffer für Tris/Glycin Gele

Transferpuffer

Methanol 20 % (v/v)

1x Transferpuffer für Tris/Glycin Gele

Waschpuffer

Tris, pH 6,8 10 mM

NaCl 100 mM

Tween 20 0,1 % (v/v)

ASM-Assaypuffer

Für 10 Proben:

500 µl Na-Acetat 1M, pH5

10 µl ZnCl₂ 10mM

480 µl H₂O

10 µl C¹⁴ Sphingomyelin

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zellen wurden nach dem Sedimentieren mit Einfriermedium (entsprechendes Medium, 20 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert. Pro Cryoröhrchen (NUNC) wurden 10^6 Zellen in 1 ml Medium gegeben und diese ÜN in ein spezielles Einfrier-Gefäß gestellt und bei -80°C eingefroren. Dieses Gefäß senkt die Innentemperatur um 1°C pro Stunde. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Stickstoff überführt.

Die eingefrorenen Zellen wurden zum Auftauen aus dem Stickstoff genommen und schnell bei 37°C aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden in 4 ml zuvor auf 37°C erwärmtes Medium überführt und bei 1600 rpm 10 min zentrifugiert, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen. DMSO ist für Zellen zytotoxisch und muss aus diesem Grund entfernt werden. Der Überstand wurde abgeschüttet, die Zellen resuspendiert und in die entsprechende Kulturschale ausgesät.

3.2.1.2 Kultivierung der intestinalen Epithelzellen

Caco-2 Zellen und humane Hautfibroblasten wurden in *Dulbecco's minimum essential medium* (DMEM) gehalten, welches mit 10 % *fetal calf serum* (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % nicht essentielle Aminosäuren und 1 % Natriumpyruvat versetzt wurde. Diese wurden bei 10 % CO_2 und 37°C kultiviert. FCS wurde vorher inaktiviert, indem man dieses für 1h bei 56°C inkubierte. Auf die Isolation und Kultivierung der Fibroblasten wird in einem gesonderten Kapitel weiter eingegangen. Je nach Fragestellung wurden die Zellen vor Stimulation für 24h im Mangelmedium inkubiert, welches kein FCS enthält.

3.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellen wurden in der modifizierten Neubauer-Zählkammer gezählt. Auf einer Glasplatte sind auf einem leicht abgesenkten Mittelstreifen zwei gegenüberliegende quadratische Zählnetze eingraviert. Durch Aufbringen eines Spezial-Deckglases

entsteht eine definierte Kammerhöhe von exakt 0,1 mm (Abbildung 3.1). Das Zentrum der kreuzförmig verstärkten Glasgravur stellt das so genannte Thoma-Netz (Abbildung 3.1) dar. Das Zählnetz von 3 mm Seitenlänge und 9 mm² Fläche enthält Großquadrate mit je 1 mm² Fläche. In den vier sich diagonal gegenüberliegenden nicht vom Thoma-Netz durchzogenen Großquadranten wurden die Zellen gezählt. Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension ergab sich nach folgender Formel:

$$(\text{Gezählte Zellen/Anzahl der ausgezählten Quadrate}) \cdot 10^4 = \text{Zellen/ml}$$

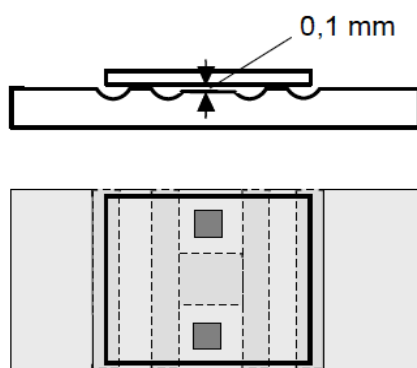
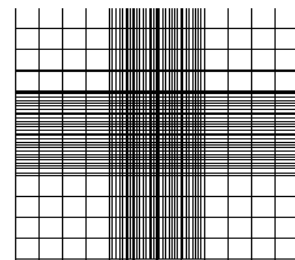


Abbildung 3.1: Neubauer-Zählkammer



Zählnetz der Neubauer-Zählkammer

3.2.1.4 Isolation und Kultivierung von Colon lamina propria Fibroblasten (CLPF)

Primäre CLPF wurden aus chirurgischem Material isoliert. Dafür wurde die Mukosa in ca. 1mm große Stücke geschnitten. Die intestinalen Epithelzellen wurden in 10 ml *Hanks' Balanced Salt Solution* ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ und 2 mM 0,5 M EDTA bei 37°C für 20 min durch Schütteln entfernt. Das verbliebene Gewebe wurde anschließend in 1ml PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺ mit 1 mg/ml Kollagenase, 0,3 mg/ml DNase I und 2 mg/ml Hyaluronidase für 30 min bei 37°C verdaut. Der Kollagenase-Verdau der isolierten Zellen wurde mit 10 % FCS in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* abgestoppt. Durch 5min Zentrifugation bei 4500 rpm und Resuspension wurden die isolierten Zellen gewaschen und anschließend in 5 ml sterilem FCS-haltigem Medium in einer 25 cm² Kulturflasche bei 37°C und 10 % CO₂ kultiviert. Nicht adhärente Zellen wurden durch Wechsel des Mediums entfernt. Sobald die Zellen konfluent gewachsen

waren, wurden sie vom Flaschenboden abgelöst (0,5 % Trypsin in PBS), zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT), in eine Petrischale (100 x 20 mm) überführt und in einem Inkubator weiterkultiviert. Das Medium wurde alle 4 Tage gewechselt bis die Zellen dicht genug gewachsen waren. Die in den Versuchen der vorliegenden Arbeit verwendeten CLPF wurden in den Passagen 3 bis 10 eingesetzt, da die Fibroblastenpopulationen nach der dritten Passage nicht mehr durch Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen oder Epithelzellen verunreinigt waren (180, 181). Kontroll-CLPF wurden aus der intestinalen Mukosa von Patienten isoliert, bei denen eine chronisch entzündliche Darmerkrankung ausgeschlossen werden konnte. Vor Stimulation mit TNF wurde zur Vermeidung einer Voraktivierung der Zellen ein Mangelmedium mit nur 0,5 % FCS zur Kultivierung der primären Fibroblasten verwendet.

Zusammensetzung des verwendeten Zellkultur-Mediums:

500 ml *DMEM high glucose*

50 ml FCS (10 %)

5 ml MEM nicht essentielle Aminosäuren (100x)

5 ml Natriumpyruvat (100 mM)

5 ml Penicillin-Streptomycin-Mischung (10 000 IE, 10 mg/ml)

5 ml MEM Vitamine (100x)

2 ml Ciprobay (2 mg/ml)

0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml)

0,5 ml Amphotericin B (1 mg/ml)

3.2.2 Arbeiten mit DNA

3.2.2.1 DNA-Isolation

Die Isolation von DNA aus Gewebe erfolgte mit dem QIAamp® DNA Mini Kit nach den Angaben des Herstellers. In diesem Fall wurden Mausschwanzspitzen verwendet, um die Mäuse zu genotypisieren.

Das Gewebe wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 180 µl ATL Puffer hinzupipettiert. Danach wurden 20 µl Proteinase-K-Stammlösung zum Ansatz

überführt, gemischt und bei 56°C lysiert. Während des Vorgangs der Lyse wurde die Probe mehrmals gemischt. Nach der vollständigen Lyse wurde die Probe kurz zentrifugiert, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Nun wurde 20 µl RNase-A-Stammlösung zu der Probe gegeben, 15 sec gemischt und 2 min bei RT inkubiert. Danach wurde wieder kurz zentrifugiert und im Anschluss 200 µl AL Puffer zupipettiert. Nach 15 sec mischen wurde die Probe 10 min bei 70°C inkubiert, 200 µl Ethanol (96-100 %) zugegeben und wieder kräftig gemischt. Die Mischung wurde nun in eine QIAamp Spinsäule vorsichtig pipettiert und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die Spinsäule wurde in ein sauberes 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Auf die Spinsäule wurde 500 µl AW1 Puffer gegeben, dann wiederum für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde erneut in ein sauberes Reaktionsgefäß gegeben und 500 µl AW2 Puffer auf die Säule pipettiert. Danach wurde bei maximaler Geschwindigkeit 3 min zentrifugiert. Der gleiche Vorgang wurde wiederholt und 100 µl AE Puffer (70°C) auf die Säule gegeben. Danach wurde für 5 min bei RT inkubiert und anschließend bei 8000 rpm 5 min zentrifugiert. Die eluierte DNA konnte nun zur Genotypisierung der Mäuse verwendet werden.

3.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Moleküle verschiedener Länge können aufgrund ihrer unterschiedlichen Mobilität in Agarosegelen getrennt werden. Man macht sich dabei die negative Gesamtladung der DNA-Doppelhelix zunutze, welche durch unter physiologischen Bedingungen deprotonierten Phosphatgruppen des Rückgrats entsteht. DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld, wobei die elektrophoretische Mobilität indirekt proportional zum Logarithmus der Anzahl ihrer Basen ist.

Zur Auftrennung der DNA wurden 1,2 %-ige Agarosegele verwendet. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer im Verhältnis 4:1 gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Größenstandard wurde eine Probe bekannter Länge und Konzentration mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 Volt für 30 min. Durch das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid fluoreszierten die Fragmente im UV-Licht und konnten fotografiert bzw. sichtbar gemacht werden.

3.2.2.3 Transfektion

Mittels Transfektion werden fremde DNA-Fragmente oder Plasmide in eukaryotische Zellen eingebracht. Bei der Transfektion unterscheidet man zwischen dem nur zeitweiligen Einbringen des Plasmids in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau in das Genom (stabile Transfektion). Durch Abbauprozesse wird fremde DNA normalerweise schnell abgebaut, nach dem Einbau in die Wirts-DNA wird dieser Vorgang jedoch unterbunden. Die Fremd-DNA kann mittels chemischer (Calcium-Phosphat-Präzipitation; Lipofektion; kationische Polymere), physikalischer (Mikroinjektion; Elektroporation; *Particle Gun*; *Magnet Assisted Transfection*) oder biologischer (Transferrininfektion; Antikörper-vermittelte Transfektion) Verfahren in die Wirtszelle eingebracht werden.

ASM-defiziente Fibroblasten wurden mit dem Expressionsplasmid pJK-ASM transfiziert, um zu zeigen, dass diese sich im Hinblick auf ihre Reaktion auf bestimmte Stimuli wieder so verhalten wie Wildtyp Fibroblasten.

Die Fibroblasten wurden mit FuGene[®]6 transfiziert, dieses Reagenz wirkt bei der Transfektion als Lipofekt. Dabei wird genetisches Material mit Hilfe von Liposomen oder Vesikel, die sehr leicht mit der Zellmembran fusionieren, in die Zelle eingebracht. Hierbei gibt es zwei prinzipiell unterschiedliche Ansätze: Einschluss der DNA in das Lumen unilamellarer Phospholipidvesikel oder die Komplexbildung der DNA an der Oberfläche kationischer Lipidvesikel. Wichtig ist die Verwendung von serumfreiem und antibiotikafreiem Medium.

Für ein 6-well wurden folgende Verdünnungen hergestellt:

3 Medium:1 FuGene

3 Medium:2 FuGene

6 Medium:1 FuGene

Die Suspension wurde kurz gemischt und für 5min bei RT inkubiert. Danach wurde die DNA in diese Verdünnungen zugegeben:

3:1 und 6µg DNA

3:2 und 12µg DNA

6:1 und 6µg DNA

Nach dem Mischen wurde der Ansatz bei RT für 45 min inkubiert und dieser anschließend tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Nach 24h-48h konnten die tranfizierten Zellen verwendet werden.

3.2.2.4 Affymetrix GeneChip Array

Die Caco-2 intestinale Epithelzellen (IEZ) wurden zuerst mit exogener SMase (0,1 U/ml) 6h und 24h stimuliert. Danach konnte die RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) wie oben beschrieben, isoliert werden. Die Genexpressionsprofile wurden wie beschrieben untersucht (180) und die *Affymetrix* HGU133A und HGU133B *GeneChips* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) verwendet. Der Chip U133A besitzt ungefähr 22283 humane Gene (HG), U133B besitzt mehr als 33000 humane EST Sequenzen. Die isolierte Caco-2 RNA wurde gepoolt und in cDNA umgeschrieben und für die real-time PCR verwendet.

10µg der gepoolten gesamten RNA wurde mittels T7-oligo-d(T)₂₄ Primer und SuperScript *reverse Transkriptase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in cDNA umgeschrieben. Nach der Synthese der doppelsträngigen cDNA wurden die *Blunt Ends* mittels T4 DNA Polymerase, *Escherichia coli* DNA Ligase und T4 Polynukleotid-Kinase erzeugt. Nach der Phenol-Chloroform Extraktion konnte die cDNA für eine *in vitro* Transkription Reaktion verwendet. Dies wurde mit dem T7 *BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit* (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY, USA) durchgeführt und die so entstandene cRNA biotinyliert. Dafür musste die markierte cRNA mit dem RNeasy Mini Kit columns (Qiagen) aufgereinigt und dann fragmentiert werden, indem man die cRNA bei 94°C für 30 min inkubierte. Die Fragmente wurden durch Mikrokapillare gegeben und elektrophoretisch durch den Agilent 2100 *Bioanalyzer* getrennt. 30 µg der biotinylierten cRNA wurde in zwei Bestandteile geteilt und jeweils mit U133A und U133B *GeneChips* hybridisiert um anschließend 16h bei 45°C mit konstanter Rotation zu inkubieren. Der Mikroarray wurde durch die *Affymetrix GeneChip Fluidics Station 400* verarbeitet. Danach wurde die cRNA mit dem Streptavidin-konjugierten Phycoerythrin gefärbt und gewaschen, um dann mit dem GeneArray Scanner (Agilent Technologies) zu scannen. Jedes Expressions-Signal steht für ein Transkript und wurde mit den unterschiedlichen Proben von den Caco-2

IEZ verglichen (182). Die Auswertung erfolgte mit Affymetrix *GeneChip* Software MAS 5.0 und Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA) (Abbildung 3.3)

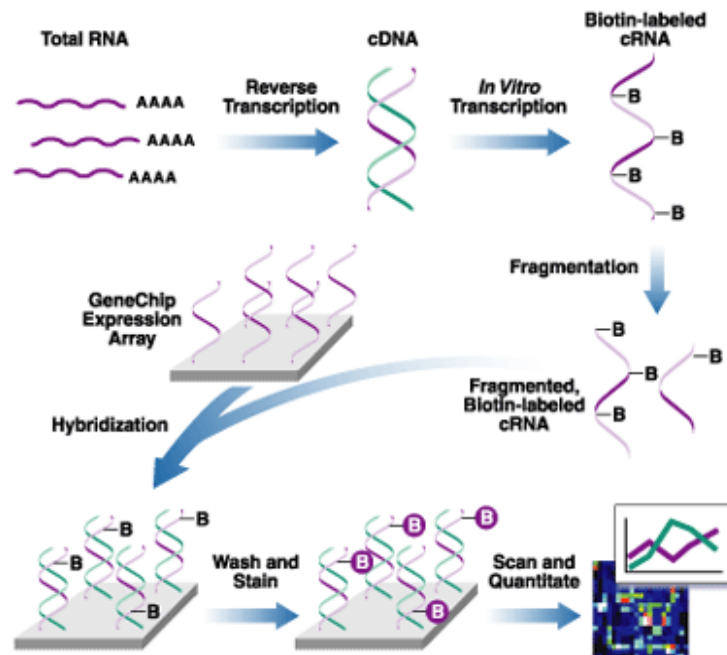


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Affymetrix Gene Array. Erklärung im Text.

3.2.3 Arbeiten mit RNA

Die Gesamt-RNA wurde nach Anleitung des RNeasy[®] Kits isoliert.

Humane CLPF und hepatische Sternzellen wurden mit 1xPBS gewaschen, mit Trypsin oder einem *Cellscrapper* vom Kulturflaschenboden abgelöst, durch Zentrifugation sedimentiert, direkt in 350 µl RLT-Puffer lysiert und mit einer Spritze homogenisiert. Nach der Isolation der RNA wurde der RNA-Gehalt mit dem Nanodrop Gerät bestimmt.

3.2.3.1 cDNA Synthese

Die isolierte Gesamt-RNA wurde nach den Vorschriften des Promega *Reverse Transcription System* reverse transkribiert. Dafür wurde zunächst 1 µg Gesamt-RNA und RNase-freies Wasser in einem Endvolumen von 9,9 µl für 10 min bei 70°C denaturiert. Nachdem die entwundene RNA auf 4°C herunter gekühlt war, wurden

Puffer, Oligo-(dT)s, dNTPs, RNase-Inhibitor und *reverse* Transkriptase in einem Endvolumen von 20 µl hinzu gegeben und für 15 min bei 42°C inkubiert. Zur Abstopfung der Enzymaktivität wurde der Ansatz für 5 min bei 99°C hitzeinaktiviert und auf 4°C herunter gekühlt.

3.2.3.2 Quantitative Analyse der mRNA Analyse mittels real time PCR

Die *real-time* PCR ist eine Methode, um quantitativ eine Aussage über die Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnitts treffen zu können. Im Gegensatz zur herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion enthält der PCR-Ansatz eine Fluoreszenz-gebundene Sonde, die zwischen dem *down-* und *upstream*-Primer hybridisiert. An das 5'-Ende dieser Sonde ist ein Reporterfarbstoff (6-FAM oder VIC) und am 3'-Ende der Quencher-Farbstoff TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) kovalent gebunden. Der Abstand zwischen diesen Farbstoffen ist so gewählt, dass der Quencher das Fluoreszenz-Signal des Reporters unterdrückt. Während der Amplifikation wird die bereits gebundene Sonde durch die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität verdrängt und gespalten. Dadurch verändert sich der Abstand zwischen Quencher und Reporter, so dass das Reportersignal frei wird und vom Detektor des Gerätes nach jedem PCR-Zyklus erkannt werden kann. Die während der 45 Zyklen freigesetzten Fluoreszenzen werden direkt nach Beendigung der PCR mit Hilfe der *Sequence Detector software* (SDS version 2.3, PE Applied Biosystems) zur Zyklenzahl graphisch dargestellt. Im exponentiellen Bereich der erhaltenen Kurven wird eine Gerade gezogen. Die Zyklenzahl, bei der diese Basislinie überschritten wird, nennt man Ct (*Cycle threshold*)-Wert.

Der optimierte PCR-Ansatz enthielt Universal Master Mix, 5 µM des *forward* und *reverse* Primers, 18 µM der fluoreszierenden Sonde und isolierte cDNA (50 ng/Well). Alle Reaktionen wurden im Triplikat in einer 384-Well-Platte untersucht. Die Laufkonditionen waren: 50°C für 2 min, 95°C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen bei 95°C für 15 sec (Denaturierung) und bei 60°C für 1 min (Annealing und Elongation). Die Ct-Werte des *house keeping genes* GAPDH wurden von den MMP-1-Werten subtrahiert:

$$dCt = Ct (MMP-1) - Ct (GAPDH)$$

Für die Auswertung wurde der Mittelwert der dCt-Werte der Triplikate ermittelt. Der dCt-Mittelwert der zusammengefassten Kontrollgruppe wurde dann von dem der gesamten Gruppe der hepatischen Sternzellen (HSC) oder CFLP abgezogen:

$$ddCt = dCt \text{ (CFLP bzw. HSC)} - dCt \text{ (Kontrolle)}$$

Die relative cDNA-Startkonzentration wurde unter Berücksichtigung der exponentiellen Amplifikation errechnet:

$$x = 2^{-ddCt}$$

Für die Auswertung von stimulierten hepatischen Sternzellen und CLPF wurde der Mittelwert der dCt- Werte der Triplikate ermittelt. Die stimulierten Mittel-dCt-Werte wurden von denen der unbehandelten Kontrolle der gleichen Gruppe abgezogen:

$$ddCt = dCt \text{ (stimuliert)} - dCt \text{ (Kontrolle)}$$

Die relative cDNA-Startkonzentration der CLPF oder hepatische Sternzellen wurden unter Berücksichtigung der exponentiellen Amplifikation errechnet:

$$x = 2^{-ddCt}$$

3.2.4 Arbeiten mit Mäusen

Weibliche Balb/c (Harlan Winkelmann, Borcheln) und RAG1^{-/-} Mäuse (Taconic, USA), mit einem Gewicht von 19-22 g wurden nach der Ankunft zwei Wochen in einem Standard Polycarbonat Mausekäfig gehalten, bevor mit den Experimenten begonnen wurde. Alle Mäuse wurden unter gleichen Standard Labor-Bedingungen gehalten (12-h Tag/Nacht Rhythmus, 22 ± 2 °C; 60 ± 5 % Feuchtigkeit).

3.2.4.1 Kolitismodelle

Chronische Kolitis

Balb/c Mäuse wurden nach einer 14 tägigen Ruhephase 4 Zyklen von 3 % DSS (*dextran sulfate sodium*; MP Biomedical, Solon, Ohio, USA) ausgesetzt (183). Die Mäuse bekamen jeweils 7 Tage 3 % oder 2,5 % DSS bei den Balb/c Mäusen und 0,75 % DSS bei den ASM^{+/+} und ASM^{-/-}-Mäusen mit C57/Bl6 Hintergrund im Trinkwasser. Im Anschluss daran 7 Tage nur Wasser. Das Körpergewicht wurde einmal pro Woche bestimmt. Nach dem letzten Zyklus DSS erhielten die Mäuse vier Wochen lang reines Trinkwasser und wurden anschließend für die Versuchsreihe verwendet. Ein 1 cm großes Stück Darm wurde für die Immunhistochemie eingebettet und anschließend der histologische Score (siehe 3.2.4.3) bestimmt. Isolierte IEZ eines Mukosastückes wurde für die Massenspektrometrie verwendet. Die mesenterialen Lymphknoten wurden zerkleinert und wie in Punkt 3.2.4.4 beschrieben gereinigt.

CD4⁺CD62L⁺ Transferkolitis

In diesem Kolitis Modell werden aus der Milz eines Spendertieres (Balb/c) die CD4⁺CD62L⁺ Zellen isoliert. Diese Zellen wurden intraperitoneal in eine RAG1^{-/-} Maus gespritzt. Dadurch erhielten die T- und B-Zell defizienten Rag1^{-/-} Mäuse eine Rekonstitution des Immunsystems durch die transferierten CD4⁺CD62L⁺ T-Zellen. Diese Zellen proliferieren und führen zu einer Entzündung des Dickdarms.

Wie beschrieben (184, 185) wurde aus dem Spendertier (Balb/c) zuerst die Milz entnommen und in RPMI Medium mit 10 % FCS und β -Mercaptoethanol gegeben. Danach wurde sie mit dem Stempel einer Spritze zerkleinert und durch einem 70 μ m Filter gefiltert, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Anschließend wurden die Erythrozyten mit 1x ACK (Ammonium-Chlorid-Kalium) Puffer lysiert (20 ml für 2 $\frac{1}{2}$ Milzen), indem man die Zellsuspension 10 min auf Eis inkubierte. Mit dem gleichen Volumen Medium, das man langsam unter Schütteln zugab, wurde die Suspension neutralisiert. Anschließend wurde bei 1600 rpm bei 4°C 10 min zentrifugiert. Die Gesamtmilzzellen wurden mit MACS Puffer (0,5 % BSA, 2 mM EDTA) resuspendiert und gezählt, anschließend wieder zentrifugiert. Die Zellen wurden mit 400 μ l MACS-Puffer pro 10⁸ Zellen und 100 μ l CD4⁺ T-Cell Biotin-Antibody MicroBeads zugegeben

und für 10 min bei 4°C auf einem Rotor inkubiert, um die CD4⁺ Zellen mit den MicroBeads magnetisch zu binden. Danach wurden pro 10⁸ Zellen 300 µl MACS-Puffer und 200 µl Anti-Biotin MicroBeads zugegeben und 15 min bei 4°C auf einem Rotor inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1600 rpm über 15 min bei 4°C. Die Zellen wurden danach mit 500 µl MACS-Puffer pro 10⁸ Zellen resuspendiert. Die Suspension wurde auf eine LS Säule gegeben und mittels Negativ-Selektion die CD4⁺ Zellen isoliert. Danach wurden die isolierten Zellen wieder zentrifugiert und mit 800 µl MACS-Puffer pro 10⁸ Zellen resuspendiert, 200 µl CD62L⁺ (L-selectin) MicroBeads zugegeben und 15 min bei 4°C auf einem Rotor inkubiert, um danach die Zellen durch Zentrifugation wieder zu waschen. Das Pellet wurde mit 500 µl MACS-Puffer pro 10⁸ Zellen resuspendiert und auf eine MS Säule gegeben. Nun wurde eine Positiv Selektion durchgeführt. Die erhaltenen Zellen wurden gezählt und pro Maus jeweils 2x10⁵ Zellen in PBS intraperitoneal gespritzt.

3.2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur histologischen Beurteilung des in der Arbeit verwendeten Kolongewebes wurden 2µm dünne Schnitte angefertigt. Das Kolongewebe wurde in Paraffin eingebettet und anschließend durch Abschmelzen bei 100°C für eine Stunde und zweimaliges Inkubieren in Xylol entfernt. Daraufhin wurden die Schnitte durch eine absteigende Ethanolreihe rehydriert, indem die Schnitte 2x 100 %, 1x 90 % und 1x 70 % Ethanol gegeben wurden. Die Schnitte wurden für 9 min mit Hämatoxylin gefärbt und anschließend gebläut, indem man diese 3 min mit warmen Wasser und anschließend 3min mit kaltem Wasser entfärbte. Danach wurden die Schnitte für 30 s mit Eosin gefärbt, kurz mit Wasser gespült und diesmal durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert. Dann wurden die Schnitte zweimal für 10 min in Xylol getaucht und anschließend mit Entellan[®] (Merck) eingedeckelt.

3.2.4.3 Histologischer Score

Für die Analyse des histologischen Scores wurde die distale Region des Kolons mit 4 % Formalin fixiert und danach das Gewebe in Paraffin eingebettet. Es wurden 2 µm dünne Schnitte angefertigt, mit Hämatoxylin-Eosin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

gefärbt (siehe Punkt 3.2.4.2) und der histologische Score wie beschrieben beurteilt (183). Die mikroskopische Entzündung der Kolitis wurde beurteilt, indem man den Verlust der Becherzellen und den Verlust der Krypten quantifizierte.

Die Histologie wurde folgendermaßen ermittelt:

Epithelium (E)

- 0: normale Morphologie
- 1: Verlust der Becherzellen
- 2: Verlust der Becherzellen in großen Arealen
- 3: Verlust der Krypten
- 4: Verlust der Krypten in großen Arealen

Infiltration (I)

- 0: keine Infiltrate
- 1: Infiltrate um die Kryptenbasis herum
- 2: Infiltrate weitreichend bis in die *lamina muscularis mucosae*
- 3: extensive Infiltration bis in die *L. muscularis mucosae* reichend und Eindickungen auf der Mukosa mit vielen Ödemen
- 4: Infiltration in der *L. submucosa*.

Der histologische Score wird durch die Summe von Epithelium und Infiltration dargestellt und hat eine Spanne von 0-8.

3.2.4.4 Isolierung der Lymphknoten

Die aus isolierten Lymphknoten gewonnenen Lymphozyten dienen zur Messung der Zytokine mittels Luminex (siehe Punkt 3.2.4.5). Die erhaltenen Zellen wurden hierfür 24h inkubiert und je nach Fragestellung die T-Zellen durch Zugabe von anti-CD3 Antikörper stimuliert.

Zur Zellgewinnung wurden zuerst die mesenterialen Lymphknoten der entsprechenden Mäuse entfernt und in RPMI Medium + 10 % FCS + β -Mercaptoethanol gegeben. Die Lymphknoten wurden anschließend mittels eines Spritzenstempels zerkleinert und danach durch einen 70 μ m Filter filtriert. Die entstandene Einzelzellsuspension wurde 2x gewaschen, indem man diese 15 min bei 1600 rpm und 4°C zentrifugierte. Nach Resuspension des Pellets konnten die Zellen gezählt werden. Es wurden 2×10^5 Zellen entnommen und in 200 μ l Medium in einer

96-well Platte ausgesät. Nach 24h wurde der Überstand für die Zytokinbestimmung im Luminex abgenommen.

3.2.4.5 Luminex

Der Luminex ist ein multiplexer Assay und mittels diesen bis zu 100 Zytokine gleichzeitig gemessen werden können. Multiplexe Assays werden direkt in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Sie enthalten eine Mischung verschiedener Bead-Typen (Bead-Mix). Jeder dieser Bead-Typen ist eindeutig durch einen individuellen roten Fluoreszenzfarbton definiert, sowie durch eine Beschichtung mit einem spezifischen Nachweisreagenz wie z.B. rekombinanten Antigenen, Oligonukleotiden, spezifischen Proteinen (hier mit A, B und C bezeichnet). Die zu untersuchenden Proben werden mit dem Bead-Mix inkubiert. Dabei bindet jeder Bead-Typ an sein spezifisches Zielmolekül (Analyt). Die an die Oberfläche der Beads gebundenen Analyten werden in einem weiteren Inkubationsschritt mit einem spezifischen grünen Fluoreszenzmarker (Konjugat) markiert. Die Menge des gebundenen Analyten ist der Fluoreszenzintensität direkt proportional. Dadurch kann die Bindungsreaktion quantifiziert werden. Im Luminex Analysesystem werden die Beads hinsichtlich ihrer roten (Bead-Klassifizierung) und grünen (Quantifizierung) Fluoreszenz individuell analysiert und ausgewertet. Das Resultat sind Multi-Analyten-Profile mit deutlich verbesserter Aussagekraft im Vergleich zum Einzelnachweis von verschiedenen Parametern (Abbildung 3.2).

Die Zytokine IL-6, IL-10 und TNF wurden mittels der Luminex[®]-Technologie in Zellüberständen von murinen Lymphknotenzellen durch den Luminex Maus Milliplex[™] Map Kit (Millipore) gemessen.

Zunächst wurden jedes Well einer 96-Well-Filterplatte mit je 10 µl Assay-Puffer angefeuchtet und danach mit jeweils 50 µl der Standardverdünnung bzw. 50 µl Probe pipettiert. Es wurde je 25 µl Beadsolution zugegeben und die Platte bei 4°C ÜN unter leichtem Schütteln inkubiert. Mittels einer Vakuumpumpe wurde der Inhalt der Wells durch den Filter am Plattenboden abgesaugt und jedes Well zweimal mit 250 µl Waschpuffer gespült. Anschließend wurden jeweils 25 µl Reporter Solution zugegeben und die Platte unter leichtem Schütteln eine Stunde bei RT inkubiert.

Danach wurde je 25 µl Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung pipettiert und die Proben 30 min inkubiert. Danach wurde die Platte erneut abgesaugt und zweimal mit Waschpuffer gewaschen. In jedes Well wurden 150 µl Sheath-Fluid pipettiert und nach kurzem Schütteln die Proben im Luminex®100™ analysiert.

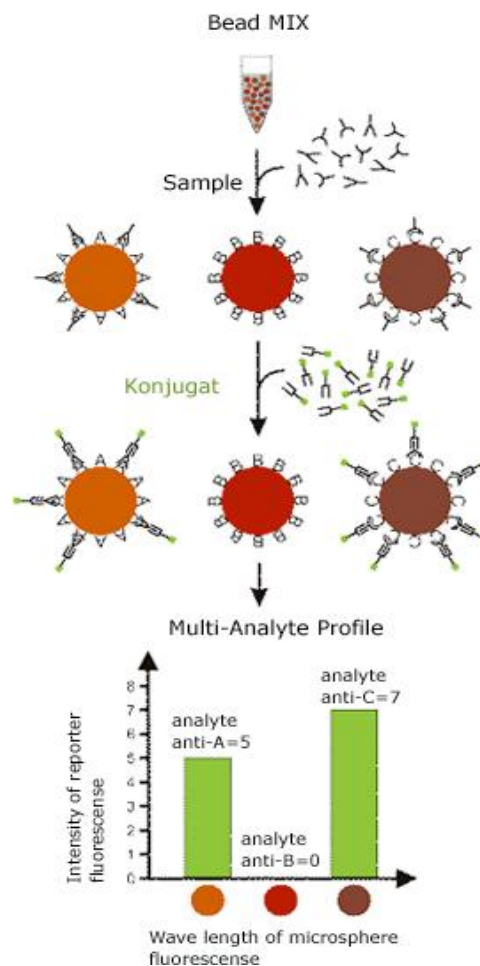


Abbildung 3.2: Analyseprinzip des Luminex®. Erklärung im Text

3.2.5 Massenspektrometrie

Intestinale Epithelzellen (IEZs) wurden aus dem Kolon wie beschrieben (186) isoliert und danach mit kaltem PBS zweimal gewaschen. Die Proben wurden mit 500 µl 0,2 % SDS lysiert und anschließend 500 µl kaltes H₂O zugegeben, um eine Endkonzentration von 0,1 % SDS nicht zu überschreiten. Die Lipide wurden mittels Elektrospray Ionisierung Tandem Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) im positiven Ionenmodus analysiert wie zuvor bei Liebisch *et al.* beschrieben (187, 188). Mittels

Flow Injektion Analyse wurden die Proben quantifiziert und der analytische Setup genutzt, um die Daten durch einen analytischen Algorithmus zu berechnen wie bei Liebisch *et al.* beschrieben. Das Ausgangsion Phosphocholin wurde mit m/z 184 gescannt. Dieser ist speziell für Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und Lysophosphatidylcholin geeignet und beinhaltet dieses Ion. Neutrale *loss scans* von m/z 141 and m/z 185 wurden für Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin gebraucht. PE-basiertes Plasmalogen (PE-pl) wurde durch die Fragmente der Ionen von m/z 364, 380 und 382 für PE p16:0, p18:1 und p18:0 Spezies analysiert. Ceramid wurde durch N-Heptadecanoyl-Sphingosin analysiert und diente als Standard für die anderen gemessenen Lipide. Freies Cholesterin (FC) und Ceramid wurden mittels selektiver Acetylierung des freien Cholesterins gemessen. Die Quantifizierung wurde durch die Kalibrierung generiert und mittels Addition der natürlichen Vorkommen der Lipide zu den Zellen homogenisiert.

