

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Medizinische Klinik D, Experimentelle Nephrologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt

## **Transporter-vermittelte Aufnahme des Tyrosinkinase-Inhibitors**

### **Imatinib in humanen dermalen Fibroblasten**



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des doctor medicinae  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Oertel, Katharina  
geb. Köllmann  
aus Mettingen

- 2017 -

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Giuliano Ciarimboli

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Christian Stock

Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2017

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Medizinische Klinik D, Experimentelle Nephrologie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann  
Referent: Prof. Dr. rer. nat. Giuliano Ciarimboli  
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Christian Stock

### ZUSAMMENFASSUNG

#### **„Transporter-vermittelte Aufnahme des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib in humanen dermalen Fibroblasten“** von Oertel, Katharina

Die systemische Sklerose ist eine Kollagenose, die sich durch profibrotische Prozesse auszeichnet und gegen die momentan keine effektive Therapie zur Verfügung steht. Die Tyrosinkinase-Inhibitoren, mit der Leitsubstanz Imatinib, sind nach ihrer erfolgreichen Einführung zur zielgerichteten Therapie bei chronisch myeloischer Leukämie auch als Therapeutikum bei Krankheitsentitäten, die auf Fibrose-Prozessen beruhen, untersucht worden.

Imatinib wirkt bei systemischer Sklerose als Tyrosinkinase-Inhibitor hemmend auf den Rezeptor des „*platelet-derived growth factor*“ (PDGF) und auf die zytosolische Tyrosinkinase c-Abl, die beide in der Pathogenese der systemischen Sklerose eine Rolle spielen. Da Imatinib im Blut teilweise als organisches Kation vorliegt und nicht frei in die dermalen Fibroblasten, die Effektorzellen der systemischen Sklerose, diffundieren kann, ist eine Transporter-vermittelte Aufnahme nötig.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Beteiligung der Transporter der SLC22A- und der SLC47A-Familie (hOCT-, hOCTN- und hMATE-Transporter) an der Imatinib-Aufnahme in Fibroblasten bei Patienten mit systemischer Sklerose. Die Eigenschaften des Transport-Prozesses werden charakterisiert und mit den Prozessen bei gesunden Hautfibroblasten verglichen.

Durch mikrofluorimetrische Messungen und eine HPLC-Bestimmung der Imatinib-Konzentration in dermalen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass der zelluläre Transport von Imatinib in die Fibroblasten ein pH-abhängiger Prozess ist. Die spezifische Aufnahme des Imatinib in die Fibroblasten der systemischen Sklerose fiel signifikant niedriger aus als in den gesunden Hautfibroblasten. Durch Inhibitions-Experimente konnte der hOCTN1 (SLC22A4) als aufnehmender Transporter bei den dermalen Fibroblasten identifiziert werden. Seine Expression wird durch Stimulation mit dem Mediator PDGF induziert. Zusammengefasst könnte die Expression des hOCTN1 als Prädiktor für den Therapieerfolg dienen und die niedrigere Expression in den Fibroblasten der systemischen Sklerose eine Erklärung für das schlechte Ansprechen auf eine Therapie sein.

Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2017

## **Erklärung**

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

„Transporter-vermittelte Aufnahme des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib in  
humanen dermalen Fibroblasten“

im Institut für Experimentelle Nephrologie der medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

unter der Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Giuliano Ciarimboli

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen  
Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder  
ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer  
in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit,  
Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades  
vorgelegt habe.

Münster, 12.09.2016

Katharina Oertel

---

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	10
1.1. Systemische Sklerose – Eine systemische Kollagenose.....	10
1.1.1. Prävalenz und Inzidenz .....	11
1.1.2. Ursache.....	11
1.1.3. Symptome.....	11
1.1.4. Diagnostik .....	14
1.1.5. Klassifikation .....	15
1.1.6. Therapie.....	17
1.1.7. Pathogenese der SSc: 3 Komponenten.....	19
1.1.7.1 Vaskulopathie.....	19
1.1.7.2. Störung der Immunantwort / Autoimmunität.....	20
1.1.7.3. Fibroblasten-Aktivierung und -Differenzierung.....	21
1.1.7.4. „Schlüssel“-Mediatoren der Pathogenese der SSc .....	24
1.1.7.4.1. TGFβ.....	24
1.1.7.4.2. PDGF.....	26
1.2. Imatinib – Ein Tyrosinkinase-Inhibitor.....	29
1.2.1. CML und das Philadelphia-Chromosom.....	29
1.2.2. Imatinib – Struktur und Wirkung .....	30
1.2.3. Imatinib bei CML.....	31
1.2.4. Imatinib bei GIST.....	32
1.2.5. Imatinib bei SSc .....	32
1.2.5.1. Von klinischen Beobachtungen zu RCT .....	32
1.2.5.2. Molekulare Zielproteine des Imatinib bei SSc .....	33
1.2.6. Pharmakokinetik.....	34
1.3. Transmembrantransport und Transporter / Carrier .....	35
1.3.1. SLC-Transporter.....	35
1.3.1.1. SLC22A-Transporter.....	36
1.3.1.1.1. OCT.....	38
1.3.1.1.1.1. OCT1 (SLC22A1).....	38
1.3.1.1.1.2. OCT2 (SLC22A2).....	38
1.3.1.1.1.3. OCT3 (SLC22A3).....	38
1.3.1.1.2. OCTN.....	39

1.3.1.1.2.1. OCTN1 (SLC22A4) .....	39
1.3.1.1.2.2. OCTN2 (SLC22A5) .....	40
1.3.1.1.3. Regulation der SLC22A-Transporter .....	40
1.3.1.2. SLC47A-Transporter .....	41
1.3.1.2.1. MATE1 (SLC47A1) .....	42
1.3.1.2.2. MATE2 (SLC47A2) .....	42
1.3.2. Imatinib und Transporter .....	43
1.3.2.1. Imatinib-Influx .....	43
1.3.2.2. Imatinib-Efflux .....	43
2. Ziel der Arbeit .....	46
2.1. Vorarbeiten .....	47
2.1.1. Kompetitive Inhibition der ASP <sup>+</sup> -Aufnahme durch Imatinib: IC <sub>50</sub> -Werte .....	47
2.1.2. Transporter-vermittelte Aufnahme von Imatinib in transfizierte HEK-Zellen .....	48
3. Material .....	49
3.1. Geräte .....	49
3.2. Chemikalien .....	52
3.3. Verbrauchsmaterialien .....	54
3.4. Puffer und Lösungen .....	55
3.5. Primer .....	57
3.6. Primäre und sekundäre Antikörper .....	58
4. Methoden .....	59
4.1. Zellkultur .....	59
4.1.1. Herkunft der Zellen .....	59
4.1.2. Herstellen des Mediums .....	59
4.1.3. Auftauen der Proben .....	60
4.1.4. Mediumwechsel .....	60
4.1.5. Passagierung / Splitten .....	60
4.1.6. Einfrieren der Proben .....	61
4.1.7. Inkubation mit den Mediatoren TGFβ und PDGF .....	61
4.2. Molekularbiologische Methoden .....	62
4.2.1. RNA-Isolation .....	62
4.2.2. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion: RT-PCR .....	62
4.2.3. Polymerase-Kettenreaktion: PCR .....	63
4.2.4. Gel-Elektrophorese .....	64
4.2.5. Real-Time quantitative PCR: qPCR .....	65

4.3. Mikrofluorimetrische Messungen .....	68
4.4. Imatinib-Akkumulation.....	70
4.5. Vermessen der Proben mit der HPLC .....	72
4.6. Normierung der Imatinib-Akkumulation .....	75
4.6.1. Zellzählung mit CASY .....	75
4.6.2. Proteinbestimmung mit Picodrop.....	75
4.7. Western Blot.....	76
4.8. Statistische Auswertung .....	78
5. Ergebnisse .....	79
5.1. Imatinib-Aufnahme in hH-F und SSc-F.....	79
5.1.1. Temperaturabhängige und spezifische Imatinib-Aufnahme .....	79
5.1.2. Transport-Kinetik: Michaelis-Menten-Kinetik .....	81
5.1.3. IC <sub>50</sub> -Werte für Imatinib an hH- und SSc-Fibroblasten.....	83
5.1.4. pH-abhängige Imatinib-Akkumulation in dermalen Fibroblasten .....	85
5.1.5. Efflux-Experimente.....	86
5.2. Transporter-Expression der <i>SLC22A</i> und <i>SLC47A</i> in hH-F und SSc-F .....	90
5.2.1. Semiquantitative PCR der <i>hOCT</i> , <i>hOCTN</i> und <i>hMATE1</i> in hH-F .....	90
5.2.2. Semiquantitative PCR der <i>hOCT</i> , <i>hOCTN</i> und <i>hMATE</i> in SSc-F.....	91
5.2.3. Semiquantitative PCR der <i>hOATP</i> in hH-F und SSc-F .....	92
5.2.4. qPCR von <i>hOCTN1</i> und <i>hMATE1</i> in hH-F und SSc-F .....	92
5.3. Funktioneller Aktivitäts-Assay mit spezifischen Inhibitoren.....	94
5.4. Einfluss der Schlüsselmediatoren TGF $\beta$ und PDGF auf die Imatinib-Aufnahme .....	98
5.4.1. Stimulation mit TGF $\beta$ .....	98
5.4.2. Stimulation mit PDGF.....	100
5.5. Western Blot für hOCTN1 .....	102
6. Diskussion .....	105
6.1 Imatinib in der SSc-Therapie .....	105
6.2 Imatinib-Influx und -Efflux als möglicher Aspekt beim Therapieerfolg .....	106
6.3 Transporter-vermittelte Imatinib-Aufnahme.....	107
6.4 Weiteres Charakteristikum der Aufnahme: pH-Abhängigkeit.....	108
6.5 Transporter-Expression in den dermalen Fibroblasten .....	109
6.6 Inhibition der Imatinib-Akkumulation durch Ergothionein .....	109
6.7 hOCTN1 als verantwortlicher Transporter für die Imatinib-Aufnahme .....	110
6.8 Einfluss von TGF $\beta$ und PDGF auf die Imatinib-Aufnahme .....	112
7. Ausblick .....	115



8. Abkürzungen .....	117
9. Abbildungsverzeichnis .....	121
10. Tabellenverzeichnis.....	123
11. Literaturverzeichnis.....	124
Literatur: Webseiten.....	162
Danksagung.....	163
Lebenslauf.....	164

# 1. Einleitung

## 1.1. Systemische Sklerose – Eine systemische Kollagenose

Die systemische Sklerose, kurz SSc, ist eine seltene Autoimmunerkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen, die sich durch einen systemischen Befall, vorwiegend an Bindegewebe und Blutgefäßen, auszeichnet. Die SSc ist eine komplexe und heterogene Krankheitsentität. Sie wird in eine diffuse Form und eine limitierte Form unterteilt (van den Hoogen et al., 2013; Wollheim, 2005).

Die **diffuse SSc (dcSSc)** ist durch eine schnell voranschreitende dermale Fibrose proximal und distal der Ellenbogen und Knie, eine Fibrose der Lunge und anderer innere Organe charakterisiert (LeRoy und Medsger, 2001; LeRoy et al., 1988).

Die **limitierte SSc (lcSSc)** manifestiert sich v. a. vaskulär. Sie schreitet insgesamt langsamer voran und weist nur eine begrenzte Haut- und Organfibrose mit Hautbeteiligung distal der Ellenbogen/Knie auf (LeRoy et al., 1988). Das **CREST-Syndrom** ist eine Unterform der lcSSc mit einer typischen Symptomkombination aus **Calcinosis cutis**, **Raynaud-Phänomen**, **Ösophagus-Dysmotilität**, **Sklerodaktylie** und **Teleangiektasie**. Calcinosis cutis bezeichnet eine Ablagerung von Kalziumsalz-Präzipitaten in Dermis und Subkutis, Ösophagus-Dysmotilität ist eine Bewegungsstörung der Speiseröhre durch zunehmende Sklerosierung und Sklerodaktylie eine Sklerose der Fingerhaut. Die Teleangiektasien und das Raynaud-Phänomen unterstreichen die Gefäßbeteiligung: Teleangiektasien sind makroskopisch sichtbare, irreversibel erweiterte Kapillargefäße der Haut und das Raynaud-Phänomen umfasst eine anfallsartige Minderdurchblutung von Fingern und Zehen durch Vasospasmen. Oft zeigt sich der typische triphasische Verlauf mit Ischämie (Weißfärbung der Akren), Zyanose (Blaufärbung) und reaktiver Hyperämie (Rotfärbung), was als Trikolore-Phänomen bezeichnet wird. Da nicht alle CREST-Patienten alle Symptome des Komplexes zeigen und auch Patienten mit dcSSc Calcinosis cutis und Teleangiektasien entwickeln können, wurde der Begriff weitestgehend durch „limitierte SSc“ ersetzt (LeRoy und Medsger, 2001; Wigley, 2001; Wollheim, 2005).

### **1.1.1. Prävalenz und Inzidenz**

Bezüglich Prävalenz und Inzidenz finden sich in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben. Bei der Prävalenz werden Zahlen zwischen 0,7/100.000 und 150/100.000 angegeben und bei der jährlichen Inzidenz Angaben zwischen 0,6/1.000.000/Jahr und 19/1.000.000/Jahr, die sich durch geographische Variationen, unterschiedliche Suszeptibilität für SSc bezüglich Alter, Geschlecht und ethnischer Herkunft sowie durch heterogene Studien mit unterschiedlichen Einschlusskriterien erklären lassen (Chiffhot et al., 2008; Ferri et al., 2002; Hunzelmann et al., 2008; Mayes et al., 2003). Frauen sind deutlich häufiger betroffen als Männer (Verhältnis von 5:1), meist im Alter zwischen 35 und 45 Jahren (Hudson und Fritzler, 2014).

### **1.1.2. Ursache**

Ätiologisch wird bei der SSc eine genetische Prädisposition vermutet. Obwohl die Krankheits-Konkordanzrate zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen unter 5 % beträgt, tritt SSc dennoch in bestimmten Familien im Vergleich zur Gesamtbevölkerung gehäuft auf. Eine positive Familienanamnese ist der bis jetzt stärkste identifizierte Risikofaktor (Arnett et al., 2001; Englert et al., 1999; Feghali-Bostwick et al., 2003). Als weitere Auslöser werden Umwelt-Intoxikationen (Nietert und Silver, 2000), der Zusammenhang mit Krebserkrankungen (Joseph et al., 2014), Infektionen mit dem Zytomegalievirus und eine Assoziation mit verschiedenen Histokompatibilitätsantigenen (HLA) (HLA-DR5/HLA-B8), auf der Zellmembran verankerten Glykoproteinen, vermutet (Lunardi et al., 2000, 2006, Namboodiri et al., 2004, 2006; Pandey und LeRoy, 1998).

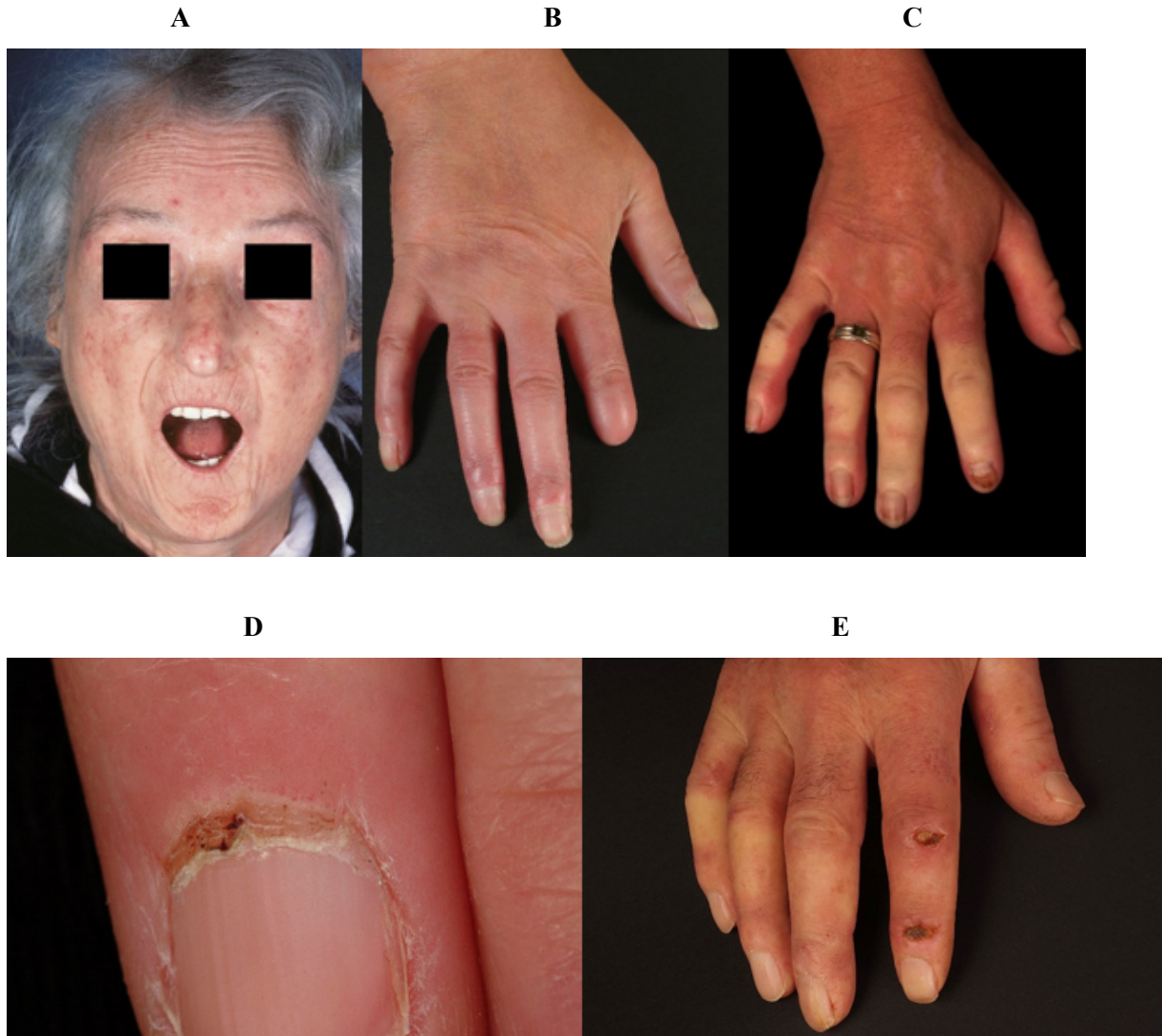
### **1.1.3. Symptome**

Das am deutlichsten sichtbarste und universelle Symptom der SSc ist die progressive Hautfibrosierung und -verdickung, welche auch als Hauptkriterium in der Klassifikation verankert ist (s. Kapitel 1.1.5.). Die betroffene Haut ist induriert und mit dem subkutanen Gewebe fest verbunden, Haarfollikel sowie Schweißdrüsen sind atrophiert (s. Abb. 1.1.) (LeRoy et al., 1988; Rodnan et al., 1979).

Im Frühstadium liegt als zweithäufigste Manifestationsform in über 90 % ein sekundäres Raynaud-Syndrom vor, das anderen Manifestationen der SSc um Jahre bis Jahrzehnte vorausgehen kann (s. Abb. 1.1. C.)) (Block und Sequeira, 2001; Jimenez und Derk, 2004; Varga und Abraham, 2007). Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Verkürzung des Zungenbändchens

und akralen Ulzerationen („Rattenbissnekrosen“) (s. Abb. 1.1. E.)). Bei weiterem Fortschreiten der Hautmanifestation können eine behinderte Mundöffnung („Mikrostomie“), eine eingeschränkte Mimik („Maskengesicht“) und eine Sklerodaktylie mit „Madonnenfingern“ diagnostiziert werden (s. Abb. 1.1. A.) + B.)) (Sticherling, 2012). Weiteres initiales Symptom mit ca. 70 % Inzidenz sind Myalgien und Polyarthralgien bis hin zur Arthritis. Durch die periartikuläre Fibrose kommt es in der späteren Krankheitsphase zu Bewegungseinschränkungen und Flexions-Fehlstellungen (Pope, 2003).

Die häufigste viszerale Komplikation ist mit bis zu 80 % die Ösophagus-Dysmotilität und der damit verbundene Reflux. Es kann darüber hinaus zu Dysphagie, sekundärer Malabsorption und Diarrhoe kommen (Rose et al., 1998). Die bedrohlichste viszerale Beteiligung stellt die Lunge mit einer pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH) (15 % Inzidenz bei dcSSc) oder einer interstitiellen Lungenerkrankung (ILD) (20-70 % Inzidenz bei dcSSc) dar, die in einer pulmonalen Fibrose und einer restriktiven Ventilationsstörung resultieren kann (Co et al., 2000; Coghlan und Mukerjee, 2001; Nihtyanova et al., 2014a). Weiterhin möglich sind eine Herzbeteiligung mit einer Myokardfibrose (20 %) und Arrhythmien oder eine Nierenbeteiligung mit einer malignen Hypertonie und einem akuten Nierenversagen (10-40 %) (Deswal und Follansbee, 1996; Steen, 2014; Visconti et al., 2014). Zusammenfassend muss gesagt werden, dass die SSc sich durch einen sehr heterogenen Krankheitsverlauf auszeichnet. Durch verbesserte Therapieoptionen der renalen Krise bei SSc stellt die Lungenbeteiligung mit PAH und ILD heute die Komplikation mit der höchsten Mortalität und Morbidität dar (Co et al., 2000; Morgan et al., 2003; Sabnani et al., 2009; Steen und Medsger, 2007).



**Abb. 1.1.: Makroskopische kutane Manifestationen der systemischen Sklerose.**

A.) Mikrostomie und Tabaksbeutelmund, Maskengesicht, gespannte Gesichtshaut und zahlreiche Teleangiektasien.

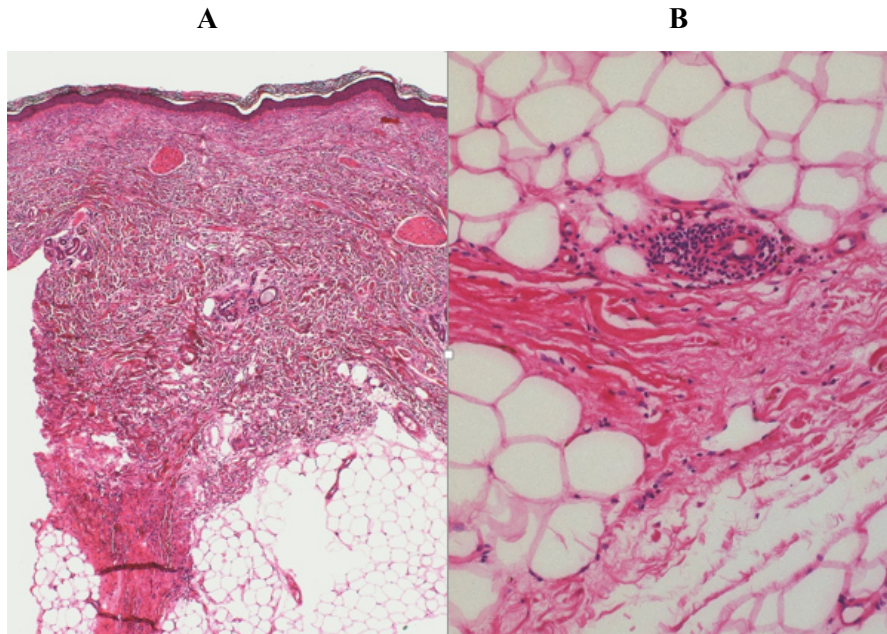
B.) Sklerodaktylie, verminderte Hautverschieblichkeit, Kontrakturen der Gelenke, teigige Schwellung der Hand, Z. n. Amputation des Endglieds des Zeigefingers aufgrund einer schweren Nekrose.

C.) Sekundäres Raynaud-Phänomen.

D.) Sklerotisch verändertes Nagelhäutchen mit veränderten Nagelfalzkapillaren.

E.) Akrale Ulzerationen, sogenannte „Rattenbissnekrosen“, Hautindurationen und verminderte Hautverschieblichkeit.

Bildmaterial aus der Online-Enzyklopädie der Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin, basierend auf der Enzyklopädie Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin (Altmeyer und Paech, 2010), 2. Auflage, © Springer-Verlag 2011. Kapitel: Systemische Sklerodermie, Bild-Galerie zu M34.8, 29.06.2015, 18.00 Uhr. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Springer Verlag, Tiergartenstr. 17, 69121 Heidelberg, mit Genehmigung durch Springer Science + Business Media.



**Abb. 1.2.: Mikroskopische kutane Manifestationen der systemischen Sklerose.**

A.) Sklerotische Dermis mit fibrotischem subkutanem Bindegewebe und atrophischen Schweißdrüsen.

B.) Subkutanes Fettgewebe mit entzündlich infiltrierten Gefäßen und Septen.

Bildmaterial aus der Online-Enzyklopädie der Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin, basierend auf der Enzyklopädie Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin (Altmeyer und Paech, 2010), 2. Auflage, © Springer-Verlag 2011. Kapitel: Systemische Sklerodermie, Bild-Galerie zu M34.8, 29.06.2015, 18.00 Uhr. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Springer Verlag, Tiergartenstr. 17, 69121 Heidelberg, mit Genehmigung durch Springer Science + Business Media.

#### 1.1.4. Diagnostik

Serologisch nachgewiesen werden können SSc-typische Antikörper (AK) in fast 95 % der Patienten bei Erstdiagnose (Walker und Fritzler, 2007). Es treten Autoantikörper, sogenannte antinukleäre Antikörper (ANA), auf, die sich gegen Kernbestandteile der körpereigenen Zellen richten. Die bei SSc spezifischen ANA sind Anti-Topoisomerase I-AK, Anti-Centromer-AK und Anti-RNA-Polymerase III-AK. Sie können seit 2013 auch als Zusatzkriterium zur Diagnose dienen (Koenig et al., 2008a; Mehra et al., 2013).

Andere Antikörper wie SSA/Ro, SSB/La, Anti-Sm, Anti-Jo 1 u. a. treten bei SSc als auch bei anderen Entitäten aus dem Kreis der systemischen autoimmunen rheumatischen Erkrankungen auf, sind dabei aber weniger häufig und weniger spezifisch für SSc (Mehra et al., 2013; Op De Beéck et al., 2012).

Anti-Topoisomerase I-AK, auch Scl-70-Antikörper genannt, sind mit dcSSc, einer erhöhten Inzidenz von pulmonaler Fibrose und einer höheren Mortalität assoziiert. Weltweit tritt dieser

ANA mit einer Frequenz von 9-42 % bei SSc-Patienten auf (Cepeda und Reveille, 2004; Hesselstrand et al., 2003; Mehra et al., 2013; Walker und Fritzler, 2007).

Die Anti-Centromer-AK treten insgesamt mit einer Frequenz von 20-40 % bei SSc auf und finden sich vermehrt bei Patienten mit lcSSc. Während renale Krisen und eine schwere pulmonale Fibrose bei Patienten mit Anti-Centromer-AK eher selten sind, zeigt sich ein höheres Risiko für PAH (Ho und Reveille, 2003; Mehra et al., 2013; Steen, 2005; Walker und Fritzler, 2007; Walker et al., 2007).

Antikörper gegen RNA-Polymerase III sind hochspezifisch für SSc. Sie können in etwa 20 % der SSc-Patienten nachgewiesen werden und gehen mit einem erhöhten Risiko für renale Krisen, Herzbeteiligung und erhöhter Mortalität einher (Cavazzana et al., 2009; Kuwana et al., 1993; Mehra et al., 2013).

Ein weiteres wichtiges diagnostisches Instrument ist die Nagelfalz-Kapillarmikroskopie. Die Vergrößerung der Kapillarschlaufen mit der Präsenz von Megakapillaren, die Distorsion und Knospung von Kapillaren sowie der Verlust von Kapillaren sind die Markenzeichen der SSc-typischen Kapillarmuster (s. Abb. 1.1. D.)) (Maricq, 1981; Nagy und Czirják, 2004).

### **1.1.5. Klassifikation**

Die ersten Klassifikations-Kriterien wurden 1980 vom „*American College of Rheumatology*“ (ACR) aufgestellt (*Masi and Subcommittee For Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee, 1980*). 2013 sind sie durch die ACR und die „*European League Against Rheumatism*“ (EULAR) überarbeitet worden, was zu einer höheren Sensitivität insbesondere bei Frühformen und bei lcSSc geführt hat (van den Hoogen et al., 2013).

1980 stellte das Major-Kriterium sklerodermieartige Hautveränderungen der Finger beider Hände dar, die sich bis nach proximal der Fingergrundgelenke ausbreiten. Mögliche Minor-Kriterien waren Sklerodaktylie, grubchenförmige Narben oder Substanzverlust der distalen Finger- und/oder Zehenweichteile oder eine bilaterale basale Lungenfibrose. Die Diagnose galt als gesichert, wenn entweder das Major-Kriterium oder mindestens zwei Minor-Kriterien erfüllt waren. Die Kriterien hatten mit 97 % und 98 % eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Endform der dcSSc, waren aber wenig sensitiv für das frühe Stadium der dcSSc und die Diagnose der lcSSc (Hudson et al., 2007; Lonzetti et al., 2001; *Masi and Subcommittee For Scleroderma*

*Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee, 1980; Ziswiler et al., 2007).*

In der neuen Klassifikation der SSc von 2013 durch die ACR/EULAR genügen sklerodermieartige Hautveränderungen mit Ausbreitung nach proximal der Fingergrundgelenke weiterhin als Kriterium für die Diagnose der SSc. Bei Fehlen dieser werden sieben andere Symptome mit unterschiedlicher Gewichtung in die Bewertung miteinbezogen: Hautverdickung an den Fingern, Fingerspitzen-Läsionen, Teleangiektasien, Nagelfalz-Alterationen, ILD oder PAH, Raynaud-Phänomen und SSc-bezogene Auto-AK (van den Hoogen et al., 2013).