3.2.6 Western Blot

Mit Hilfe des so genannten Western Blotting ist es möglich, Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen und anschließend zu identifizieren. Ein Proteingemisch wird mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend des Molekulargewichts seiner Komponenten aufgetrennt. Durch die Anwesenheit von SDS erhalten die Proteine eine negative Ladung. Der Zusatz von β -Mercaptoethanol bewirkt eine Spaltung intramolekularer Disulfidbrücken (Reduktion). Die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine hängt dann nur noch von der Molekülgröße sowie der Porengröße des dreidimensionalen Gel-Netzwerks ab. Nach der elektrophoretischen Auftrennung werden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert („geblottet“), können mit spezifischen Antikörpern markiert und so mittels einer Chemolumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht werden.

3.2.6.1 Gewinnung von Zelllysaten

Die Zellen wurden mit 300 μ l 0,1 % SDS-Lysispuffer in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren beschichtet und 15 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Zellen, mit einem *Cellscraper* abgelöst und anschließend für 5 min bei 8000 rpm

zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde in ein frisches Eppendorf Gefäß überführt.

3.2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde mittels *bicinchoninic acid solution* (BCA) und copper(II) sulphate Lösung (1:50) (Sigma Aldrich, Germany) nach Smith *et al* bestimmt. Darin werden die Biuret-Reaktion (Protein und Cu^{2+} in alkalischer Lösung führt zur Bildung von Cu^{1+}) mit dem wasserlöslichen Natriumsalz der Bicinchoninsäure kombiniert. Durch die Interaktion von zwei BCA-Molekülen mit einem Cu^{1+} -Ion entsteht ein wasserlösliches, violettes Reaktionsprodukt mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Dies erlaubt die photometrische Quantifizierung von Proteinen in wässriger Lösung.

Die Zunahme der Absorption bei 540 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Probenlösung. Absolute Werte für den Proteingehalt wurden durch die Messung einer Verdünnungsreihe einer BSA-Standardlösung bekannter Konzentration ermittelt. Durch Auftragung der Absorption bei 540 nm gegen den Proteingehalt der Verdünnungsreihe erhielt man eine Eichgerade, mit deren Hilfe der Gesamtproteingehalt der Probe ermittelt werden konnte. Die Probenlösungen wurden hierfür im Verhältnis 1:2 verdünnt eingesetzt, mit 200 µl BCA-Kupfer Lösung versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Absorption der gebildeten Komplexe konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden. Anschließend wurden anhand der Standardkurve die Proteinkonzentrationen der Probenlösung berechnet (Programm SOFTmax PRO von Molecular Devices, USA).

3.2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung der denaturierten Proteine mittels SDS-PAGE wurde das X-Cell II™ Mini-Cell Modul (Novex-Kammer) der Firma Invitrogen BV/Novex verwendet. Hierfür wurden fertige SDS-Polyacrylamidgele (4–12 %) mit den Proteinproben beladen. Die fertigen Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Novex- Kammer mit Laufpuffer befüllt.

Zur Vorbereitung der Proben wurden 30 µg isoliertes Gesamtprotein mit 1x SDS-Probenpuffer und 2,5 % β-Mercaptoethanol auf ein Volumen von 30 µl versetzt. Die äquivalenten Proteinmengen wurden anschließend bei 95°C für 5 min denaturiert und nach kurzer Zentrifugation in die Taschen des Polyacrylamidgels einpipettiert. Auf jedes Gel wurde außerdem ein Proteinstandard als Größenmarker für die zu detektierenden Proteine aufgetragen. Nachdem die in die Geltaschen gefüllten Proteinproben bei 50-70 V (12,5 mA pro Gel) in das Sammelgel eingewandert waren und das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 120 V (18 mA pro Gel) erhöht. Die Laufzeit, bis die Laufmittelfront das untere Ende des Gels erreicht hatte, betrug ca. 1,5 h.

3.2.6.4 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Blotten)

Proteine können durch einen Transfer aus SDS-Polyacrylamidgelen auf geeignete Membranen übertragen werden. Der Proteintransfer erfolgte mit dem X-Cell II™ Mini Cell Blot-Modul mittels Tank-Blot-Technik. Hierfür wurde eine Sandwich-Anordnung aus Schwämmen, Whatman-Filterpapieren, dem Polyacrylamidgel und der Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm) hergestellt. Auf die Kathodenseite des Blot-Moduls wurden zwei mit Transferpuffer getränkte Schwämme gelegt; darauf folgte eine Anordnung aus je einer Lage Whatman-Filterpapier, Polyacrylamidgel, Nitrozellulosemembran, Whatman-Filterpapier und zwei weiteren getränkten Schwämmen. Beim Aufbau wurde darauf geachtet, dass sich zwischen den einzelnen Schichten keine Luftblasen befanden, da sonst nur ein unvollständiger Transfer stattgefunden hätte. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 0,8 mA/cm² Gelfläche für die Dauer von 45 min.

3.2.6.5 Immundetektion der Proteine

Zur Immundetektion der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4°C bzw. für eine Stunde bei RT in Blockierlösung (5 %-ige BSA-Lösung in Waschpuffer) inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen und so unspezifische Bindungsstellen auf ein Minimum zu reduzieren. Danach wurde die Membran für mindestens eine Stunde bei RT unter leichtem Schütteln mit dem in

Blockierlösung verdünnten Primärantikörper inkubiert. Die Membran wurde dann für 6 x 10 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend für eine weitere Stunde mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper (HRP-gekoppelt; verdünnt in 5 %-iger BSA in Waschpuffer) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran anschließend mit dem ECL-Plus™ Western Blotting Detection Kit entwickelt, in Folie verpackt und in eine Röntgenfilmkassette eingelegt. Es wurde ein Hyperfilm aufgelegt und nach geeigneter Expositionszeit entwickelt.

3.2.6.6 Strippen der Nitrozellulosemembran

Nach erfolgter Immundetektion des Zielproteins auf der Nitrozellulosemembran konnte diese für weitere Antikörperinkubationen verwendet werden. Hierfür wurden die gebundenen Antikörper durch eine 15-minütige Inkubation in einer Stripping-Lösung (Re-Blot-Solution) bei RT entfernt. Anschließend wurde die Membran 10 min gewaschen, 30 min neu mit 5 % BSA blockiert und mit dem nächsten Primärantikörper inkubiert.

3.2.7 ELISA

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert.

Der Sandwich-ELISA verwendet zwei Antikörper (Ak), die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Hierbei ist es wichtig, dass beide Ak an unterschiedlichen Stellen an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Der erste Ak (*coating-Ak*) wird an eine feste Phase gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird dann zugegeben und inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Ak das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen. Die ungebundenen Bestandteile der Probe werden dadurch entfernt und zurück bleibt nur das am *coating-Ak* gebundene Antigen. Im nächsten Schritt wird ein Detektions-Ak zugegeben, an dessen Ende ein Enzym (meistens Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish*), Alkalische Phosphatase (AP) oder seltener Glucoseoxidase (GOX) gebunden ist. Dieser zweite Ak bindet ebenfalls an das

Antigen und es entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige zweite Ak ausgewaschen und dann ein zum Enzym passendes chromogenes Substrat zugegeben. Dieses wird vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt, dessen Nachweis durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemoluminiszenz erfolgen kann. Für quantitative Nachweise wird üblicherweise eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen durchgeführt, um eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal (optische Extinktion, emittierte Intensität) zu erhalten. Alternativ kann auch die Kombination eines ungekoppelten Detektions-Ak und eines zusätzlichen sekundären Ak, an den ein Enzym gebunden wurde, verwendet werden (Abbildung 3.4).

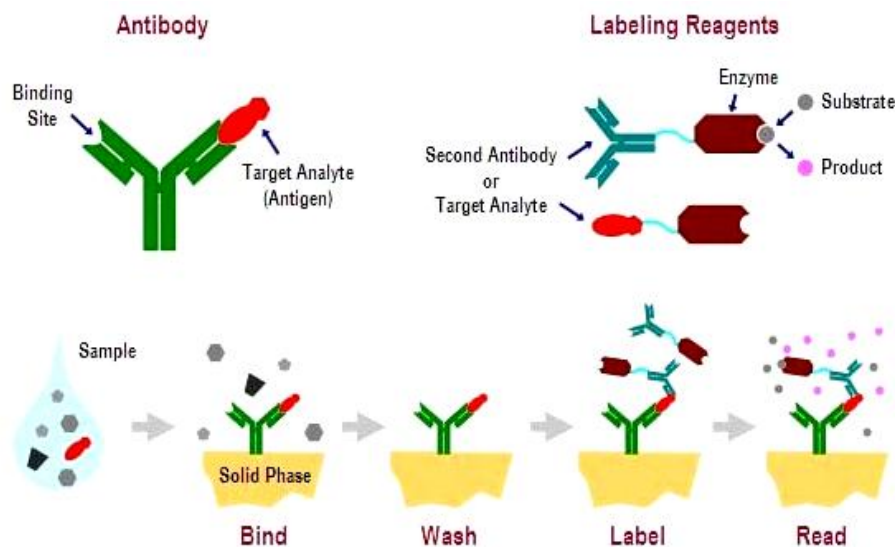


Abbildung 3.4: Nachweisreaktion mittels ELISA. Erklärungen im Text.

Mittels ELISA wurden die Sekretion von MMP-1, MMP-1/TIMP-1 Komplex und IL-8 analysiert. Die Durchführung dieser Assays erfolgte jeweils entsprechend der Protokolle der Hersteller (R&D). Zur Gewinnung geeigneter Zellüberstände wurden die Zellen (humane Hautfibroblasten, hepatische Sternzellen, Caco-2 und CLPF) in 12-well Platten ausgesät, bis diese subkonfluent waren. Einen Tag vor Stimulation wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei manchen Experimenten wurde Mangelmedium ohne FCS verwendet, damit die im FCS enthaltenen Zytokine keinen Einfluss auf das Ergebnis hatten und eine Vorstimulation der Zellen vermieden

werden konnte. Die Zellen wurden mit IL-1 β (1 ng/ml), TNF (10 ng/ml), TGF- β (1 ng/ml) oder LPS (10 ng/ml) stimuliert. Je nach Fragestellung erfolgte eine Vorinkubation zur Beeinflussung der Zellreaktion. Im Falle von Imipramin oder β -Methyl-Cyclodextrin erfolgten diese 30 min vor Stimulation.

Des Weiteren wurde die Sekretion von humanen IL-8 untersucht. Der endogene IL-8 Antikörper wurde in einer Konzentration von 2 μ g/ml in 0,1 M NaHCO₃-Puffer (pH 8,5) verdünnt und in ELISA Platten mit 100 μ l pro Well bei 4°C ÜN gecoatet. Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 200 μ l pro Well mit einer 10 % FCS Lösung in PBS für 30 min blockiert. Nach erneutem Waschen wurde 100 μ l Standard bzw. Probe pipettiert und für 1h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde mit 100 μ l biotinylierter IL-8 AK-Lösung (Pierce; 100 ng/ml in 10 % FCS/PBS) für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden 100 μ l pro Well einer Streptavidin-Peroxidase Lösung (HE Healthcare; 1:2000 in 10 % FCS/PBS) pipettiert. Nach einer Stunde wurde wieder gewaschen und je 100 μ l Tetramethylbenzidin Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) zugegeben. Nach einer Inkubation von 30 min wurde die Reaktion mit 50 μ l 0,5 M H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion bei 540/450 nm gemessen.

3.2.8 FACS *fluorescence activated cell sorting*

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Durchflusszytometer, Coulter EPICS XL-MCL (Coulter Immunotech, Krefeld), werden die Zellen in einer Suspension vorgelegt, über eine Kapillare angesaugt und mit Probenflüssigkeit (isotonische Kochsalzlösung) verdünnt. Durch einen Geschwindigkeitsgradienten wird der Probenstrom zur Mitte der Düse hin stärker beschleunigt. Diese so genannte hydrodynamische Fokussierung bewirkt, dass eine Verwirbelung vermieden wird und die einzelnen Zellen in einem Flüssigkeitsstrom nacheinander eine Messküvette passieren, auf die ein Argonlaserstrahl mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm trifft. Gestreutes Licht und Fluoreszenz werden über ein System von dichroitischen Spiegeln, optischen Linsen und Filtern zu Photomultipliern weitergeleitet und detektiert. Die Photodiode für das Vorwärtsstreulicht (FSC) detektiert das Licht, das in Strahlenrichtung von der Zelle gestreut wird. Die Intensität des Vorwärtsstreulichts gibt Auskunft über die Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC) wird orthogonal zum Strahlengang

detektiert. Das SSC-Signal ist abhängig von der inneren Struktur der Zelle und liefert ein Maß für die Granularität der Zelle. Die Fluoreszenzemission wird ebenfalls im 90°-Winkel zur Strahlenrichtung des Lasers gesammelt und nach Abtrennung mit Hilfe von dichroitischen Spiegeln und Interferenzfiltern in Spektralbereiche bestimmter Wellenlängen aufgetrennt:

Fluoreszenz 1 (FL1): 505-545 nm, mit 525nm Bandpassfilter

Fluoreszenz 2 (FL2): 555-600 nm, mit 575 nm Bandpassfilter

Fluoreszenz 3 (FL3): 605-645 nm, mit 620 nm Bandpassfilter

Fluoreszenz 4 (FL4): 650-725 nm, mit 675 nm Bandpassfilter

Für jede vermessene Zelle wird eine Datenbank angelegt. Dadurch ist es möglich Zellsubpopulationen einer Messung unabhängig voneinander zu betrachten und zu analysieren. Zellpopulationen können im Histogramm oder, bei Auftragung zweier gemessener Parameter, als *Dot Plot* dargestellt werden. Die Messungen und Auswertungen der vorliegenden Arbeit wurden mit der Software *Expo32* durchgeführt.

3.2.9 Vitalitätsassay

Eine eventuelle Zytotoxizität von Imipramin wurde durch einen Stoffwechsellaffinitätstest untersucht. Dazu wurden je 5×10^4 Zellen pro 96-Well in 100 μ l Medium \ddot{U} N ausgesät. Danach wurden die Zellen mit 30 μ M Imipramin inkubiert und \ddot{U} N inkubiert. Anschließend wurde zu den Zellen 20 μ l Tetrazoliumlösung (1 ml 3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethylphenyl)-2H-Tetrazoliumsalz (MTS) mit 50 μ l Phenazin-methosulfat (PMS) Gemisch) pipettiert. Nach 4h wurde die Extinktion bei 450/650 nm gemessen. Lebende Zellen setzen mit Hilfe von Dehydrogenasen das gelbe Tetrazoliumsalz zu dem rötlichen Formazan Produkt um. Die Konzentration des Formazan Produktes ist proportional zur Vitalität der Zellen.

3.2.10 ASM-Aktivitätsassay

Der ASM Aktivitätsassay dient zur Messung der ASM Aktivität mittels Radioaktivität. An das Sphingomyelin ist ein C^{14} -Atom gebunden. Dieses wird nach der Hydrolyse

durch die ASM freigesetzt und kann radioaktiv gemessen werden. Dadurch, dass der Puffer das pH-Optimum der ASM besitzt, wird nur diese aktiv.

Der ASM-Aktivitätsassay wurde nach Takahishi *et al.* (189) mit einigen Modifikationen durchgeführt. Die Zellen (humane Hautfibroblasten und Caco-2 Zellen) wurden mit IL-1 β (1 ng/ml) 10 min und 20 min inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1x PBS+Ca²⁺ zweimal bei 4°C gewaschen. Die Zellen wurden mit 1x PBS+Ca²⁺ +Triton100x (4 %) lysiert. Jeweils 120 μ l pro Well wurde auf die Zellen gegeben und für 10min inkubiert. Die lysierten Zellen wurden abgelöst und mittels BCA Test die Proteinkonzentration gemessen. 100 μ l Zelllysate und 100 μ l ASM-Puffer (1 M Na-Acetat, pH 5; 10 mM ZnCl₂, H₂O und C¹⁴ Sphingomyelin (NEC-663 [choline-methyl-¹⁴C], Perkin Elmer Life and Analytical Science, Boston, MA, USA) wurden 1h bei 37°C bei 500 rpm geschüttelt. Mit 20 % Trichloressigsäure (200 μ l) und 5 % BSA (100 μ l) wurde die Reaktion abgestoppt, gevortext und 5 min bei RT ruhen gelassen. Danach wurde bei 3000 rpm 5 min zentrifugiert. 350 μ l Überstand wurde in ein Szintillationsgefäß überführt und die Szintillation mittels *liquid scintillation analyzer* 1600TR Tri-Carb (Canberra Packard, Dreieich, Germany) analysiert.

3.2.11 Migrations- und Invasionssassay

Zur Quantifizierung der durch Kollagen eingewanderten hepatischen Sternzellen wurden Transwells (8 μ m Polycarbonat Membran Nunc 25 mm *Tissue Culture Inserts*; NUNC Langen-Selbold) für 6-well Platten verwendet. Diese Methode basiert auf der Fähigkeit der Zellen, aktiv durch eine definierte Porengröße wandern zu können (Abbildung 3.5).

Zur Beschichtung wurden die Transwells in eine Petrischale gegeben und ÜN bei 37°C mit Kollagen I (0,5 mg/ml) inkubiert. Vor der Zugabe von Zellen wurden vorher 1,5 ml Medium in ein 6-well gegeben und zum Einstellen des pH-Wertes für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 3x10⁵ hepatische Sternzellen in 1ml Medium dem Transwell zupipettiert. Je nach Fragestellung wurden die Zellen vorher mit Imipramin (30 μ M) 30 min vorinkubiert und nach Sedimentation mit IL-1 β (1 ng/ml) oder TNF (10 ng/ml) stimuliert. Nach 6h wurden die Transwells zur Färbung mit DAPI vorbereitet.

Die Invasion von Tumorzellen wird u.a. durch MMPs gesteuert. Deswegen wurde in einem zweiten Ansatz 24h zuvor in dem unteren Teil des Transwells hepatische Sternzellen ausgesät und entsprechend mit IL-1 β oder TNF stimuliert. Nach 24h wurden die hepatische Karzinomzelllinie HepG2 auf eine mit Kollagen I beschichteten Polycarbonatmembran ausgesät und nach 6h wie oben beschrieben verwendet und mit DAPI gefärbt.

Durch die selektive Bindung des Farbstoffs DAPI an zelluläre DNA kommt es zur Ausbildung stark fluoreszierender Komplexe, wodurch fluoreszierende Zellkerne entstehen, während eine cytoplasmatische Fluoreszenz nicht nachweisbar ist. Zur Quantifizierung der eingewanderten Zellen wurde die Polycarbon Membran der Transwells aus der Vorrichtung geschnitten, die obere Seite mit einem Q-Tip gereinigt und mit PBS gewaschen. Dadurch lösen sich die nicht ausgewanderten Zellen ab. Zum Fixieren der gewanderten Zellen wurde die Membran mit 4 % PFA 15 min inkubiert. Nach erneutem Waschen mussten die Zellen noch permeabilisiert werden, damit das DAPI in die Zelle diffundieren kann. Die Membran wurde hierfür mit 0,1 % Triton 15 min beschichtet. Nach Waschen mit PBS wurde die Membran mit den fixierten Zellen 5min mit DAPI gefärbt und erneut gewaschen. Nach Trocknen der Membran wurde diese mit Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA) eingedeckelt. Die migrierten und invasiven Zellen wurden mikroskopiert und 20 Gesichtsfelder ausgezählt.

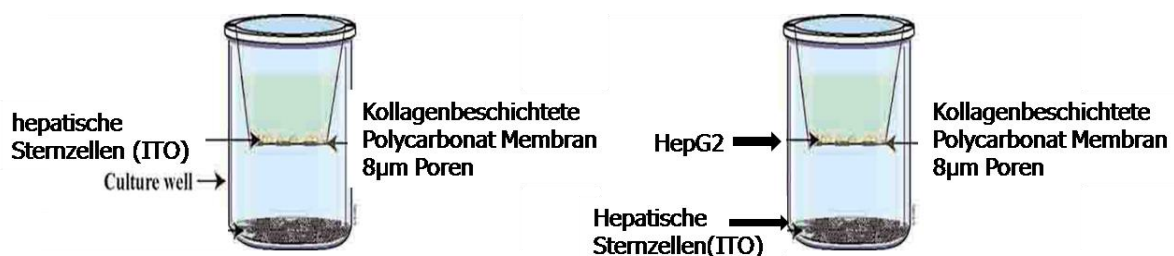


Abbildung 3.5: Aufbau des Invasionsassays. Auf die Kollagenbeschichtete Polycarbonatmembran werden die hepatischen Sternzellen ausgesät und stimuliert. Nach 6h werden die migrierten Zellen mittels Mikroskop ausgezählt. Im rechten Bild wurde 24h vorher im unteren Teil des Wells die hepatischen Sternzellen ausgesät und entsprechend stimuliert. Die HepG2 Zellen wurden im oberen Teil des Transwell ausgesät und nach Invasion wie beschrieben ausgezählt.

3.2.12 Statistik

Messwerte wurden als Mittelwert \pm *standard error of the mean* (SEM) Standardfehler dargestellt. Die Graphen wurden mittels SigmaPlot als vertikale Box-Plots (25 %-75 %-Bereich der Werte) dargestellt. Die statistischen Auswertungen wurden mit dem *Students T-Test* und *Mann-Whitney U Rank Sum-Test* durchgeführt. Bei einem p-Wert von $<0,05$ wurden die Unterschiede als statistisch signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Die Produktion von MMP-1 nach Stimulation mit IL-1 β ist abhängig von der sauren Sphingomyelinase

4.1.1 Erhöhte Expression von MMP-1 und MMP-10 mRNA in Caco-2 intestinalen Epithelzellen (IEZ) nach Stimulation mit exogener Sphingomyelinase (SMase)

Zur Identifikation ceramidinduzierter Signalwege wurde eine *Affymetrix GeneChip* Analyse nach Stimulation von IEZ mit exogener Sphingomyelinase (SMase) durchgeführt. Anhand dieser Daten war erkennbar, dass durch Ceramidbildung Gene reguliert werden, die bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) von Bedeutung sind. Diese Gene sollten in ihrer möglichen Bedeutung für die intestinale Entzündung näher untersucht werden.

Die Analyse zeigte einen Anstieg verschiedener Gene nach Stimulation mit exogener SMase. Bereits nach 6h zeigte die Auswertung einen signifikanten Anstieg der MMP-1 und MMP-10 Expression und dieser war auch noch nach 24h erkennbar (Abbildung 4.1). Da Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) bei CED eine bedeutende Rolle spielen und im *GeneChip* Array nach Ceramidbildung sehr stark erhöht vorlagen, wurden diese näher untersucht. Zur Validierung der Analysedaten wurde die intestinale Epithelzelllinie Caco-2 mit exogener SMase stimuliert. Die dadurch resultierende Ceramidbildung und deren Einfluss auf die MMP-1 wurde weiter auf RNA Ebene untersucht, da MMP-1 bei vielen Krankheiten induziert. Für MMP-10 ist ein Zusammenhang mit CED bisher nicht beschrieben, weshalb auf eine weitere Untersuchung verzichtet wurde.

4.1.2 Ceramidbildung durch die exogene Sphingomyelinase erhöht in Caco-2 IEZ die Sekretion von MMP-1

Zur Validierung der gewonnenen Daten aus dem *Affymetrix* Array wurde die MMP-1 Konzentration im Überstand von Caco-2 IEZ nach der Stimulation mit exogener SMase untersucht. MMP-1 ist bei Patienten mit Colitis ulcerosa auf RNA-Ebene erhöht

und spielt auch bei anderen inflammatorischen Krankheiten eine Rolle. Deswegen wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der exogenen SMase und der MMP-1 Produktion gibt.

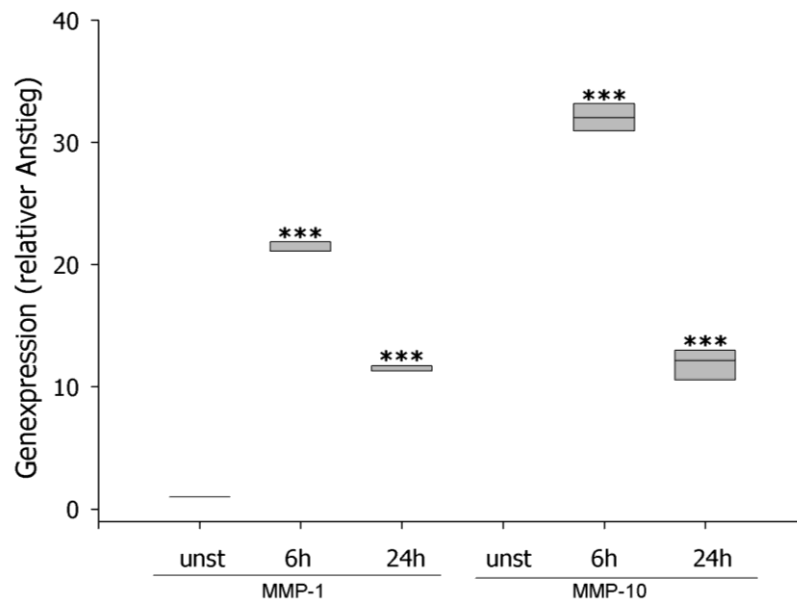


Abbildung 4.1: Affymetrix GeneChip Array Analyse nach Stimulation mit exogener SMase. Intestinale Epithelzellen Caco-2 wurden mit exogener SMase (0,1 U/ml) stimuliert, nach 6h und 24h die RNA isoliert und für den Affymetrix GeneChip Array aufbereitet. Die Expression von MMP-1 und MMP-10 war nach 6h und 24h signifikant erhöht (unst= unstimulierte Probe); (***) $p < 0,001$ vs. unst, Rank Sum Test; $n=4$).

Die Zelllinie Caco-2 wurde hierfür mit verschiedenen Konzentrationen (0,0001 U/ml-0,25 U/ml) der exogenen SMase stimuliert. Der Überstand von Caco-2 IEZ wurde nach 24h mittels ELISA auf die Sekretion der MMP-1 untersucht. Es zeigte sich ein signifikant dosisabhängiger Anstieg der MMP-1 Produktion durch Stimulation mit exogener SMase (Abbildung 4.2). Bereits bei einer sehr niedrigen Konzentration von 0,005 U/ml stieg die Produktion von MMP-1 signifikant an und erreichte das Maximum bei einer Konzentration von 0,125 U/ml (Abbildung 4.2).

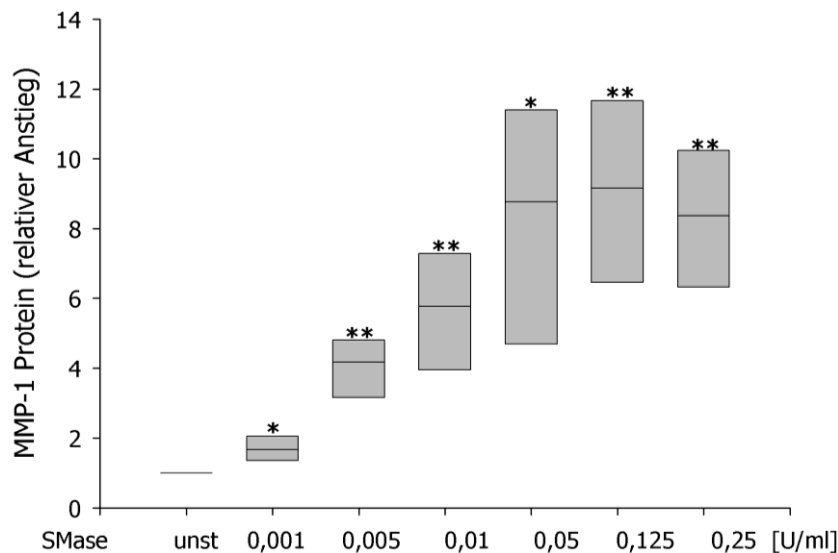


Abbildung 4.2: Dosisabhängiger Anstieg der MMP-1 Produktion nach Stimulation mit exogener SMase. Caco-2 IEZ wurden mit verschiedenen Konzentrationen von exogener SMase stimuliert und nach 24h die Konzentration von MMP-1 im Überstand mittels ELISA gemessen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. unst; Rank Sum Test; $n=6$). Es besteht ein dosisabhängiger Anstieg der MMP-1 Produktion. Das Maximum ist bei einer Konzentration von 0,125 U/ml erreicht.

4.1.3 ASM-defiziente Hautfibroblasten zeigen keinen Anstieg der MMP-1 Produktion von MMP-1 nach Stimulation mit IL-1 β

Um den Einfluss der endogen vorhandenen sauren Sphingomyelinase (ASM) auf die MMP-1 Produktion zu untersuchen, wurde ein genetisches Modell mit humanen ASM-defizienten Hautfibroblasten verwendet. Bei Patienten der Niemann-Pick'schen Krankheit sowohl Typ A als auch Typ B ist ein genetischer Defekt der ASM vorhanden. Für diesen Versuch wurden Hautfibroblasten aus Patienten mit Niemann-Pick Typ A gewonnen. Die Hautfibroblasten von Patienten mit Niemann-Pick'scher Krankheit Typ A und Kontrollfibroblasten von gesunden Patienten wurden miteinander verglichen und dadurch der Einfluss der ASM auf die MMP-1 Expression und Produktion ermittelt.

Die verwendeten Fibroblasten wurden zunächst auf die Aktivität der ASM untersucht, um zu zeigen, dass die ASM-defizienten Fibroblasten keine bzw. nur geringe ASM-Aktivität besitzen. IL-1 β ist ein Aktivator der ASM und wurde somit bei dem ASM-Aktivitätsassay als Stimulanz verwendet. Die ASM-Aktivität der genetisch ASM-defizienten Fibroblasten (ASM^{-/-}) und Kontrollfibroblasten (ASM^{+/+}) wurde mittels

ASM-Aktivitätsassay bestimmt. Die ASM^{+/+}-Fibroblasten zeigten nach Stimulation mit IL-1 β (1 ng/ml) nach 15 min und 30 min einen deutlichen Anstieg der ASM Aktivität (Abbildung 4.3). ASM-defiziente Fibroblasten wiesen hingegen im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten nur eine ASM-Basisaktivität von 7 % auf (Abbildung 4.3). Die ASM-defizienten Fibroblasten zeigten außerdem bei einer Stimulation mit IL-1 β (1 ng/ml) nach 15 min und 30 min keinen Anstieg der ASM-Aktivität.

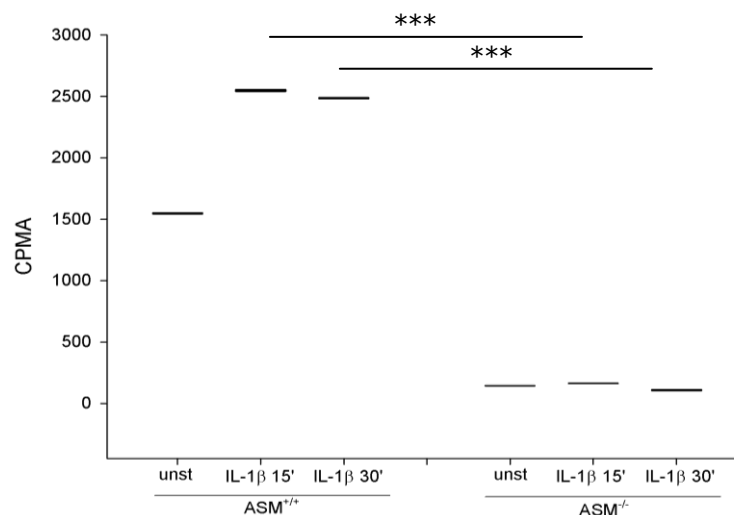


Abbildung 4.3: ASM-Aktivitätsassay mit humanen Hautfibroblasten. Die humanen Hautfibroblasten wurden mit IL-1 β (1 ng/ml) 15 min und 30 min stimuliert und die ASM-Aktivität mittels C¹⁴ Sphingomyelin gemessen. ASM^{+/+} und ASM^{-/-} Fibroblasten wurden hinsichtlich deren ASM-Aktivität miteinander verglichen. Die ASM^{-/-}-Fibroblasten zeigten nur etwa 7 % Anstieg der basalen ASM-Aktivität im Vergleich zu den ASM^{+/+}-Fibroblasten.

Im nächsten Abschnitt wurde zunächst der Einfluss der ASM auf RNA Ebene mittels *Real Time* (RT)-PCR quantitativ miteinander verglichen.