Bei der Unterscheidung zwischen limitierter und systemischer SSc hilft der modifizierte Rodnan Haut Score (mRSS). Beim mRSS werden 17 Hautareale, darunter Finger, Hände, Unter- und Oberarme, durch Palpation vom Untersucher in 4 Kategorien von 0 = normale Dicke bis 3 = schwerwiegende Hautverdickung eingeteilt (Clements et al., 1993; Rodnan et al., 1979). Der mRSS korreliert mit der dermalen Fibrose, die wiederum mit dem Fibrose-Grad und der Dysfunktion der inneren Organe und der Mortalität korreliert. Bei diffuser SSc steigt der mRSS initial schnell an, mit einem Plateau nach 3-5 Jahren, und danach langsamerer Zunahme. Bei limitierter SSc zeigt sich ab Beginn ein deutlich langsamerer Anstieg und eine niedrigere Gesamtpunktzahl (Clements et al., 1990, 2000; Shand et al., 2007; Steen und Medsger, 2001; Steen et al., 1984).

Weiterhin als problematisch stellte sich die Klassifikation bei Patienten in besonders frühen SSc-Stadien dar. Um eine möglichst frühe Diagnose und Therapie in diesem Stadium zu ermöglichen (*window of opportunity*), wurden durch die „*European Scleroderma Trials and Research group*“ (EUSTAR) diagnostische Kriterien mit einer hohen klinischen Relevanz für die frühe SSc validiert. Angelehnt an die Kriterien von LeRoy und Medsger 2001 wurden drei pathodiagnostische Domänen festgelegt: Die Haut-Domäne mit geschwollenen Fingern, die vaskuläre Domäne mit Raynaud-Phänomen und abnormaler Nagelfalz-Kapillarmikroskopie sowie die Labor-Domäne mit SSc-spezifischen ANA (Avouac et al., 2011; Jordan et al., 2015a; Koenig et al., 2008b; LeRoy und Medsger, 2001; Maricq, 1981; Matucci-Cerinic et al., 2009).



### 1.1.6. Therapie

Bei der Therapie der SSc muss die symptomatische von der Krankheits-modifizierenden Therapie unterschieden werden. Während die symptomatische Therapie auf die Beschwerdelinderung abzielt, ohne dass die Krankheitsentwicklung beeinflusst wird, versuchen die DMARD (*disease-modifying antirheumatic drugs*) mit einer immunsuppressiven und antifibrotischen Therapie die SSc in ihrem Verlauf zu verlangsamen (Blank et al., 2006; Nihtyanova et al., 2014b).

Als DMARD werden verschiedene Substanzen genutzt: die Chemotherapeutika Cyclophosphamid, Mycophenolat-Mofetil und Methotrexat und der monoklonale anti-CD20 Antikörper Rituximab. Bei Cyclophosphamid konnte der positive Effekt auf die pulmonale Fibrose und die Hautbeteiligung in zwei randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studien nachgewiesen werden; es wird trotz seiner Toxizität zur Therapie der ILD empfohlen (Hoyles et al., 2006; Kowal-Bielecka et al., 2009; Tashkin et al., 2006). Methotrexat zeichnet sich durch starke Nebenwirkungen wie Leber-Toxizität, Panzytopenie und eine potenzielle Teratogenität aus. Zwei randomisierte kontrollierte Studien (RCT) konnten eine leichte, aber nicht signifikante Verbesserung des mRSS feststellen, sodass es bei früher dcSSc zur Therapie der Hautmanifestationen in Betracht gezogen werden kann (van den Hoogen et al., 1996; Kowal-Bielecka et al., 2009; Pope et al., 2001). Mycophenolat-Mofetil wird als Medikament gut toleriert und zeigte positive Effekte bezüglich Hautfibrosierung und Lungenfunktion, allerdings liegen noch keine größeren Studien vor (Derk et al., 2009; Mendoza et al., 2012; Nihtyanova et al., 2007; Stratton et al., 2001; Yilmaz et al., 2014). Bei der Therapie mit Rituximab konnten in Pilot-Studien und Fall-Kontroll-Studien durch die EUSTAR vielversprechende Ergebnisse mit einer Verbesserung der Hautfibrose und einer Prävention der Zunahme der Lungenfibrose nachgewiesen werden. Trotzdem fehlen auch hier RCT (Daoussis et al., 2010, 2012; Jordan et al., 2015b; Maslyanskiy et al., 2014; McQueen und Solanki, 2015; Smith et al., 2010, 2013).

Zur DMARD-Therapie erhalten die Patienten oft begleitend Steroide zur Verbesserung der inflammatorischen Arthritis. Der nachgewiesene nutzbringende Effekt von Steroiden bei SSc ist aufgrund von fehlenden RCT limitiert. Allerdings zeigte sich bei höheren Glukokortikoid-Dosen von 15 mg Prednisolon/Tag und mehr eine Assoziation mit einem höheren Risiko für eine renale Krise (Iudici et al., 2013; Kowal-Bielecka et al., 2009; Steen und Medsger, 1998).

Eine weitere Therapieoption stellt die Hochdosis-Immunsuppression mit autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation dar, die eine signifikante Verbesserung der Vitalkapazität, des mRSS und des Langzeit-Überlebens in Studien zeigen konnte. Da sich durch

gravierende Nebenwirkungen wie Infektionen eine behandlungsbezogene Mortalität von ca. 10 % ergab, wird empfohlen, eine autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation nur bei einer SSc-Untergruppe mit extrem schlechter Prognose durchzuführen (Cipriani et al., 2015; Kowal-Bielecka et al., 2009; van Laar et al., 2014). Angesichts der bis jetzt unbefriedigenden Therapiemöglichkeiten gibt es weitere Ansätze, wie die Gabe von Immunglobulinen intravenös (Levy et al., 2004; Takehara et al., 2013) oder die Plasmapherese (Jacobs et al., 1991; Szücs et al., 2003), deren Wert für die klinische Anwendung noch unklar ist.

Die symptomatische Therapie ist ein weiterer wichtiger Baustein in der Therapie der SSc, die sich mit der Milderung der gastrointestinalen Symptome und der Symptome durch das Raynaud-Phänomen, durch akrale Ulzerationen und durch die PAH befasst.

Trotz fehlender spezifischer RCT sollen laut EULAR-Empfehlungen bei gastroösophagealem Reflux Protonenpumpen-Inhibitoren und bei Motilitätsstörungen Prokinetika zum Einsatz kommen (Kowal-Bielecka et al., 2009). Den Patienten mit Raynaud-Phänomen wird empfohlen warme Kleidung zu tragen, eine Kälteexposition zu vermeiden und einen möglichen Nikotinabusus zu stoppen. Medikamentös können als Erstlinien-Therapie orale Dihydropyridine wie Nifedipin eingesetzt werden und als Zweitlinien-Therapie, insbesondere bei digitalen Ulzerationen, Prostazyklin-Analoga wie Iloprost (Kowal-Bielecka et al., 2009; Thompson und Pope, 2005); weiterhin möglich sind selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer und Angiotensin II-Rezeptor-Antagonisten (Coleiro et al., 2001; Dziadzio et al., 1999). Nach dem Versagen der Erst- und Zweitlinien-Therapie kann zur Prävention weiterer digitaler Ulzera Bosentan, ein Endothelin-Rezeptor-Antagonist, bei Patienten mit dcSSc zum Einsatz kommen (Korn et al., 2004; Matucci-Cerinic et al., 2011; Kowal-Bielecka et al., 2009).

Für die PAH konnte in zwei hochqualitativen RCT eine signifikante positive Wirkung von Bosentan und Sitaxentan auf die körperliche Belastbarkeit nachgewiesen werden (Barst et al., 2006; Channick et al., 2001; Kowal-Bielecka et al., 2009). Außerdem werden therapeutisch der Phosphodiesterase Typ 5-Inhibitor Sildenafil und das Prostazyklin-Analoga Epoprosterol eingesetzt (Badesch et al., 2000; Galiè et al., 2005; Kowal-Bielecka et al., 2009).

In der Zusammenschau ist die optimale Therapie der SSc noch unklar. Der beschriebene heterogene Krankheitsverlauf und die lückenhafte Studienlage erschweren die Etablierung eines einheitlichen Therapiealgorithmus.

### 1.1.7. Pathogenese der SSc: 3 Komponenten

Die Pathogenese der SSc zeichnet sich durch ein komplexes Wechselspiel von drei Komponenten aus, die durch ihr Zusammenwirken im Endstadium der SSc, der progressiven und diffusen Fibrose, münden (Abraham und Varga, 2005; Varga und Abraham, 2007). Zu Beginn treten eine Vaskulopathie und eine Störung der angeborenen und erworbenen Immunabwehr mit Autoimmunität und T-/B-Lymphozyten-Aktivierung auf. Dadurch kommt es zur Fibroblasten-Aktivierung, -Differenzierung und -Rekrutierung, zur Synthese von Molekülen der Extrazellulären Matrix (ECM) und dadurch schließlich zur Fibrose (Denton, 2015; Gabrielli et al., 2009; Pattanaik et al., 2015; Varga und Abraham, 2007).

#### 1.1.7.1 Vaskulopathie

Eine Vaskulopathie gehört zu den initialen Abläufen bei der Pathogenese der SSc und zeigt sich klinisch u. a. durch das sekundäre Raynaud-Phänomen, Nagelfalzkapillar-Alterationen und Teleangiektasien (Fleischmajer und Perlish, 1980; Kahaleh, 1995; Kahaleh et al., 1979; Prescott et al., 1992; Varga und Abraham, 2007). Entsprechend tritt das Raynaud-Phänomen in der Frühphase und oft Jahre vor fibrotischen Veränderungen auf (Kahaleh, 2004). Der Mechanismus der endothelialen Gefäßschädigung ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt. Es gibt eine Hypothese, die eine endotheliale Apoptose durch Antikörper gegen endotheliale Zellen (ACEA) postuliert (Kahaleh, 2004; Renaudineau et al., 1999; Sgonc et al., 1996; Worda et al., 2003; Wusirika et al., 2003).

Als Folge der Endothel-Schädigung kommt es u. a. zu einer Dysbalance zwischen Gerinnung und Fibrinolyse, die zu einer Ablagerung von Fibrin und somit zur Gefäßobliteration führen kann (Cerinic et al., 2003). Zusammen bewirken die endotheliale Apoptose und die Gefäßobliteration eine Hypoxie und einen SSc-typischen Mangel an kleinen Blutgefäßen im Endstadium der Erkrankung (Varga und Abraham, 2007). Paradoxe Weise kommt es in der Hypoxie trotz hochregulierter pro-angiogenetischer Faktoren wie VEGF und VEGF-Rezeptor (Davies et al., 2006; Distler et al., 2004; Kuwana et al., 2004) zu einer gestörten Differenzierung von endothelialen Vorläufer-Zellen aus dem Knochenmark und einer geminderten Vaskulogenese (Del Papa et al., 2006; Kuwana et al., 2004).

Darüber hinaus zeigt sich neben der eigentlichen Vaskulopathie eine perivaskuläre Hyperplasie (Helmbold et al., 2004). Perizyten sind kontraktile Zellen, die zusammen mit den Endothelzellen die Blutkapillare bilden. Als wenig differenzierte Zellen haben sie das Potential, sich zu glatten

Muskelzellen, Fibroblasten und aktivierten Fibroblasten, den sogenannten Myofibroblasten, die u. a. eine Aktin-Unterform (*alpha-smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA)) exprimieren, zu entwickeln (Hirschi und D'Amore, 1996; Rajkumar et al., 1999, 2005; Sundberg et al., 1996). Die Proliferation der Perizyten und die Zunahme der glatten Muskelzellen beschleunigen die Obliteration (Helmbold et al., 2004) und inhibieren das Endothelzell-Wachstum (Orlidge und D'Amore, 1987).

### **1.1.7.2. Störung der Immunantwort / Autoimmunität**

Bei der SSc sind sowohl die unspezifische Immunabwehr (zellulär – Monozyten/Makrophagen, humoral – Interleukine) als auch die spezifische Immunabwehr (zellulär – T-/B-Lymphozyten, humoral – Auto-Antikörper/Antikörper) pathologisch verändert (Varga und Abraham, 2007).

Bei der Haut-Untersuchung von SSc-Patienten zeigen sich Infiltrate aus mononukleären Zellen, v. a. aktivierte T-Lymphozyten mit oligoklonaler Expansion und Monozyten/Makrophagen. Die Infiltrate korrelieren dabei mit dem Grad und dem Progress der Hautverdickung (Kräling et al., 1995; Roumm et al., 1984; Sakkas et al., 2002). Perivaskulär finden sich ebenfalls Infiltrate aus CD3<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-positiven mononukleären Zellen, die profibrotische Zytokine und Chemokine sezernieren (Artlett, 2005).

Bei den CD4<sup>+</sup>-positiven T-Lymphozyten können zwei Gruppen unterschieden werden: Die Typ1-T-Helferzellen und die Typ2-T-Helferzellen. Während die Typ1-T-Helferzellen mit der Ausschüttung von Zytokinen wie Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) an der unspezifischen Immunabwehr beteiligt sind und Makrophagen aktivieren, sind die Typ2-T-Helferzellen Teil der spezifischen Immunabwehr. Sie exprimieren ein typisches Zytokin-Muster aus IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 und interagieren mit B-Lymphozyten, die Antikörper produzieren und ausschütten (Zhang et al., 2014). Der Typ1 der T-Helferzellen wirkt pro-inflammatorisch, Typ2 anti-inflammatorisch. In Bezug auf fibrotische Prozesse haben die T-Helferzellen-Typen ebenfalls entgegengesetzte Rollen: Typ2 ist profibrotisch und fördert die Kollagen-Ablagerung, während Typ1 mit INF- $\gamma$  fibrotische Prozesse inhibiert (Wynn, 2004).