Die ASM-defizienten (ASM^{-/-}) Fibroblasten und Kontrollfibroblasten (ASM^{+/+}) wurden hierfür mit IL-1 β (1 ng/ml) oder exogener SMase (0,1 U/ml) für 6h stimuliert. Nach Isolation der RNA und Umschreiben der RNA in cDNA wurde eine RT-PCR durchgeführt, um die Expression der MMP-1 mRNA der ASM^{+/+} und ASM^{-/-} Fibroblasten miteinander zu vergleichen. Die Kontrollfibroblasten zeigten einen 8,4-fachen \pm 2,6 signifikanten Anstieg der MMP-1 Expression nach der Stimulation mit IL-1 β (Abbildung 4.4). Bei den ASM^{-/-}-Fibroblasten konnte hingegen nur eine marginale Steigerung der MMP-1 mRNA durch IL-1 β gezeigt werden (1,5-fach \pm 0,25). Stimulation mit exogener SMase erhöhte in den ASM^{-/-}-Fibroblasten die Expression

der MMP-1 mRNA signifikant um das 17,5-fache \pm 7,7, bei den ASM^{+/+}-Fibroblasten hingegen konnte keine Vermehrung der MMP-1 Expression durch exogene SMase beobachtet werden (Abbildung 4.4). Die Stimulation mit anderen Zytokinen, die bei CED eine Rolle spielen, wie TNF, LPS und INF- γ zeigten keinen nennenswerten Anstieg der MMP-1 Expression in den verwendeten Fibroblasten (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde auf Proteinebene der Einfluss der ASM nur nach IL-1 β -Stimulation weiter untersucht.

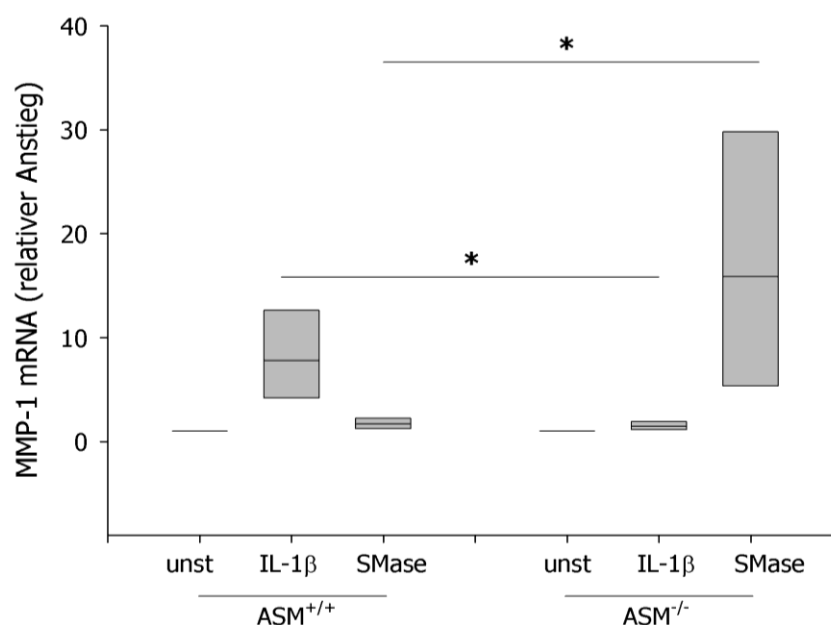


Abbildung 4.4: RT-PCR der humanen Hautfibroblasten. Die Fibroblasten wurden mit IL-1 β (1 ng/ml) oder exogener SMase (0,1 U/ml) 6h stimuliert und eine RT-PCR durchgeführt. IL-1 β führt nur in ASM^{+/+}-Fibroblasten zu einem signifikanten Anstieg der MMP-1 Expression. Im Gegensatz dazu bewirkt die exogene SMase lediglich in ASM^{-/-}-Fibroblasten einen Anstieg der MMP-1 Produktion (*p<0,05 ASM^{+/+} vs. ASM^{-/-}, Rank Sum Test; n=6).

Die erzielten Ergebnisse auf RNA Ebene wurden anschließend auch auf Proteinebene untersucht, um zu beobachten, ob sich der Einfluss der exogenen SMase auch auf das Protein bezieht oder ob sich dieser Effekt nur auf RNA-Ebene zeigt. Mittels MMP-1 ELISA wurde die Abhängigkeit von der ASM bei IL-1 β Stimulation in ASM^{+/+}- und ASM^{-/-}-Fibroblasten untersucht.

Die Hautfibroblasten wurden jeweils mit 0,1 ng/ml oder 1 ng/ml IL-1 β über 24h inkubiert. Im Überstand der ASM^{+/+}-Fibroblasten konnte ein signifikanter Anstieg der MMP-1 Konzentration um 2,7 \pm 0,38 nach der Stimulation mit 1 ng/ml IL-1 β gezeigt

werden (Abbildung 4.5 A). Im Gegensatz dazu wurde bei den $ASM^{-/-}$ -Fibroblasten nur eine marginale Erhöhung der MMP-1 Produktion festgestellt ($1,55 \pm 0,11$). Der Anstieg der MMP-1 Konzentration bei $ASM^{+/+}$ -Fibroblasten konnte schon bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml beobachtet werden. Die $ASM^{+/+}$ -Fibroblasten zeigten bei IL-1 β Stimulation einen dosisabhängigen Anstieg der MMP-1 Konzentration (Abbildung 4.5 B), welcher bei den $ASM^{-/-}$ -Fibroblasten nicht zu beobachten war (Daten nicht gezeigt).

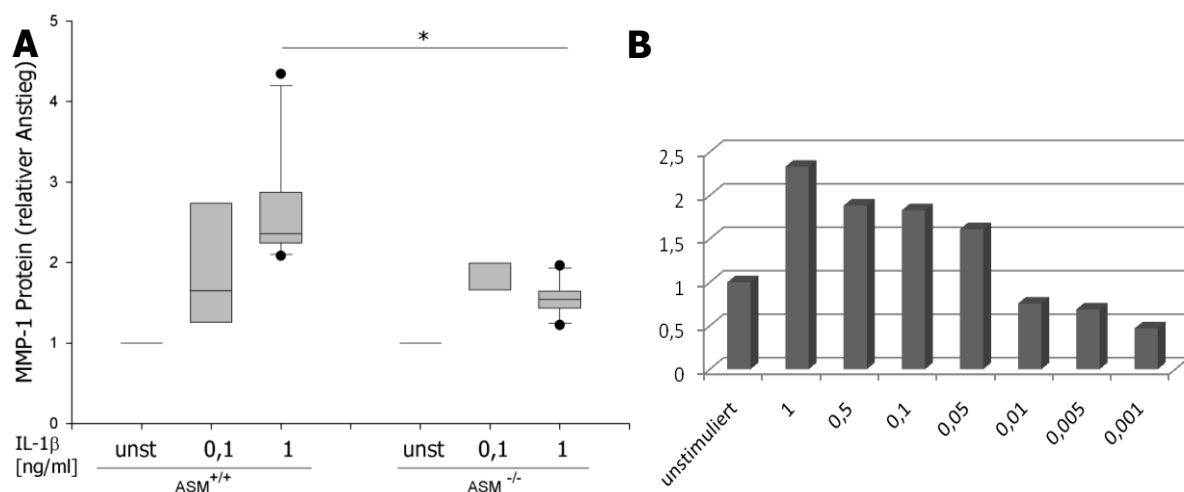


Abbildung 4.5: MMP-1 Produktion der humanen Hautfibroblasten nach Stimulation mit IL-1 β . (A) Die Hautfibroblasten wurden mit IL-1 β (0,1 und 1 ng/ml) 24h stimuliert und die MMP-1 Konzentration im Überstand mittels ELISA gemessen. Die MMP-1 Produktion stieg signifikant in $ASM^{+/+}$ -Fibroblasten nach IL-1 β Stimulation an, was bei den $ASM^{-/-}$ -Fibroblasten nicht gezeigt werden konnte (* $p < 0,05$; IL-1 β $ASM^{+/+}$ vs. IL-1 β $ASM^{-/-}$; Rank Sum Test; $n=5$). (B) Dosisabhängiger Anstieg der MMP-1 Produktion nach Stimulation mit IL-1 β (0,001-1ng/ml) in $ASM^{+/+}$ -Fibroblasten ($n=2$).

4.1.4 Transfektion mit dem Expressionsplasmid pJK-ASM rekonstituiert die MMP-1 Produktion nach Stimulation mit IL-1 β

Die $ASM^{-/-}$ -Fibroblasten wurden mit dem Expressionsplasmid für die ASM (pJK-ASM) transfiziert, um Bedingungen wie in den $ASM^{+/+}$ -Fibroblasten wiederherzustellen. Dadurch sollte die Abhängigkeit der MMP-1 Produktion von der ASM-Expression verifiziert werden. Hierfür wurden die $ASM^{-/-}$ -Fibroblasten mit dem Kontrollplasmid pJK oder dem Expressionsplasmid pJK-ASM transfiziert. Das Plasmid pJK enthält einen simultan exprimierenden myc-tag, wodurch die transfizierten Zellen nach 24h

markiert und aussortiert werden konnten. Nach weiteren 24h Stimulation mit IL-1 β (1 ng/ml) wurde mittels ELISA die Konzentration des MMP-1 Proteins im Überstand untersucht. Die mit dem Expressionsplasmid pJK-ASM transfizierten ASM^{-/-}-Fibroblasten zeigten einen 2,4-fachen \pm 0,3 signifikanten Anstieg der MMP-1 Produktion (Abbildung 4.6 A). Dieser Anstieg ist vergleichbar mit dem in ASM^{+/-}-Fibroblasten beobachteten Werten (Abbildung 4.5). Die ASM^{-/-}-Fibroblasten, die mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden oder diejenigen ohne transfiziertes Plasmid, zeigten nach Stimulation mit IL-1 β keinen Anstieg der MMP-1 Produktion (1,2-fach \pm 0,2 und 1.1-fach \pm 0,11) (Abbildung 4.6 A).

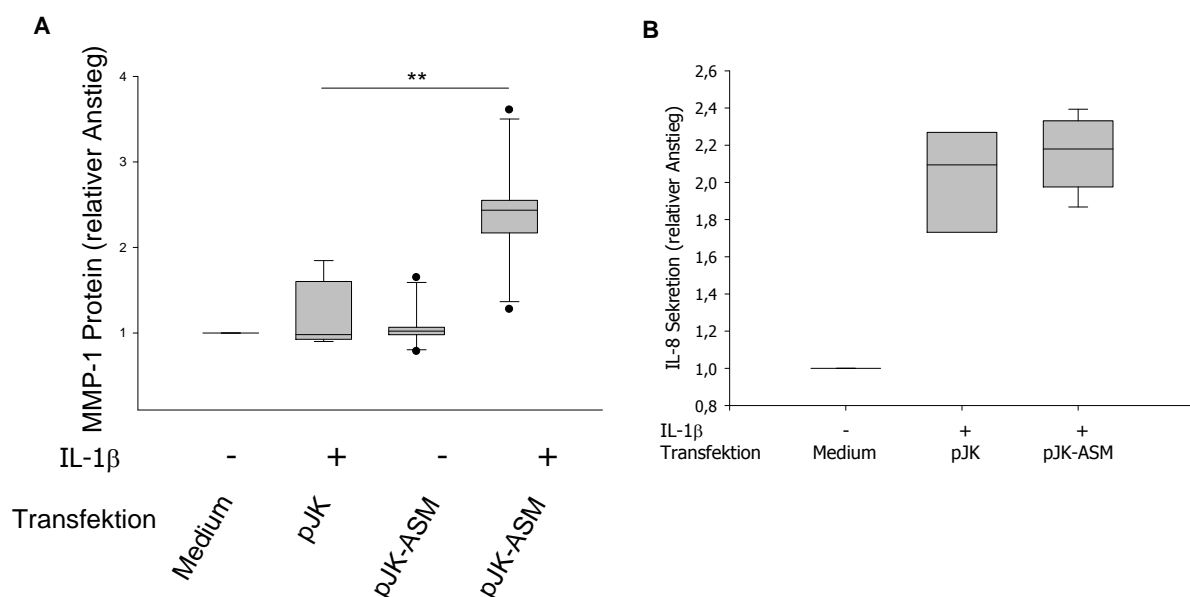


Abbildung 4.6: MMP-1 Produktion nach Transfektion der ASM^{-/-}-Fibroblasten mit Expressionsplasmid pJK-ASM und Kontrollplasmid pJK. (A) Transfektion der ASM^{-/-}-Fibroblasten und Stimulation mit IL-1 β (1 ng/ml). Mittels ELISA wurde die MMP-1 Produktion im Überstand bestimmt. Transfektion mit dem Plasmid pJK-ASM bewirkte einen signifikanten Anstieg der MMP-1 Produktion (* p <0,05; pJK vs. pJK-ASM; Rank Sum Test; n =5). (B) IL-8 ELISA der transfizierten ASM^{-/-}-Fibroblasten mit pJK und pJK-ASM zeigte keinen Unterschied in der Produktion von IL-8 nach Stimulation mit IL-1 β (1 ng/ml).

Ein anderer Signalweg, der über IL-1 β aktiviert wird, führt zur Bildung von IL-8. Der Anstieg von IL-8 wurde auf dessen Abhängigkeit von der ASM untersucht. Die ASM^{-/-}-Fibroblasten zeigten eine Zunahme der IL-8 Produktion durch IL-1 β Stimulation nach 24h. Die mit dem Kontrollplasmid pJK transfizierten ASM^{-/-}-Fibroblasten und die mit dem Expressionsplasmid pJK-ASM transfizierten ASM^{-/-}-Fibroblasten zeigten bezüglich

der IL-8 Produktion keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 4.6 B) (2,15-fach \pm 0,1 vs. 2-fach \pm 0,2).

Zur weiteren Bestätigung, dass die ASM für die MMP-1 Produktion erforderlich ist, erfolgte die pharmakologische Hemmung der ASM durch Imipramin (30 μ M). Imipramin ist ein trizyklisches Antidepressivum und verhindert die proteolytische Degradation der ASM (190-192). Zurzeit sind 6 verschiedene SMasen bekannt. Zur Verifizierung eines möglichen Einflusses der neutralen SMase (NSM), wurden die ASM^{+/+}-Fibroblasten auch mit dem Inhibitor der NSM L-Carnitin (10 μ g/ml) inkubiert.

Die Zellen wurden mit den Inhibitoren 30 min vorinkubiert und anschließend mit IL-1 β (1 ng/ml) stimuliert. Die Konzentration von MMP-1 wurde nach 24h im Überstand mittels ELISA ermittelt. Die ASM^{+/+}-Fibroblasten zeigten nach Stimulation mit IL-1 β einen signifikanten Anstieg der MMP-1 Produktion um das 8,4-fache \pm 2,8; $p < 0,01$ (Abbildung 4.7 A). Dieser Anstieg konnte durch Inhibition der ASM mittels Imipramin vollständig blockiert werden (0,6-fach \pm 0,16; $p = 0,016$).

Zur Inhibition der NSM wurden die ASM^{+/+}-Fibroblasten mit L-Carnitin 30 min vorbehandelt und anschließend mit IL-1 β (1 ng/ml) 24h stimuliert. Die Produktion der MMP-1 stieg durch Stimulation mit IL-1 β um das 11,25-fache \pm 3,9 an. Die Inhibition der NSM durch L-Carnitin scheint somit die Induktion von MMP-1 durch Stimulation mit IL-1 β nicht zu beeinträchtigen (11-fach \pm 3,9) (Abbildung 4.7 B).

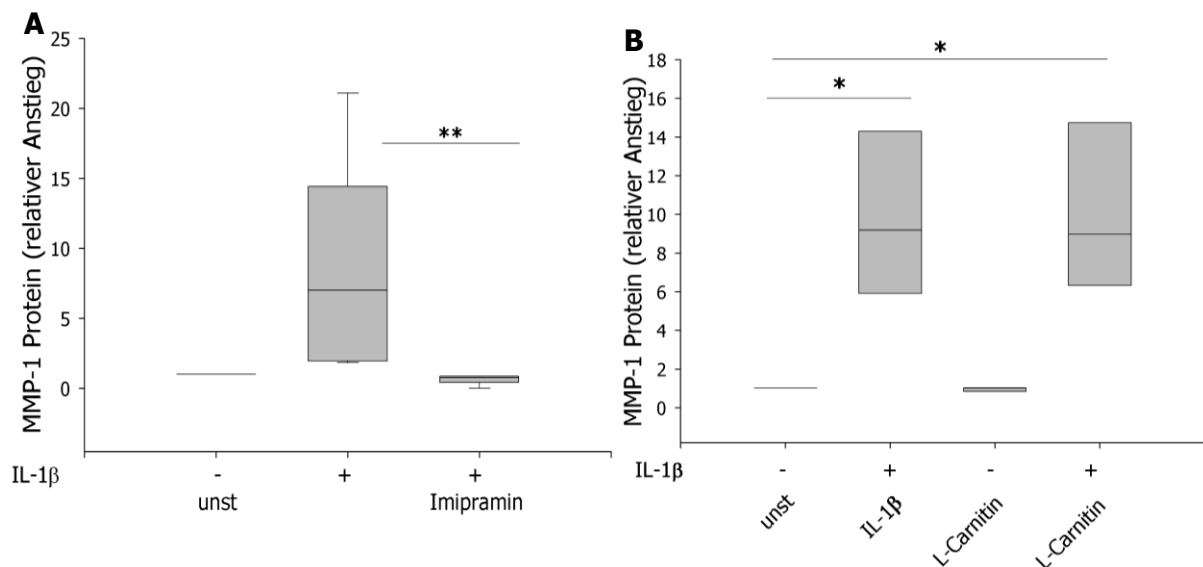


Abbildung 4.7: Pharmakologische Inhibition der ASM und NSM und deren Einfluss auf die Induktion von MMP-1. (A) Pharmakologische Inhibition der ASM durch Imipramin (30 μ M). ASM^{+/+}-Fibroblasten wurden mit Imipramin 30 min vorinkubiert und mit IL-1 β (1 ng/ml) 24h stimuliert. Mittels ELISA wurde die Konzentration von MMP-1 untersucht. Die Induktion von MMP-1 konnte durch Imipramin komplett reduziert werden (**p<0,01; IL-1 β vs. IL-1 β +Imipramin, Rank Sum Test; n=5). (B) Die Inhibition der neutralen SMase durch L-Carnitin (10 μ g/ml) in ASM^{+/+} Fibroblasten zeigte keinen Einfluss von L-Carnitin auf die MMP-1 Produktion (*p<0,05 IL-1 β vs. IL-1 β +L-Carnitin, Rank-Sum Test; n=6).

Andere Inhibitoren des Ceramidmetabolismus wie Monensin (1 μ M) und D609 (25 μ g/ml) wurden ebenfalls auf deren Einfluss überprüft. Der Inhibitor FumonisinB hemmt die saure Ceramidase und es wurde untersucht, ob sich dadurch ein Einfluss auf die MMP-1 Produktion zeigt, was nicht bestätigt werden konnte. Nur bei Imipramin kam es zu einer sehr starken Reduktion der MMP-1 Konzentration im Überstand. Bei den anderen Inhibitoren konnte nur eine geringe Verminderung der MMP-1 Produktion beobachtet werden. Deswegen wurde in den weiteren Versuchen nur Imipramin verwendet. (Daten nicht gezeigt).

Eine Destruktion von Lipid Rafts wurde durch die Extraktion von Cholesterin mit m- β -Cyclodextrin (m- β -CD) erreicht. Dadurch sollte gezeigt werden, dass der Effekt der ASM über Lipid Rafts vermittelt wird. Die Vorbehandlung mit m- β -CD (10 nM) führt zum Ausbleiben der MMP-1 Produktion durch IL-1 β (0,53-fach \pm 0,17), während die Stimulation mit IL-1 β ohne m- β -CD Behandlung zu einem 12,2-fachen \pm 4,7 Anstieg führt (p=0,03) (Abbildung 4.8).

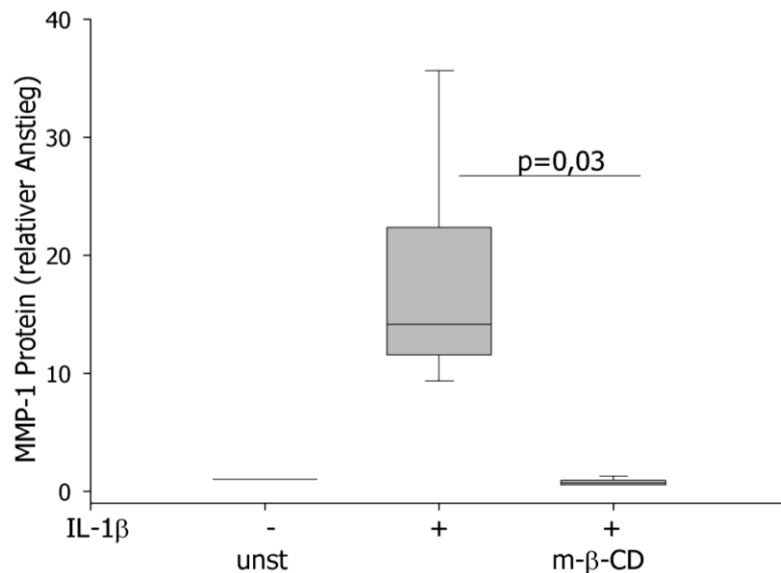


Abbildung 4.8: Extraktion von Cholesterin aus Lipid Rafts mit Methyl-β-Cyclodextrin unterbindet Induktion von MMP-1 durch IL-1β. Die humanen ASM^{+/+}-Fibroblasten wurden mit Methyl-β-Cyclodextrin (m-β-CD) (10 mM) 1 Stunde vorinkubiert und danach mit IL-1β (1 ng/ml) stimuliert. Mittels MMP-1 ELISA wurde in den Überständen die MMP-1 Konzentration ermittelt (p=0,03 IL-1β vs. IL-1β+ m-β-CD; Rank Sum Test; n=6).

4.1.5 Die ASM hat Einfluss auf die ERK Phosphorylierung nach IL-1β Stimulation, aber nicht auf die p38MAPK Phosphorylierung

Die *mitogene-activated protein* (MAP)-Kinasen werden normalerweise direkt durch Phosphorylierung von zwei Aminosäuren, Tyrosin und Threonin, welche nur durch eine Aminosäure voneinander getrennt sind. Damit die Kinasen aktiv sind, müssen beide Reste phosphoryliert sein. Die Phosphorylierung dieser beiden Aminosäuren wird durch die MAP-Kinase Kinase vollzogen, welche einen Schritt *upstream* in der Kaskade steht. Wenn die MAP-Kinasen aktiviert sind, akkumulieren sie im Nukleus, wo sie daraufhin Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und so die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen regulieren. Sobald die MAP-Kinasen dephosphoryliert und damit inaktiviert werden, verteilen sie sich wieder im Zytosol und stehen für weitere Aktivierungszyklen zur Verfügung.

Die Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen ist abhängig von der Stimulation durch verschiedene Zytokine wie z. B. IL-1β, TGF-β oder TNF. Nach Stimulation mit IL-1β zu verschiedenen Zeitpunkten sollte untersucht werden, ob dieser Signalweg ASM-abhängig ist. Dafür wurden die ASM-defizienten Fibroblasten im Vergleich zu den

ASM^{+/+}-Fibroblasten nach Stimulation mit IL-1 β untersucht. Mittels Western Blot wurde die Phosphorylierung der Kinase ERK1/2 (*extracellular signal-related kinases*) und p38MAPK analysiert. Bei den ASM^{+/+}-Fibroblasten zeigte sich nach IL-1 β Stimulation eine schnelle Phosphorylierung der p38MAPK und ERK1/2. Bereits nach 5 Minuten war eine deutliche Phosphorylierung der beiden Kinasen sichtbar (Abbildung 4.9).

Bei den ASM-defizienten Fibroblasten konnte zu keinem Stimulationszeitpunkt mit IL-1 β eine Phosphorylierung von ERK 1/2 nachgewiesen werden. Bei der p38MAP Kinase kam es hingegen zu einer vergleichbaren Phosphorylierung wie bei den ASM^{+/+}-Fibroblasten (Abbildung 4.10).

Die unterschiedliche Phosphorylierung bei ERK1/2 wurde näher untersucht. Durch Vorstimulation mit der exogener SMase (0,1 U/ml) und anschließender Stimulation mit IL-1 β zu verschiedenen Zeitpunkten, sollte in ASM^{-/-}-Fibroblasten die Situation von ASM^{+/+}-Fibroblasten simuliert werden. Durch Zugabe der exogenen SMase konnte die Phosphorylierung von ERK1/2 nach IL-1 β Stimulation rekonstituiert werden (Abbildung 4.11).

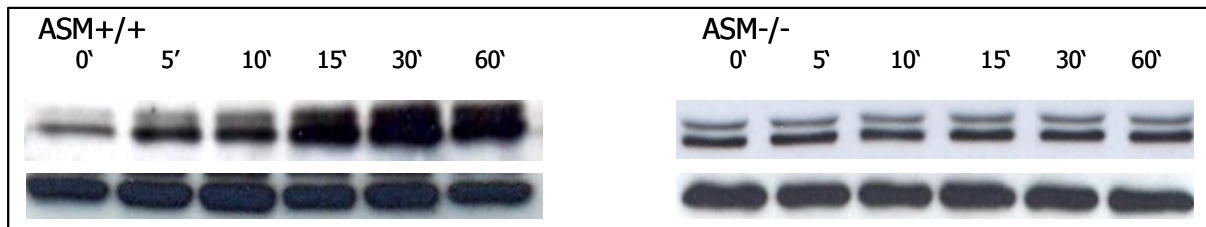


Abbildung 4.9: Phosphorylierung von ERK1/2. ASM^{+/+} und ASM^{-/-} Fibroblasten wurden über verschiedene Zeitintervalle (0-60 min) mit IL-1 β (1 ng/ml) stimuliert. Bereits nach 5 min zeigt ERK1/2 (44/42 kDa) bei ASM^{+/+}-Fibroblasten eine deutliche Phosphorylierung die im zeitlichen Verlauf weiter zunimmt. ASM^{-/-}-Fibroblasten weisen keine Zunahmen der Phosphorylierung durch IL-1 β auf. Der untere Western Blot zeigt die Ladekontrolle β -actin (38 kDa).

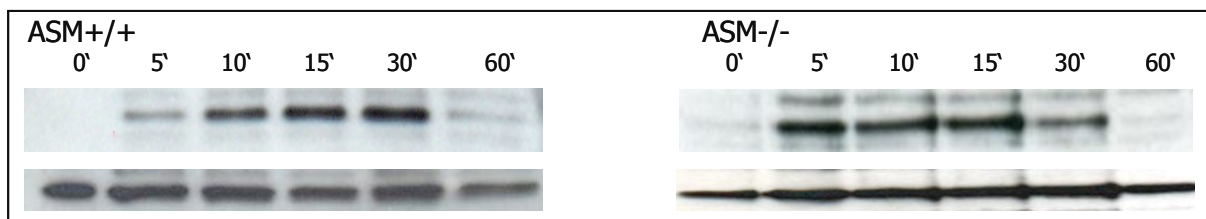


Abbildung 4.10: Phosphorylierung von p38MAPK. ASM^{+/+} und ASM^{-/-} Fibroblasten nach Stimulation mit IL-1 β (1 ng/ml) zu verschiedenen Zeiten. Bei beiden Fibroblasten zeigt sich ein vergleichbarer Anstieg der Phosphorylierung von p38MAPK. Der untere Western Blot zeigt die Ladekontrolle β -actin.

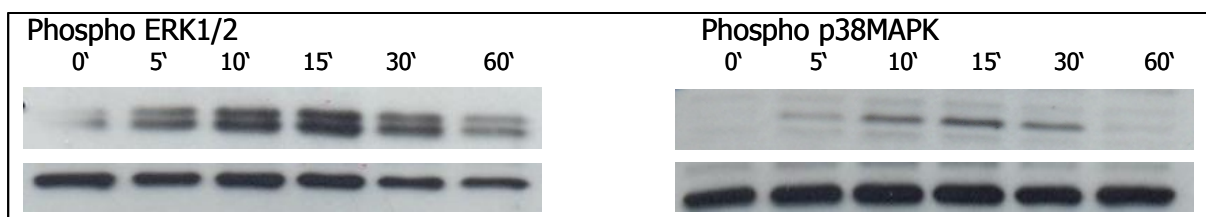


Abbildung 4.11: Phosphorylierung der ERK1/2 und p38MAPK in ASM^{-/-} Fibroblasten bei gleichzeitiger Inkubation mit exogener SMase. ASM^{-/-}-Fibroblasten wurden mit exogener SMase (0,1 U/ml) vorbehandelt (30 min) und mit IL-1 β (1 ng/ml) zu verschiedenen Zeiten stimuliert. Dadurch kommt es zu einer Rekonstitution der zuvor ausgebliebenen Phosphorylierung von ERK1/2. Der untere Western Blot zeigt die Ladekontrolle β -actin.

4.2 Pharmakologische Inhibition der ASM durch Imipramin blockiert die Produktion von MMP-1 in IEZ und Kolon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF)

4.2.1 Die pharmakologische Inhibition der ASM durch das trizyklische Antidepressivum Imipramin reduziert die MMP-1 Produktion nach Stimulation mit IL-1 β und TNF

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Hautfibroblasten die Inhibition der ASM mit Imipramin eine vollständige Hemmung der MMP-1 Induktion durch IL-1 β bewirkt. Da eine vermehrte Produktion von MMP-1 bei der Pathogenese von CED bedeutsam ist, wurden die gewonnenen Erkenntnisse auch an intestinalen Epithelzellen (IEZ) und primären *colon lamina propria* Fibroblasten (CLPF) von Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) und Kontrollpatienten (KO) untersucht. Die Kontrollpatienten hatten keine chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

Die ASM wird durch verschiedene inflammatorische Zytokine aktiviert, die auch bei CED entzündungsfördernd wirken. Hierzu gehören u.a. TNF und IL-1 β . Deswegen wurden IEZ und CLPF mit den Zytokinen TNF (10 ng/ml) und IL-1 β (1 ng/ml) stimuliert und die Produktion von MMP-1 untersucht.

Zuerst wurde die Abhängigkeit der MMP-1 Produktion von der ASM in der intestinalen Epithelzelllinie Caco-2 untersucht. Die Sekretion von MMP-1 wurde durch IL-1 β um das 2,9-fache \pm 0,07 in Caco-2 Zellen induziert (Abbildung 4.12; $p < 0,001$). Die Inhibition der ASM mit Imipramin (30 μ M) verhinderte jeglichen Anstieg der Produktion von MMP-1 (0,5-fach \pm 0,03; $p < 0,05$) nach Stimulation mit IL-1 β . Durch die Stimulation mit TNF kam es ebenfalls zu einer signifikanten Induktion der MMP-1 Sekretion (2,5-fach \pm 0,1; $p < 0,001$). Mit Imipramin blieb dieser Anstieg aus (0,8-fach \pm 0,06). Somit führte die Inhibition mit Imipramin bei beiden Zytokinen zu einer Blockierung der MMP-1 Induktion (Abbildung 4.12).

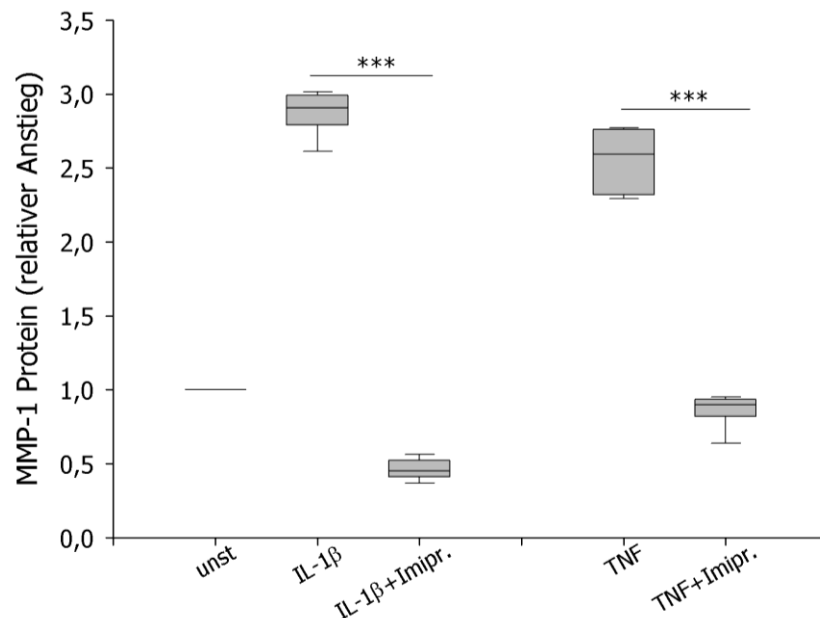


Abbildung 4.12: Pharmakologische Inhibition der ASM durch Imipramin verhindert die Induktion von MMP-1 durch TNF und IL-1 β in IEZ. Die IEZ wurden mit Imipramin (30 μ M) 30 min vorinkubiert und mit TNF (10 ng/ml) oder IL-1 β (1 ng/ml) stimuliert. Konzentration von MMP-1 im Überstand wurde nach 24h mittels ELISA bestimmt (** $p < 0,001$; Rank Sum Test; $n = 8$).

Bisherige Versuche haben gezeigt, dass MMP-1 in Fibroblasten von Patienten mit CU auf RNA-Ebene erhöht ist. In dieser Arbeit sollte die MMP-1 Produktion auf Proteinebene in CLPF von Patienten mit CU und von Kontrollpatienten untersucht werden. Der Einfluss der ASM auf die entzündungsbedingte Produktion von MMP-1 wurde mit Hilfe der Zytokine TNF und IL-1 β untersucht, weil diese Zytokine die ASM aktivieren. Zur pharmakologischen Inhibition der ASM wurde abermals Imipramin verwendet. Die CLPF wurden mit Imipramin vorinkubiert und anschließend mit TNF oder IL-1 β stimuliert und nach 24h wurde die Konzentration von MMP-1 im Überstand bestimmt. Bei allen CLPF, die aus Kontrollpatienten isoliert worden waren, zeigte sich nach Stimulation mit TNF und IL-1 β ein starker Anstieg der MMP-1 Produktion ($p < 0,001$) (Abbildung 4.13). Die Inhibition der ASM durch Imipramin blockierte die MMP-1 Produktion nach Stimulation, sowohl mit IL-1 β als auch mit TNF (Abbildung 4.13).

Die CLPF von Patienten mit CU wurden ebenfalls mit Imipramin vorinkubiert und danach mit TNF oder IL-1 β stimuliert. Wie bei den CLPF von Kontrollpatienten kam es durch die Stimulation zu einem starken Anstieg der MMP-1 Produktion (Abbildung 4.14). Dieser konnte verhindert werden, indem die CLPF zuvor mit Imipramin

inkubiert wurden. Es zeigte sich kein Anstieg der MMP-1 Produktion nach Stimulation mit TNF oder IL-1 β .

Die CLPF und Caco-2 Zellen wurden nach der Zugabe von Imipramin einem Vitalitätstest unterzogen, um die Vitalität der Fibroblasten und Caco-2 Zellen nachzuweisen. Im Vergleich zu den unstimulierten Caco-2 Zellen und Fibroblasten war keine erhöhte Apoptoserate durch Imipramin nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

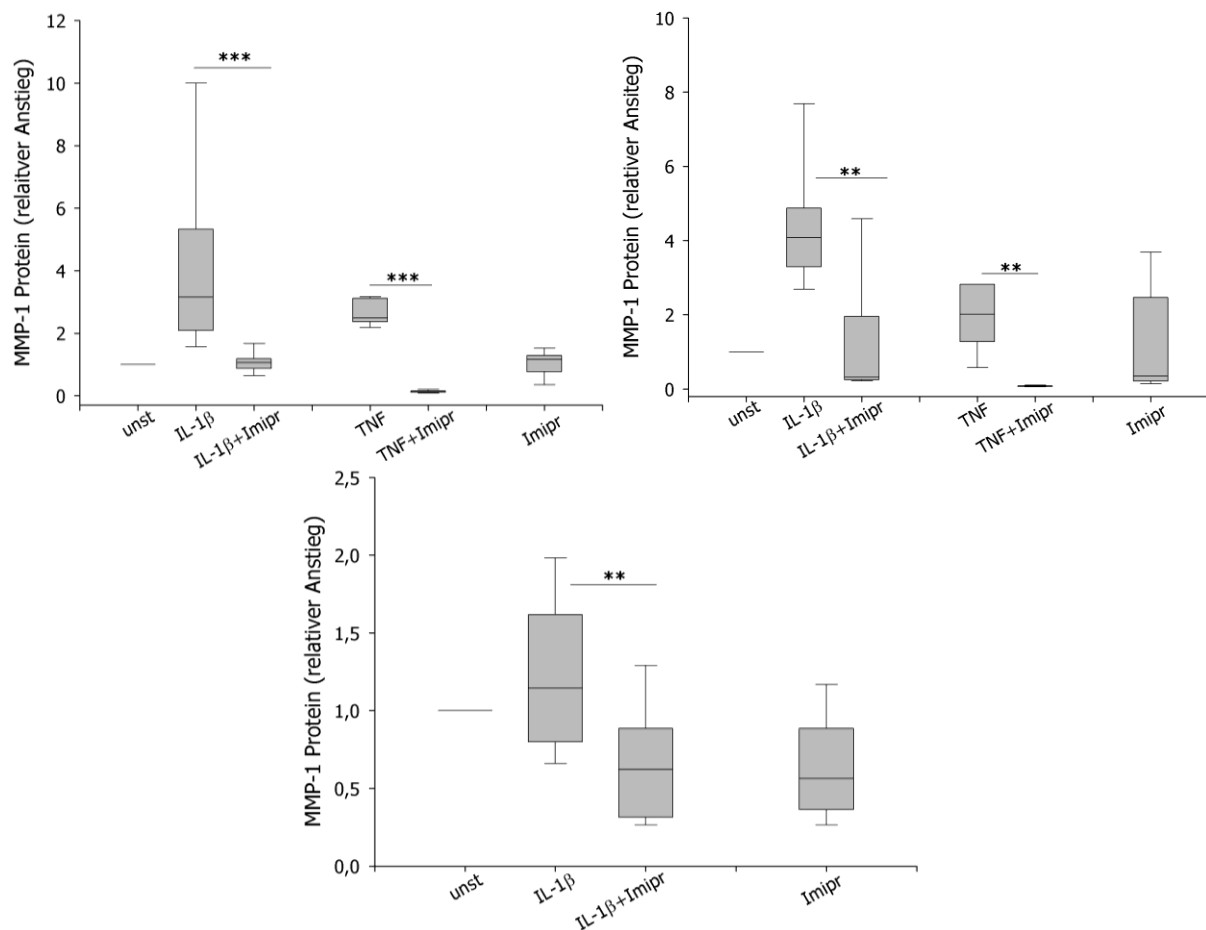


Abbildung 4.13: Fehlende MMP-1 Induktion in CLFP von Kontrollpatienten durch Inhibition der ASM mit Imipramin. Die Fibroblasten wurden aus Kontrollpatienten isoliert, kultiviert und mit Imipramin 30 min vorinkubiert und danach mit IL-1 β bzw. TNF stimuliert. Nach 24h wurde der Überstand abgenommen und mittels ELISA die MMP-1 Konzentration gemessen (**p<0,01; ***p<0,001 IL-1 β vs. IL-1 β +Imipramin; Rank Sum Test; n=10-12).

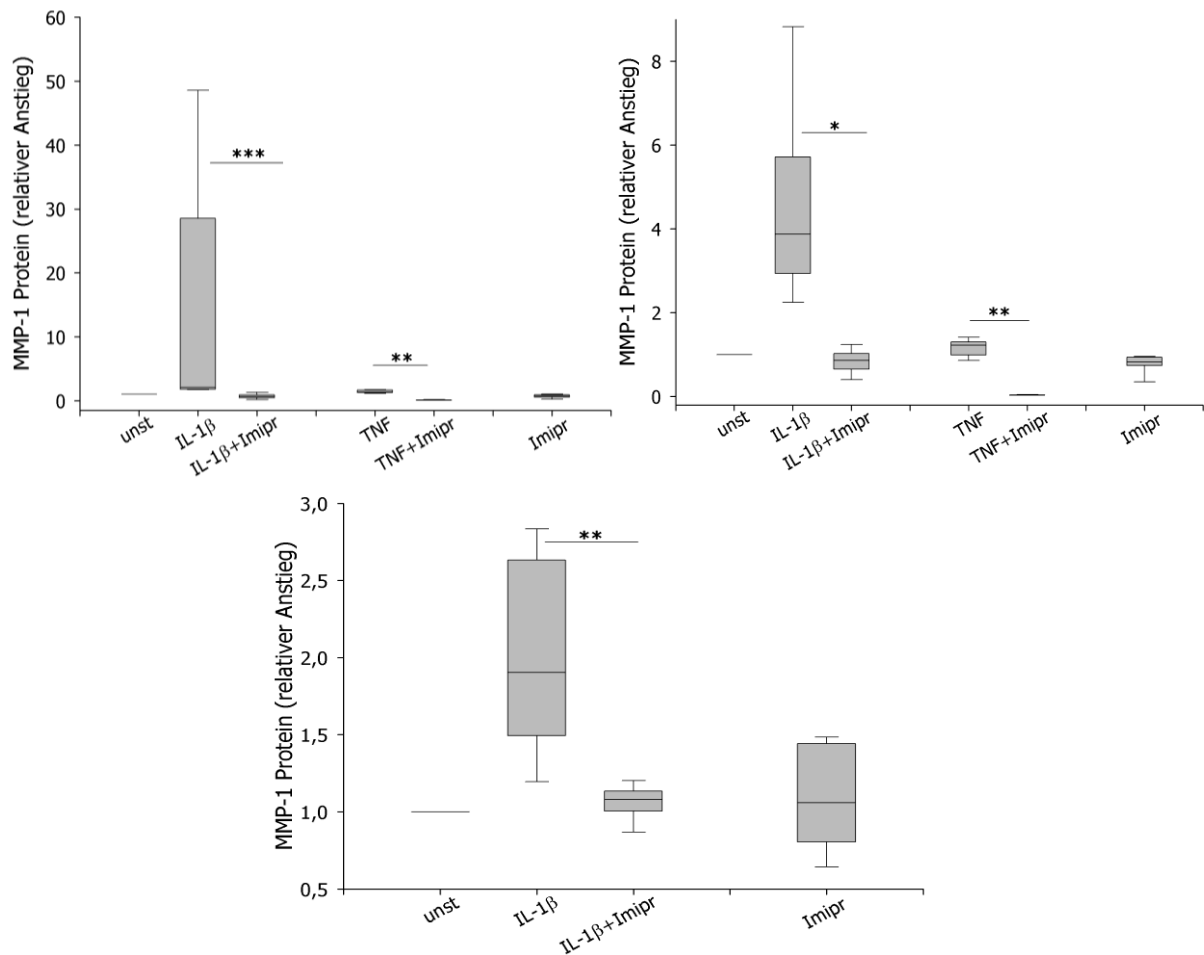


Abbildung 4.14: Ausbleiben der Induktion von MMP-1 durch pharmakologische Inhibition der ASM mit Imipramin in CLPF bei Patienten mit Colitis ulcerosa. Die Fibroblasten wurden isoliert, kultiviert und mit Imipramin 30 min vorinkubiert und danach mit IL-1β (1 ng/ml) oder TNF (10 ng/ml) stimuliert. Nach 24h wurde der Überstand abgenommen und mittels ELISA die MMP-1 Konzentration gemessen (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 IL-1β vs. IL-1β+Imipramin; Rank Sum Test; n=10-12).

4.2.2 Imipramin reduziert die Phosphorylierung von ERK1/2 nach Stimulation mit IL-1β

Durch die Analyse des Signalweges, der zur MMP-1 Produktion führt, sollte die Lokalisation der Signalunterbrechung nachgewiesen werden, die durch die Inhibition der ASM mit Imipramin entsteht.

CLPF von Kontrollpatienten und Patienten mit CU wurden nach Vorinkubation mit Imipramin mit TNF (10 min und 20 min) oder IL-1β (10 min und 20 min) stimuliert und mittels Western Blot wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 bestimmt. Die Stimulation mit IL-1β führte zu einer schnellen Phosphorylierung von ERK1/2 in

beiden CLPF (Abbildung 4.15; A und B). Die Inhibition der ASM durch Imipramin reduzierte die Phosphorylierung bei Stimulation mit IL-1 β (Abbildung 4.15). Dieser Effekt konnte bei der Stimulation mit TNF nicht gezeigt werden. Weder bei den CLPF der Kontrollpatienten noch bei den Patienten mit CU konnte eine Inhibition der Phosphorylierung von ERK1/2 nachgewiesen werden, da sich durch TNF keine rasche Phosphorylierung von ERK1/2 zeigte (Abbildung 4.15).

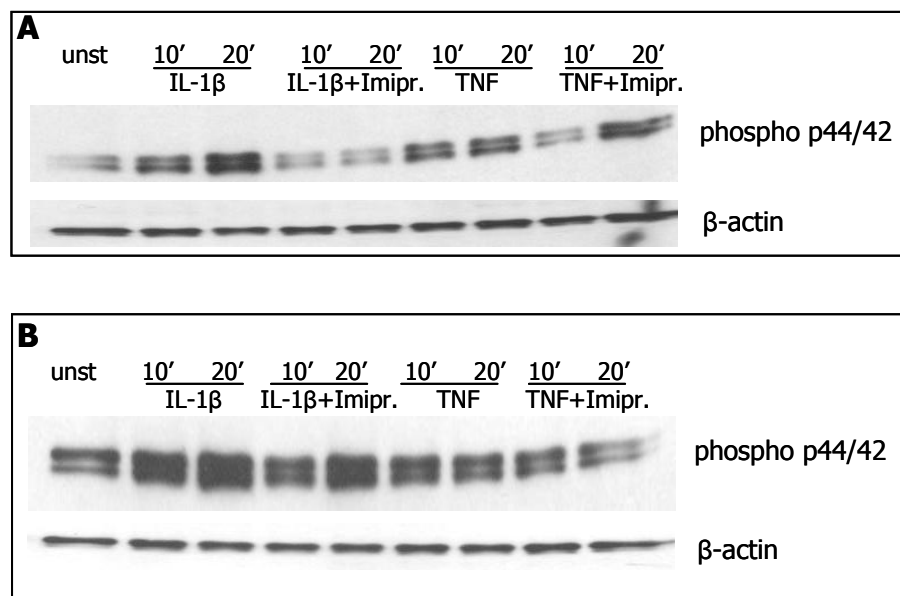


Abbildung 4.15: Phosphorylierung von ERK1/2 nach Vorinkubation mit Imipramin und anschließender Stimulation mit IL-1 β oder TNF. CLPF von Kontrollpatienten (A) und Patienten mit CU (B) wurden kultiviert und mit Imipramin 30 min vorinkubiert. Anschließend wurden diese mit IL-1 β (1 ng/ml) oder TNF (10 ng/ml) 10 min und 20 min stimuliert. Mittels Western Blot wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Durch Vorbehandlung mit Imipramin ist eine verminderte Phosphorylierung nach Stimulation erkennbar (phospho 44/42= ERK1/2).

4.2.3 Aktivitätsabhängige Serumkonzentration von MMP-1 bei CU und MC Patienten

Bisher wurde ein Zusammenhang von MMP-1 bei CU und MC Patienten nur auf mRNA Ebene untersucht. Durch die Verwendung von Patientenseren aus einer klinikinternen Serumbank konnte die Konzentration von MMP-1 bei unterschiedlicher Krankheitsaktivität von CU und MC miteinander verglichen werden. Die Krankheitsaktivitäten wurden unterteilt in aktiv, chronisch aktiv und in Remission. Die geringste MMP-1 Konzentration fand man in Seren von gesunden Probanden. Bei MC

Patienten in Remission war diese deutlich höher, jedoch war die höchste Konzentration in Patienten in akutem Stadium zu sehen. (Abbildung 4.16). Bei CU Patienten im aktiven Stadium konnte ebenfalls eine Erhöhung von MMP-1 im Vergleich zu den Kontrollprobanden gezeigt werden. Die CU Patienten, die in Remission waren, hatten im Gegensatz zu den anderen Stadien die geringste Konzentration von MMP-1 im Serum. Bei der Kontrollgruppe waren die Konzentrationen von MMP-1 am geringsten und wiesen im Vergleich zu allen Patientenseren die niedrigsten Werte auf (Abbildung 4.16).

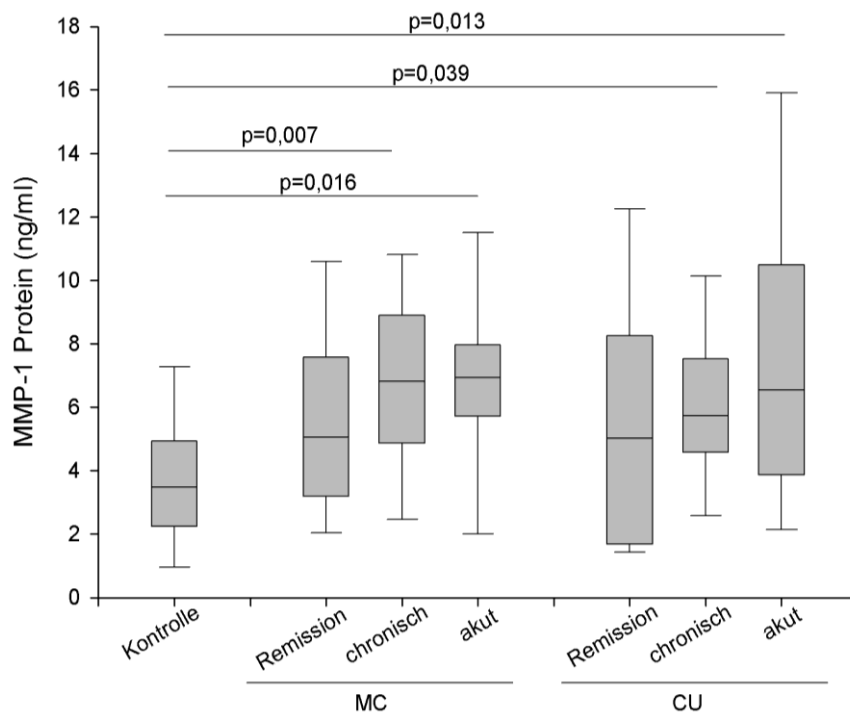


Abbildung 4.16: MMP-1 Serumkonzentration bei Patienten mit CU und MC in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität. Die Seren wurden mittels MMP-1 ELISA untersucht. Darstellung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Rank-Sum Test; n=15-20).

4.3 Veränderung der bioaktiven Lipide bei experimenteller muriner Kolitis in verschiedenen Kolutismodellen

4.3.1 Lipidveränderungen und Ceramidbildung bei chronischer DSS Kolitis

Lipid-basierte Diäten oder pharmakologische Beeinflussung des Lipidmetabolismus stellen potentielle therapeutische Prinzipien bei CED dar. Deshalb wurde in dieser Arbeit eine systematische Bestimmung der bioaktiven Lipide bei der murinen Kolitis durchgeführt und die Auswirkungen des *second messengers* Ceramid untersucht.

Im ersten Ansatz wurde durch Gabe von DSS im Trinkwasser eine chronische Kolitis induziert. Vier Wochen nach dem 4. Zyklus, im Stadium der chronischen Kolitis, wurden die IEZ aus dem Kolon der Mäuse isoliert und mittels der Tandem Massenspektrometrie die Lipidkonzentration bestimmt. Als Kontrollgruppe dienten Mäuse ohne DSS induzierter Kolitis. Die Konzentrationen der verschiedenen Lipide aus isolierten murinen IEZ wurden mit den Kontroll-IEZ verglichen.

Zunächst wurden die isolierten IEZ mittels FACS untersucht, um zu verifizieren, dass es sich bei den gewonnenen Zellen um intestinale Epithelzellen handelt. Der Antikörper G8.8 diente hierbei als Marker, da dieser spezifisch nur an Epithelzellen bindet (Abbildung 4.17). Nach Markierung der Epithelzellen mit dem G8.8 Antikörper wurde mit einem FITC gekoppelten sekundären Antikörper gefärbt und mittels FACS analysiert. Die Auswertung der FACS Analyse zeigte, dass es sich bei mindestens 93 % der isolierten Zellen um Epithelzellen handelt (Abbildung 4.17).

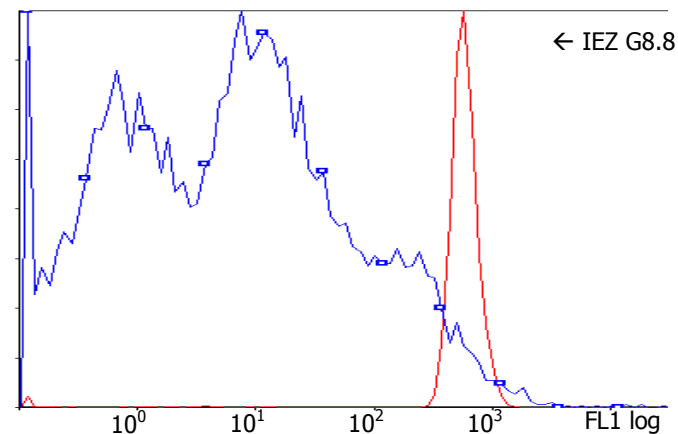


Abbildung 4.17: FACS-Analyse der Epithelzellpopulation nach Isolation der murinen IEZ aus dem Mauskolon. Die intestinalen Epithelzellen wurden aus dem Kolon von Mäusen isoliert und anschließend mit dem Antikörper G8.8 als Epithelzellmarker inkubiert. Dadurch konnte verifiziert werden, dass hauptsächlich die intestinalen Epithelzellen isoliert wurden (rote Linie: G8.8 positive Zellen; blaue Linie: G8.8 negative Zellen).

Die Lipidanalyse durch die Massenspektrometrie machte deutlich, dass es durch die Induktion einer chronischen Kolitis in IEZ von Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen einen Anstieg von Ceramid um 71 % kommt (Abbildung 4.18 A). Im Gegensatz dazu war das Lipid Lysophosphatidylcholin (LPC) in den IEZ von Kolitis Mäusen um 22 % vermindert (Abbildung 4.18 A). Phosphatidylcholin (PC) blieb in beiden Gruppen konstant und zeigte im Falle der Kolitis keine Konzentrationsänderung (Abbildung 4.18 B). Das freie Cholesterin verringerte sich in der Gruppe mit induzierter Kolitis (Abbildung 4.18 B). Die Konzentration an Sphingomyelin (SM) und Phosphatidylethanolamin (PE) gingen in der Gruppe mit Kolitis im Vergleich zu der Kontrollgruppe zurück (Abbildung 4.18 C). Das Lipid Plasmalogen (PE-pl) stieg im Gegensatz zur Kontrollgruppe an (Abbildung 4.18 C). Abbildung 4.18 D zeigt den histologischen Score der chronischen Kolitismäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Mäuse mit DSS induzierter Kolitis hatten, wie zu erwarten, einen deutlich höheren Score als die Mäuse der Kontrollgruppe.

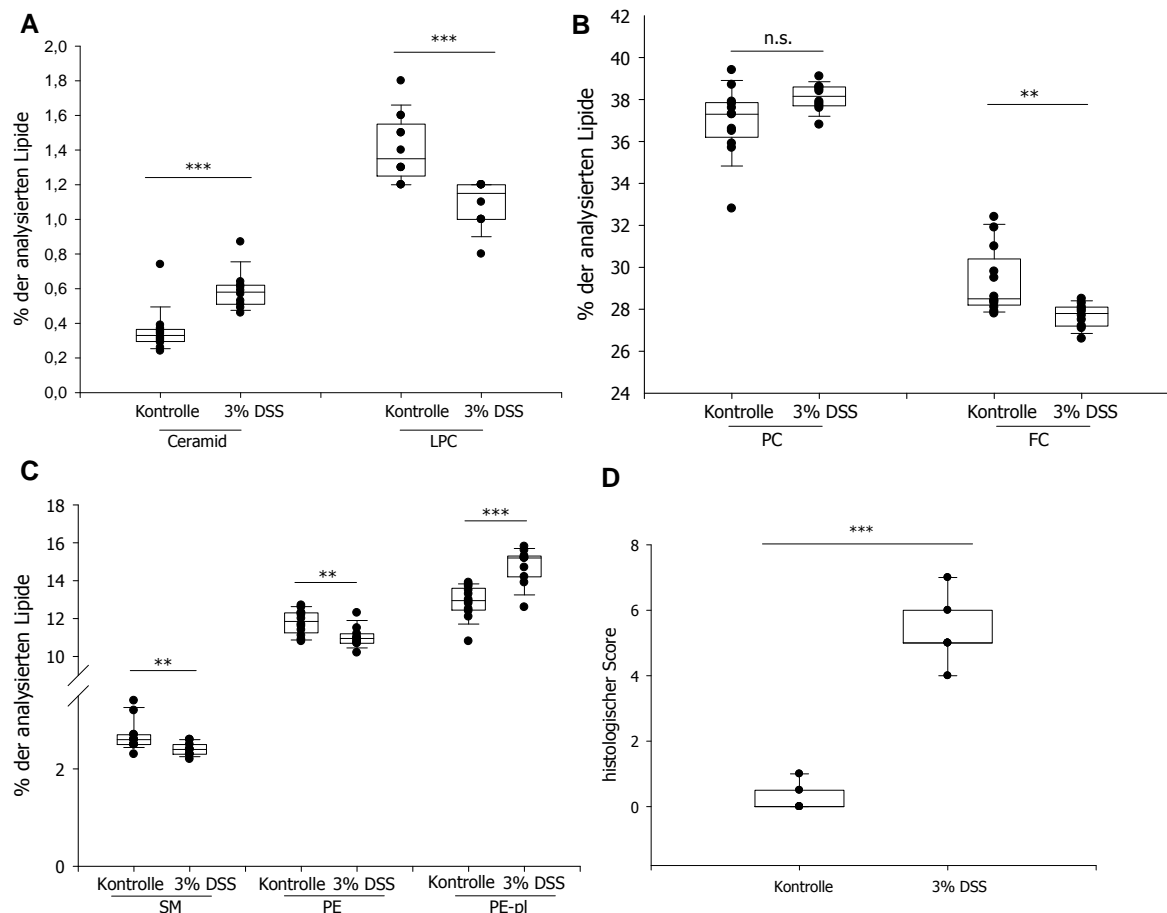


Abbildung 4.18: Lipidveränderung bei DSS-induzierter chronischer Kolitis in Balb/c Mäusen. Massenspektrometrie-Daten der Lipide in IEZ von Kolitis und Kontrollmäusen. **(A)** Anteil der gemessenen Lipide Ceramid und Lysophosphatidylcholin (LPC). **(B)** Anteil der Lipide Phosphatidylcholin (PC) und freiem Cholesterin (FC). **(C)** Anteil der Lipide Sphingomyelin (SM), Phosphatidylethanolamin (PE) und Plasmalogen (PE-pl). (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; Rank Sum Test; $n = 10$) **(D)** Histologischer Score der beiden Gruppen (*** $p < 0,001$; Kontrolle vs. DSS; T-Test; $n = 10$).

4.3.2 Lipidveränderungen und Ceramidbildung im $CD4^+CD62L^+$ Transferkolitismodell

Die gleiche Lipidanalyse wie in der DSS-induzierten chronischen Kolitis wurde auch im Transferkolitismodell angewendet.

Bei der Transferkolitis war die Ceramidkonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe um 159 % erhöht (Abbildung 4.19 A). Im Gegensatz dazu reduzierte sich der Anteil von Lysophosphatidylcholin um 22 % (Abbildung 4.19 A). Der Anteil an Phosphatidylcholin und freiem Cholesterin blieb fast konstant und zeigte bei der Transferkolitis gegenüber der Kontrollgruppe keine Veränderung (Abbildung 4.19 B). Der histologische Score der Transferkolitis im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, ist in Abbildung 4.19 C dargestellt und zeigte die deutliche Ausprägung der Kolitis.

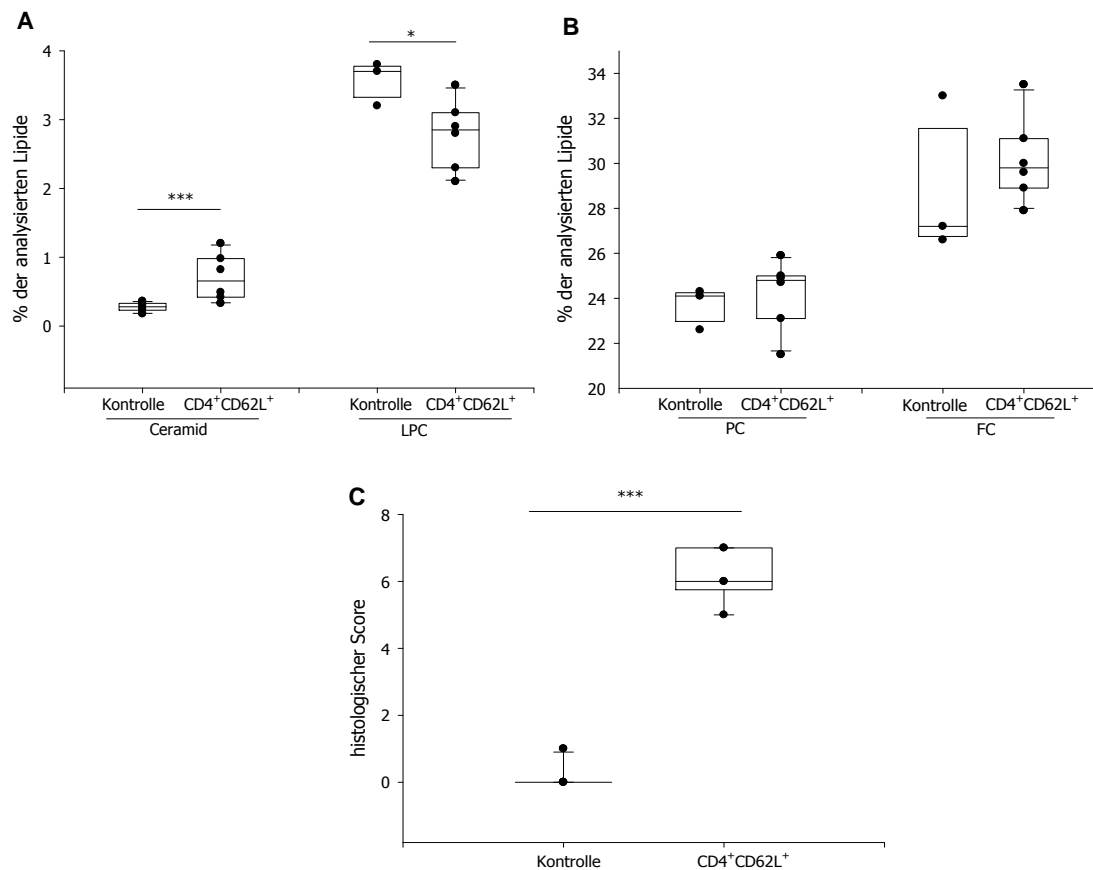


Abbildung 4.19: Lipidveränderung bei Transferkolitis mit CD4⁺CD62L⁺Zellen in RAG1^{-/-}Mäusen. Massenspektrometrie-Daten der Lipide in IEZ von RAG1^{-/-} und Kontroll-Mäusen. **A** Der Anteil der Lipide Ceramid und Lysophosphatidylcholin (LPC) bei Mäusen mit Transferkolitis und in der Kontrollgruppe. **B** Anteil der Lipide Phosphatidylcholin (PC) und freiem Cholesterin (FC) (Rank-Sum Test). **C** Histologischer Score von Mäusen mit Transferkolitis und Kontrollgruppe (Kontrolle vs. Transferkolitis; T-Test; n=3-6).

4.3.3 Induzierte DSS Kolitis bei ASM knock-out Mäusen

Um den Einfluss der ASM im experimentellen Mausmodell zu untersuchen, wurden ASM *knock-out* (ko) (ASM^{-/-}) Mäuse gezüchtet. Es wurde eine chronische Kolitis mit 0,75 % DSS bei ASM^{-/-} und Wildtypmäusen (C75/Bl6 Hintergrund) induziert. 4 Wochen nach dem 4. Zyklus wurden die Mäuse getötet und das Kolon und die mesenterialen Lymphknoten entnommen.

Der histologische Score zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Tendenziell konnte man einen erhöhten Score bei den ASM^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen erkennen. Die Luminex-Daten haben gezeigt, dass die pro-inflammatorische Zytokine TNF und IL-6 bei den ASM^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen stark erhöht sind (p<0,001). Das anti-inflammatorische

Zytokin IL-10 stieg bei den ASM^{-/-}-Mäusen ebenfalls an, aber nicht so stark wie bei den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-6 und TNF (Abbildung 4.20).

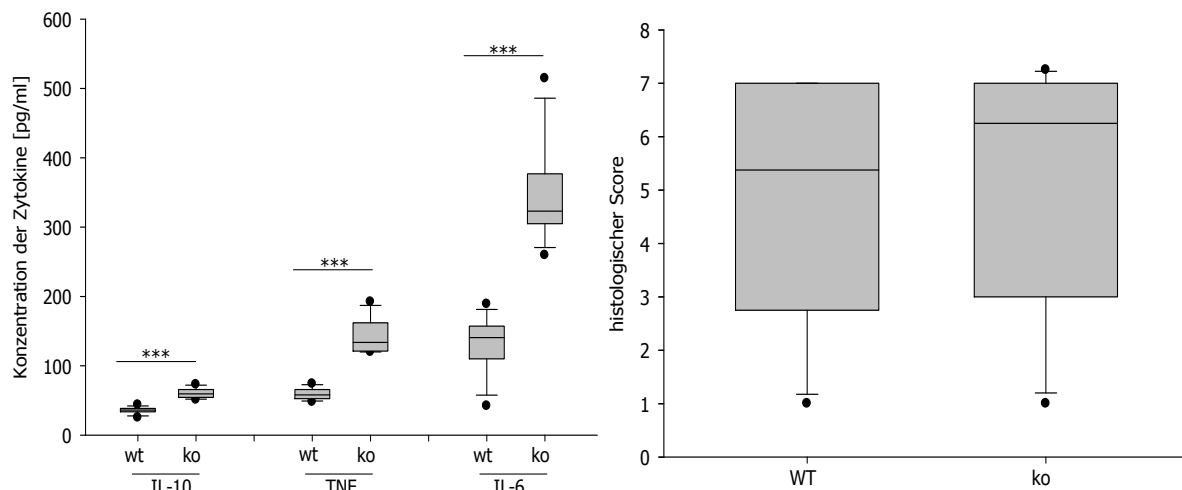


Abbildung 4.20: Zytokinanalyse und histologischer Score bei chronischer DSS Kolitis in ASM^{-/-}- und Wildtypmäusen. Bei Wildtyp- und ASM^{-/-}-Mäusen wurde mittels 0,75 % DSS eine chronische Kolitis induziert. 4 Wochen nach dem 4. Zyklus wurden die Mäuse getötet und deren Kolon und die mesenterialen Lymphknoten entnommen. Die Luminex-Daten ergaben, dass bei den ASM^{-/-}-Mäusen die Zytokine IL-6 und TNF stark erhöht waren im Vergleich zu den Wildtypmäusen. Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 war in den ASM^{-/-}-Mäusen nicht so stark erhöht. Der histologische Score zeigte in beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied (wt= Wildtypmäuse; ko= ASM^{-/-}-Mäuse; Rank-Sum Test; n=6).