Bei SSc findet sich eine pathologische Verschiebung des T-Helferzellen-Typs zum Typ2 (Atamas et al., 1999; Mavalia et al., 1997; Rottoli et al., 2005; Tan et al., 2006; Tsuji-Yamada et al., 2001) mit entsprechend signifikant erhöhten Zytokin-Spiegeln für IL-4, IL-10, IL-13 (Hasegawa et al., 1997). Bei IL-4 und IL13 konnte gezeigt werden, dass diese Zytokine, sogar unabhängig von

anderen profibrotischen Zytokinen, wie dem Transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), die Fibrose durch eine Aktivierung der Kollagen-Synthese verstärken (Fertin et al., 1991; Jinnin et al., 2004; Kaviratne et al., 2004; Salmon-Ehr et al., 1996). Im Gegensatz dazu ist bei SSc der Anteil der T-Helferzellen mit Typ1 erniedrigt und somit auch INF- $\gamma$ , welches antifibrotisch wirkt und die TGF $\beta$ -induzierte Kollagen-Transkription aufheben würde (Ghosh et al., 2001; Jimenez et al., 1984; Wynn, 2004).

Ein weiterer Aspekt ist die Autoimmunität, bei der durch B-Lymphozyten Auto-AK gegen körpereigene Antigene gebildet werden. Insgesamt weisen die B-Lymphozyten bei SSc-Patienten einige Abnormalitäten auf. Während die naiven B-Zellen erhöht sind, sind die B-Gedächtniszellen erniedrigt, aber durch eine erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern hyperaktiv (Sato et al., 2004). Außerdem zeigt sich bei den B-Lymphozyten bei SSc eine erhöhte Expression von CD19, einem wichtigen Signaltransduktions-Molekül für die Autoantikörper-Produktion (Sato et al., 2004), und gesteigerte Werte für „*B cell activating factor of the TNF family*“ (BAFF), einen entscheidenden Überlebensfaktor von B-Zellen (Matsushita et al., 2006).

Baroni et al. fanden 2006 stimulatorische Auto-AK gegen den „*Platelet-derived growth factor*“-Rezeptor (PDGF-R), die agonistisch die PDGF-R-Signalkaskade induzieren (s. Kapitel 1.1.7.4.2. PDGF); außerdem wurde die Differenzierung zu Myofibroblasten und die Kollagen Typ I-Expression durch die Auto-AK stimuliert (Baroni et al., 2006).

Daneben wird weiteren AK ein Beitrag zur Pathogenese zugeschrieben. Anti-Topoisomerase I-AK, deren Serumwerte mit der Krankheitsschwere und -Aktivität der SSc korrelieren (Hu et al., 2003), bewirken gebunden an Fibroblasten u. a. eine Aktivierung und stärkere Adhäsion von Monozyten (Hénault et al., 2006). Die Antikörper gegen endotheliale Zellen (ACEA) stehen im Verdacht die Leukozyten-Adhäsion an Endothelzellen durch eine erhöhte Expression von Adhäsions-Molekülen (*Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1), *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1)) zu verursachen (Carvalho et al., 1996). Ob auch andere, zur Diagnose genutzte, Auto-AK wie Anti-Centromer-AK und Anti-RNA-Polymerase III-AK (s. Kapitel 1.1.4. Diagnostik) selbst eine Rolle in der Pathogenese der SSc spielen, kann bisher nicht abschließend beantwortet werden (Harris und Rosen, 2003).

### **1.1.7.3. Fibroblasten-Aktivierung und -Differenzierung**

Fibroblasten sind die Haupt-Effektorzellen der SSc und der häufigste Zelltyp in der ECM (Kendall und Feghali-Bostwick, 2014; Varga und Abraham, 2007). Sie produzieren

physiologischerweise Kollagen, retikuläre und elastische Fasern, Glykosaminoglykane und Adhäsionsmoleküle wie Fibronectin, das eine Brückenfunktion zwischen Kollagen und anderen ECM-Molekülen übernimmt (Kendall und Feghali-Bostwick, 2014; Wight und Potter-Perigo, 2011).

Die normale Fibroblasten-Aktivität dient u. a. dem Wundverschluss und ist selbstlimitierend. Bei der pathologischen Fibroblasten-Antwort der SSc ist sie amplifiziert und nicht selbstlimitiert (Varga und Bashey, 1995). Die SSc-Fibroblasten (SSc-F) produzieren signifikant schneller und mehr Kollagen (Jelaska et al., 1996; LeRoy, 1974), indem u. a. das Gen für das Kollagen Typ I, Alpha-1-Kette (*COL1A1*), die den Hauptbestandteil des Kollagen Typ I bildet, vermehrt transkribiert wird (Eckes et al., 1996). Darüber hinaus zeichnet sich die *COL1A1*-mRNA durch eine deutlich erhöhte Stabilität und Halbwertszeit aus, was ebenfalls zur gesteigerten Kollagen-Synthese beiträgt (Eckes et al., 1996). Weiterhin ist die Fibronectin-Transkription und die Stabilität der Fibronectin-mRNA erhöht, sodass die SSc-F durch transkriptionelle und posttranskriptionelle Modifikationen eine erhöhte Synthese von ECM-Molekülen erreichen (Eckes et al., 1996). Auch das Muster der Kollagen-Vernetzung ist verändert, mit einer signifikant erhöhten Anzahl an Quervernetzungen durch die Lysylhydroxylase 2, die bei SSc vermehrt transkribiert wird (Brinckmann et al., 2005). Um Kontakt zu den Kollagen- und Fibronectin-Molekülen aufzubauen, nutzen Fibroblasten die transmembranösen Integrine  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_{II}\beta_1$  und  $\alpha_{XI}\beta_1$  (Eckes et al., 2006). Integrin  $\alpha_1\beta_1$  hat die Fähigkeit, die Kollagen-Synthese herunter zu regulieren (Gardner et al., 1999), ist aber auf der SSc-F-Oberfläche reduziert exprimiert (Ivarsson et al., 1993).

Die sonst nur transient bei Wundheilungsprozessen auftretenden aktivierten Fibroblasten, die Myofibroblasten, werden in gesunden Geweben durch Apoptose entfernt (Abraham et al., 2007); bei SSc hingegen verbleiben sie (Desmoulière et al., 2005). Generell zeigen SSc-F eine relative Resistenz gegen Fas-induzierte Apoptose. Verschiedene Autoren machen dafür TGF $\beta$  und die durch TGF $\beta$  aktivierte Proteinkinase B (PKB), auch Akt genannt, verantwortlich (Jelaska und Korn, 2000; Jun et al., 2005; Santiago et al., 2001).

Die Differenzierung vom Fibroblasten zum Myofibroblasten wird durch TGF $\beta$  und eine Splice-Variante von Fibronectin stimuliert (Varga und Abraham, 2007; Wight und Potter-Perigo, 2011). Allerdings kann die Rekrutierung zum Myofibroblasten auch aus verschiedenen anderen Zelltypen erfolgen, u. a. Perizyten, Fibrozyten, Epithelzellen und mesenchymalen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (Abe et al., 2001; Abraham et al., 2007; Bellini und Mattoli, 2007; Desmoulière et al., 2005; Kalluri, 2009; Rajkumar et al., 2005; Sundberg et al., 1996) (s. Abb. 1.3.).

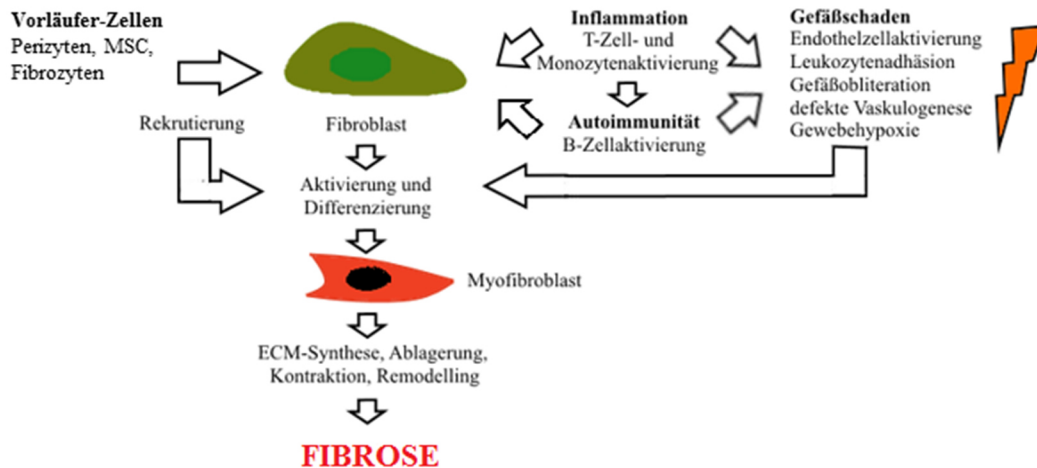
Neben der Aktivierung der Fibroblasten durch die Prädominanz des Typ2 der T-Helferzellen (s. Kapitel 1.1.7.2.) ist ein weiterer Aktivierungsmechanismus die autokrine Stimulation durch das profibrotische Zytokin TGF $\beta$  im Rahmen eines Ultrashort-Feedback-Mechanismus. Die SSc-F schütten vermehrt TGF $\beta$  aus, welches an den TGF $\beta$ -R bindet, der bei SSc signifikant überexprimiert ist (Kawakami et al., 1998; Pannu et al., 2004). Auf diese Weise ergibt sich eine autokrine Stimulationsschleife (Jimenez et al., 1996; Pannu und Trojanowska, 2004; Pannu et al., 2006).

Ein weiterer Faktor, der zur Aktivierung und Proliferation der Fibroblasten beiträgt, sind ROS, reaktive Sauerstoffspezies wie z. B. O $_2^{\cdot-}$ , die von den Fibroblasten selber freigesetzt werden (Murrell et al., 1990; Sambo et al., 2001; Servettaz et al., 2007). Unterstützend wirken hier profibrotische Zytokine. TGF $\beta$  kann einerseits die Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase und somit die ROS-Bildung induzieren (Sturrock et al., 2006). Andererseits wird TGF $\beta$  selbst von der inaktiven Form durch ROS in die aktive Form umgewandelt (Barcellos-Hoff und Dix, 1996; Bellocq et al., 1999), sodass sich ebenfalls eine autokrine Feedbackschleife ergibt (Sambo et al., 2001). Andere profibrotische Zytokine wie PDGF und CTGF, der „*connective tissue growth factor*“, sind überdies Teil dieser autokrinen Schleife (Meng et al., 2002; Sambo et al., 2001; Svegliati et al., 2005). Außerdem setzen andere, an der SSc-Pathogenese beteiligte Zellen wie Monozyten, Endothel- und Epithelzellen durch NADPH-Oxidase signifikant mehr ROS frei als gesunde Kontrollen und tragen so zusätzlich zum oxidativen Stress bei (Holland et al., 1998; Sambo et al., 1999; Servettaz et al., 2007).

Endothelin-1 (ET-1), ein Peptid aus den Endothelzellen, das eine starke Vasokonstriktion bewirkt, hat darüber hinaus eine Bedeutung bei der Differenzierung/Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und der erhöhten Produktion von ECM-Molekülen (Abraham et al., 1997; Gabrielli et al., 2009; Shephard et al., 2004). In SSc-F liegen erhöhte ET-1-Spiegel vor (Abraham et al., 1997; Cambrey et al., 1994; Kawaguchi et al., 1994; Vancheeswaran et al., 1994) und die Expression der ET-1-Rezeptoren ist modifiziert (Abraham et al., 1997; Mayes, 2003; Shi-Wen et al., 2001). ET-1 trägt zur profibrotischen Wirkung von TGF $\beta$  bei und ist fähig, bei gesunden Fibroblasten einen fibrotischen Phänotyp zu induzieren (Shephard et al., 2004; Shi-Wen et al., 2001; Shi-wen et al., 2007).

Die Fibrose stellt das Endstadium dieser komplexen Pathogenese dar und ist die Hauptursache der Symptome der SSc. Graduell ersetzt die Fibrose die Bereiche der vaskulären Inflammation und stört die Gewebearchitektur durch die Ablagerung der Proteine der ECM. Die ECM stellt

wiederum selbst ein Reservoir für profibrotische Zytokine dar (Gabrielli et al., 2009; Varga und Abraham, 2007).



**Abb. 1.3.: Übersicht: 3 Komponenten der Pathogenese der SSc.** Eine initiale Vaskulopathie und eine Störung des spezifischen und unspezifischen Immunsystems mit Autoimmunität aktivieren Fibroblasten. Diese und zusätzliche Fibroblasten, die aus Perizyten, Fibrozyten und mesenchymalen Stammzellen rekrutiert werden, differenzieren zu Myofibroblasten. Durch eine pathologische Synthese von Komponenten der ECM wird das Endstadium des SSc, die Fibrose, erreicht. Abbildung nach (Varga und Abraham, 2007). MSC = mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark.

#### 1.1.7.4. „Schlüssel“-Mediatoren der Pathogenese der SSc

Zwei profibrotische Zytokine, die essentiell für die Aktivierung und Differenzierung der Fibroblasten sind, sind TGFβ und PDGF. Ihre Wirkung über molekulare Signalkaskaden zeichnet sich durch ein komplexes Zusammenspiel mit den Fibroblasten, mit anderen Zytokinen und untereinander aus.

##### 1.1.7.4.1. TGFβ

TGFβ ist ein Zytokin-Homodimer, das, neben seiner Funktion bei Fibrosierungs-Prozessen, eine Rolle bei der Embryogenese, Zelldifferenzierung und bei der Wundheilung spielt. TGFβ kann von Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen gebildet werden (Gabrielli et al., 2009) und liegt zuerst in einer inaktiven/latenten Form in der ECM vor, die u. a. durch ROS und Integrin  $\alpha_v\beta_5$  aktiviert werden kann (Asano et al., 2005; Barcellos-Hoff und Dix, 1996; Lafyatis, 2014). Der aktivierte TGFβ bindet an seinen Rezeptor, eine Rezeptor-Serin-/Threonin-Kinase, die als



Heterodimer aus Typ I und Typ II gebildet wird. Durch die Rezeptor-Dimerisierung findet eine Phosphorylierung der zytosolischen Serin-/Threonin-Kinase-Aktivität des Typ I durch Typ II statt, sodass nachfolgend die Effektormoleküle, die sogenannten SMAD, phosphoryliert werden können (Massagué, 2000). Bei SSc liegen generell erhöhte TGF $\beta$ -Spiegel vor (Ludwicka et al., 1995). Aber auch die TGF $\beta$ -Rezeptoren Typ I und II sind bei SSc auf Protein- und mRNA-Ebene überexprimiert (Kawakami et al., 1998; Kubo et al., 2002; Pannu et al., 2006) und zeigen dabei ein geändertes Verhältnis mit einer erhöhten Ratio von Typ I : Typ II, das mit der Kollegen-Synthese korreliert (Pannu et al., 2004).