4.3.4 Lipidveränderungen bei chronischer DSS Kolitis in Balb/c Mäusen nach Zugabe von Lecithin im Futter

Klinische Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Stremmel in Heidelberg haben gezeigt, dass sich der klinische Verlauf der CU durch Gabe von Phosphatidylcholin (PC) (auch Lecithin genannt) verbessern lässt (193). Aus diesem Grund führten wir im chronischen Kolutismodell mit Balb/c Mäusen einen Therapieversuch mit Lecithin durch. Die Gabe erfolgte 4 Wochen nach dem 4. DSS-Zyklus oral für eine Woche. Eine Gruppe erhielt 4 % Lecithin im Pelletfutter, die andere Gruppe erhielt normales Futter (Ssniff®, Soest). Nach 7 Tagen wurde der Versuch beendet und das Kolon und die mesenterialen Lymphknoten für weitere Experimente entnommen.

Die Analyse der bioaktiven Lipide durch die Massenspektrometrie zeigte für LPC eine etwas geringere Konzentration bei beiden Gruppen mit Kolitis gegenüber der Kontrollgruppe ohne Kolitis. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant (Abbildung 4.21). Für PC ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen

den Gruppen, wobei die Mäuse mit Kolitis tendenziell einen höheren Gehalt an PC aufwiesen als die Kontrolle ohne Kolitis (Abbildung 4.22).

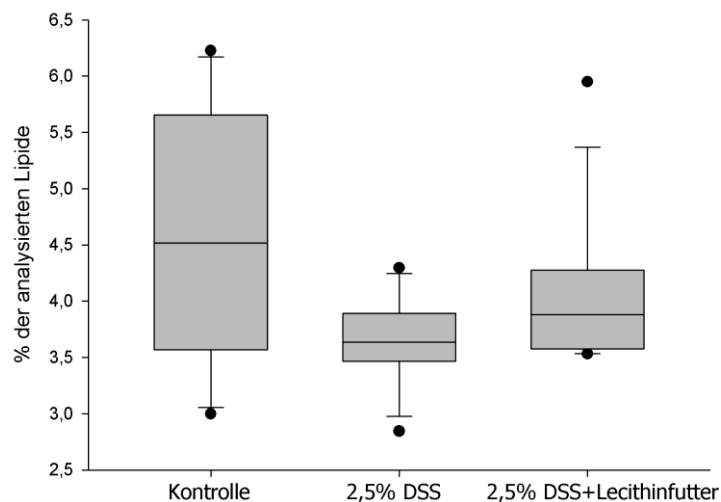


Abbildung 4.21: Massenspektrometrie-Daten von Lysophosphatidylcholin (LPC) in intestinalen Epithelzellen (IEZ) bei chronischer Kolitis ± Lecithinfutter. 4 Wochen nach Beendigung des 4. Zyklus DSS wurden die Mäuse in 2 Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe bekam Futter mit 40g/kg Lecithin, die andere Gruppe normales Pelletfutter. Nach 7 Tagen wurden die Mäuse für die Versuche verwendet. Aus einem Stück Kolon wurden die IEZ isoliert und mittels Massenspektrometrie die Lipide analysiert. Bei LPC zeigte sich kein signifikanter Unterschied (n=5-9).

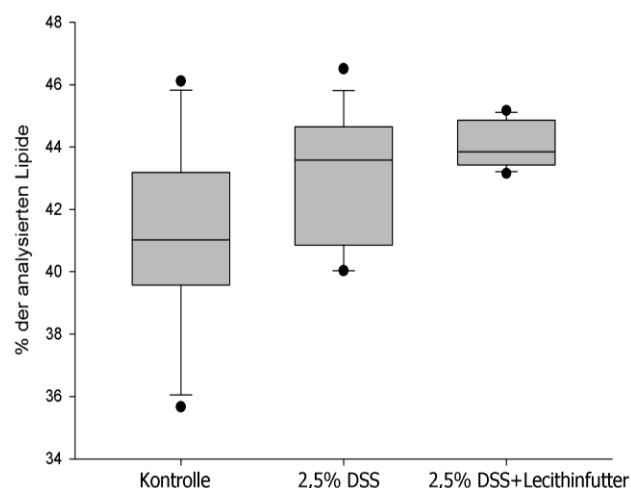


Abbildung 4.22: Massenspektrometrie-Daten von Phosphatidylcholin (PC) in IEZ bei chronischer DSS Kolitis. 4 Wochen nach Beendigung des 4. Zyklus DSS wurden die Mäuse in 2 Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe bekam Futter mit 40g/kg Lecithin, die andere Gruppe normales Pelletfutter. Nach 7 Tagen wurde mittels Massenspektrometrie der Gehalt an PC in den IEZ ermittelt. In allen drei Mausgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied (n=5-9).

Die Auswertung der Luminex-Daten weisen darauf hin, dass es auch in den Konzentrationen der einzelnen Zytokine einen Unterschied innerhalb der drei Gruppen gab. Die IL-10 Konzentration in den beiden Gruppen, die mit DSS behandelt wurden, stieg signifikant im Vergleich zu den Kontrollmäusen an (Abbildung 4.23 A).

Allerdings konnte zwischen den beiden Kolitisgruppen, von denen eine Gruppe Lecithin im Futter erhielt, kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 erzielte in keiner der drei Gruppen einen signifikanten Unterschied. Tendenziell sieht man jedoch eine Verminderung in der Kolitisgruppe, die Lecithinfutter erhielt (Abbildung 4.23 B). Das pro-inflammatorische Zytokin TNF zeigte in beiden Kolitisgruppen einen signifikanten Anstieg der Konzentration im Vergleich zu den Kontrollmäusen und war in der Gruppe mit Lecithin im Futter etwas erhöht, ohne jedoch signifikant zu sein (Abbildung 4.23 C).

Der histologische Score dagegen wies einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kolitisgruppen auf. Die Gruppe mit Lecithinfutter zeigte einen deutlich erhöhten histologischen Score im Vergleich zu der Kolitisgruppe, die Standardfutter bekommen hatte (Abbildung 4.23 D).

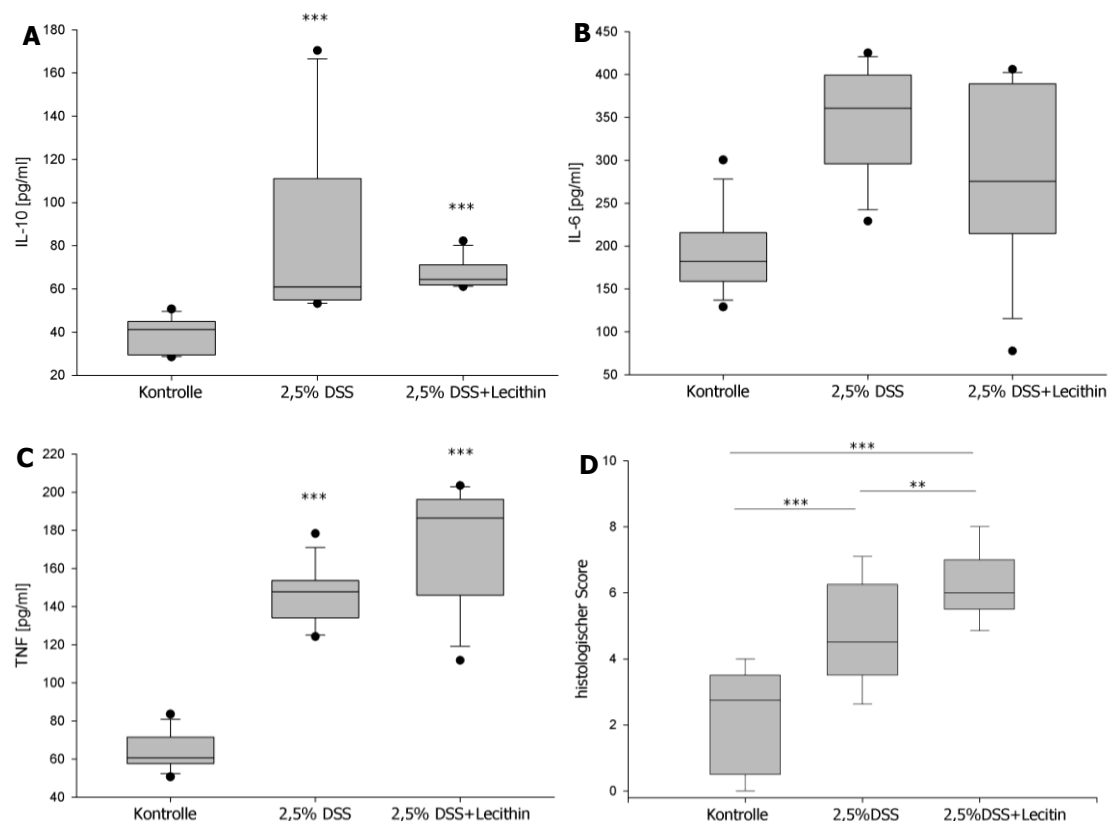


Abbildung 4.23: Zytokinanalyse und histologischer Kolitis-Score bei Therapieversuch mit Lecithin in DSS induzierter chronischer Kolitis in Balb/c Mäusen. Den Mäusen wurde eine chronische Kolitis mit DSS induziert. 4 Wochen nach Beendigung des 4. Zyklus DSS wurden die Mäuse in 2 Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe bekam Futter mit 40 g/kg Lecithin, die andere Gruppe Standardfutter. Nach 7 Tagen wurden die mesenterialen Lymphknoten isoliert und der Kolitisscore ermittelt. **(A-C)** Mittels Luminex wurden IL-10, IL-6 und TNF analysiert. Bei den Zytokinen IL-10 und TNF zeigte sich ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu den gesunden Tieren ($***p < 0,001$; Rank Sum Test; Kontrolle vs DSS behandelte Mäuse). **(D)** Der histologische Score war bei den Mäusen mit Lecithinfutter signifikant höher als bei den Kolitis-Mäusen mit normalem Futter ($n=12$).

4.4 Einfluss von Ceramid und Imipramin auf die Produktion von MMP-1 und die Invasion von hepatischen Sternzellen und der Tumorzelllinie HepG2

4.4.1 Stimulation mit verschiedenen Zytokinen induziert die MMP-1 Produktion in hepatischen Sternzellen und wird durch Imipramin gehemmt.

Die MMPs spielen bei der Pathogenese verschiedener Krankheiten eine Rolle, wie z.B. COPD, Fibrose und beim primären Lebertumor (HCC, *hepatocellular carcinoma*). Bei der Migration und Invasion der Zellen sind unter anderem die MMPs beteiligt. Deshalb untersuchten wir den Einfluss des Ceramidmetabolismus auf die MMP-1 Induktion und die Invasion bzw. Migration von hepatischen Sternzellen (HSC) oder auch ITO genannt und der HCC Tumorzelllinie HepG2.

Zuerst wurden die hepatischen Sternzellen mit verschiedenen Zytokinen stimuliert und der Einfluss der ASM auf die MMP-1 Produktion untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Imipramin 30 min vorinkubiert und anschließend mit IL-1 β (1 ng/ml), TNF (10 ng/ml), TGF- β (1 ng/ml) oder LPS (10 ng/ml) stimuliert. Nach 24h wurde der Überstand mittels des MMP-1 ELISA analysiert. Es zeigte sich durch die Stimulation mit IL-1 β ein starker Anstieg der MMP-1 Sekretion ($p < 0,01$). Die Inkubation mit Imipramin verhinderte den Anstieg der MMP-1 Produktion und blockierte diesen vollständig (Abbildung 4.24 A). Nach der Stimulation mit TNF stieg die MMP-1 Sekretion ebenfalls stark an, diese war jedoch etwas geringer als nach Stimulation mit IL-1 β ($p < 0,01$). Die Inhibition der ASM mit Imipramin führte auch bei TNF zu einer vollständigen Blockierung der MMP-1 Sekretion (Abbildung 4.24 A). Auch TGF- β führte nach 24h Stimulation zu einer Steigerung der MMP-1 Produktion ($p < 0,01$). Die Inkubation mit Imipramin nach TGF- β Stimulation bewirkte eine deutliche Verminderung der MMP-1 Produktion (Abbildung 4.24 B). Diese war jedoch nicht so vollständig blockiert wie bei den Stimulationen mit IL-1 β und TNF. Stimulation mit LPS führte zu keinem Anstieg der Produktion des MMP-1 Proteins (Abbildung 4.24 B).

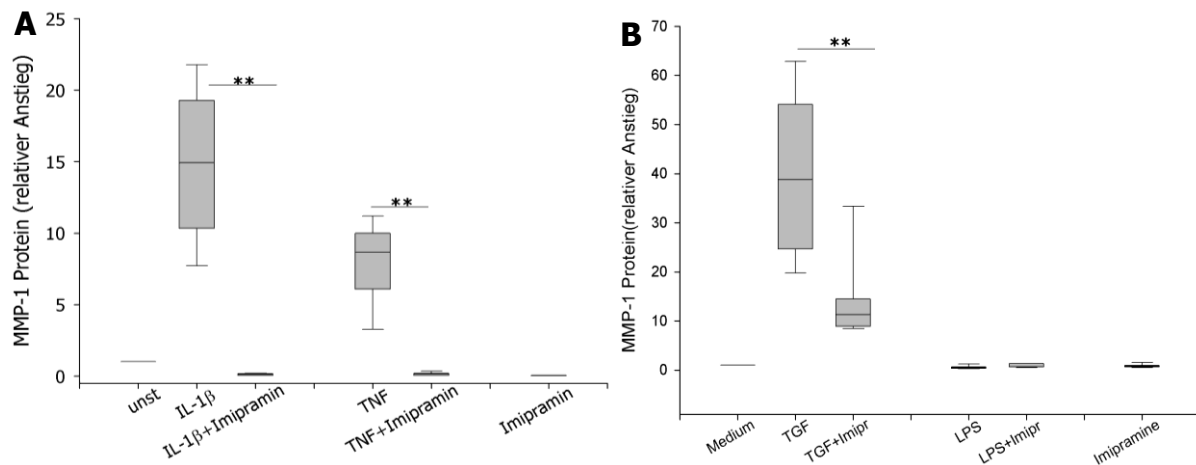


Abbildung 4.24: Anstieg der MMP-1 Produktion durch die Stimulation mit verschiedenen Zytokinen und deren Induktionshemmung durch Imipramin. (A+B) Hepatische Sternzellen wurden mit IL-1 β (1 ng/ml), TNF (10 ng/ml), TGF- β (1 ng/ml) oder LPS (10 ng/ml) 24h stimuliert oder entsprechend vor der Stimulation 30 min mit Imipramin inkubiert. Nach 24h wurde der Überstand mittels MMP-1 ELISA analysiert. Durch Stimulationen mit IL-1 β , TNF und TGF- β kam es zu einer starken Steigerung der MMP-1 Produktion, die wiederum mit Imipramin blockiert wurde. Die Stimulation mit LPS führte zu keiner gesteigerten Produktion von MMP-1 (**p<0,01; Rank Sum Test; n=8-10).

Die MMP-1 Induktion durch die Zytokine TNF und IL-1 β wurde bei den hepatischen Sternzellen weiter auf deren Abhängigkeit von der ASM untersucht. Zur Ermittlung der idealen Hemmkonzentration von Imipramin wurden verschiedene Konzentrationen (30 μ M, 15 μ M und 5 μ M) eingesetzt. Es zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung der MMP-1 Produktion mit vollständiger Inhibition bei einer Konzentration von 30 μ M. Diese Inhibition wurde sowohl für die Stimulation mit IL-1 β als auch für TNF gezeigt (Abbildung 4.25). Diese Konzentration entspricht auch der in der Literatur meist verwendeten Konzentration und wurde somit in den ganzen folgenden Versuchen verwendet.

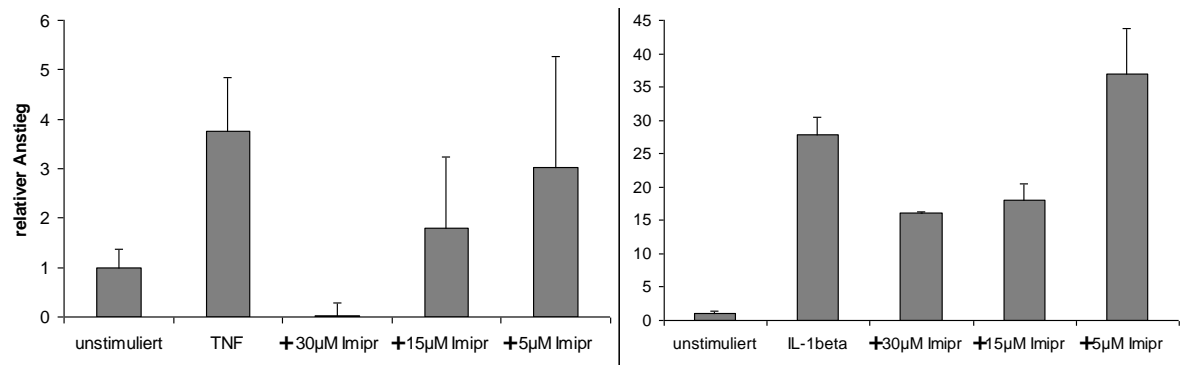


Abbildung 4.25: Dosisabhängige Reduktion von MMP-1 durch Imipramin. Hepatische Sternzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Imipramin (30 µM, 15 µM und 5 µM) inkubiert und nach 30 min mit TNF (10 ng/ml) oder IL-1β (1 ng/ml) stimuliert. Nach 24h wurde mittels MMP-1 ELISA der Überstand analysiert. Bei beiden Stimulationen zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung der MMP-1 Induktion. Die stärkste Hemmung war bei 30 µM zu beobachten (n=3).

Bei Caco-2 IEZ konnte gezeigt werden, dass diese Zellen einen dosisabhängigen Anstieg der MMP-1 Produktion durch alleinige Stimulation mit exogener SMase aufweisen. Bei den Fibroblasten konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden. Es wurde ein zusätzlicher Stimulus wie IL-1β benötigt, um die MMP-1 Produktion zu erhöhen.

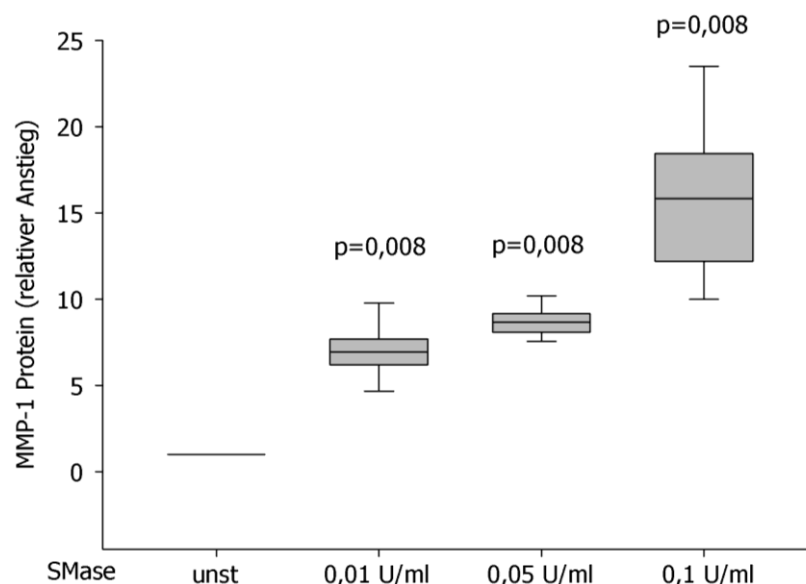


Abbildung 4.26: Exogene SMase reguliert dosisabhängig die MMP-1 Produktion. Die hepatischen Sternzellen wurden für 24h mit exogener SMase in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Anschließend wurde der Überstand mittels ELISA auf die MMP-1 Konzentration untersucht (Rank Sum Test; unstimuliert vs. stimuliert; n=5;).

Deshalb wurde untersucht, ob die Ceramidbildung durch exogene SMase ausreicht, um in hepatischen Sternzellen die MMP-1 Produktion zu steigern. Die Zellen wurden hierfür 24h mit verschiedenen Konzentrationen exogener SMase stimuliert. Die Überstände wurden danach mittels ELISA auf die MMP-1 Produktion untersucht. Die exogene SMase steigerte die MMP-1 Produktion in hepatischen Sternzellen dosisabhängig. Schon bei einer geringen Konzentration von 0,01 U/ml zeigte sich eine signifikante Zunahme der MMP-1 Produktion (Abbildung 4.26).

Des Weiteren wurde eine Zeitreihe nach Stimulation mit IL-1 β (1 ng/ml) durchgeführt, um zu zeigen, wann die Produktion von MMP-1 ansteigt. Damit sollte ein geeigneter Zeitpunkt zur Analyse der Zellinvasion ermittelt werden. Die hepatischen Sternzellen wurden mit IL-1 β (1 ng/ml) stimuliert, jeweils nach 1h, 3h, 6h und 24h der Überstand entnommen und mittels MMP-1 ELISA analysiert. Nach 1h und 3h war noch kein Anstieg der MMP-1 Produktion zu erkennen (Abbildung 4.27). Ein Anstieg der MMP-1 Produktion war erst nach 6h erkennbar und die MMP-1 Konzentration zu diesem Zeitpunkt war mit der Konzentration nach 24h vergleichbar. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die anschließenden Invasionsassays nach 6h durchgeführt.

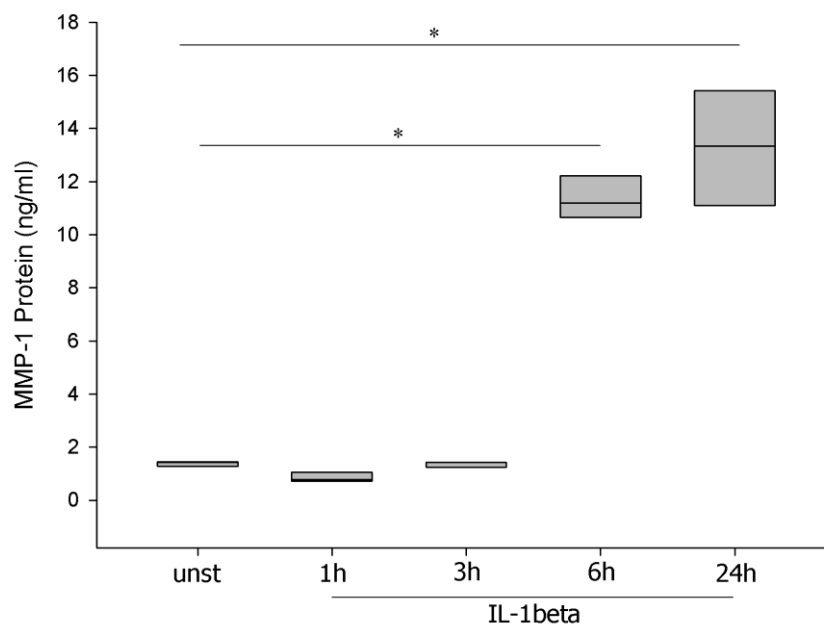


Abbildung 4.27: Zeitreihe zur MMP-1 Sekretion nach Stimulation mit IL-1 β . Hepatische Sternzellen wurden mit IL-1 β stimuliert, der Überstand nach verschiedenen Zeiten abgenommen und mittels ELISA die MMP-1 Konzentration zu diesen Zeiten bestimmt. Die MMP-1 Produktion ist bereits nach 6h stark angestiegen, auf ein Niveau das mit der MMP-1 Sekretion nach 24h vergleichbar ist (Rank Sum Test; * $p < 0,05$; $n = 6$).

4.4.2 Die Inkubation mit Imipramin verhindert eine vermehrte Invasion von hepatischen Sternzellen und HepG2 Zellen

Die Zellinvasion im Gewebe wird zum Teil durch MMPs ermöglicht. Dies ist u.a. auch dadurch bedingt, dass MMPs die Bestandteile des Bindegewebes wie Kollagen degradieren können. Verschiedene Zelltypen benötigen MMPs, um physiologisch in das Gewebe einzuwandern, wenn dort Umbauvorgänge stattfinden. Darüber hinaus benötigen auch Tumorzellen eine vermehrte Degradation des Gewebes zur Invasion und zur Gewinnung von Abbauprodukten, um das Tumorwachstum ebenfalls zu fördern.

Zur Ermittlung der Zellinvasivität wurden Versuche im Zweikammersystem mit Transwells durchgeführt. Die Transwells wurden 24h vor der Zugabe der Zellen mit Kollagen I (0,5 mg/ml) bei 37°C inkubiert, um die Polycarbonat Membran mit Kollagen zu benetzen. Die hepatischen Sternzellen (3×10^5 Zellen) wurden dann auf die mit Kollagen beschichtete Membran ausgesät, anschließend mit Imipramin (30 μ M) 30 min vorinkubiert und danach mit TNF (10 ng/ml) oder IL-1 β (1 ng/ml) stimuliert.

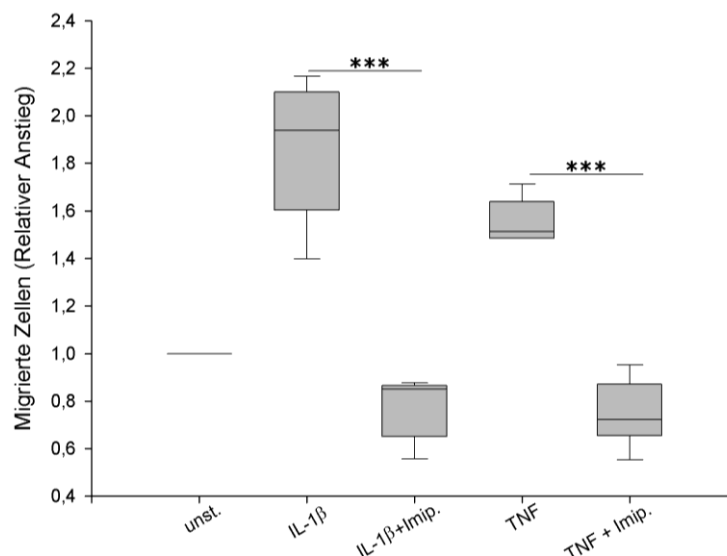


Abbildung 4.28: Relativer Anstieg der invasiven hepatischen Sternzellen 6h nach Stimulation mit IL-1 β oder TNF. Die hepatischen Sternzellen wurden auf eine $\bar{U}N$ beschichtete Kollagenmembran (8 μ m Polycarbonat) ausgesät, mit Imipramin vorinkubiert und mit IL-1 β (1 ng/ml) oder TNF (10 ng/ml) stimuliert. Nach 6 Stunden wurden die Zellen apikal entfernt und die basal durch die Kollagenschicht eingewanderten Zellen fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Invasion erhöht sich bei einer Stimulation mit IL-1 β oder TNF, wird aber durch Imipramin gehemmt (Rank-Sum Test, *** $p < 0,001$; IL-1 β vs. IL-1 β +Imipramin und TNF vs. TNF+Imipramin; $n=6$).

Nach 6 Stunden wurden die Membranen auf der apikalen Seite gesäubert, um die durch die Kollagenschicht gewanderten Zellen von den sessilen Zellen unterscheiden zu können. Danach wurde die Membran vorsichtig aus der Umrandung gelöst. Die Zellen auf der basalen Seite wurden mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und mit DAPI gefärbt. Die durch die Kollagenschicht eingedrungenen Zellen konnten anschließend am Mikroskop ausgezählt werden.

Die Stimulation mit IL-1 β und TNF führte dazu, dass im Vergleich zu den unstimulierten Zellen signifikant mehr hepatische Sternzellen durch die kollagenbeschichtete Polycarbonat Membran mit 8 μ m Porengröße wandern (Abbildung 4.28 und 4.29). Inkubation mit Imipramin führte zu einer Aufhebung der vermehrten Zellinvasion (Abbildung 4.28 und 4.29). Bei den unstimulierten Transwells waren 15 Zellen pro Gesichtsfeld zu erkennen. Die Stimulation mit IL-1 β erhöhte die Zahl der durch die Kollagenschicht gewanderten Zellen auf 27,75 pro Gesichtsfeld, bei Stimulation mit TNF auf 23,45 Zellen pro Gesichtsfeld. Die Vorbehandlung mit Imipramin verringerte die vorhandene Zellzahl auf 11,5 bzw. 11,3 pro Gesichtsfeld (Abbildung 4.29).

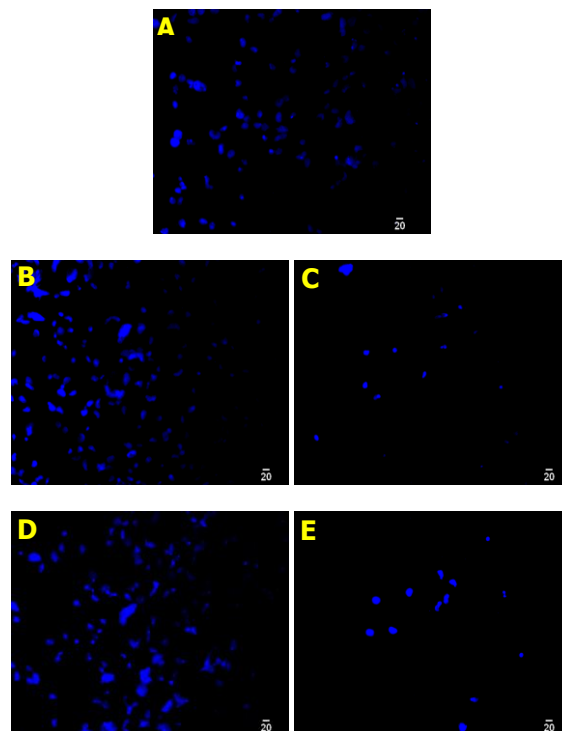


Abbildung 4.29: DAPI Färbung der invasiven hepatischen Sternzellen. Mikroskopische Aufnahmen der Stimulationen mit IL-1 β und TNF, sowie deren Verminderung durch Vorinkubation mit Imipramin. (A) unstimuliert, (B) IL-1 β , (C) IL-1 β +Imipramin, (D) TNF und (E) TNF+Imipramin

Das Verhalten der hepatischen Sternellen ohne Kollagenbeschichtung der Polycarbonylmembran wurde untersucht, um sicher zu gehen, dass die Zellen durch den Abbau der Kollagenschicht vermehrt wandern können und nicht aufgrund vermehrter Migration durch die Stimulation. Die ITO Zellen wurden hierfür auf eine Membran ohne vorherige Beschichtung mit Kollagen ausgesät und mit IL-1 β (1 ng/ml) oder TNF (10 ng/ml) stimuliert. Nach 6 Stunden wurden die Zellen wie zuvor beschrieben fixiert und gefärbt. Zwischen den einzelnen Versuchsansätzen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (Abbildung 4.30).

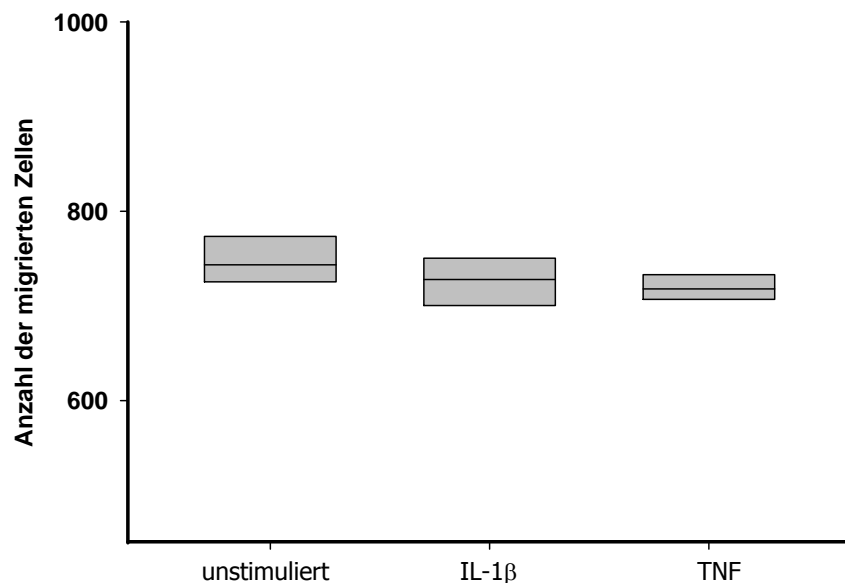


Abbildung 4.30: Migration der hepatischen Sternzellen ohne kollagenbeschichtete Membran. Hepatische Sternzellen wurden mit IL-1 β (1 ng/ml) und TNF (10 ng/ml) stimuliert und nach 6h die migrierten Zellen ausgezählt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen (n=5).

In einem weiteren Versuchsansatz sollte die Invasion der hepatischen Karzinomzellen HepG2 in Abhängigkeit der von hepatischen Sternzellen produzierten MMP-1 untersucht werden. Vorversuche mit HepG2 zeigten keine MMP-1 Produktion durch Stimulation mit IL-1 β oder TNF (Daten nicht gezeigt). Deswegen wurden zunächst die hepatischen Sternzellen in die untere Kammer des Transwells ausgesät und wie in den oben beschriebenen Versuchen stimuliert. Die HepG2 Zellen wurden 24h

später auf eine mit Kollagen I (0,5 mg/ml) beschichtete Membran in die obere Kammer des Transwells ausgesät. Nach 6h wurden die Membranen wieder apikal gesäubert und anschließend die basal migrierten Zellen fixiert, gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Es zeigte sich, dass die HepG2 Zellen sehr viel mehr einwanderten, wenn vorher die hepatischen Sternzellen in der basalen Kammer mit IL-1 β oder TNF stimuliert worden waren (Abbildung 4.31). Wurden die hepatischen Sternzellen gleichzeitig mit Imipramin vorbehandelt war die vermehrte Invasion von HepG2 Zellen durch IL-1 β und TNF wieder aufgehoben (Abbildung 4.31).

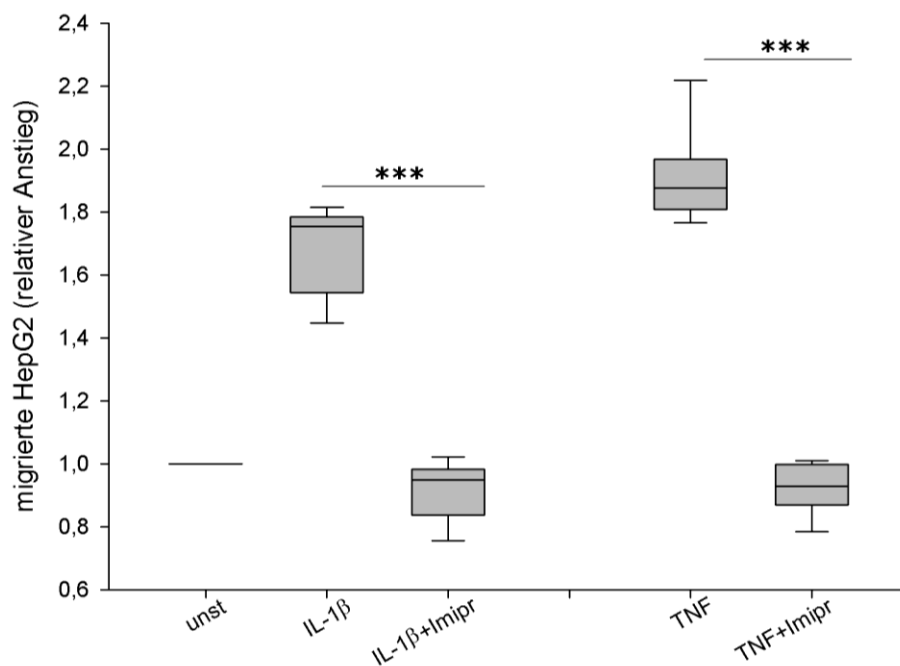


Abbildung 4.31: Invasion von HepG2 Zellen. Hepatische Sternzellen wurden in der unteren Kammer des Transwells ausgesät. Die Zellen wurden mit IL-1 β oder TNF \pm Imipramin stimuliert. 24h später wurden die HepG2 Zellen auf eine mit Kollagen I beschichtete Polycarbonat Membran gegeben und nach 6h die Invasion der Zellen bestimmt. Es zeigte sich eine vermehrte Invasion der HepG2 Zellen in Anwesenheit stimulierter hepatischer Sternzellen. Dieser Effekt war durch gleichzeitiger Gabe von Imipramin vollständig aufgehoben (***) $p < 0,001$; Rank Sum Test; $n=6$).

Die Auswirkungen der ASM Inhibition durch Imipramin wurde auch auf mRNA Ebene untersucht. Die hepatischen Sternzellen wurden für 6h mit IL-1 β \pm Imipramin stimuliert und anschließend die RNA isoliert. Bei der pharmakologischen Inhibition der ASM wurden die hepatischen Sternzellen vorher mit Imipramin 30 min vorinkubiert. Durch quantitative RT-PCR konnte ermittelt werden, ob Imipramin

schon auf mRNA Ebene einen Einfluss auf die MMP-1 Expression hat, oder ob dieser Effekt auf Proteinebene zu beobachten ist. Durch die Stimulation mit IL-1 β zeigte sich ein starker Anstieg der MMP-1 Expression ($p=0,004$). Dieser Anstieg konnte durch Zugabe von Imipramin vollständig blockiert werden (Abbildung 4.32).

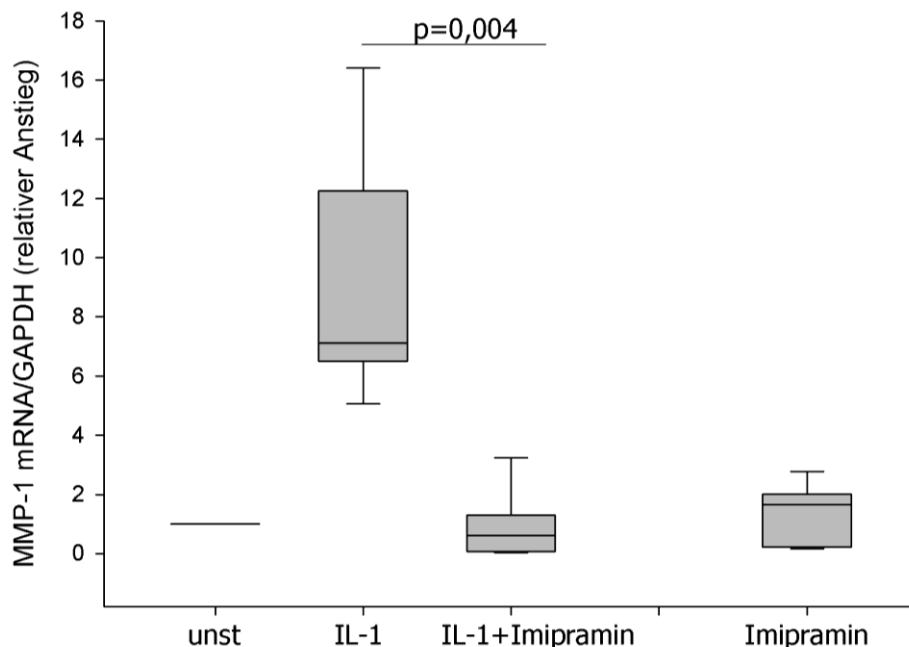


Abbildung 4.32: Quantitative RT-PCR der mRNA von MMP-1 mit hepatischen Sternzellen \pm Stimulation mit IL-1 β . Hepatische Sternzellen wurden mit IL-1 β (1 ng/ml) 6h stimuliert und danach die RNA isoliert. Mittels *reverse* Transkription wurde die RNA auf cDNA umgeschrieben und für die RT-PCR verwendet. Die Inkubation mit Imipramin führt zu einem fehlenden Anstieg der MMP-1 Expression ($n=5$).

Die Auswirkung der pharmakologischen Inhibition von ASM wurde mittels Western Blot analysiert. Es wurden verschiedene Signalmoleküle untersucht, die zu einer Induktion der MMP-1 führen. Die hepatischen Sternzellen wurden mit IL-1 β oder TNF für 10 und 20 min stimuliert. Die ASM-Hemmung erfolgte, indem die hepatischen Sternzellen zuvor für 30 min mit Imipramin inkubiert wurden. Es zeigte sich, dass sich die Phosphorylierung der ERK1/2 und von NF- κ B durch die Stimulation mit IL-1 β bereits nach 10 und 20 min verstärkt wurde (Abbildung 4.33). Diese Phosphorylierung von ERK1/2 und NF- κ B wurde durch Imipramin etwas vermindert. Nach der Stimulation mit TNF war keine eindeutige Phosphorylierung von IL-1 β und NF- κ B bzw. eine verminderte Phosphorylierung Imipramin zu erkennen.

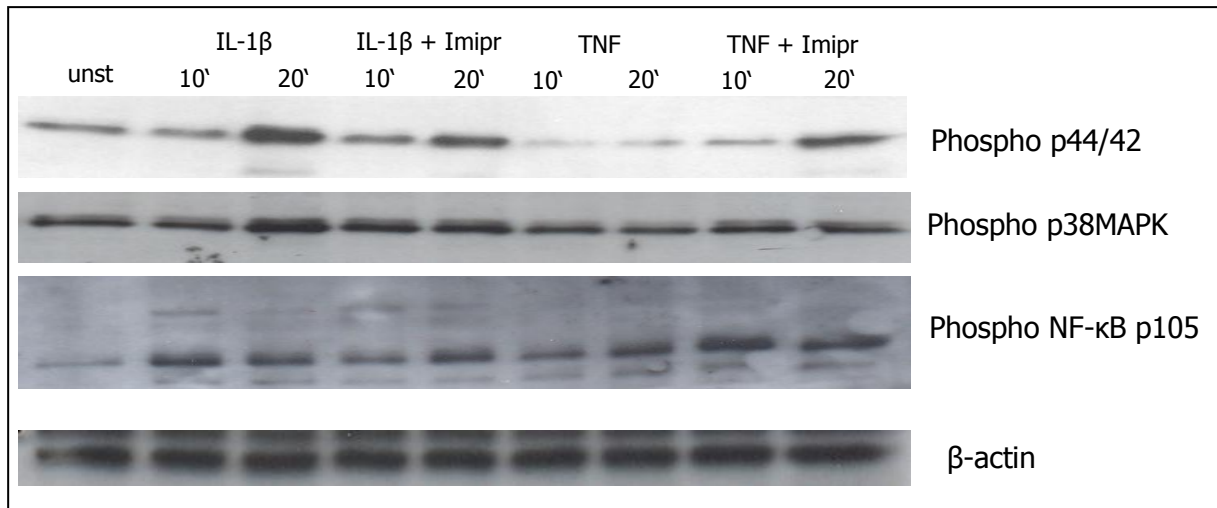


Abbildung 4.33: Western Blot der hepatischen Sternzellen nach Stimulation mit IL-1β und TNF. Die hepatischen Sternzellen wurden mit IL-1β (1 ng/ml) und TNF (10 ng/ml) 10 und 20 min stimuliert (phospho 44/42 entspricht ERK1/2, weil 44 bzw. 42 kDa groß).

5 Diskussion

5.1 Die Produktion von MMP-1 nach Stimulation mit IL-1 β ist abhängig von der sauren Sphingomyelinase

Ziel der Untersuchungen war, die durch Lipidveränderungen verursachten pathophysiologischen Prozesse bei der intestinalen Entzündung zu identifizieren, zu charakterisieren und daraus mögliche Therapiestrategien zu entwickeln.

Zunächst wurden intestinale Epithelzellen mit exogener Sphingomyelinase (SMase) stimuliert, um die Gene zu identifizieren, die durch diese Stimulation aktiviert werden. Die Ceramidbildung durch exogene SMase führt in der intestinalen Epithelzelllinie Caco-2 zu einer Erhöhung der Genexpression verschiedener Gene. Am auffälligsten waren die verstärkte Expression von Matrix Metalloproteinase-1 (MMP)-1 und MMP-10. Auf Proteinebene konnte die dosisabhängige Bildung von MMP-1 durch exogene SMase bestätigt werden. MMP-1 ist bei Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) auf RNA Ebene stark erhöht und es wird angenommen, dass die dadurch vermehrte Matrixdegeneration für die intestinale Schädigung bei CU pathophysiologisch bedeutsam ist. Daraufhin wurde untersucht, durch welche der am Ceramidmetabolismus beteiligten Enzyme eine Beeinflussung der MMP-1 Produktion möglich ist. Bei Caco-2 Zellen genügte eine Stimulation mit exogener SMase, um schon bei geringen Konzentrationen die MMP-1 Produktion zu erhöhen. Da in humanen Zellen mehrere endogene SMasen vorhanden sind, sollte geklärt werden, ob die Ceramidbildung für die MMP-1 Induktion durch Entzündungsmediatoren relevant ist. In einem genetischen Modell mit humanen Hautfibroblasten von Patienten mit Niemann-Pick'scher Erkrankung konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die saure Sphingomyelinase (ASM) notwendig ist, um die MMP-1 Produktion durch IL-1 β zu induzieren. Patienten mit dieser Erkrankung sind durch einen genetischen Defekt nicht mehr in der Lage, aktive ASM zu bilden. Eine Induktion der MMP-1 ist nach der Stimulation mit IL-1 β nur in den gesunden Kontrollfibroblasten sichtbar. Durch die Stimulation mit IL-1 β kommt es bei den ASM^{-/-}-Fibroblasten im Gegensatz zu den ASM^{+/+}-Fibroblasten nur zu einer marginalen Erhöhung der MMP-1 Expression. Die RT-PCR und die Proteinanalyse zeigen, dass die MMP-1 Produktion sowohl auf mRNA Ebene als auch auf

Proteinebene von der ASM abhängig ist. Die ASM^{-/-}-Fibroblasten sind durch alleinige Gabe exogener SMase in der Lage, die MMP-1 Produktion zu erhöhen, sie sind somit grundsätzlich dazu in der Lage, die MMP-1 Produktion durch Ceramidbildung zu steigern. Die Unfähigkeit zur MMP-1 Induktion durch IL-1 β in ASM^{-/-}-Fibroblasten kann kompensiert werden, indem die Zellen gleichzeitig mit exogener SMase stimuliert werden. Transfektion eines ASM Expressionsplasmids in ASM-defiziente Fibroblasten stellt die vermehrte MMP-1 Produktion durch IL-1 β Stimulation ebenfalls wieder her, vergleichbar mit der Signalantwort in ASM^{+/+}-Fibroblasten. Diese Daten lassen erkennen, dass MMP-1 durch Stimulation mit IL-1 β nur ansteigt, wenn die ASM in den Fibroblasten vorhanden ist. Somit kann gefolgert werden, dass die durch IL-1 β verursachte Aktivierung der ASM mit konsekutiver Ceramidbildung nicht nur ein Begleitphänomen ist, sondern für die Hochregulierung von MMP-1 durch IL-1 β unabdingbar ist.

Als Ursache der gestörten Signaltransduktion bei ASM-Defizienz konnte eine unzureichende Phosphorylierung von ERK1/2 in den ASM^{-/-} Fibroblasten nach IL-1 β Stimulation festgestellt werden. Im Gegensatz dazu scheint aber die Phosphorylierung der p38MAPK und der Anstieg der IL-8 Produktion nicht von der ASM abhängig zu sein, da sowohl in den ASM-defizienten Fibroblasten als auch in den Kontrollfibroblasten ein vergleichbarer Anstieg der Phosphorylierung von p38MAPK und Bildung von IL-8 zu erkennen sind. Beide Effekte machen deutlich, dass der p38MAPK Signalweg und die IL-8 Produktion in diesem Zellmodell nicht von der ASM abhängig sind. Der ASM-abhängige Signalweg scheint somit über ERK1/2 zu führen und ist schon in diesem frühen Stadium der Aktivierung des MMP-1 Signalweges durch die ASM-Defizienz gestört. In diesem Zellmodell konnte durch TNF jedoch keine MMP-1 Produktion beobachtet werden. Es ist aber bekannt, dass es zu einer MMP-1 Induktion in Fibroblasten durch TNF kommen kann. Die fehlende MMP-1 Induktion durch TNF in diesem Zellmodell war vermutlich durch Voraktivierung des TNF-Signalweges in Zellkultur bedingt.

Diese Ergebnisse wurden durch Verwendung pharmakologischer Inhibitoren verschiedener am Ceramidmetabolismus beteiligter Enzyme bestätigt. Eine komplette Induktionshemmung konnte nur durch den ASM-Inhibitor Imipramin beobachtet werden.

Daraus lässt sich schließen, dass die Inhibition der ASM in humanen Fibroblasten ausreicht, um die durch IL-1 β vermittelte MMP-1 Produktion zu hemmen. Die Inhibition der neutralen SMase reduzierte die MMP-1 Produktion nicht. Auch die Hemmung der Ceramidase durch FumoninsinB hatte keinen Einfluss auf die MMP-1 Produktion. Bei dem verwendeten Zellmodell beeinflusst somit die ASM die Produktion von MMP-1 und nicht die neutrale SMase. Verschiedene Zytokine und stimulatorische Prozesse führen zur Aktivierung der ASM. Durch die ASM kommt es zur Hydrolysierung des Sphingomyelins und anschließender Bildung des *second messengers* Ceramid (32, 194-196). Viele dieser ASM-aktivierenden Stimuli, führen ebenfalls zu einer Aktivierung des MAPK Signalweges, welcher wiederum zu einem Anstieg der MMP-1 Expression führt (194, 197-200). Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass es eine Verbindung zwischen Sphingomyelin-Derivaten des exogenen langkettigen Ceramids oder der exogenen neutralen SMase und der Aktivierung des MAPK Signalweges gibt (201, 202). Dieser Zusammenhang ist bei endogener SMase oder endogenen langkettigen Ceramiden nicht definiert. Bei dem verwendeten Zellmodell kann man einen Zusammenhang zwischen der Bildung von Ceramid durch ASM und der Phosphorylierung von ERK1/2 sehen. Reunanen et al. (203) und Bu *et al.* (204) vermuten, dass die MMP-1 Produktion durch exogenes Ceramid und Dihydrosphingosin-1-Phosphat (dhS1P) aufgehoben wird, indem ERK inhibiert wird aber nicht JNK oder p38MAPK (203). Diese Ergebnisse konnten auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Aus diesen Ergebnissen kann man folgern, dass durch die Stimulation mit exogener SMase der ERK1/2 Signalweg über die SMasen und die daraus resultierende Ceramidbildung beeinflusst wird. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit mit ASM-defizienten Fibroblasten lässt sich folgern, dass es bei ASM-Defizienz durch Stimulation mit IL-1 β nicht zur Ceramidbildung kommt und somit die ERK-Phosphorylierung nur inadäquat verläuft und dementsprechend bleibt eine MMP-1 Produktion aus. Da ASM-defiziente Fibroblasten nicht in der Lage sind, durch Stimulation mit IL-1 β ERK1/2 zu phosphorylieren, muss bei diesen Fibroblasten eine Blockade in der frühen Signaltransduktion bestehen. Grassmé *et al.* konnten zeigen, dass die Aktivität der ASM eine Freisetzung von Ceramid in den Mikrodomänen der Plasmamembran vermittelt (34). Ceramid fusioniert mit kleinen Mikrodomänen zu großen Signalplattformen in der Plasmamembran, welche die Signaltransduktion verstärken können (23, 132). Manche Signalwege sind vom „Clustern“ der

Mikrodomänen abhängig und können über diesen Mechanismus reguliert werden. Wird die ASM inhibiert oder kommt es zu keiner Oligomerisierung der Mikrodomänen, ist die Signaltransduktion gestört. Dieser Mechanismus würde auch erklären, warum die MMP-1 Produktion durch die Extraktion von Cholesterin aus Lipid Rafts mittels Methyl- β -Cyclodextrin verringert wird. Bu *et al.* konnten zeigen, dass das Pertussistoxin (Erreger des Keuchhusten) die G-Protein-gekoppelten Effekte der dhS1P induzierten ERK1/2 Phosphorylierung aufhebt (204). Dies ist auch in dieser Arbeit bestätigt worden, denn die ERK1/2 Phosphorylierung wird über den Ceramidmetabolismus gesteuert. Nach der Stimulation mit IL-1 β in den Hautfibroblasten und den CLPF konnte man einen Anstieg der ERK1/2 Phosphorylierung erkennen, welche bei den ASM-defizienten Fibroblasten ausblieb.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Stimulation mit IL-1 β die ASM aktiviert und Ceramid entsteht. Dadurch wird die Bildung von Mikrodomänen in den Lipid Rafts ermöglicht und somit die Signaltransduktion verstärkt. Im Anschluss kommt es zu einer Aktivierung des ERK1/2 Signalweges wodurch die MMP-1 Produktion angeschaltet wird. Andere Signalwege wie der p38MAPK Signalweg oder die Aktivierung der Produktion von IL-8 scheinen ASM unabhängig.

5.2 Die Pharmakologische Inhibition der ASM durch Imipramin blockiert die Produktion von MMP-1 in IEZ und Kolon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF)

Nachdem im Modell mit ASM-defizienten Fibroblasten eine Abhängigkeit der MMP-1 Induktion durch die ASM beobachtet werden konnte, wurde in Caco-2 Zelllinien und *Colon lamina propria* Fibroblasten (CLPF) die Rolle von Ceramid als *second messenger* genauer definiert. Die Zellen wurden mit exogener SMase oder ASM-aktivierenden Zytokinen, wie beispielsweise IL-1 β oder TNF stimuliert, um eine Ceramidbildung zu induzieren.

Die *Affymetrix GeneChip* Analysen nach Ceramidbildung durch exogene SMase zeigten in Caco-2 Zellen einen starken Anstieg der MMP-1 und MMP-10 mRNA. Der dosisabhängige Anstieg der MMP-1 Produktion wurde durch ELISA Daten verifiziert.

Bisher wurde eine MMP-1 Induktion durch Ceramid in intestinalen Epithelzellen nicht beschrieben. Dies kann zum Verständnis der durch Ceramid bedingten Auswirkungen auf die Tumordinvasion und Metastasierung beitragen und dadurch möglicherweise diesbezügliche Therapiestrategien ermöglichen.

In primären Fibroblasten ist ein inflammatorischer Stimulus erforderlich, wie z.B. IL-1 β oder TNF um eine MMP-1 Produktion zu induzieren. Diese Regulation fehlt in der Tumorzelllinie Caco-2, da die Produktion von MMP-1 durch die alleinige Gabe von exogener SMase ansteigt. Dieser Effekt ist bei den CLPF nicht vorhanden, so dass hier noch ein zusätzlicher Regulator der MMP-1 Induktion vorgeschaltet sein muss, der die ASM aktiviert. Bei den CLPF konnte deshalb auch kein dosisabhängiger Einfluss der exogenen SMase gezeigt werden. Erst durch den Stimulus von Zytokinen gemeinsam mit endogener Aktivität der ASM, wird die Produktion von MMP-1 in primären Fibroblasten gesteigert.

Die Zytokine IL-1 β und TNF induzieren die MMP-1 Produktion und aktivieren außerdem die ASM (32, 109). Aus diesem Grund wurden diese Stimuli auch in dieser Arbeit verwendet, um die Abhängigkeit der MMP-1 Produktion von der ASM zu verdeutlichen. Um die Relevanz der Sphingomyelin-Degradation durch die ASM für die zytokinvermittelte MMP-1 Produktion aufzuklären, wurde deren Aktivität durch den pharmakologischen Inhibitor Imipramin gehemmt. Die Ergebnisse zeigen, dass die durch IL-1 β und TNF vermittelte MMP-1 Produktion durch Imipramin komplett gehemmt wird. Die Inhibition der ASM führt außerdem zu einer defekten ERK1/2 Aktivierung. Die fehlende MMP-1 Induktion mit Imipramin führt bei den CLPF zu einer Verminderung der Phosphorylierung von ERK1/2. Diese Resultate zeigen, dass es zu einer sehr frühen Störung im Signalweg auf Ebene der Plasmamembran kommt.

Die Aktivierung der ASM durch IL-1 β oder TNF führt zur Ceramidbildung in den Mikrodomänen der Plasmamembran. Dort vermittelt Ceramid die Fusion von kleinen Membran Rafts zu großen Signal-Plattformen wodurch eine größere Dichte an Signalmolekülen entsteht und dadurch die Signaltransduktion verstärkt und initiiert (23) wird. Durch die Inhibition der ASM kommt es zur Hemmung der Ceramidbildung, daraufhin wird auch der Signalweg über ERK1/2 gehemmt, da die Phosphorylierung unterdrückt wird. Die Phosphorylierung von ERK1/2 ist somit von den Lipid Rafts abhängig, da diese durch die Ceramidbildung zu Signal-Plattformen verdichtet

werden und es zu einer erhöhten Signaltransduktion kommt. Dagegen zeigen die Western Blots der CLPF, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 nach Stimulation mit TNF und Behandlung mit Imipramin nicht gehemmt wird. Diese Phosphorylierung erfolgt somit über einen Signalweg, der nicht von intakten Lipid Rafts abhängt. Diese Daten lassen vermuten, dass die Ceramidbildung durch die ASM, aktiviert von IL-1 β oder TNF, die intestinale Gewebsstruktur durch den Anstieg der MMP-1 Produktion vermittelt. Die MMP-1 Produktion kann durch die Inhibition der ASM blockiert werden. Dieser Effekt kann durch die inadäquate Phosphorylierung von ERK1/2 und die darauffolgende nicht vollständig aktivierte MAPK-Kaskade erklärt werden. Welche Transkriptionsfaktoren dabei involviert sind, könnte in diesem Zusammenhang ebenfalls gut untersucht werden.

Es konnte für MMP-1 gezeigt werden, dass diese durch den Transkriptionsfaktor AP-1 reguliert wird (205). Dieser Transkriptionsfaktor ist *downstream* der Phosphorylierung von ERK1/2 (206). Dies würde erklären, warum es zu keiner ERK1/2 Phosphorylierung nach ASM Inhibition kommt. AP-1 wird u.a. auch von Ceramid aktiviert und es kommt dadurch zu einer Aktivierung von NF- κ B (207). Da die MMP-1 Produktion von der Ceramidbildung durch die ASM abhängig ist (208, 209), müsste der AP-1 Promotor ebenfalls durch Ceramid reguliert werden. Aktivierte ASM degradiert Sphingomyelin, wodurch es zu einem Anstieg der MMP-1 Produktion kommt. Vermehrte MMP-1 Produktion scheint für Schädigungen in der Kolonmukosa bei Patienten mit CU verantwortlich zu sein (154, 210, 211). Anhand dieser Daten erscheint es möglich, durch eine Induktionshemmung von MMP-1 mit ASM-Inhibitoren Patienten mit CU zu therapieren. Die Blockierung der Induktion der MMP-1 Produktion durch Imipramin könnte durchaus als Therapieansatz benutzt werden.

Die Analyse von Serumproben von Patienten mit CED zeigt, dass MMP-1 in das Serum sezerniert wird und möglicherweise ein geeigneter Parameter für die Quantifizierung der entzündlichen Aktivität von CU und MC sein kann. Bei einem akuten Schub kann man erkennen, dass die MMP-1 Konzentration im Vergleich zu den gesunden Kontrollen, sowohl bei MC als auch bei CU stark erhöht ist. MMP-1 könnte deshalb als möglicher biologischer Marker für den Aktivitätsgrad von CU und MC dienen. In bisherigen Untersuchungen wurde die MMP-1 Expression nur auf

mRNA Ebene untersucht (157). Anhand der Serumdaten lässt sich der Einfluss der Entzündungsreaktion auf die systemische MMP-1 Konzentration erkennen. Die Regulation von MMP-1 erfolgt nicht nur lokal auf RNA Ebene, sondern wird auch auf die Proteinebene durch die Entzündung reguliert.

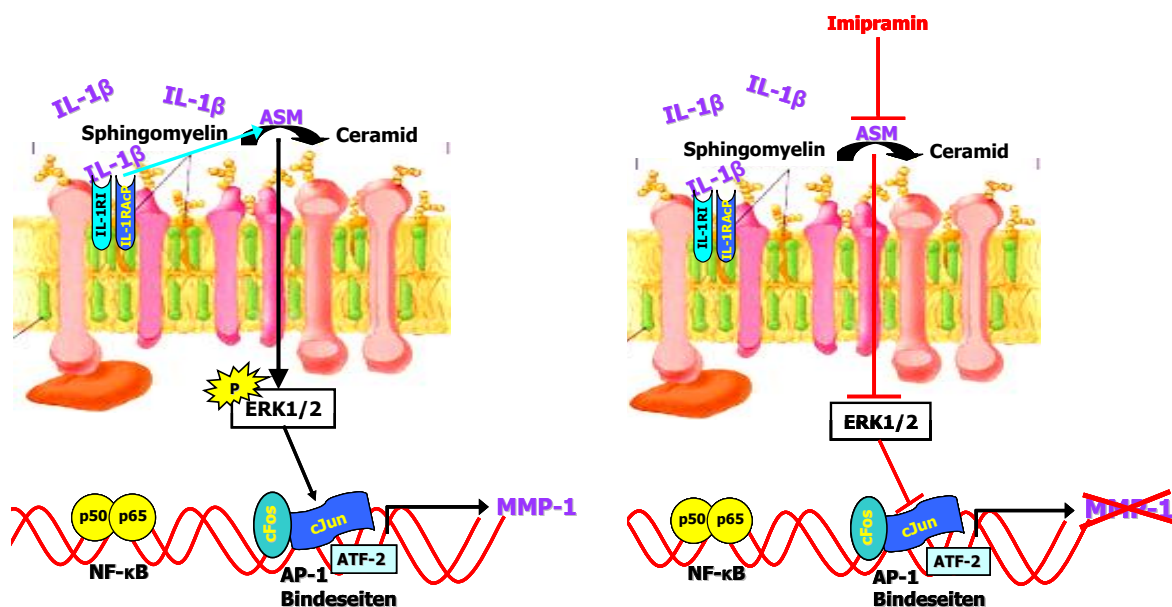


Abbildung 5.1: Die MMP-1 Produktion ist von der Aktivierung der sauren Sphingomyelinase abhängig. Die Aktivierung der ASM durch Zytokine wie IL-1β führt zur Ceramidbildung durch Hydrolyse von Sphingomyelin. ERK1/2 wird durch die Aktivierung phosphoryliert und der Signalweg wird induziert. Durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 kommt es zu einer erhöhten Produktion von Matrix Metalloproteinase-1.

5.3 Veränderung der bioaktiven Lipide bei experimenteller muriner Kolitis in verschiedenen Kolitismodellen

Anhand von zwei Kolitismodellen in der Maus sollten die bioaktiven Lipide und deren Einfluss auf Kolitis untersucht werden. Bei der chronischen DSS-Kolitis und der CD4⁺CD62L⁺-Transferkolitis wurden mittels Massenspektrometrie eine Reihe von bioaktiven Lipiden bei kranken und gesunden Mäusen miteinander verglichen. Vor allem sollten die Veränderungen von Ceramid als *second messenger* und somit dessen mögliche Bedeutung für die Pathogenese von CED untersucht werden.

Mittels Elektrospray-Ionisierungs-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) wurden folgende bioaktive Lipide analysiert und deren Konzentrationen in IEZ bestimmt:

Ceramid, Sphingomyelin (SM), Lysophosphatidylcholin (LPC), Phosphatidylcholin (PC), Plasmalogen (PE-pl), Phosphatidylethanolamin (PE) und Cholesterin wurden aus intestinalen Epithelzellen von der Maus Mukosa bestimmt. Die FACS Analysen haben gezeigt, dass die für die Massenspektrometrie isolierten IEZ zu einem Großteil intestinale Epithelzellen enthielten. Die Isolierung der IEZ konnte somit verifiziert werden.

Bisherige Studien haben gezeigt, dass das Phospholipid PC eine anti-inflammatorische Wirkung in der intestinalen Mukosa besitzt (77). Bei Patienten mit CU wurde ein verminderter Gehalt von PC und LPC im Vergleich zu Patienten mit MC oder gesunden Kontrollen in der Mukosa gezeigt (75). Die in dieser Arbeit durchgeführten Kolitismodelle zeigten bei PC allerdings keine Veränderung. Der Gehalt an PC blieb bei der chronischen Kolitis und bei der Transferkolitis im Vergleich zu den gesunden Mäusen nahezu konstant. Für das Abbauprodukt von PC, LPC konnte eine Verringerung der Konzentration in beiden Modellen beobachtet werden. Das Sphingolipid SM war bei der chronischen DSS-Kolitis reduziert. Im Gegensatz dazu war Ceramid bei beiden Modellen stark erhöht. Der Anstieg an Ceramid bei zeitgleicher Verminderung von SM lässt sich dadurch erklären, dass SM durch Sphingomyelinasen (SMasen) hydrolysiert wird. Eine Erhöhung von Ceramid kann aber auch durch eine verminderte Aktivität der sauren Ceramidase entstehen. PE-pl und freies Cholesterin waren in den Modellen ebenfalls reduziert.

Sakata *et al.* konnten zeigen, dass die ASM die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen bei chronischer Kolitis im Tiermodell ansteigen lässt (212, 213). Durch Ceramidbildung in IEZ kommt es *in vitro* zu einer Verminderung der Barrierefunktion (113). Eine weitere Konsequenz der Ceramidakkumulation kann der Anstieg von Apoptose, Inflammation oder ein erhöhtes Infektionsrisiko sein. Durch die Ceramid-Alteration kommt es außerdem zu einem Eingriff in die Membranfluidität. Dies führt auch zu einer Veränderung der Aktivität verschiedener Ionenkanäle (214). Die Barrieremembran wird durch den Ceramidanstieg permeabler und dadurch können inflammatorische Zellen einwandern (113). Der Anstieg von Ceramid und die dadurch induzierte Apoptose, Entzündung und die Permeabilität der Membran wurde ebenfalls im Tiermodell bei zystischer Fibrose gezeigt (215). All diese Effekte könnten eventuell durch eine Inhibition der ASM und die dadurch verminderte Ceramidbildung

verhindert werden. Positive Effekte durch Imipraminbehandlung bei Patienten mit CU konnten bereits in einer klinischen Untersuchung gezeigt werden (216). Die in dieser Arbeit dargestellte Hemmung der Zytokin-induzierten MMP-1 Produktion durch Behandlung mit Imipramin kann als möglicher pathophysiologischer Angriffspunkt der therapeutischen Effekte von Imipramin gesehen werden.