Bei der nachfolgenden TGF $\beta$ -Signalkaskade kann ein SMAD-abhängiger und ein SMAD-unabhängiger Signalweg unterschieden werden. Beim SMAD-Signalweg binden die phosphorylierten Rezeptor-SMAD (R-SMAD) 2 und 3 an das Kofaktor-SMAD (coSMAD) 4 und bilden einen Komplex, der in den Zellkern eindringt und an eine Konsensussequenz aus CAGAC bindet, das sogenannte SMAD-bindende Element (SBE) (Massagué, 2000; Ramirez et al., 2006; Varga und Abraham, 2007; Xu et al., 2000). Bei SSc-F ist die Menge von SMAD3 und phosphoryliertem SMAD2/3 erhöht und vermehrt im Nucleus lokalisiert, was auf eine Aktivierung des SMAD-Signalweges hindeutet (Mori et al., 2003). Im Zellkern rekrutiert der Komplex die transkriptionellen Koaktivatoren p300 und CREB-bindendes Protein und reguliert auf diese Weise die Transkription der TGF $\beta$ -regulierten Gene, z. B. *Kollagen Typ I (COL1A1, COL1A2)*, *CTGF*, *Fibronektin* und  *$\alpha$ -SMA* (Chen et al., 1999; Feng et al., 1998; Janknecht et al., 1998; Massagué, 2000; Shen et al., 1998; Varga und Abraham, 2007). Diese TGF $\beta$ -abhängigen Gene sind bei SSc signifikant überexprimiert (Whitfield et al., 2003). SMAD7 hat die Fähigkeit, diesen SMAD-abhängigen Signalweg zu inhibieren, ist aber bei SSc vermindert (Dong et al., 2002). Der SMAD-Signalweg wird außerdem streng durch die MAP-Kinase-Kaskade (*mitogen-activated protein kinase*) kontrolliert. Der Signalweg der MAP-Kinase-Kaskade über das kleine G-Protein Ras/MEK/ERK bewirkt eine Phosphorylierung und Aktivierung von SMAD1 (Leask und Abraham, 2004; Mulder, 2000; Pannu et al., 2007). Der Spiegel von phosphoryliertem SMAD1 bei SSc-F ist ebenfalls signifikant erhöht, was eine ständige Aktivierung der SSc-F erklären könnte (Pannu et al., 2008).

Darüber hinaus gibt es einen SMAD-unabhängigen/Non-SMAD Signalweg, der mit dem SMAD-abhängigen Weg u. a. durch die Phosphorylierung der SMAD interagieren kann (Moustakas und Heldin, 2005; Mu et al., 2012; Pannu et al., 2007). Der TGF $\beta$ -R kann direkt Non-SMAD-Proteine phosphorylieren, sodass parallele Signalwege entstehen (Moustakas und Heldin, 2005); u. a. werden durch TGF $\beta$  SMAD-unabhängig zwei weitere MAP-Kinase-Signalwege aktiviert (c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38)) (Atfi et al., 1997; Mu

et al., 2012; Varga und Abraham, 2007; Zhang, 2009). In einem weiteren Signalweg wird SMAD-unabhängig über die Rho-GTPasen Cdc42, Rac und die Serin-/Threonin-Kinase PAK die zytosolische Tyrosinkinase (TK) c-Abl (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog*) stimuliert (Atfi et al., 1997; Roig et al., 2000; Wang et al., 2005; Daniels et al., 2004). Die c-Abl-Expression ist bei SSc erhöht und bei einer Inhibition von c-Abl kann u. a. die TGF $\beta$ -induzierte Fibroblasten-Differenzierung zu Myofibroblasten und die Synthese von ECM-Komponenten herunterreguliert werden (Karimizadeh et al., 2015; Daniels et al., 2004).

TGF $\beta$  hat eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese der SSc. Neben der Induktion von ET-1 und ROS, der Reduktion der Fas-induzierten Apoptose und der konstitutiven Aktivierung der Fibroblasten durch eine autokrine Stimulationsschleife (s. Kapitel 1.1.7.3.) ist TGF $\beta$  das stärkste Zytokin für die Myofibroblasten-Differenzierung (Leask und Abraham, 2004).

CTGF, dessen Transkription durch TGF $\beta$  induziert wird, verstärkt die Bindung von TGF $\beta$  an seinen Rezeptor, mit der Folge, dass die TGF $\beta$ -Signalkaskade unterstützt wird (Abreu et al., 2002). Darüber hinaus wirkt CTGF selbst profibrotisch. Unabhängig von TGF $\beta$  fördert es die Fibroblasten-Proliferation und die Synthese von ECM-Komponenten, sodass bei SSc TGF $\beta$  und CTGF bezüglich der Fibrose synergistisch zusammenwirken (Holmes et al., 2001; Leask und Abraham, 2003, 2004).

#### **1.1.7.4.2. PDGF**

Der Wachstumsfaktor PDGF, der zuerst in Thrombozyten entdeckt worden war (Ross et al., 1974), hat als Mitogen eine wichtige Funktion bei der Embryogenese, Wundheilung und anderen Bindegewebs-Prozessen (Andrae et al., 2008; Betsholtz, 2003; Gabrielli et al., 2009; Heldin und Westermark, 1999). Er tritt als Homo- oder Heterodimer auf, das aus den verschiedenen Polypeptid-Ketten (A-D) über Disulfidbrücken gebildet wird. Insgesamt ergeben sich fünf Isoformen PDGF-AA, -BB, -CC, -DD und das Heterodimer PDGF-AB (Heldin und Westermark, 1999; Li und Eriksson, 2003).

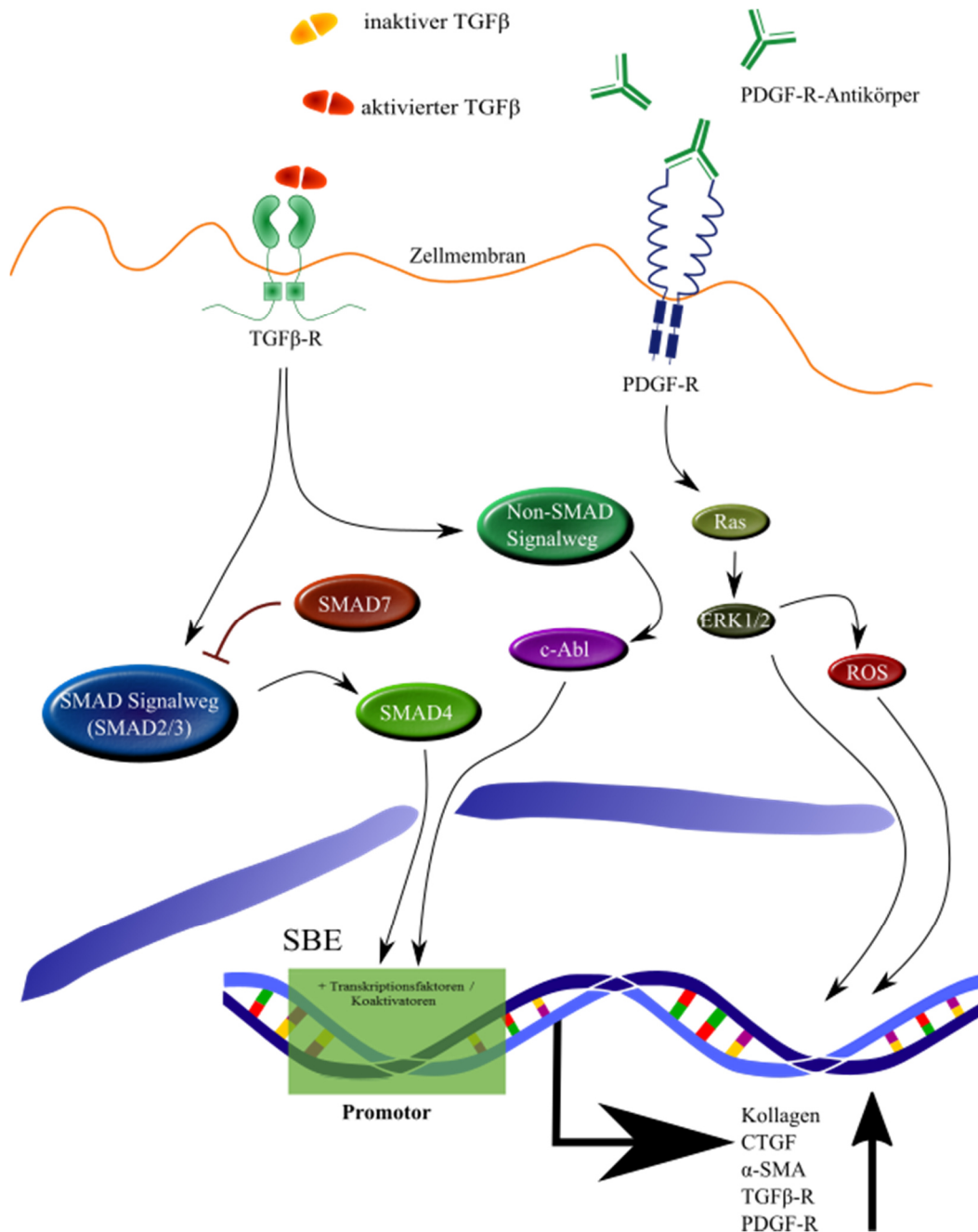
PDGF bindet als Dimer an den PDGF-Rezeptor (PDGF-R), der wiederum selber ein Homo- oder Heterodimer aus den PFGF-R $\alpha$  und PFGF-R $\beta$  ist (PDGF-R $\alpha\alpha$ , PDGF-R $\alpha\beta$ , PDGF-R $\beta\beta$ ) (Heldin und Westermark, 1999). Der PDGF-R ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) mit einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne. Durch die Bindung des PDGF kommt es zu einer Dimerisierung des Rezeptors mit Autophosphorylierung der Tyrosinreste. Proteine mit einer SH2-Domäne, einem Bindemotiv für diese phosphorylierten Tyrosine, binden an die RTK,

werden aktiviert und setzen weitere komplexe Signalkaskaden in Gang, u. a. die PI3-Kinase und die Phospholipase C- $\gamma$  (Heldin und Westermark, 1999). Ras, ein kleines G-Protein, wird über Adapter-Moleküle mit SH2-Domäne aktiviert und startet den MAP-Kinase-Signalweg, der als Downstream-Moleküle die Serin-/Threonin-Kinasen ERK 1/2 beinhaltet (Graf et al., 1997; Heldin und Westermark, 1999).

Bei SSc sind PDGF und PDGF-R $\beta$  erhöht exprimiert, v. a. in mikrovaskulären Perizyten, was eine Erklärung für die Proliferation und die dadurch entstehende Vaskulopathie bei SSc sein kann (Gay et al., 1989; Klareskog et al., 1990; Ludwicka et al., 1995; Rajkumar et al., 2005).

Weiterhin aktivieren die Serin-/Threonin-Kinasen ERK1/2 die NADPH-Oxidase, die ROS erzeugt (Serù et al., 2004; Svegliati et al., 2005). ROS und ERK1/2 stabilisieren Ras durch einen verminderten proteasomalen Abbau. Auf diese Weise stellt sich bei SSc, durch PDGF induziert, eine Auto-Amplifikation des oxidativen Stresses durch Ras/ERK/ROS ein, der Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schäden und profibrotische Prozesse begünstigt (Svegliati et al., 2005). Die agonistischen Auto-AK gegen PDGF-R induzieren ebenfalls die Ras/ERK/ROS-Kaskade (s. Kapitel 1.1.7.2.) (Baroni et al., 2006).

In der Wirkung der beiden Zytokine TGF $\beta$  und PDGF gibt es bezüglich der Signalkaskade darüber hinaus Überschneidungen. Neben dem von beiden aktivierten MAP-Kinase-Weg Ras/MEK/ERK steigert TGF $\beta$  bei SSc die Expression von PDGF-R $\alpha$  (Yamakage et al., 1992). Durch eine Ko-Stimulation der SSc-F mit TGF $\beta$  und PDGF, wie sie bei diesem Krankheitsbild vorliegt, wird somit eine zusätzliche Stimulation der Fibroblasten-Proliferation bewirkt (Yamakage et al., 1992).



**Abb. 1.4.: Aktivierung der Fibroblasten durch molekulare Signalwege.** TGFβ und PDGF-R-Auto-AK initiieren durch das Andocken an ihre Rezeptoren verschiedene Signalkaskaden, die die DNA-Transkription bei SSc beeinflussen. Der TGFβ-R ist eine Serin-/Threonin-Kinase, die R-SMAD2 und R-SMAD3 aktiviert. Zusammen mit coSMAD4 bilden sie einen Komplex, der im Zellkern am SBE mit Hilfe von Koaktivatoren die Transkription von TGFβ-regulierten Proteinen stimuliert. Eine Inhibition des SMAD-Komplexes ist durch SMAD7 möglich. Es gibt einen SMAD-unabhängigen Signalweg mit c-Abl, einer TK, als Downstream-Molekül. Die PDGF-R-Auto-AK binden an den PDGF-R, eine RTK, die über eine Ras/ERK/ROS-Kaskade oxidativen Stress erzeugt. SBE = *SMAD-binding element*. α-SMA = *α-smooth muscle Actin*. Modifiziert nach (Gabielli et al., 2009).

## **1.2. Imatinib – Ein Tyrosinkinase-Inhibitor**

Der vorausgehende Abschnitt unterstreicht den Stellenwert von Proteinkinasen in der Pathogenese der SSc auf molekularer Ebene. Auch bei anderen Entitäten scheinen Proteinkinasen, mit den Unterfamilien der Serin-/Threonin-Kinasen und den Tyrosinkinasen, eine zentrale Rolle innezuhaben (Druker und Lydon, 2000; Roskoski, 2015).

Imatinib, das als Gleevec/Glivec vermarktet wird, ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI), der sowohl Rezeptor-Tyrosinkinasen als auch zytosolische Tyrosinkinasen hemmen kann (Carroll et al., 1997; Savage und Antman, 2002). Pharmazeutisch genutzt wird das Imatinib Mesylat, ein Salz der Methansulfonsäure. Als molekular zielgerichtete Therapie (*targeted therapy*) wurde es zuerst bei der chronisch myeloischen Leukämie eingeführt (Druker und Lydon, 2000; Druker et al., 1996, 2001; Savage und Antman, 2002).

### **1.2.1. CML und das Philadelphia-Chromosom**

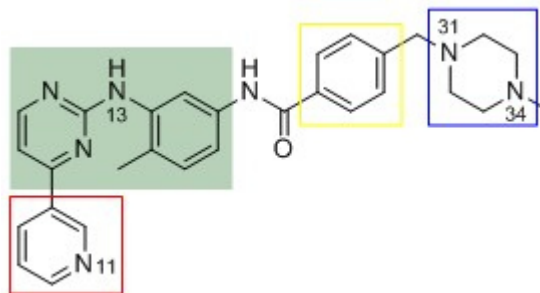
Die chronische myeloische Leukämie (CML) gehört zu den malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, bei dem eine Stammzelle unkontrolliert proliferiert und die Differenzierung in reife Blutzellen fehlt (Apperley, 2014; Sawyers et al., 1991). Initial präsentieren sich die Patienten mit eher unspezifischen Symptomen wie Nachtschweiß und Gewichtsverlust (Apperley, 2014). Typischerweise gliedert sich der Krankheitsverlauf in drei konsekutive Phasen (chronische Phase, Akzeleration und Blastenkrise), die mit Fortschreiten der Krankheit schwerer zu kontrollieren sind (Apperley, 2014).

Auf chromosomaler Ebene entdeckten Nowell und Hungerford in den 1960er Jahren genetische Veränderungen bei Patienten mit CML in Form einer Verkürzung von Chromosom 22, das in diesem Fall als Philadelphia-Chromosom bezeichnet wird (Nowell und Hungerford, 1960a, 1960b; Rowley, 1973). Ausgangspunkt für diese Chromosomenmutation ist eine reziproke Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22, durch die das Protoonkogen *ABL1* (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) auf Chromosom 22 verlagert wird (de Klein et al., 1982; Rowley, 1973). Das Philadelphia-Chromosom tritt außer bei der CML auch bei kindlichen und adulten Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie und bei der akuten myeloischen Leukämie auf (Kurzrock et al., 1987; Specchia et al., 1995; Suryanarayan et al., 1991).

Die Bruchstelle auf Chromosom 22 befindet sich nicht an einem singulären Punkt der DNA, sondern kann in verschiedenen Abschnitten vorliegen, die sich im Gen „*breakpoint cluster region*“ (*BCR*) befinden (Groffen et al., 1984; Heisterkamp et al., 1985; Pane et al., 1996; Saglio et al., 1990). Dementsprechend entstehen auf molekularer Ebene unterschiedlich lange Fusionsgene, *BCR-ABL1*, die für Fusionsproteine mit einem Molekulargewicht von 190, 210 oder 230 kDa codieren (Advani und Pendergast, 2002; Ben-Neriah et al., 1986; Chan et al., 1987; Pane et al., 1996; Saglio et al., 1990). Diese Fusionsproteine zeigen eine pathologisch gesteigerte TK-Aktivität (Kloetzer et al., 1985; Konopka et al., 1984) und haben so einen Angriffspunkt für den TKI Imatinib.

### 1.2.2. Imatinib – Struktur und Wirkung

Bei Imatinib handelt es sich um einen Vertreter der 2-Phenylaminopyrimidine, die mit ATP kompetitiv um die Bindungsstelle an Tyrosinkinasen konkurrieren (Buchdunger et al., 1996; Carroll et al., 1997; Druker et al., 1996). Neben dem 2-Phenylaminopyrimidin als Grundgerüst beinhaltet Imatinib noch ein substituiertes Pyridin und eine Amidbindung mit einem Phenyl- und einem Piperazinyl-Ring (s. Abb. 1.5.) (Nagar et al., 2002).



**Abb. 1.5.: Chemische Struktur von Imatinib.** Das Grundgerüst stellt das 2-Phenylaminopyrimidin (grün unterlegte Struktur) dar. Daneben befindet sich in 4-Position des Pyrimidins ein Pyridin (rot), das über die 3-Position verknüpft ist. Über eine Amidbindung schließt sich ein Phenyl-Ring (gelb) und weitergehend ein Piperazinyl-Ring (blau) an (Nagar et al., 2002). Bei vollständiger Protonierung von Imatinib (pH 2 im Magen) ergeben sich vier mögliche Protonierungsstellen ( $N^{11}$ ,  $N^{13}$ ,  $N^{31}$  und  $N^{34}$ ) (Szakács et al., 2005). Abbildung nach (Buchdunger et al., 1996; Carroll et al., 1997).

Damit Imatinib an die TK binden kann, ist der „*activation loop*“, eine zentrale Sequenz der TK, von essentieller Bedeutung. Die Phosphorylierung des Aminosäure-Rests Tyrosin Tyr<sup>393</sup> im *activation loop* entscheidet darüber, ob die Kinase in einer aktiven oder inaktiven Konformation vorliegt. Ist Tyr<sup>393</sup> phosphoryliert, ist die TK in einer offenen Konformation stabilisiert, Substrate können binden, nicht aber Imatinib (Nagar et al., 2002; Schindler et al., 2000). Nur wenn Tyr<sup>393</sup>

nicht phosphoryliert ist und die Kinase in einer inaktiven Konformation vorliegt, bindet Imatinib (Nagar et al., 2002; Schindler et al., 2000).

TK sind hochkonservierte Proteine mit einer C-terminalen katalytischen und einer N-terminalen regulatorischen Domäne. Strukturell schiebt sich Imatinib zwischen den N- und C-Lappen dieser bilobulären Kinasedomäne (Nagar et al., 2002; Schindler et al., 2000). Auf einer Kontaktfläche von 1251 Å<sup>2</sup> bilden sich zwischen Imatinib und der TK Van-der-Waals-Interaktionen und 6 Wasserstoffbrückenbindungen aus, die die Kinase inaktivieren (Nagar, 2007; Nagar et al., 2002; Schindler et al., 2000).

Auf diese Weise ist Imatinib in der Lage die Aktivität von TK wie Bcr-Abl, c-Abl und RTK, wie dem PDGF-R, konzentrationsabhängig in vivo und in vitro zu reduzieren, ohne dass die Expression der Kinasen verändert wird (Buchdunger et al., 1996, 2000; Carroll et al., 1997).

### **1.2.3. Imatinib bei CML**

Die Einführung von Imatinib ermöglichte eine zielgerichtete und effektive Therapie bei Patienten mit CML (*targeted therapy*). So konnte durch die Behandlung sowohl das periphere Blutbild normalisiert, als auch die Expression des Philadelphia-Chromosoms reduziert werden (Druker et al., 2001; Fischer et al., 2002; Kantarjian et al., 2002; Sawyers et al., 2002). Dies wurde auch bei Patienten erzielt, bei denen die bisherige (Standard-)Therapie mit Interferon- $\alpha$  nur unzureichende Ergebnisse erbracht hatte (Kantarjian et al., 2002; Sawyers et al., 2002). Selbst in der Endphase der Erkrankung, der Blastenkrise, sprachen einige Patienten noch auf die Behandlung mit Imatinib an (Sawyers et al., 2002).

Insgesamt ist Imatinib gut verträglich. Als unerwünschte Arzneimittelwirkung traten u. a. eine Reduktion von Blutzellen, Übelkeit und Erbrechen, Durchfälle und Ödeme auf (Atallah et al., 2007; Druker et al., 2001; Fischer et al., 2002; Kantarjian et al., 2002; Sawyers et al., 2002). Trotz des durchschlagenden Erfolgs der Imatinib-Therapie existieren CML-Zelllinien, die gegenüber einer Behandlung resistent sind (Mahon et al., 2000).

Dies führte zur Entwicklung von TKI der zweiten Generation und dritten Generation. Nilotinib und Dasatinib, zwei TKI der zweiten Generation, wirken effektiver als Imatinib und können auch bei den meisten Fällen von Imatinib-Resistenz erfolgreich eingesetzt werden (Cannell, 2007; Francis et al., 2013; Kantarjian et al., 2006a, 2006b; O'Hare et al., 2005; Shah et al., 2004, 2014; Talpaz et al., 2006).

### **1.2.4. Imatinib bei GIST**

Ein weiterer Einsatzbereich von Imatinib sind gastrointestinale Stromatumore, kurz GIST. GIST sind seltene Tumore des Gastrointestinal-Traktes, deren Pathogenese ebenfalls auf einer pathologisch veränderten TK beruht (Hirota et al., 1998; Joensuu et al., 2001). CD117, auch c-kit genannt, ist eine RTK, die durch eine Mutation in fast 80 % bei GIST konstitutiv aktiviert ist (Hirota et al., 1998; Iorio et al., 2014).

Imatinib inhibiert selektiv CD117 und die nachfolgende Aktivierung von Signalkaskaden (Heinrich et al., 2000). Bei einem nicht resektablen oder metastasierten GIST sowie als adjuvantes Chemotherapeutikum kommt Imatinib daher zum Einsatz (Dematteo et al., 2009; Joensuu, 2012; Joensuu et al., 2001; van Oosterom et al., 2001).

### **1.2.5. Imatinib bei SSc**

#### **1.2.5.1. Von klinischen Beobachtungen zu RCT**

Bei der Therapie von CML-Patienten mit Imatinib wurden einige interessante Beobachtungen gemacht. U. a. zeigte sich bei der Imatinib-Therapie eine Reduktion der Knochenmarks-Fibrose, die bei CML begleitend auftritt. Die Reduktion war unabhängig vom zytogenetischen Ansprechen der Patienten, woraus man schloss, dass ein Mechanismus, unabhängig von der Suppression des Philadelphia-Chromosoms, verantwortlich sein müsste (Bueso-Ramos et al., 2004; Hasserjian et al., 2002; Beham-Schmid et al., 2002). Außerdem beobachtete man klinische Verbesserungen bei Patienten, die gleichzeitig unter CML und rheumatoider Arthritis litten, bezüglich ihrer rheumatischen Beschwerden; daher wurde Imatinib auch als Therapeutikum für die rheumatoide Arthritis untersucht (Eklund und Joensuu, 2003; Miyachi et al., 2003; Sandler et al., 2006).

Distler et al. konnten 2007 zum ersten Mal zeigen, dass eine Inkubation von Fibroblasten mit Imatinib bei einer Konzentration von 1 µg/mL ( $\approx 1,7$  µmol) die Synthese von ECM-Molekülen wie Kollagen Typ I (COL1A1, COL1A2) und Fibronectin sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene dosisabhängig herunterregulieren konnte (Distler et al., 2007). Der Effekt zeigte keine messbaren toxischen Nebenwirkungen auf die Fibroblasten und war bei der Inkubation mit den profibrotischen Mediatoren TGF $\beta$  und PDGF am stärksten (Distler et al., 2007). Bei der Situation in vivo konnte die Reduktion der ECM-Moleküle und die verminderte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten an einem Bleomycin-induzierten Fibrose-Modell und dem „tight skin“-Maus-Modell, einem Tiermodell für die SSc, gezeigt werden (Akhmetshina et al.,



2009; Distler et al., 2007; Pablos et al., 2004). Imatinib erzielte darüber hinaus in verschiedenen Modellen von Lungen-, Nieren- und Leber-Fibrose positive Effekte (Abdollahi et al., 2005; Wang et al., 2005; Yoshiji et al., 2005). Vor dem Hintergrund der nicht zufriedenen stellenden Therapieoptionen bei SSc (s. Kapitel 1.1.6. Therapie) kam man deshalb bei der Suche nach neuen antifibrotischen Substanzen auf Imatinib.

Ab 2008 wurde in Fallberichten und in sehr kleinen Patienten-Kollektiven von ersten positiven klinischen Beobachtungen bei der Therapie von Patienten mit SSc, nephrogener systemischer Fibrose und sklerotischer Graft-versus-Host-Reaktion mit Imatinib berichtet (Distler et al., 2008; Kay und High, 2008; Magro et al., 2009; Olivieri et al., 2009; Sfikakis et al., 2008; van Daele et al., 2008).

Bei weiteren, größer angelegten Studien (Pilotversuche, RCT) fanden sich inkonsistente Befunde (Bournia et al., 2013). In einigen Studien führe Imatinib zu einer Verbesserung der kutanen (mRSS) und/oder der pulmonalen Symptomatik (forcierte Vitalkapazität (FVC)) (Chung et al., 2009; Gordon et al., 2014; Hatano et al., 2010; Khanna et al., 2011; Spiera et al., 2011; Tamaki et al., 2012; Guo et al., 2012), während es in anderen Studien keinen Effekt zeigte (Khanna et al., 2011; Pope et al., 2011; Prey et al., 2012). Übereinstimmend berichten viele der Autoren von einer großen Anzahl an Arzneimittelnebenwirkungen, die teilweise einen vorzeitigen Abbruch der Studien erforderten (Khanna et al., 2011; Pope et al., 2011; Spiera et al., 2011).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Rolle von Imatinib in der Therapie der SSc noch nicht abschließend geklärt ist, zumal in den oben genannten Studien nur geringe Fallzahlen vorlagen und unterschiedliche Dosisschemata zum Einsatz kamen. Umso wichtiger ist daher ein genaues pathophysiologisches Verständnis der zellulären Vorgänge bei dieser Krankheit und des Eingreifens von Imatinib in diese.

#### **1.2.5.2. Molekulare Zielproteine des Imatinib bei SSc**

Zielproteine des TKI Imatinib bei SSc sind der PDGF-R (RTK), c-Abl (TK) und potentiell SMAD1. Imatinib interferiert mit dem PDGF-Signalweg durch die Blockade der TK-Aktivität des PDGF-Rezeptors. Immunhistochemisch konnte in Hautbiopsien nach Imatinib-Therapie eine Reduktion von phosphoryliertem und damit aktiviertem PDGF-R $\beta$  nachgewiesen werden (Chung et al., 2009). In einer Studie zur Anwendung bei SSc-assoziiierter PAH kam es außerdem durch Imatinib zu einer Reduktion des PDGF-BB Spiegels im Blut (Hatano et al., 2010).

C-Abl, eine TK und ein SMAD-unabhängiges Downstream-Molekül der TGF $\beta$ -Signalkaskade, wird durch Imatinib ebenfalls inhibiert. Auf diese Weise konnte auf molekulargenetischer Ebene die TGF $\beta$ -induzierte Gen-Expression und auf zellulärer Ebene die Myofibroblasten-Differenzierung reduziert werden (Karimizadeh et al., 2015; Wang et al., 2005; Wilkes und Leof, 2006; Daniels et al., 2004).

Als dritter Angriffspunkt von Imatinib bei SSc wurde SMAD1 ins Gespräch gebracht. Die SMAD1 aktivierende Signalkaskade via Ras/MEK/ERK ist bei SSc verstärkt aktiviert und führt zu einem erhöhten Spiegel von phosphoryliertem SMAD1 (Pannu et al., 2008). SMAD1 wiederum stimuliert die CTGF-Expression, was durch Imatinib gehemmt werden kann. Als Erklärung für diesen Mechanismus könnte dienen, dass unter den pathologischen Konditionen der SSc die c-Abl zur Aktivierung der SMAD1 beiträgt (Pannu et al., 2008).