Für PC wurde eine protektive Wirkung bei Patienten mit CU beschrieben (193, 217, 218). Deswegen wurden bei den Kolitismodellen auch PC und das Abbauprodukt LPC untersucht. Es gab keine Hinweise für die Verminderung von PC in intestinalen Epithelzellen (IEZ) bei Kolitis, aber sehr wohl bei dessen Abbauprodukte LPC. Dies war in entzündeten Arealen im Kolonepithel signifikant reduziert. Bisherige Arbeiten beobachteten, dass durch LPC pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β (219) reguliert werden. Durch die Reduktion von LPC kommt es außerdem zu einer Verminderung von Monozyten und T-Zellen in den entzündeten Arealen (220). Die geringere Konzentration von LPC und die daraus resultierende Verminderung der Entzündungsreaktion zeigte sich in beiden Kolitsmodellen.

Die einwöchige Behandlung mit Lecithin nach Induktion einer chronischen DSS Kolitis im Mausmodell führte wider Erwarten zu einem schlechteren Verlauf der Kolitis. Hier stehen die Ergebnisse im Tiermodell im Widerspruch zu den von Stremmel *et al.* publizierten klinischen Daten (193). Erwartungsgemäß hätte sich der Zustand verbessern sollen, wie bei Patienten mit CU beschrieben. Weiterhin ist unklar, warum sich die murine chronische DSS-Kolitis durch Gabe von Lecithin verschlechtert, während sich die Entzündung bei Patienten mit CU verbessert.

Die Daten in dieser Arbeit zeigen, dass der Anstieg von Ceramid bei der experimentellen Kolitis eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von CED und bei der Induktion der MMP-1 Produktion spielen könnte. Die pharmakologische Inhibition der ASM mit Imipramin hemmt die MMP-1 Induktion nach der Stimulation mit den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1 β oder TNF komplett. Die Hemmung der ASM und der nachfolgenden Ceramidbildung kann deshalb eine mögliche Strategie sein, um die intestinale Entzündung, vor allem bei CU Patienten, zu verringern.

Der Einfluss der ASM auf die Produktion von MMP-1 konnte in unserem Tiermodell nicht untersucht werden, da die MMP-1 humanspezifisch ist. Bei Mäusen sind die MMPs McolA und McolB vorhanden, die aber nicht vergleichbar mit MMP-1 im humanen System sind.

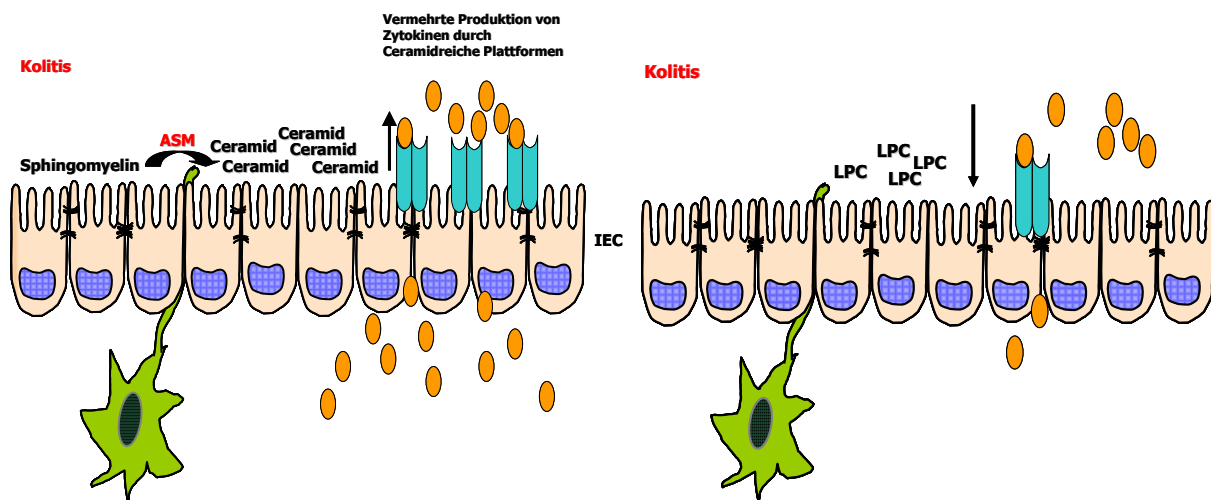


Abbildung 5.2: Einfluss der experimentellen Kolitis auf die bioaktiven Lipide Ceramid und Lysophosphatidylcholin (LPC). Durch die Induktion der Kolitis kommt es zu einer Veränderung der Lipide bei intestinalen Epithelzellen. Die Ceramidkonzentration steigt an und die LPC-Konzentration nimmt ab. LPC wirkt anti-entzündlich, wird aber bei der DSS-Kolitis reduziert und Ceramid erhöht die Zahl der aggregierten Rezeptoren durch die Bildung von Mikrodomänen in den Lipid Rafts. Es kommt damit insgesamt zu einer verstärkten Entzündungsreaktion.

5.4 Einfluss von Ceramid und Imipramin auf die Produktion von MMP-1 und die Invasion von hepatischen Sternzellen und der Tumorzelllinie HepG2

Leberschäden resultieren aus der Aktivierung von hepatischen Sternzellen, welche als Antwort auf pro-inflammatorische Zytokine u.a. MMPs produzieren und somit zur Matrixdegradation führen (221). Zytokine, freie Radikale aus der Lipidperoxidation und ein verändertes extrazelluläres Matrix (EZM)-Milieu tragen zur Entstehung des hepatozellulärem Karzinoms (HCC) bei. Die Aktivierung der hepatischen Sternzellen umfasst die Proliferation und die morphologische Umwandlung von sternförmigen, Vitamin A speichernden ruhenden hepatischen Sternzellen zu Myofibroblasten-ähnlichen und Vitamin A armen aktivierten hepatischen Sternzellen (222). Für die

hepatischen Sternzellen oder auch ITO Zellen genannt, ist bekannt, dass die aktiven hepatischen Sternzellen MMP-1 produzieren. Hepatische Sternzellen erhöhen ihre Produktion an MMP-1 durch Stimulation mit verschiedenen Zytokinen. Durch die Verwendung von ASM-Hautfibroblasten konnte gezeigt werden, dass eine Produktion von MMP-1 von der ASM-Aktivierung abhängig ist (208, 209). An hepatischen Sternzellen konnte gezeigt werden, dass Stimulation mit IL-1 β , TNF und TGF- β zu einer raschen MMP-1 Bildung führt. Durch diese MMP-1 Produktion kann wiederum die Invasionsfähigkeit der hepatischen Sternzellen erhöht werden. Im Gegensatz zu den verwendeten Zytokinen führt die Aktivierung des Toll-like Rezeptors (TLR) 4 durch Lipopolysaccharide (LPS) interessanterweise zu keinem Anstieg der MMP-1 Produktion.

Die Stimulation mit IL-1 β und TNF steigert die MMP-1 Produktion und dadurch wird die Invasionsaktivität durch die kollagenbeschichtete Membran erhöht. Eine vermehrte Migration in diesem Zusammenhang kann ausgeschlossen werden, weil die Stimulation mit IL-1 β oder TNF zu keiner vermehrten Migration führt. Somit erhöhen die Zellen ihre Invasionsaktivität durch den Abbau der kollagenbeschichteten Membran, weil die Stimulation mit IL-1 β und TNF die MMP-1 Produktion in den hepatischen Sternzellen ansteigen lässt. Die extrazelluläre Matrix und deren Abbau durch die MMPs spielen für die Invasion eine entscheidende Rolle. Somit konnte gezeigt werden, dass nur der vermehrte MMP-1 abhängige Abbau von Kollagen durch Stimulation mit den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF die Invasion steigert. Da durch die alleinige Stimulation mit der exogenen SMase die MMP-1 Produktion gesteigert wird, zeigt sich, dass ein Stress-Stimulus der zur Ceramidbildung führt genügt, um die Produktion von MMP-1 zu erhöhen.

Die Ceramid-aktivierte Protein Kinase (CAPK) aktiviert Raf-1, welches die *mitogen activated protein kinases* stimuliert. Raf Kinase Inhibitor Protein inhibiert den Signalweg von ERK/MAPK und dadurch resultiert eine Inhibition der Zellproliferation in hepatischen Sternzellen (223). In dieser Arbeit konnte auch eine verminderte Phosphorylierung von ERK/MAPK durch die Behandlung mit Imipramin gezeigt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es durch Inhibition der ASM auch zu einer Inhibition von CAPK kommt und deshalb Raf nicht aktiviert werden kann, was letztlich die Proliferation der hepatischen Sternzellen vermindert.

Die Verminderung der Invasion von hepatischen Sternzellen und hepatozellulären Karzinomzellen durch das Antidepressivum Imipramin scheint ebenfalls durch Beeinflussung der Signalwege von ERK und MAPK verursacht. Die IL-1 β induzierte Phosphorylierung von ERK wird durch Inkubation mit Imipramin gehemmt. Die Signalwege ERK1/2, p38MAPK und NF- κ B werden *upstream* vom Transkriptionsfaktor AP-1 angeschaltet (224). Diese Signalwege sind bei der Stimulation der hepatischen Sternzellen durch Imipramin auch beeinflusst. Der Anstieg der ERK1/2 Phosphorylierung führt zu einer vermehrten inflammatorischen Reaktion in der Leber (224). Die Stimulation mit dem Zytokin IL-1 β zeigt diesen Effekt bei den hepatischen Sternzellen auf. Die Vorbehandlung mit Imipramin und die geringere ERK1/2 Phosphorylierung konnte nur bei IL-1 β dargestellt werden.

Die hepatischen Sternzellen benötigen außerdem keinen zusätzlichen Stimulus, um die MMP-1 Produktion durch exogene SMase zu erhöhen. Die Stimulation der hepatischen Sternzellen allein durch exogene SMase reicht aus, um die MMP-1 Produktion dosisabhängig zu erhöhen. Dies bedeutet, dass auch die unspezifische Stimulation der hepatischen Sternzellen, die zu einer Ceramidbildung führt, eine vermehrte MMP-1 Produktion verursachen kann. Eine Hemmung der ASM durch Imipramin führt wieder zu einer kontrollierten Verminderung der durch IL-1 β und TNF induzierten MMP-1 Produktion.

Eine Behandlung mit Imipramin scheint daher eine mögliche Strategie zu sein, die Invasion von hepatischen Sternzellen und hepatozellulären Karzinomzellen zu verhindern. Es kommt zu einem geringeren Kollagenabbau und dadurch auch zu einer geringeren Invasion der hepatischen Sternzellen. Die Sezernierung von MMP-1 alleine reicht, um die Invasion zu steigern. Dies zeigt sich vor allem bei den HepG2 Zellen. HepG2 sind nicht in der Lage, die MMP-1 Produktion zu steigern. Sie sind somit nicht in der Lage das Kollagen I auf der Polycarbonatmembran abzubauen. Die Migration von IL-1 β und TNF stimulierten HepG2 ist mit der unstimulierten Zellen vergleichbar. Erst durch die MMP-1 Sekretion von hepatischen Sternzellen wird den HepG2 Zellen eine Invasion durch Kollagen ermöglicht. Dieser Effekt kann durch die Inkubation der hepatischen Sternzellen mit Imipramin wieder aufgehoben werden. Die HepG2 erhöhen ihre Invasivität nur in Anwesenheit der MMP-1 sezernierenden hepatischen Sternzellen und durch die Stimulation mit IL-1 β oder TNF, weil die MMP-1 das Kollagen I in der Polycarbonatmembran abbaut und die Invasion der

HepG2 erhöht. Die Inkubation mit Imipramin verringert die Invasion wieder. Imipramin verhindert die MMP-1 Expression bereits auf mRNA-Ebene ein. Dies könnte auch durch einen Effekt auf den Transkriptionsfaktor AP-1 bedingt sein, welcher durch Imipramin gehemmt werden könnte und es dadurch zu keiner MMP-1 Produktion kommt.

Die Ceramidakkumulation vermittelt inflammatorische Prozesse und erhöht die Anfälligkeit für zystische Fibrose (215). Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der ASM durch Amitriptylin den Ceramidspiegel in der Lunge wieder normalisiert (215). Amitriptylin ist wie Imipramin ein trizyklisches Antidepressivum und wirkt ähnlich auf die ASM. Deswegen könnte die Hemmung der ASM durch Imipramin auch positiv auf die HCC wirken.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die ASM bei vielen Entzündungsprozessen eine Rolle spielt. Eine Blockade der ASM führt zu einer verminderten Entzündungsreaktion. Darüber hinaus spielt bei der Invasion der hepatischen Sternzellen die ASM induzierte MMP-1 Produktion eine wichtige Rolle. Dieser Effekt könnte auch genutzt werden, um die Invasivität maligner Zellen wie am Beispiel der HCC Zellen gezeigt zu vermindern und bei hepatischen Schäden ein ungünstiges Remodelling der extrazellulären Matrix und damit die Fibrose bzw. Zirrhose zu verhindern.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des *second messengers* Ceramid und der Einfluss der sauren Sphingomyelinase (ASM) auf die Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 Produktion untersucht.

In einem genetischen Modell mit ASM-defizienten humanen Hautfibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Induktion der MMP-1 nach Stimulation mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-1 β durch die ASM reguliert wird. Im Gegensatz dazu zeigte die Inhibition der neutralen SMase keinen Effekt auf die MMP-1 Konzentration. Die durch IL-1 β induzierte MMP-1 Produktion in Fibroblasten ist dabei vollständig von der ASM-Produktion abhängig. Die Inhibition der ASM scheint daher eine mögliche Strategie zu sein, um die MMP-1 Synthese bei Entzündungsreaktionen zu vermindern.

Bei der experimentellen Kolitis kommt es zu einer Akkumulation von Ceramid und Verringerung von LPC. Eine Folge der Ceramidbildung ist die gesteigerte Produktion von MMP-1. Die Induktion von MMP-1 durch TNF oder IL-1 β wird durch Hemmung der ASM vollständig blockiert. Die ASM Hemmung scheint daher eine mögliche Strategie zu sein, die überschießende MMP-1-Produktion und möglicherweise damit die Gewebedestruktion bei Colitis ulcerosa zu reduzieren.

Die MMPs spielen auch bei der Zellinvasion und Zirrhoseentstehung eine zentrale Rolle. Darüberhinaus sind die MMPs entscheidend bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen beteiligt. Die pharmakologische Hemmung der ASM durch Imipramin, hat einen Einfluss auf die Invasion hepatischer Sternzellen und Karzinomzellen. Werden hepatische Sternzellen mit Imipramin inkubiert, ist die MMP-1 Produktion nach Stimulation mit IL-1 β , TNF und TGF- β gehemmt und die Invasion in eine Kollagenschicht aufgehoben. Damit ergeben sich durch die Modulation der ceramidvermittelten MMP-1 Produktion auch bei hepatischen Erkrankungen wie der Leberfibrose bzw. Zirrhose und der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms möglicherweise neue therapeutische Angriffspunkte.

7 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die saure Sphingomyelinase (ASM) entscheidend für die Produktion der Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) ist. Die Aktivierung der ASM durch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β oder TNF führt sowohl in Fibroblasten als auch in intestinalen Epithelzellen und hepatischen Sternzellen zu einer massiven Steigerung der MMP-1 Produktion. Dieser Anstieg kann man durch den pharmakologischen Inhibitor der ASM, Imipramin, gehemmt werden.

Anhand der Daten dieser Arbeit erscheint eine Therapie von CU Patienten mit Imipramin erfolgversprechend. Zur Bestätigung der Hypothese soll im Rahmen einer geplanten klinischen Studie vor und nach Behandlungsbeginn eine Kolonbiopsie genommen werden und diese auf Expressions- und Proteinebene hinsichtlich der MMP-1 Produktion untersucht werden. Nach der Behandlung sollte entsprechend unserer Ergebnisse die MMP-1 Produktion reduziert sein und im Idealfall auch die Gewebedestruktion rückläufig sein.

In dieser Arbeit wurden die bioaktiven Lipide beim experimentellen Kollitismodell in der Maus untersucht. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa konnte gezeigt werden, dass die Phospholipide Phosphatidylcholin (PC) und Lysophosphatidylcholin (LPC) einen anti-inflammatorischen Einfluss haben und diese im Vergleich zu den gesunden Kontrollpatienten im Mucus bei Colitis ulcerosa stark vermindert sind. Im Gegensatz dazu konnten wir zeigen, dass beim experimentellen Kollitismodell die Lipide Ceramid und LPC ansteigen und PC nahezu konstant bleibt. Die orale Gabe von PC führte bei der chronischen DSS Kollitis sogar zu einer Zunahme des Epithelschadens und entzündlichen Infiltrates. Diese Ergebnisse zeigen, dass PC unter bestimmten Bedingungen eine chronische intestinale Entzündung auch verschlechtern kann. Es wäre daher wichtig in Folgeuntersuchungen die Ursache für die diskrepanten Befunde zu identifizieren, um zu vermeiden, dass durch die Applikation von PC die Entzündung bei CED Patienten unter bestimmten Bedingungen verstärkt wird.

Damit ergeben sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit zwei direkt in die Klinik weisende Folgestudien, die Einfluss auf zukünftige Therapien, insbesondere bei Patienten mit CED, haben könnten.

Die mögliche Bedeutung der ASM für die hepatische Fibrose und Invasivität der HCC Zellen, die wir in vitro demonstrieren konnten, sollte zunächst in experimentellen Modellen der Leberfibrose bzw. HCC Tumormodellen bestätigt werden. Auch hier bestünde im Falle positiver in vivo Ergebnisse ein Potential für eine therapeutische Anwendung einer ASM Blockade beim Menschen.

8 Literaturverzeichnis

1. Graham MF. Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease – an update. *Inflamm Bowel Disease* 1995 Dec;1:220-227.
2. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003 Feb;124(2):521-536.
3. Jewell DP. Ulcerative colitis and Crohn's disease--susceptibility genes and clinical patterns. *J Gastroenterol* 1998 Jun;33(3):458-462.
4. Binder V, Orholm M. Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease. *Neth J Med* 1996 Feb;48(2):53-56.
5. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001 May 31;411(6837):599-603.
6. Schreiber S, Hanpe J, Nikolaus S, Foelsch UR. Review article: exploration of the genetic aetiology of inflammatory bowel disease--implications for diagnosis and therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2004 Oct;20 Suppl 4:1-8.
7. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001 May 31;411(6837):603-606.
8. Inohara N, Koseki T, Lin J, del PL, Lucas PC, Chen FF, et al. An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem* 2000 Sep 8;275(36):27823-27831.
9. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001 Feb 16;276(7):4812-4818.
10. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 1997 Aug 7;388(6642):548-554.
11. Hugot JP, Zouali H, Lesage S. Lessons to be learned from the NOD2 gene in Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003 Jun;15(6):593-597.
12. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002 Jan;122(1):44-54.
13. Arnott ID, Kingstone K, Ghosh S. Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2000 Nov;35(11):1163-1169.

14. Irvine EJ, Marshall JK. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* 2000 Dec;119(6):1740-1744.
15. Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, Waldhoer T, Lochs H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 1993 Jun 5;341(8858):1437-1439.
16. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972 Feb 18;175(23):720-731.
17. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997 Jun 5;387(6633):569-572.
18. van MG, Simons K. Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem* 1988 Jan;36(1):51-58.
19. Anderson RG. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Dec 1;90(23):10909-10913.
20. Brown DA, London E. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol* 1998 Jul 15;164(2):103-114.
21. Jeong J, McMahon AP. Cholesterol modification of Hedgehog family proteins. *J Clin Invest* 2002 Sep;110(5):591-596.
22. Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* 2002 Sep;110(5):597-603.
23. Gulbins E, Li PL. Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006 Jan;290(1):R11-R26.
24. Cifone MG, De MR, Roncaioli P, Rippo MR, Azuma M, Lanier LL, et al. Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *J Exp Med* 1994 Oct 1;180(4):1547-1552.
25. Cremesti A, Paris F, Grassme H, Holler N, Tschopp J, Fuks Z, et al. Ceramide enables fas to cap and kill. *J Biol Chem* 2001 Jun 29;276(26):23954-23961.
26. Grassme H, Jekle A, Riehle A, Schwarz H, Berger J, Sandhoff K, et al. CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 2001 Jun 8;276(23):20589-20596.
27. Grassme H, Schwarz H, Gulbins E. Molecular mechanisms of ceramide-mediated CD95 clustering. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Jun 22;284(4):1016-1030.
28. Gulbins E, Bissonnette R, Mahboubi A, Martin S, Nishioka W, Brunner T, et al. FAS-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated RAS signaling pathway. *Immunity* 1995 Apr;2(4):341-351.

29. Kirschnek S, Paris F, Weller M, Grassme H, Ferlinz K, Riehle A, et al. CD95-mediated apoptosis in vivo involves acid sphingomyelinase. *J Biol Chem* 2000 Sep 1;275(35):27316-27323.
30. Boucher LM, Wiegmann K, Futterer A, Pfeffer K, Machleidt T, Schutze S, et al. CD28 signals through acidic sphingomyelinase. *J Exp Med* 1995 Jun 1;181(6):2059-2068.
31. Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Calvo M, Enrich C, et al. Defective TNF-alpha-mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J Clin Invest* 2003 Jan;111(2):197-208.
32. Schutze S, Potthoff K, Machleidt T, Berkovic D, Wiegmann K, Kronke M. TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* 1992 Nov 27;71(5):765-776.
33. Zhang DX, Yi FX, Zou AP, Li PL. Role of ceramide in TNF-alpha-induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 Nov;283(5):H1785-H1794.
34. Grassme H, Jendrosseck V, Bock J, Riehle A, Gulbins E. Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J Immunol* 2002 Jan 1;168(1):298-307.
35. Dumitru CA, Gulbins E. TRAIL activates acid sphingomyelinase via a redox mechanism and releases ceramide to trigger apoptosis. *Oncogene* 2006 Sep 14;25(41):5612-5625.
36. Simarro M, Calvo J, Vila JM, Places L, Padilla O, Berola-Ila J, et al. Signaling through CD5 involves acidic sphingomyelinase, protein kinase C-zeta, mitogen-activated protein kinase kinase, and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Immunol* 1999 May 1;162(9):5149-5155.
37. Rosenman SJ, Ganji AA, Tedder TF, Gallatin WM. Syn-capping of human T lymphocyte adhesion/activation molecules and their redistribution during interaction with endothelial cells. *J Leukoc Biol* 1993 Jan;53(1):1-10.
38. Abdel Shakor AB, Kwiatkowska K, Sobota A. Cell surface ceramide generation precedes and controls Fc gamma RII clustering and phosphorylation in rafts. *J Biol Chem* 2004 Aug 27;279(35):36778-36787.
39. Bezombes C, Grazide S, Garret C, Fabre C, Quillet-Mary A, Muller S, et al. Rituximab antiproliferative effect in B-lymphoma cells is associated with acid-sphingomyelinase activation in raft microdomains. *Blood* 2004 Aug 15;104(4):1166-1173.
40. Mathias S, Younes A, Kan CC, Orlov I, Joseph C, Kolesnick RN. Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1 beta. *Science* 1993 Jan 22;259(5094):519-522.

41. Goggel R, Winoto-Morbach S, Vielhaber G, Imai Y, Lindner K, Brade L, et al. PAF-mediated pulmonary edema: a new role for acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med* 2004 Feb;10(2):155-160.
42. Grassme H, Jendrossek V, Riehle A, von KG, Berger J, Schwarz H, et al. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med* 2003 Mar;9(3):322-330.
43. Esen M, Schreiner B, Jendrossek V, Lang F, Fassbender K, Grassme H, et al. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* induced apoptosis of human endothelial cells. *Apoptosis* 2001 Dec;6(6):431-439.
44. Grassme H, Gulbins E, Brenner B, Ferlinz K, Sandhoff K, Harzer K, et al. Acidic sphingomyelinase mediates entry of *N. gonorrhoeae* into nonphagocytic cells. *Cell* 1997 Nov 28;91(5):605-615.
45. Jan JT, Chatterjee S, Griffin DE. Sindbis virus entry into cells triggers apoptosis by activating sphingomyelinase, leading to the release of ceramide. *J Virol* 2000 Jul;74(14):6425-6432.
46. Grassme H, Riehle A, Wilker B, Gulbins E. Rhinoviruses infect human epithelial cells via ceramide-enriched membrane platforms. *J Biol Chem* 2005 Jul 15;280(28):26256-26262.
47. Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodieci P, Juan G, Ehleiter D, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001 Jul 13;293(5528):293-297.
48. Santana P, Pena LA, Haimovitz-Friedman A, Martin S, Green D, McLoughlin M, et al. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* 1996 Jul 26;86(2):189-199.
49. Charruyer A, Grazide S, Bezombes C, Muller S, Laurent G, Jaffrezou JP. UV-C light induces raft-associated acid sphingomyelinase and JNK activation and translocation independently on a nuclear signal. *J Biol Chem* 2005 May 13;280(19):19196-19204.
50. Rotolo JA, Zhang J, Donepudi M, Lee H, Fuks Z, Kolesnick R. Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. *J Biol Chem* 2005 Jul 15;280(28):26425-26434.
51. Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med* 2000 Oct;6(10):1109-1114.
52. Lacour S, Hammann A, Grazide S, Lagadic-Gossmann D, Athias A, Sergent O, et al. Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 2004 May 15;64(10):3593-3598.

53. Delmas D, Rebe C, Micheau O, Athias A, Gambert P, Grazide S, et al. Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene* 2004 Nov 25;23(55):8979-8986.
54. Yabu T, Tomimoto H, Taguchi Y, Yamaoka S, Igarashi Y, Okazaki T. Thalidomide-induced antiangiogenic action is mediated by ceramide through depletion of VEGF receptors, and is antagonized by sphingosine-1-phosphate. *Blood* 2005 Jul 1;106(1):125-134.
55. Nieva JL, Alonso A, Basanez G, Goni FM, Gulik A, Vargas R, et al. Topological properties of two cubic phases of a phospholipid:cholesterol:diacylglycerol aqueous system and their possible implications in the phospholipase C-induced liposome fusion. *FEBS Lett* 1995 Jul 10;368(1):143-147.
56. Abrami L, Fivaz M, Decroly E, Seidah NG, Jean F, Thomas G, et al. The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin. *J Biol Chem* 1998 Dec 4;273(49):32656-32661.
57. Tran D, Carpentier JL, Sawano F, Gorden P, Orci L. Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Nov;84(22):7957-7961.
58. Sandvig K, Garred O, van HA, van MG, van DB. Importance of glycolipid synthesis for butyric acid-induced sensitization to shiga toxin and intracellular sorting of toxin in A431 cells. *Mol Biol Cell* 1996 Sep;7(9):1391-1404.
59. Riethmuller J, Riehle A, Grassme H, Gulbins E. Membrane rafts in host-pathogen interactions. *Biochim Biophys Acta* 2006 Dec;1758(12):2139-2147.
60. Hannun YA, Loomis CR, Merrill AH, Jr., Bell RM. Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J Biol Chem* 1986 Sep 25;261(27):12604-12609.
61. Hannun YA, Bell RM. Phorbol ester binding and activation of protein kinase C on triton X-100 mixed micelles containing phosphatidylserine. *J Biol Chem* 1986 Jul 15;261(20):9341-9347.
62. Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 Feb;9(2):162-176.
63. Homaidan FR, Chakroun I, Haidar HA, El-Sabban ME. Protein regulators of eicosanoid synthesis: role in inflammation. *Curr Protein Pept Sci* 2002 Aug;3(4):467-484.
64. Martin S, Phillips DC, Szekely-Szucs K, Elghazi L, Desmots F, Houghton JA. Cyclooxygenase-2 inhibition sensitizes human colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis through clustering of DR5 and concentrating death-inducing signaling complex components into ceramide-enriched caveolae. *Cancer Res* 2005 Dec 15;65(24):11447-11458.

65. Pettus BJ, Kitatani K, Chalfant CE, Taha TA, Kawamori T, Bielawski J, et al. The coordination of prostaglandin E2 production by sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate. *Mol Pharmacol* 2005 Aug;68(2):330-335.
66. Kono M, Allende ML, Proia RL. Sphingosine-1-phosphate regulation of mammalian development. *Biochim Biophys Acta* 2008 Sep;1781(9):435-441.
67. Bernhard W, Postle AD, Linck M, Sewing KF. Composition of phospholipid classes and phosphatidylcholine molecular species of gastric mucosa and mucus. *Biochim Biophys Acta* 1995 Mar 16;1255(2):99-104.
68. Butler BD, Lichtenberger LM, Hills BA. Distribution of surfactants in the canine gastrointestinal tract and their ability to lubricate. *Am J Physiol* 1983 Jun;244(6):G645-G651.
69. Schryver-Kecskemeti K, Eliakim R, Carroll S, Stenson WF, Moxley MA, Alpers DH. Intestinal surfactant-like material. A novel secretory product of the rat enterocyte. *J Clin Invest* 1989 Oct;84(4):1355-1361.
70. Stremmel W, Merle U, Zahn A, Autschbach F, Hinz U, Ehehalt R. Retarded release phosphatidylcholine benefits patients with chronic active ulcerative colitis. *Gut* 2005 Jul;54(7):966-971.
71. Bengmark S, Jeppsson B. Gastrointestinal surface protection and mucosa reconditioning. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1995 Sep;19(5):410-415.
72. Ottlecz A, Romero JJ, Hazell SL, Graham DY, Lichtenberger LM. Phospholipase activity of *Helicobacter pylori* and its inhibition by bismuth salts. *Biochemical and biophysical studies. Dig Dis Sci* 1993 Nov;38(11):2071-2080.
73. Weitkamp JH, Perez-Perez GI, Bode G, Malfertheiner P, Blaser MJ. Identification and characterization of *Helicobacter pylori* phospholipase C activity. *Zentralbl Bakteriell* 1993 Sep;280(1-2):11-27.
74. Foltz CJ, Fox JG, Cahill R, Murphy JC, Yan L, Shames B, et al. Spontaneous inflammatory bowel disease in multiple mutant mouse lines: association with colonization by *Helicobacter hepaticus*. *Helicobacter* 1998 Jun;3(2):69-78.
75. Ehehalt R, Wagenblast J, Erben G, Lehmann WD, Hinz U, Merle U, et al. Phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine in intestinal mucus of ulcerative colitis patients. A quantitative approach by nanoElectrospray-tandem mass spectrometry. *Scand J Gastroenterol* 2004 Aug;39(8):737-742.
76. Ehehalt R, Jochims C, Lehmann WD, Erben G, Staffer S, Reininger C, et al. Evidence of luminal phosphatidylcholine secretion in rat ileum. *Biochim Biophys Acta* 2004 Jun 1;1682(1-3):63-71.
77. Treede I, Braun A, Sparla R, Kuhnel M, Giese T, Turner JR, et al. Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine. *J Biol Chem* 2007 Sep 14;282(37):27155-27164.

78. Liu-Wu Y, Svenningsson A, Stemme S, Holm J, Wiklund O. Identification and analysis of macrophage-derived foam cells from human atherosclerotic lesions by using a "mock" FL3 channel in flow cytometry. *Cytometry* 1997 Oct 1;29(2):155-164.
79. Kolesnick RN, Goni FM, Alonso A. Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J Cell Physiol* 2000 Sep;184(3):285-300.
80. Ruvolo PP. Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol Res* 2003 May;47(5):383-392.
81. Rother J, van EG, Schwarzmann G, Sandhoff K. Biosynthesis of sphingolipids: dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Nov 30;189(1):14-20.
82. van EG, Sandhoff K. Ganglioside metabolism. Enzymology, Topology, and regulation. *J Biol Chem* 1993 Mar 15;268(8):5341-5344.
83. Futerman AH, Stieger B, Hubbard AL, Pagano RE. Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the cis and medial cisternae of the Golgi apparatus. *J Biol Chem* 1990 May 25;265(15):8650-8657.
84. Okazaki T, Bell RM, Hannun YA. Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation. *J Biol Chem* 1989 Nov 15;264(32):19076-19080.
85. Bartke N, Hannun YA. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res* 2009 Apr;50 Suppl:S91-S96.
86. Jenkins RW, Canals D, Hannun YA. Roles and Regulation of Secretory and Lysosomal Acid Sphingomyelinase. *Cell Signal* 2009 Jan 18.
87. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 Feb;9(2):139-150.
88. Dobrowsky RT, Hannun YA. Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. *J Biol Chem* 1992 Mar 15;267(8):5048-5051.
89. Wolff RA, Dobrowsky RT, Bielawska A, Obeid LM, Hannun YA. Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 1994 Jul 29;269(30):19605-19609.
90. Perry DK, Hannun YA. The role of ceramide in cell signaling. *Biochim Biophys Acta* 1998 Dec 8;1436(1-2):233-243.
91. Liu J, Mathias S, Yang Z, Kolesnick RN. Renaturation and tumor necrosis factor-alpha stimulation of a 97-kDa ceramide-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1994 Jan 28;269(4):3047-3052.