### **1.2.6. Pharmakokinetik**

Um in den verschiedenen Zielzellen bei CML, GIST und SSc wirken zu können, muss Imatinib nach der Verabreichung aufgenommen und über die Blutbahn zu den Zielzellen gebracht werden. Imatinib wird schnell (innerhalb von 1-2 h) und effektiv vom Gastrointestinal-Trakt aufgenommen. Die absolute Bioverfügbarkeit nach oraler Administrierung, im Vergleich zur intravenösen Gabe (= 100 %), beträgt bei Imatinib ca. 98 %, was bedeutet, dass das Medikament nach der Resorption praktisch komplett unverändert im systemischen Kreislauf zur Verfügung steht (Gschwind et al., 2005; Peng et al., 2004, 2005). Im Blut ist Imatinib zu 95 % an Plasmaproteine, v. a. Albumin, gebunden (Peng et al., 2005). In der Leber wird Imatinib durch die Cytochrom P450-Enzyme, kurz CYP, v. a. CYP3A4 und CYP3A5, metabolisiert. Bei diesem Prozess entsteht der pharmakologisch aktive Metabolit von Imatinib, N-Desmethyl Imatinib (CGP-74588) (Gschwind et al., 2005; Levêque und Maloisel, 2005; Peng et al., 2005). Die Halbwertszeiten für Imatinib und seinen aktiven Metaboliten betragen etwa 13 h und 20 h. Die Elimination erfolgt hauptsächlich über die Galle/Faeces in Form des Metaboliten und nur zu einem geringen Anteil über die Harnwege (Verhältnis von 5:1) (Gschwind et al., 2005; Peng et al., 2005).

2005 konnten Szakács et al. durch Titrationsexperimente zeigen, dass Imatinib beim physiologischen pH des Blutes (pH 7,4) zu 33 % als monokationisches Molekül vorliegt mit einem einzelnen Proton am Piperazinyl-Ring (N<sup>34</sup>) (s. Abb. 1.5.). Je niedrigerer der pH, desto höher der Protonierungsgrad des Imatinib. Beim duodenalen pH von 4,6 ist Imatinib zu 80 % mono- und zu 20 % dikationisch, während es beim Magen-pH von 2 zu zwei Dritteln trikationisch

(N<sup>34</sup>, N<sup>11</sup>, N<sup>31</sup>) und zu einem Drittel voll protoniert mit 4 Protonen vorliegt (N<sup>34</sup>, N<sup>11</sup>, N<sup>31</sup>, N<sup>13</sup>) (s. Abb. 1.5.) (Szakács et al., 2005).

Da Imatinib bei physiologischem pH zu 33 % als Kation vorliegt und geladene Moleküle nicht frei durch die Zellmembran diffundieren können, unterstreicht dies die Bedeutung einer Transporter-vermittelten Aufnahme in die Zielzellen. Für diese Aufnahme kommen verschiedene, für Kationen geeignete, Transportproteine in Frage.

### **1.3. Transmembrantransport und Transporter / Carrier**

Die Lipiddoppelschicht der menschlichen Zellmembranen, die aus amphiphilen Phospholipiden besteht, ist nur für unpolare, hydrophobe Moleküle permeabel und stellt für polare, hydrophile Moleküle eine Barriere dar. Daher sind bestimmte Transmembranproteine, sogenannte Transporter, auch Carrier genannt, nötig, um geladene organische Moleküle selektiv über eine Zellmembran zu transportieren (Saier, 2000).

Für geladene Moleküle, denen die freie/einfache Diffusion unmöglich ist, gibt es verschiedene Transportarten. Der passive Transport, bei dem die geladenen Moleküle dem Konzentrationsgradienten folgen, ist als erleichterte Diffusion bekannt. Diese besondere Art des Transports funktioniert ohne Energiezufuhr von außen und ist durch spezifische Transportproteine vermittelt. Diese Transport-Proteine arbeiten Substrat-spezifisch und unabhängig vom elektrischen Gradienten (Ciarimboli, 2008; Hediger et al., 2004).

Beim aktiven Transport gibt es den primär aktiven Transport und den sekundär aktiven Transport. Beim primär aktiven Transport werden Substrate unter ATP-Verbrauch, d. h. direkt Energie-abhängig, gegen den elektrischen Gradienten bewegt, z. B. durch die ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*) und Ionenpumpen. Der sekundär aktive Transport nutzt die Energie aus dem Transport eines Teilchens mit dem Konzentrations- oder dem elektrischen Gradienten aus, um ein weiteres Molekül, in Symport- oder Antiport-Funktion, gegen den Gradienten zu transportieren (Hediger et al., 2004; Saier, 2000).

#### **1.3.1. SLC-Transporter**

Die SLC-Transporter (*solute carrier*) sind eine Familie der Transmembrantransporter mit momentan 52 bekannten Mitgliedern und 395 Genen, die sowohl geladene und ungeladene organische Moleküle als auch anorganische Ionen transportieren können (Hediger et al., 2013). Zu ihr gehören Transportproteine, die eine erleichterte Diffusion über Carrier und einen sekundär

aktiven Transport ermöglichen, nicht aber erleichterte Diffusion über Kanalproteine (Ionenkanäle, Aquaporine) und nicht primär aktive ATP-abhängige Transportvorgänge (Hediger et al., 2004, 2013).

Während die SLC-Transporter innerhalb der Unterfamilien mindestens 20-25 % Sequenzhomologien aufweisen, gibt es zwischen den Familien wenige bis keine Homologien (Eraly et al., 2003; Hediger et al., 2004; Ren und Paulsen, 2005). Obwohl die SLC weit verbreitet sind und eine lange evolutionäre Entwicklung aufweisen (Eraly et al., 2003; Höglund et al., 2011), ist per Nomenklatur für die Klassifikation als SLC nicht die phylogenetische Verwandtschaft mit anderen SLC-Familien entscheidend, sondern die biologische Transport-Funktion. Per Nomenklatur ist auch die Bezeichnung der Transporter geregelt: Auf „SLC“ als Stammname folgt die Nummer der Familie (1-52) und ein einzelner Großbuchstabe (A, B, C...) als Kennzeichnung der Subfamilie.

In Zwillingsstudien wurde die Vermutung aufgestellt, dass intra- und inter-individuelle genetische Unterschiede zwischen Menschen für 20-95 % der Variabilität der Medikamenten-Effekte und der Medikamenten-Verteilung verantwortlich sein könnten (Kalow et al., 1998). Da die SLC eine wichtige Rolle bei der Aufnahme und dem Metabolismus der Medikamente spielen, können Polymorphismen wie Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) und Mutationen entscheidende Unterschiede in der Pharmakokinetik verursachen (Ciarimboli, 2008; Kerb et al., 2002; Leabman et al., 2002).

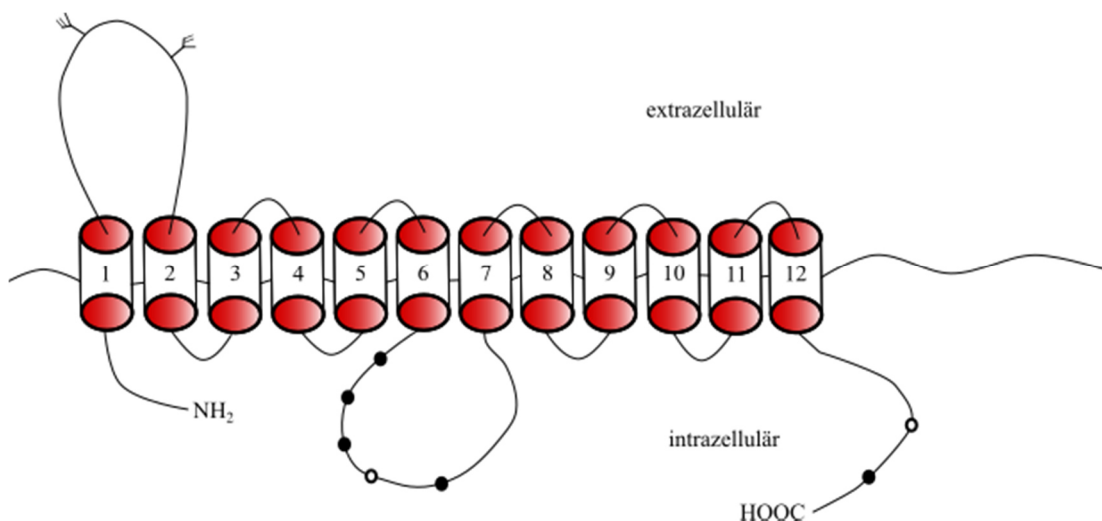
Bezüglich des Spektrums der transportierten Moleküle gibt es unter den SLC zwei Familien, die den Transport von organischen kationischen Molekülen (OC) vermitteln, die SLC22A- und die SLC47A-Transporter-Familie.

### **1.3.1.1. SLC22A-Transporter**

Die SLC22A-Transporter-Familie besteht aus den Organischen Kationen-Transportern (OCT), den Organischen Kation-/Carnitin-Transportern (OCTN), den Organischen Anionen-Transportern (OAT) und einem Urat-Transporter (URAT1) (Koepsell, 2013; Koepsell und Endou, 2004). Die meisten SLC-Transporter sind bezüglich ihrer Substratspezifität polyspezifisch und können so zur Aufnahme, Verteilung und Exkretion verschiedener Substanzen, wie Xenobiotika (Tetraethylammonium ( $\text{TEA}^+$ ), 1-Methyl-4-phenylpyridinium ( $\text{MPP}^+$ )), Medikamenten (Aciclovir, Metformin) und endogenen Stoffen (Serotonin,

Prostaglandin E<sub>2</sub>), in Leber, Niere und Gastrointestinal-Trakt beitragen (Ciarimboli, 2008; Koepsell und Endou, 2004; Koepsell et al., 2007).

Aufgrund der Sequenzhomologien innerhalb eine SLC-Familie teilen die SLC22A-Transporter ihre molekulare Struktur, die aus 12 Transmembrandomänen (TMD) mit einer  $\alpha$ -Helix als Sekundärstruktur besteht. Zwischen den TMD 1 und 2 befindet sich eine große extrazelluläre, glykosylierte Schleife und zwischen den TMD 6 und 7 liegt eine große intrazelluläre Schleife. Der C- und der N-Terminus des Proteins ist ebenfalls intrazellulär gelegen (Burckhardt und Wolff, 2000; Ciarimboli, 2008; Koepsell und Endou, 2004). An den intrazellulären Schleifen der Transporter der SLC22A-Familie zeigen sich viele mögliche, oft in allen OCT konservierte, Phosphorylierungsstellen, u. a. für Serin-/Threonin-Kinasen (Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC), Proteinkinase (PKG)) und Tyrosinkinasen, die zur Regulation der Transporter beitragen können (Burckhardt und Wolff, 2000; Ciarimboli und Schlatter, 2005) (s. Abb. 1.6.).



**Abb. 1.6.: Molekulare Topologie des hOCT1.** 12 TMD, intrazellulärer N- und C-Terminus, zwischen TMD 1 und 2 liegt eine extrazelluläre, glykosylierte Schleife und zwischen TMD 6 und 7 eine intrazelluläre Schleife mit Phosphorylierungsstellen für PKA (weiße Punkte) und PKC (schwarze Punkte). Modifiziert aus (Ciarimboli, 2008).

Die SLC22A-Carrier arbeiten mit einem passiven Transportmechanismus, als Uniporter (OCT1-3), als Anionen-Austauscher (OAT1, OAT3), als Natrium (Na<sup>+</sup>)-/OC-Cotransporter bzw. H<sup>+</sup>-/OC-Antiporter (OCTN1) und als Na<sup>+</sup>-/Carnitin-Cotransporter (OCTN2) (Koepsell und Endou, 2004; Pelis und Wright, 2014). Für den Transport von organischen Kationen kommen aus der SLC22A-Familie nur die Subgruppe der OCT und der OCTN in Frage.

### **1.3.1.1.1. OCT**

Die Mitglieder der OCT-Familie haben zwischen 550 und 560 Aminosäuren und weisen, neben der molekularen Topologie des Transporters (s. Abb. 1.6.), Spezies-übergreifend viele Gemeinsamkeiten bezüglich der Transport-Charakteristiken auf (Ciarimboli, 2008; Gorboulev et al., 1997; Koepsell et al., 2007). Die Triebkraft für den Transport ist allein der elektrochemische Gradient. Der Transport verläuft  $\text{Na}^+$ -unabhängig, Protonen-unabhängig, elektrogen, d. h. Ladungs-verschiebend, und ist reversibel (Koepsell und Endou, 2004; Koepsell et al., 2007). Bei den Substraten, die transportiert werden können, gibt es darüber hinaus viele Überschneidungen, z. B. ist der Transport der Modell-Kationen  $\text{MPP}^+$  und  $\text{TEA}^+$  durch alle OCT möglich; allerdings weisen die Transporter unterschiedliche Affinitäten auf (Koepsell et al., 2007).

#### **1.3.1.1.1.1. OCT1 (SLC22A1)**

Der OCT1 der Ratte, rOCT1, war 1994 der erste der OCT, der durch Klonen identifiziert werden konnte (Gründemann et al., 1994). Der OCT beim Menschen, hOCT1, ist v. a. in der Leber (Gorboulev et al., 1997; Zhang et al., 1997), aber auch in der Plazenta (Wessler et al., 2001) und im Bronchialgewebe (Lips et al., 2005) exprimiert und vermittelt die basolaterale Aufnahme von Substanzen in die Zelle. In der Leber bewirkt der hOCT1 mit seiner sinusoidalen Expression die Aufnahme von Xenobiotika und Medikamenten in die Hepatozyten, die dort über die Prozesse der Biotransformation entgiftet und apikal mit der Galle ausgeschieden werden können (Ciarimboli, 2008; Koepsell et al., 2007).

#### **1.3.1.1.1.2. OCT2 (SLC22A2)**

Im Gegensatz zum hOCT1 ist der hOCT2 primär in der Niere exprimiert, wo er in der basolateralen Membran lokalisiert ist. Dort trägt er zum Uptake von OC in die proximalen Tubuluszellen bei, die wiederum Medikamente und andere Substanzen über die luminale Membran mit dem Urin exkretieren können (Gorboulev et al., 1997; Koepsell und Endou, 2004; Motohashi et al., 2002). Außerdem kann der hOCT2 noch in anderen Organen wie dem Gehirn (Cortex und subkortikale Nuclei) nachgewiesen werden (Busch et al., 1998).

#### **1.3.1.1.1.3. OCT3 (SLC22A3)**

Das Expressions-Spektrum des hOCT3 ist sehr breit, denn man findet ihn im Skelettmuskel als auch in der Plazenta, in der Leber, der Niere, im Herz und im zentralen Nervensystem (Inazu et

al., 2003; Koepsell et al., 2007; Shang et al., 2003; Verhaagh et al., 1999; Wessler et al., 2001; Wu et al., 2000). Im Gehirn trägt der hOCT3 u. a. zur Regulation der Salzaufnahme und der interstitiellen Konzentration von monoaminen Neurotransmittern und Neurosteroiden bei, weswegen er auch als extraneuronaler Monoamin-Transporter bezeichnet wird (Gründemann et al., 1998; Vialou et al., 2004).