92. Joseph CK, Byun HS, Bittman R, Kolesnick RN. Substrate recognition by ceramide-activated protein kinase. Evidence that kinase activity is proline-directed. *J Biol Chem* 1993 Sep 25;268(27):20002-20006.
93. Zhang P, Liu B, Jenkins GM, Hannun YA, Obeid LM. Expression of neutral sphingomyelinase identifies a distinct pool of sphingomyelin involved in apoptosis. *J Biol Chem* 1997 Apr 11;272(15):9609-9612.
94. Adam-Klages S, Adam D, Wiegmann K, Struve S, Kolanus W, Schneider-Mergener J, et al. FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* 1996 Sep 20;86(6):937-947.
95. Yao Y, Zhou Y, Wang C. Both the isomerase and chaperone activities of protein disulfide isomerase are required for the reactivation of reduced and denatured acidic phospholipase A2. *EMBO J* 1997 Feb 3;16(3):651-658.
96. Ng DS, Francone OL, Forte TM, Zhang J, Haghpasand M, Rubin EM. Disruption of the murine lecithin:cholesterol acyltransferase gene causes impairment of adrenal lipid delivery and up-regulation of scavenger receptor class B type I. *J Biol Chem* 1997 Jun 20;272(25):15777-15781.
97. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 2005 Dec;6(12):1191-1197.
98. Gomez DE, Skilton G, Alonso DF, Kazanietz MG. The role of protein kinase C and novel phorbol ester receptors in tumor cell invasion and metastasis (Review). *Oncol Rep* 1999 Nov;6(6):1363-1370.
99. Sawai H, Okazaki T, Takeda Y, Tashima M, Sawada H, Okuma M, et al. Ceramide-induced translocation of protein kinase C-delta and -epsilon to the cytosol. Implications in apoptosis. *J Biol Chem* 1997 Jan 24;272(4):2452-2458.
100. Muller G, Ayoub M, Storz P, Rennecke J, Fabbro D, Pfizenmaier K. PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J* 1995 May 1;14(9):1961-1969.
101. Nickel W, Wieland FT. Biogenesis of COPI-coated transport vesicles. *FEBS Lett* 1997 Aug 25;413(3):395-400.
102. Jones MJ, Murray AW. Evidence that ceramide selectively inhibits protein kinase C-alpha translocation and modulates bradykinin activation of phospholipase D. *J Biol Chem* 1995 Mar 10;270(10):5007-5013.
103. Hannun YA. Sphingolipid second messengers: tumor suppressor lipids. *Adv Exp Med Biol* 1997;400A:305-312.
104. Iwasaki-Bessho Y, Banno Y, Yoshimura S, Ito Y, Kitajima Y, Nozawa Y. Decreased phospholipase D (PLD) activity in ceramide-induced apoptosis of human keratinocyte cell line HaCaT. *J Invest Dermatol* 1998 Apr;110(4):376-382.

105. Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 1996 Mar 7;380(6569):75-79.
106. Kaiser GC, Polk DB. Tumor necrosis factor alpha regulates proliferation in a mouse intestinal cell line. *Gastroenterology* 1997 Apr;112(4):1231-1240.
107. Mizoguchi E, Mizoguchi A, Takedatsu H, Cario E, de Jong YP, Ooi CJ, et al. Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* 2002 Jan;122(1):134-144.
108. Abreu-Martin MT, Vidrich A, Lynch DH, Targan SR. Divergent induction of apoptosis and IL-8 secretion in HT-29 cells in response to TNF-alpha and ligation of Fas antigen. *J Immunol* 1995 Nov 1;155(9):4147-4154.
109. Hofmeister R, Wiegmann K, Korherr C, Bernardo K, Kronke M, Falk W. Activation of acid sphingomyelinase by interleukin-1 (IL-1) requires the IL-1 receptor accessory protein. *J Biol Chem* 1997 Oct 31;272(44):27730-27736.
110. Homaidan FR, El-Sabban ME, Chakroun I, El-Sibai M, Dbaiibo GS. IL-1 stimulates ceramide accumulation without inducing apoptosis in intestinal epithelial cells. *Mediators Inflamm* 2002 Feb;11(1):39-45.
111. Visnjic D, Batinic D, Banfic H. Arachidonic acid mediates interferon-gamma-induced sphingomyelin hydrolysis and monocytic marker expression in HL-60 cell line. *Blood* 1997 Jan 1;89(1):81-91.
112. Goggel R, Winoto-Morbach S, Vielhaber G, Imai Y, Lindner K, Brade L, et al. PAF-mediated pulmonary edema: a new role for acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med* 2004 Feb;10(2):155-160.
113. Bock J, Liebisch G, Schweimer J, Schmitz G, Rogler G. Exogenous sphingomyelinase causes impaired intestinal epithelial barrier function. *World J Gastroenterol* 2007 Oct 21;13(39):5217-5225.
114. Kolesnick RN. Sphingomyelin and derivatives as cellular signals. *Prog Lipid Res* 1991;30(1):1-38.
115. Goni FM, Alonso A. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett* 2002 Oct 30;531(1):38-46.
116. Levade T, Jaffrezou JP. Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim Biophys Acta* 1999 Apr 19;1438(1):1-17.
117. Brady RO, Kanfer JN, Mock MB, Fredrickson DS. The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1966 Feb;55(2):366-369.
118. CROCKER AC, MAYS VB. Sphingomyelin synthesis in Niemann-Pick disease. *Am J Clin Nutr* 1961 Jan;9:63-67.

119. Kanfer JN, Young OM, Shapiro D, Brady RO. The metabolism of sphingomyelin. I. Purification and properties of a sphingomyelin-cleaving enzyme from rat liver tissue. *J Biol Chem* 1966 Mar 10;241(5):1081-1084.
120. Schuchman EH. The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. *J Inherit Metab Dis* 2007 Oct;30(5):654-663.
121. Spence MW, Byers DM, Palmer FB, Cook HW. A new Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase in fetal bovine serum. *J Biol Chem* 1989 Apr 5;264(10):5358-5363.
122. Okazaki T, Bielawska A, Domae N, Bell RM, Hannun YA. Characteristics and partial purification of a novel cytosolic, magnesium-independent, neutral sphingomyelinase activated in the early signal transduction of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-induced HL-60 cell differentiation. *J Biol Chem* 1994 Feb 11;269(6):4070-4077.
123. Bernardo K, Krut O, Wiegmann K, Kreder D, Micheli M, Schafer R, et al. Purification and characterization of a magnesium-dependent neutral sphingomyelinase from bovine brain. *J Biol Chem* 2000 Mar 17;275(11):7641-7647.
124. Nyberg L, Duan RD, Axelson J, Nilsson A. Identification of an alkaline sphingomyelinase activity in human bile. *Biochim Biophys Acta* 1996 Mar 29;1300(1):42-48.
125. Titball RW. Bacterial phospholipases C. *Microbiol Rev* 1993 Jun;57(2):347-366.
126. Zuckert WR, Marquis H, Goldfine H. Modulation of enzymatic activity and biological function of *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase C by amino acid substitutions and by replacement with the *Bacillus cereus* ortholog. *Infect Immun* 1998 Oct;66(10):4823-4831.
127. Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 2001 Jul;14(3):584-640.
128. Vazquez-Boland JA, Dominguez-Bernal G, Gonzalez-Zorn B, Kreft J, Goebel W. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes Infect* 2001 Jun;3(7):571-584.
129. Smith EL, Schuchman EH. The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. *FASEB J* 2008 Oct;22(10):3419-3431.
130. Wiegmann K, Schutze S, Machleidt T, Witte D, Kronke M. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 1994 Sep 23;78(6):1005-1015.

131. Wang J, Megha, London E. Relationship between sterol/steroid structure and participation in ordered lipid domains (lipid rafts): implications for lipid raft structure and function. *Biochemistry* 2004 Feb 3;43(4):1010-1018.
132. Gulbins E, Kolesnick R. Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene* 2003 Oct 13;22(45):7070-7077.
133. Sandhoff K, Kolter T. Processing of sphingolipid activator proteins and the topology of lysosomal digestion. *Acta Biochim Pol* 1998;45(2):373-384.
134. Schuette CG, Doering T, Kolter T, Sandhoff K. The glycosphingolipidoses-from disease to basic principles of metabolism. *Biol Chem* 1999 Jul;380(7-8):759-766.
135. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006 Feb 15;69(3):562-573.
136. Hijova E. Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. *Bratisl Lek Listy* 2005;106(3):127-132.
137. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999 Jul 30;274(31):21491-21494.
138. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003 May 2;92(8):827-839.
139. Lemaitre V, D'Armiento J. Matrix metalloproteinases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2006 Mar;78(1):1-10.
140. Bauer EA, Eisen AZ, Jeffrey JJ. Immunologic relationship of a purified human skin collagenase to other human and animal collagenases. *Biochim Biophys Acta* 1970 Apr 22;206(1):152-160.
141. Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A, Bauer EA, Grant GA, Eisen AZ. Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J Biol Chem* 1986 May 15;261(14):6600-6605.
142. Pardo A, Selman M. MMP-1: the elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol* 2005 Feb;37(2):283-288.
143. Mackay AR, Ballin M, Pelina MD, Farina AR, Nason AM, Hartzler JL, et al. Effect of phorbol ester and cytokines on matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in tumor and normal cell lines. *Invasion Metastasis* 1992;12(3-4):168-184.
144. Fowlkes JL, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H. Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem* 1994 Oct 14;269(41):25742-25746.

145. Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem* 1996 Apr 26;271(17):10079-10086.
146. Naglich JG, Jure-Kunkel M, Gupta E, Fargnoli J, Henderson AJ, Lewin AC, et al. Inhibition of angiogenesis and metastasis in two murine models by the matrix metalloproteinase inhibitor, BMS-275291. *Cancer Res* 2001 Dec 1;61(23):8480-8485.
147. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 2001 Oct;13(5):534-540.
148. Baugh MD, Hollander AP, Evans GS. The regulation of matrix metalloproteinase production in human colonic fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1998 Nov 17;859:175-179.
149. Baugh MD, Evans GS, Hollander AP, Davies DR, Perry MJ, Lobo AJ, et al. Expression of matrix metalloproteases in inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 1998 Nov 17;859:249-253.
150. Heuschkel RB, MacDonald TT, Monteleone G, Bajaj-Elliott M, Smith JA, Pender SL. Imbalance of stromelysin-1 and TIMP-1 in the mucosal lesions of children with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000 Jul;47(1):57-62.
151. Kirkegaard T, Hansen A, Bruun E, Brynskov J. Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease. *Gut* 2004 May;53(5):701-709.
152. DiSebastiano P., di Mola FF, Artese L, Rossi C, Mascetta G, Pernthaler H, et al. Beneficial effects of Batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in rat experimental colitis. *Digestion* 2001;63(4):234-239.
153. Medina C, Videla S, Radomski A, Radomski MW, Antolin M, Guarner F, et al. Increased activity and expression of matrix metalloproteinase-9 in a rat model of distal colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003 Jan;284(1):G116-G122.
154. Naito Y, Yoshikawa T. Role of matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease. *Mol Aspects Med* 2005 Aug;26(4-5):379-390.
155. Sykes AP, Bhogal R, Brampton C, Chander C, Whelan C, Parsons ME, et al. The effect of an inhibitor of matrix metalloproteinases on colonic inflammation in a trinitrobenzenesulphonic acid rat model of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1999 Nov;13(11):1535-1542.
156. Naito Y, Takagi T, Kuroda M, Katada K, Ichikawa H, Kokura S, et al. An orally active matrix metalloproteinase inhibitor, ONO-4817, reduces dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Inflamm Res* 2004 Sep;53(9):462-468.

157. Wang YD, Yan PY. Expression of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2006 Oct 7;12(37):6050-6053.
158. Arihiro S, Ohtani H, Hiwatashi N, Torii A, Sorsa T, Nagura H. Vascular smooth muscle cells and pericytes express MMP-1, MMP-9, TIMP-1 and type I procollagen in inflammatory bowel disease. *Histopathology* 2001 Jul;39(1):50-59.
159. Medina C, Radomski MW. Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2006 Sep;318(3):933-938.
160. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002 Mar;2(3):161-174.
161. Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res* 2000 Dec;6(12):4823-4830.
162. Delany AM, Brinckerhoff CE. Post-transcriptional regulation of collagenase and stromelysin gene expression by epidermal growth factor and dexamethasone in cultured human fibroblasts. *J Cell Biochem* 1992 Dec;50(4):400-410.
163. Frisch SM, Ruley HE. Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone. *J Biol Chem* 1987 Dec 5;262(34):16300-16304.
164. Kerr LD, Miller DB, Matrisian LM. TGF-beta 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell* 1990 Apr 20;61(2):267-278.
165. Lyons JG, Birkedal-Hansen B, Pierson MC, Whitelock JM, Birkedal-Hansen H. Interleukin-1 beta and transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor induce expression of M(r) 95,000 type IV collagenase/gelatinase and interstitial fibroblast-type collagenase by rat mucosal keratinocytes. *J Biol Chem* 1993 Sep 5;268(25):19143-19151.
166. Angel P, Baumann I, Stein B, Delius H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P. 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol Cell Biol* 1987 Jun;7(6):2256-2266.
167. Dayer JM, de RB, Burrus B, Demczuk S, Dinarello CA. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *J Clin Invest* 1986 Feb;77(2):645-648.
168. Rutter JL, Benbow U, Coon CI, Brinckerhoff CE. Cell-type specific regulation of human interstitial collagenase-1 gene expression by interleukin-1 beta (IL-1 beta) in human fibroblasts and BC-8701 breast cancer cells. *J Cell Biochem* 1997 Sep 1;66(3):322-336.

169. Conca W, Kaplan PB, Krane SM. Increases in levels of procollagenase messenger RNA in cultured fibroblasts induced by human recombinant interleukin 1 beta or serum follow c-jun expression and are dependent on new protein synthesis. *J Clin Invest* 1989 May;83(5):1753-1757.
170. Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1985 Dec 1;162(6):2163-2168.
171. Sirum-Connolly K, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 or phorbol induction of the stromelysin promoter requires an element that cooperates with AP-1. *Nucleic Acids Res* 1991 Jan 25;19(2):335-341.
172. Lin CW, Georgescu HI, Evans CH. The role of AP-1 in matrix metalloproteinase gene expression. *Agents Actions* 1993;39 Spec No:C215-C218.
173. Lim M, Martinez T, Jablons D, Cameron R, Guo H, Toole B, et al. Tumor-derived EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates collagenase transcription through MAPK p38. *FEBS Lett* 1998 Dec 11;441(1):88-92.
174. Simon C, Simon M, Vucelic G, Hicks MJ, Plinkert PK, Koitschev A, et al. The p38 SAPK pathway regulates the expression of the MMP-9 collagenase via AP-1-dependent promoter activation. *Exp Cell Res* 2001 Dec 10;271(2):344-355.
175. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? *J Cell Physiol* 2007 Nov;213(2):355-364.
176. Kaiser GC, Polk DB. Tumor necrosis factor alpha regulates proliferation in a mouse intestinal cell line. *Gastroenterology* 1997 Apr;112(4):1231-1240.
177. Mizoguchi E, Mizoguchi A, Takedatsu H, Cario E, de Jong YP, Ooi CJ, et al. Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* 2002 Jan;122(1):134-144.
178. De Jong YP, Comiskey M, Kalled SL, Mizoguchi E, Flavell RA, Bhan AK, et al. Chronic murine colitis is dependent on the CD154/CD40 pathway and can be attenuated by anti-CD154 administration. *Gastroenterology* 2000 Sep;119(3):715-723.
179. Dan N, Kanai T, Totsuka T, Iiyama R, Yamazaki M, Sawada T, et al. Ameliorating effect of anti-Fas ligand MAb on wasting disease in murine model of chronic colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003 Oct;285(4):G754-G760.
180. Leeb SN, Vogl D, Falk W, Scholmerich J, Rogler G, Gelbmann CM. Regulation of migration of human colonic myofibroblasts. *Growth Factors* 2002 Jun;20(2):81-91.

181. Brenmoehl J, Falk W, Goke M, Scholmerich J, Rogler G. Inflammation modulates fibronectin isoform expression in colonic lamina propria fibroblasts (CLPF). *Int J Colorectal Dis* 2008 Oct;23(10):947-955.
182. Langmann T, Moehle C, Mauerer R, Scharl M, Liebisch G, Zahn A, et al. Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. *Gastroenterology* 2004 Jul;127(1):26-40.
183. Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Scholmerich J, Gross V, Falk W. Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1999 May;116(2):238-245.
184. Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, Glickman J, Nieuwenhuis E, Iijima H, et al. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med* 2002 May 6;195(9):1129-1143.
185. Mudter J, Wirtz S, Galle PR, Neurath MF. A new model of chronic colitis in SCID mice induced by adoptive transfer of CD62L+ CD4+ T cells: insights into the regulatory role of interleukin-6 on apoptosis. *Pathobiology* 2002;70(3):170-176.
186. Daig R, Rogler G, Aschenbrenner E, Vogl D, Falk W, Gross V, et al. Human intestinal epithelial cells secrete interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 but not interleukin-1 or interleukin-6. *Gut* 2000 Mar;46(3):350-358.
187. Liebisch G, Lieser B, Rathenberg J, Drobnik W, Schmitz G. High-throughput quantification of phosphatidylcholine and sphingomyelin by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with isotope correction algorithm. *Biochim Biophys Acta* 2004 Nov 8;1686(1-2):108-117.
188. Wiesner P, Leidl K, Boettcher A, Schmitz G, Liebisch G. Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* 2009 Mar;50(3):574-585.
189. Takahashi I, Takahashi T, Abe T, Watanabe W, Takada G. Distribution of acid sphingomyelinase in human various body fluids. *Tohoku J Exp Med* 2000 Sep;192(1):61-66.
190. Albouz S, Hauw JJ, Berwald-Netter Y, Boutry JM, Bourdon R, Baumann N. Tricyclic antidepressants induce sphingomyelinase deficiency in fibroblast and neuroblastoma cell cultures. *Biomedicine* 1981 Dec;35(7-8):218-220.
191. Hurwitz R, Ferlinz K, Sandhoff K. The tricyclic antidepressant desipramine causes proteolytic degradation of lysosomal sphingomyelinase in human fibroblasts. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1994 Jul;375(7):447-450.

192. Jensen JM, Schutze S, Forl M, Kronke M, Proksch E. Roles for tumor necrosis factor receptor p55 and sphingomyelinase in repairing the cutaneous permeability barrier. *J Clin Invest* 1999 Dec;104(12):1761-1770.
193. Stremmel W, Merle U, Zahn A, Autschbach F, Hinz U, Eehalt R. Retarded release phosphatidylcholine benefits patients with chronic active ulcerative colitis. *Gut* 2005 Jul;54(7):966-971.
194. Kida Y, Kobayashi M, Suzuki T, Takeshita A, Okamatsu Y, Hanazawa S, et al. Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. *Cytokine* 2005 Feb 21;29(4):159-168.
195. Mathias S, Kolesnick R. Ceramide: a novel second messenger. *Adv Lipid Res* 1993;25:65-90.
196. Zhang Y, Mattjus P, Schmid PC, Dong Z, Zhong S, Ma WY, et al. Involvement of the acid sphingomyelinase pathway in uva-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001 Apr 13;276(15):11775-11782.
197. Raymond L, Eck S, Mollmark J, Hays E, Tomek I, Kantor S, et al. Interleukin-1 beta induction of matrix metalloproteinase-1 transcription in chondrocytes requires ERK-dependent activation of CCAAT enhancer-binding protein-beta. *J Cell Physiol* 2006 Jun;207(3):683-688.
198. Cortez DM, Feldman MD, Mummidi S, Valente AJ, Steffensen B, Vincenti M, et al. IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 Dec;293(6):H3356-H3365.
199. Honda A, Abe R, Makino T, Norisugi O, Fujita Y, Watanabe H, et al. Interleukin-1beta and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in dermal fibroblasts mediate UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *J Dermatol Sci* 2008 Jan;49(1):63-72.
200. Denkert C, Koch I, Berger S, Kobel M, Siegert A, Hauptmann S. Cytokine-suppressive anti-inflammatory drugs (CSAIDs) inhibit invasion and MMP-1 production of ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett* 2003 May 30;195(1):101-109.
201. Pyne S, Chapman J, Steele L, Pyne NJ. Sphingomyelin-derived lipids differentially regulate the extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK-2) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) signal cascades in airway smooth muscle. *Eur J Biochem* 1996 May 1;237(3):819-826.
202. Giltiay NV, Karakashian AA, Alimov AP, Ligthle S, Nikolova-Karakashian MN. Ceramide- and ERK-dependent pathway for the activation of CCAAT/enhancer binding protein by interleukin-1beta in hepatocytes. *J Lipid Res* 2005 Nov;46(11):2497-2505.
203. Reunanen N, Westermarck J, Hakkinen L, Holmstrom TH, Elo I, Eriksson JE, et al. Enhancement of fibroblast collagenase (matrix metalloproteinase-1) gene

- expression by ceramide is mediated by extracellular signal-regulated and stress-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 1998 Feb 27;273(9):5137-5145.
204. Bu S, Yamanaka M, Pei H, Bielawska A, Bielawski J, Hannun YA, et al. Dihydrosphingosine 1-phosphate stimulates MMP1 gene expression via activation of ERK1/2-Ets1 pathway in human fibroblasts. *FASEB J* 2006 Jan;20(1):184-186.
205. Vincenti MP, White LA, Schroen DJ, Benbow U, Brinckerhoff CE. Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1996;6(4):391-411.
206. Kang KA, Zhang R, Piao MJ, Ko DO, Wang ZH, Lee K, et al. Inhibitory effects of triphlorethol-A on MMP-1 induced by oxidative stress in human keratinocytes via ERK and AP-1 inhibition. *J Toxicol Environ Health A* 2008;71(15):992-999.
207. Machleidt T, Wiegmann K, Henkel T, Schutze S, Baeuerle P, Kronke M. Sphingomyelinase activates proteolytic I kappa B-alpha degradation in a cell-free system. *J Biol Chem* 1994 May 13;269(19):13760-13765.
208. Bauer J, Liebisch G, Hofmann C, Huy C, Schmitz G, Obermeier F, et al. Lipid alterations in experimental murine colitis: role of ceramide and imipramine for matrix metalloproteinase-1 expression. *PLoS One* 2009;4(9):e7197.
209. Bauer J, Huy C, Brenmoehl J, Obermeier F, Bock J. Matrix metalloproteinase-1 expression induced by IL-1beta requires acid sphingomyelinase. *FEBS Lett* 2009 Mar 4;583(5):915-920.
210. Wang YD, Mao JW. Expression of matrix metalloproteinase-1 and tumor necrosis factor-alpha in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2007 Nov 28;13(44):5926-5932.
211. Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, van Hogezaand RA, Lamers CB, Hommes DW, Verspaget HW. Role of matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinase and tumor necrosis factor-alpha single nucleotide gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007 Jun 7;13(21):2960-2966.
212. Sakata A, Yasuda K, Ochiai T, Shimeno H, Hikishima S, Yokomatsu T, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells by SMA, a novel inhibitor of sphingomyelinase and its therapeutic effect on dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Cell Immunol* 2007 Jan;245(1):24-31.
213. Sakata A, Ochiai T, Shimeno H, Hikishima S, Yokomatsu T, Shibuya S, et al. Acid sphingomyelinase inhibition suppresses lipopolysaccharide-mediated release of inflammatory cytokines from macrophages and protects against

- disease pathology in dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Immunology* 2007 Sep;122(1):54-64.
214. Lang F, Huber SM, Szabo I, Gulbins E. Plasma membrane ion channels in suicidal cell death. *Arch Biochem Biophys* 2007 Jun 15;462(2):189-194.
215. Teichgraber V, Ulrich M, Endlich N, Riethmuller J, Wilker B, De Oliveira-Munding CC, et al. Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat Med* 2008 Apr;14(4):382-391.
216. Esmaeili A, Masjedi M AAFZBAeal. New insights of anti-depressant therapy in the management of ulcerative colitis (UC) [Abstract]. *Gastroenterology* 2008;134:A-100-[705].
217. Fabia R, Ar'Rajab A, Willen R, Andersson R, Ahren B, Larsson K, et al. Effects of phosphatidylcholine and phosphatidylinositol on acetic-acid-induced colitis in the rat. *Digestion* 1992;53(1-2):35-44.
218. Mourelle M, Guarner F, Malagelada JR. Polyunsaturated phosphatidylcholine prevents stricture formation in a rat model of colitis. *Gastroenterology* 1996 Apr;110(4):1093-1097.
219. Liu-Wu Y, Hurt-Camejo E, Wiklund O. Lysophosphatidylcholine induces the production of IL-1beta by human monocytes. *Atherosclerosis* 1998 Apr;137(2):351-357.
220. Olofsson KE, Andersson L, Nilsson J, Bjorkbacka H. Nanomolar concentrations of lysophosphatidylcholine recruit monocytes and induce pro-inflammatory cytokine production in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 May 30;370(2):348-352.
221. Hozawa S, Nakamura T, Nakano M, Adachi M, Tanaka H, Takahashi Y, et al. Induction of matrix metalloproteinase-1 gene transcription by tumour necrosis factor alpha via the p50/p50 homodimer of nuclear factor-kappa B in activated human hepatic stellate cells. *Liver Int* 2008 Dec;28(10):1418-1425.
222. Knittel T, Saile B, Ramadori G. [Fibrogenesis. Pathophysiology and therapeutic approaches]. *Internist (Berl)* 1998 Mar;39(3):238-246.
223. Ma J, Li F, Liu L, Cui D, Wu X, Jiang X, et al. Raf kinase inhibitor protein inhibits cell proliferation but promotes cell migration in rat hepatic stellate cells. *Liver Int* 2009 Apr;29(4):567-574.
224. Mandrekar P, Szabo G. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol* 2009 Jun;50(6):1258-1266.

9 Anhang

Teile der vorliegenden Arbeit wurden als Posterbeiträge auf Kongressen oder in wissenschaftlichen Zeitschriften vorgestellt. Die Titel der Publikationen sind im Folgenden aufgelistet:

Posterbeiträge:

Bauer J, Huy C, Brenmoehl J, Schölmerich J, Rogler G, Obermeier F, Bock J:

Der Einfluss der Sphingomyelinase auf die Expression von Matrix Metalloproteinasen in intestinalen Epithelzellen. 113. Kongress der DGIM, Wiesbaden, 14-18.04.2007
Med. Klinik 2007, 102: P0882

Bauer J, Huy C, Brenmoehl J, Schölmerich J, Rogler G, Obermeier F, Bock J:

Influence of sphingomyelinases on the expression of matrix metalloproteinase-1 in intestinal epithelial cells. 108th Annual Meeting of American-Gastroenterological-Association, Digestive Disease Week, Washington DC, 19-24.05.2007
Gastroenterology 2007; 132: No. 4 (Suppl. 2): A699

Bauer J, Liebisch G, Huy C, Schmitz G, Obermeier F, Bock J:

Bedeutung von Ceramid als second messenger. 62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Bochum 12-15.09.2007,
Gastroenerologie 2007; 45 (8): P257

Bauer J, Huy C, Brenmoehl J, Rogler G, Schölmerich J, Obermeier F, Bock J:

Der Einfluss der Sphingomyelinase auf die Expression von Matrix Metalloproteinasen. 62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Bochum 12-15.09.2007,
Gastroenerologie 2007; 45 (8): P259

Bauer J, Huy C, Brenmoehl J, Schölmerich J, Obermeier F, Bock J:

Der Einfluss der sauren Sphingomyelinase auf die Expression von Matrix Metalloproteinasen-1 in intestinalen Epithelzellen und Fibroblasten. 114. Kongress der DGIM, Wiesbaden, 29.03.-02.04.2008
Med. Klinik 2008; 103, Suppl1: S23

Bauer J, Huy C, Brenmoehl J, Schölmerich J, Obermeier F, Bock J:

IL-1 β -induced expression of matrix metalloproteinase-1 is dependent upon acid sphingomyelinase. 109th Annual Meeting of American-Gastroenterological-Association, Digestive Disease Week, San Diego, USA, 17-22.05.2008

Gastroenterology 2008; 134(4 Suppl1): A647

Bauer J, Huy C, Brenmoehl J, Schölmerich J, Obermeier F, Bock J:

Die Induktion von MMP-1 durch IL-1 β ist abhängig von der sauren Sphingomyelinase. 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Berlin, 01-04.10.2008

Gastroenterologie 2008; 46(9): P016

Bauer J, Huy C, Brenmoehl J, Schölmerich J, Obermeier F, Bock J:

Die Induktion von MMP-1 durch IL-1 β ist abhängig von der sauren Sphingomyelinase. 36. Kongress der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern, Aschaffenburg, 23-25.10.2008

Gastroenterologie 2008; 46(10): G10

Bauer J, Liebisch G, Huy C, Schmitz G, Obermeier F, Bock J:

Akkumulation von Ceramid bei experimenteller Kolitis: Die Bedeutung der sauren Sphingomyelinase für die Expression von Matrix Metalloproteinase-1. 115. Kongress der DGIM, Wiesbaden, 18-22.04.2009,

Med. Klinik 2009; 104, Suppl1: PS 93

Bauer J, Liebisch G, Huy C, Schmitz G, Obermeier F, Bock J:

Accumulation of ceramide in experimental colitis: Role of acid sphingomyelinase for Matrix Metalloproteinase-1 expression. 110th Annual Meeting of American-Gastroenterological-Association, Digestive Disease Week, Chicago, IL, USA, 30.05.-04.06.2009

Gastroenerology 2009; 136(5): A258

Bauer J, Liebisch G, Huy C, Schmitz G, Obermeier F, Bock J:

Lipidveränderung bei experimenteller Kolitis: Die Bedeutung der sauren Sphingomyelinase für die Produktion von Matrix-Metalloproteinase-1. 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Hamburg, 30.09.-03.10.2009,

Gastroenterologie 2009; 47(9): P050

Bauer J, Liebisch G, Huy C, Schmitz G, Obermeier F, Bock J:

Lipidveränderungen bei experimenteller Kolitis: Die Bedeutung von Ceramid für die Expression von Matrix Metalloproteinase-1

37. Kongress der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern, Augsburg, 29-31.10.2009, Gastroenterologie 2009; 47 (10): G1

Originalarbeiten:

Bauer J, Huy C, Brenmoehl J, Obermeier F, Bock J. (2009) Matrix metalloproteinase-1 expression induced by IL-1 β requires acid sphingomyelinase. FEBS Letters 585: 915-920

Bauer J, Liebisch G, Hofmann C, Huy C, Schmitz G, Obermeier F, Bock J. (2009) Lipid alterations in experimental murine colitis: Role of ceramide and imipramine for Matrix Metalloproteinase-1 expression. PLoS One. 2009 Sep 29;4(9): e7197

Bauer J, Ziegler S, Obermeier F, Bock J. Imipramine blocks induction of MMP-1 and invasion of hepatic stellate cells and the tumour cell line HepG2. *In Vorbereitung*

10 Danksagung

Zum Gelingen meiner Dissertation haben viele Leute beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken möchte.

Als erstes danke ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Schölmerich für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Jürgen Bock, der mir vor allem bei der Organisation der Arbeit geholfen hat und mir mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite stand.

Ein weiterer Dank gilt meinen Betreuern PD Dr. Thomas Langmann und PD Dr. Florian Obermeier, die mir bei der Arbeit mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite standen. Außerdem danke ich PD Dr. Thomas Langmann für die Kooperation bei den Affymetrixdaten.

Prof. Dr. Gerd Schmitz und Dr. Gerhard Liebisch danke ich für die Kooperation bei den Massenspektrometriedaten.

Prof. Dr. E. Gulbins und Andrea Riehle danke ich für die ASM-defizienten Fibroblasten und die Ratschläge zur Kultivierung.

Auch möchte ich dem Team vom H1, AG Obermeier für die schöne Zeit danken, vor allem meinen Mädels Rita Brunner-Ploss („nichtfachliche nebenbei Unterstützung“) und Andrea Dirmeier, die meine schlechte Laune und meine Zeiten der überstrapazierten Nerven geduldet und überstanden haben. Christian Huy möchte ich für die viele Unterstützung bei einigen Experimenten danken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Nadja Dunger und Nicole Grunwald danke ich vorallem für die hilfreiche Unterstützung bei sämtlichen Mausversuchen. Dr. Heidi Piberger, Manuela Stieber-Gunckel und Dr. Gisela Paul, die mir alle mit ihrem Fachwissen, ihrer konstruktiven Kritik und ihren vielen Ideen immer wieder den nötigen Schwung gegeben haben.

Danken möchte ich auch Dr. Claudia Hofmann, die immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und mich auch bei wissenschaftlichen Fragestellungen immer unterstützt hat und damit einen wichtigen Beitrag zum Gelingen meiner Doktorarbeit geleistet hat.

Stephan Ziegler (Zahnmedizinstudent) danke ich für die tolle Zusammenarbeit bei den Experimenten mit den hepatischen Sternzellen und HepG2 Zellen.

Anne Schmoll danke ich für ihre Freundschaft und wunderbare Nachbarschaft.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne die das ganze nicht möglich gewesen wäre. Vor allem meine Mama die mich immerwieder aufgemuntert und mich ständig unterstützt hat. Meiner Schwester Nathalie und meinem Schwager Janosch möchte ich für die Aufmunterungen, die vielen guten Essen und tollen Gespräche danken. Danke, dass ihr immer für mich dagewesen seid.

11 Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 19.04.2010

(Jessica Bauer)