### **1.3.1.1.2. OCTN**

#### **1.3.1.1.2.1. OCTN1 (SLC22A4)**

Der OCTN1 unterscheidet sich von den OCT bezüglich der molekularen Topologie v. a. durch ein Nukleotid-Bindungsstellen-Motiv, weshalb er als neuartig (*Novel*) bezeichnet wurde (Tamai, 2013; Tamai et al., 1997). Er ist in verschiedenen Organen und Geweben, u. a. in der Niere, der Trachea, im Knochenmark, in Spermien, in Mitochondrien und in Monozyten exprimiert (Gründemann et al., 2005; Lamhonwah und Tein, 2006; Tamai et al., 1997, 2004; Xuan et al., 2003).

Zu seinem Transport-Mechanismus und seiner Funktion gibt es verschiedene Hypothesen. Einerseits arbeitet der OCTN1 bidirektional, multispezifisch, elektroneutral und pH-abhängig als H<sup>+</sup>-/OC-Antiporter, mit einer niedrigeren Aktivität bei azidischem pH extrazellulär (Koepsell und Endou, 2004; Tamai, 2013; Tamai et al., 1997; Yabuuchi et al., 1999). Daher wurde vermutet, dass er u. a. bei der Exkretion von Xenobiotika und der Resorption von OC, z. B. apikal an der Bürstensaummembran der proximalen Tubuli, eine Rolle spielen könnte (Jong et al., 2011; Koepsell und Endou, 2004; Tamai, 2013; Tamai et al., 1997, 2004; Yabuuchi et al., 1999).

Andererseits zeigten Gründemann et al. 2005, dass der OCTN1 ein hochspezifischer Aufnahme-Transporter für das zwitterionische Antioxidans Ergothionein (ET) ist ( $K_m$  21  $\mu$ mol) (Cheah und Halliwell, 2012; Gründemann et al., 2005; Gründemann, 2012). Deshalb wird eine andere Funktion des OCTN1 in der Regulation des oxidativen Stresses durch die ET-Aufnahme gesehen. Da OCTN1 ET 100-fach effizienter aufnimmt als die OC TEA<sup>+</sup> und Carnitin, wurde auch die Bezeichnung „ET-Transporter“ für den OCTN1 vorgeschlagen (Gründemann et al., 2005). Während bei OCTN1 andere OC (z. B. TEA<sup>+</sup>) zusammen mit H<sup>+</sup> durch eine Antiporter-Funktion aufgenommen werden, wird ET zusammen mit Na<sup>+</sup> durch einen Kotransport in die Zelle befördert (Gründemann et al., 2005).

Darüber hinaus konnte eine signifikante Assoziation zwischen dem OCTN1 und der rheumatoiden Arthritis nachgewiesen werden. Ein SNP in einem der Transkriptionsfaktoren, die die Transkription des OCTN1 steuern, RUNX1 (*Runt-related transcription factor 1*), bewirkt eine erhöhte Suszeptibilität für rheumatoide Arthritis (Tokuhira et al., 2003).

#### **1.3.1.1.2.2. OCTN2 (SLC22A5)**

Der OCTN2 ist ein Na<sup>+</sup>-Carnitin-Cotransporter mit einer hohen Affinität für Carnitin (K<sub>m</sub> 4,3 μmol) (Koepsell et al., 2007; Ohashi et al., 1999; Tamai et al., 1998, 2001; Wagner et al., 2000). Er ist in vielen Zellen exprimiert, besonders stark in der Niere, der Skelettmuskulatur, der Plazenta und im Herz (Grigat et al., 2009; Tamai et al., 1998, 2001; Wu et al., 1999). Neben Carnitin transportiert der OCTN2 polyspezifisch auch verschiedene andere OC, z. B. TEA<sup>+</sup> und Verapamil, allerdings Na<sup>+</sup>-unabhängig (Ohashi et al., 2001; Wu et al., 1998, 1999).

Da Fettsäuren ohne Carnitin nicht in die Mitochondrien zur β-Oxidation aufgenommen werden können, wurde daraus geschlossen, dass der OCTN2 ein essentieller Transporter für die Carnitin-Aufnahme und damit für den Fettsäure-Stoffwechsel darstellt (Tamai, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen des OCTN2 zu einer ungenügenden Carnitin-Aufnahme in die Muskelzellen führen und so die primäre systemische Carnitin-Defizienz, eine Stoffwechselerkrankung, verursachen (Hashimoto et al., 1998; Koizumi et al., 1999; Nezu et al., 1999; Tang et al., 1999).

#### **1.3.1.1.3. Regulation der SLC22A-Transporter**

Die SLC22A-Transporter sind auf vielfältige Weise reguliert. Einerseits ist eine kurzfristige Regulation durch Phosphorylierung an den Phosphorylierungs-Konsensussequenzen bekannt, die Subtyp-, Spezies- und Gewebe-abhängig ist und zu einer geänderten Affinität für bestimmte Substrate führen kann. Andererseits gibt es eine Langzeit-Regulation der SLC22A-Transporter, die u. a. über Hormone und die Transkriptions-Kontrolle vermittelt wird (Ciarimboli und Schlatter, 2005).

OCT1 wird durch die PKA inhibiert und durch Calmodulin, die Calmodulin-abhängige Kinase II und die TK Lck (*lymphocyte specific protein tyrosine kinase*) stimuliert (Ciarimboli und Schlatter, 2005; Ciarimboli et al., 2004). Passend zu einer Lokalisation an der basolateralen Seite der Hepatozyten ist die Transkriptions-Regulation des OCT1-Promoters u. a. über den HNF-4α



(*Hepatocyte nuclear factor 4  $\alpha$* ), einen Leber-assoziierten nukleären Transkriptionsfaktor, der als Homodimer an die DNA bindet, gesteuert (Saborowski et al., 2006).

Als Mitglied der SLC22A wird OCT2 ebenfalls durch die PKA inhibiert und durch Calmodulin und die Calmodulin-abhängige Kinase II stimuliert (Cetinkaya et al., 2003; Ciarimboli und Schlatter, 2005). Darüber hinaus wird der OCT2 durch die PI3-Kinase und den second Messenger zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) gehemmt, der vermutlich an ein cGMP-bindendes Protein andockt und auf diese Weise mit dem OCT2 interagiert (Cetinkaya et al., 2003; Ciarimboli und Schlatter, 2005; Schlatter et al., 2002).

Im Gegensatz dazu zeigt sich bei OCT3 keine typische Aktivierung durch Proteinkinasen, sondern eine verstärkte Aktivierung im dephosphorylierten Stadium. Durch die Protein-Serin-/Threonin-Phosphatase und die Protein-Tyrosin-Phosphatase, die die Phosphorylierung durch die ihnen entgegen gesetzten Kinasen rückgängig machen, erfolgt eine signifikante Stimulation des Substrat-Transportes (Martel et al., 2001). Durch Calmodulin und die Calmodulin-abhängige Kinase II sowie die Phosphodiesterase 1, die den Abbau von cGMP bewirkt, wurde OCT3 ebenfalls aktiviert (Ciarimboli und Schlatter, 2005; Martel et al., 2001; Massmann et al., 2014).

Für OCTN1 konnte gezeigt werden, dass eine Regulation durch das *Scaffold*-Protein NHE-RF3 (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 3*) besteht. NHE-RF3 interagiert mit dem C-terminalen Ende des OCTN1 und ist so an seinem molekularen Trafficking und der Lokalisation in der Bürstensaummembran der proximalen Tubuli beteiligt (Ciarimboli und Schlatter, 2005; Gisler et al., 2003).

### 1.3.1.2. SLC47A-Transporter

Die SLC47A-Transporter-Familie besitzt zwei bisher bekannte Mitglieder, MATE1 (SLC47A1) und MATE2 (SLC47A2), die „*Multidrug and Extrusion Proteins*“. Die MATE arbeiten als polyspezifische, elektroneutrale, bidirektionale H<sup>+</sup>-/OC-Antiporter und sind entscheidend an der transepithelialen Sekretion von OC beteiligt (Motohashi und Inui, 2013a; Omote et al., 2006; Otsuka et al., 2005; Pelis und Wright, 2014). Während OCT1 und OCT2 primär basolateral in Leber und Niere lokalisiert sind und eine OC-Aufnahme bewirken, befinden sich die MATE in den apikalen Membranen der Nieren-Tubuli und der Gallenkanälchen. Dort bewirken sie die Sekretion der, durch die OCT aufgenommenen, OC in Urin und Galle und orchestrieren so zusammen mit OCT die Exkretion von OC im Menschen (Meyer zu Schwabedissen et al., 2010; Motohashi und Inui, 2013a, 2013b; Otsuka et al., 2005; Sato et al., 2008; Staud et al., 2013).

Die molekulare Topologie der SLC47A-Transporter unterscheidet sich von der der SLC22A-Transporter. Während MATE in Bakterien und Pflanzen 12 TMD aufweist, zeigen sie im Menschen 13 TMD mit einem externen COOH-Terminus. Zwischen TMD 12 und 13 befindet sich eine große zytolasmatische Schleife. Der N-Terminus liegt intrazellulär (Zhang und Wright, 2009; He et al., 2010; Motohashi und Inui, 2013a). Obwohl sie für die Transport-Funktion nicht notwendig ist, scheint die TMD 13 die Umsatzrate des MATE zu beeinflussen (Zhang und Wright, 2009).

Für die Substrat-Selektivität muss gesagt werden, dass MATE1 und MATE2 ein breites Spektrum an OC transportieren und dabei in der Selektivität untereinander stark überlappen (Astorga et al., 2012; Motohashi und Inui, 2013a; Ohta et al., 2009; Tanihara et al., 2007).

#### **1.3.1.2.1. MATE1 (SLC47A1)**

Der MATE1 ist vor allem in den proximalen Tubuli der Niere, aber auch in der Plazenta, der Leber und der Skelettmuskulatur exprimiert (Otsuka et al., 2005; Terada et al., 2006). Durch seine Funktion als  $H^+$ -/OC-Antiport arbeitet MATE1, wie auch MATE2, pH-abhängig (Motohashi und Inui, 2013a). Ein sehr potenter und spezifischer Inhibitor dieser Transportfunktion ist das Antiprotozoikum Pyrimethamin ( $K_m$  77 nmol) (Ito et al., 2010).

#### **1.3.1.2.2. MATE2 (SLC47A2)**

Bei MATE2 sind mehrere Isoformen, die durch Spleißvorgänge entstehen, identifiziert worden, u. a. MATE2-B und MATE2-K. MATE2-K tritt nur in der Bürstensaummembran der proximalen Tubuli der humanen Niere auf (Koepsell et al., 2007; Masuda et al., 2006). Zusammen bewirken MATE1 und MATE2-K in der Niere die Exkretion von OC über die Bürstensaummembran (Masuda et al., 2006; Motohashi und Inui, 2013a).

## **1.3.2. Imatinib und Transporter**

### **1.3.2.1. Imatinib-Influx**

Thomas et al. konnten 2004 zeigen, dass die Imatinib-Aufnahme in CML-Zellen temperaturabhängig abläuft, was auf einen aktiven Aufnahmeprozess hindeutet (Thomas et al., 2004). Weiterhin konnten sie als Erstes durch einen funktionellen Aktivitäts-Assay mit spezifischen Inhibitoren des hOCT1 darlegen, dass die Imatinib-Aufnahme bei CML über den hOCT1, und nicht über hOCT2 oder hOCT3 vermittelt wird (Thomas et al., 2004). White et al. konnten diese Ergebnisse 2006 bestätigen, indem sie mit Prazosin, einem hOCT1-Inhibitor, die intrazelluläre Imatinib-Aufnahme hemmten (White et al., 2006). Patienten mit einer hohen hOCT1-Expression zeigten in retrospektiven Studien ein signifikant besseres zytogenetisches Ansprechen und eine längere Gesamtüberlebenszeit, sodass die hOCT1-Expression vor Therapie-Beginn sogar als potenter Prädiktor für das zytogenetische Ansprechen vorgeschlagen wurde (Crossman et al., 2005; Eechoute et al., 2011; Nardinelli et al., 2012; Wang et al., 2008; White et al., 2006).

In einer Arbeit von Hu et al. hingegen konnte mit einem *Xenopus laevis*-Modell weder eine Interaktion zwischen OCT1 und Imatinib nachgewiesen werden, noch zeigten Patienten mit Funktions-reduzierten Gen-Varianten des hOCT1 signifikant geänderte Plasma-Konzentrationen des Medikaments (Hu et al., 2008). Alternativ wurden durch Hu et al. mithilfe des *Xenopus laevis*-Modells weitere mögliche Imatinib-Uptake-Transporter identifiziert, die für andere TKI durch andere Arbeitsgruppen ebenfalls als aufnehmende Transporter vorgeschlagen wurden: OCTN2 (SLC22A5) sowie OATP1A2 und OATP1B3, die beide Mitglieder der SLC21A-Transporter-Familie sind (Hu et al., 2008; Khurana et al., 2014a, 2014b). Darüber hinaus wurden MATE1 und MATE2 als mögliche Carrier postuliert. Da Imatinib und andere TKI bei klinisch relevanten Konzentrationen starke hemmende Effekte auf OCT1, MATE1 und MATE2 demonstrierten, wurde daraus geschlossen, dass Imatinib ein Substrat dieser Transporter sein könnte und es zu einem signifikanten Wechselspiel zwischen Imatinib und anderen Substraten dieser SLC kommen kann (Minematsu und Giacomini, 2011).

### **1.3.2.2. Imatinib-Efflux**

Es gibt verschiedene Carrier, die für den Efflux von Medikamenten und dadurch für Medikamenten-Resistenzen verantwortlich gemacht werden, u. a. die ABC-Transporter-Familie mit den Subfamilien ABCA-ABCG. Die ABC-Transporter binden Substrate spezifisch und

vermitteln einen primär aktiven Transport gegen den Konzentrationsgradienten unter Hydrolyse von ATP (Dean et al., 2001; Kunjachan et al., 2013).

Bis zu 40 % der CML-Patienten entwickeln unter der Imatinib-Therapie eine Resistenz gegen TKI, was einerseits auf *BCR-ABL*-Kinase-Domäne-Mutationen und Gen-Amplifikation zurückgeführt wird, andererseits aber auch auf die ABC-Transporter (Apperley, 2007; Burger und Nooter, 2004; Francis et al., 2013; Giannoudis et al., 2014; Lucas et al., 2008; Mahon et al., 2000).

Bisher konnte gezeigt werden, dass Imatinib ein Substrat der Effluxpumpen ABCB1 (Burger et al., 2005; Czyzewski und Styczynski, 2009; Dai et al., 2003; Hu et al., 2008; Thomas et al., 2004; Hamada et al., 2003), ABCG2 (Burger et al., 2004, 2005; Eechoute et al., 2011; Hu et al., 2008; Noguchi et al., 2009), ABCC1 (Czyzewski und Styczynski, 2009) und ABCC3 (Eechoute et al., 2011; Giannoudis et al., 2014) ist. In Experimenten war u. a. in ABCB1-transfizierten Zellen der Imatinib-Transport nach extrazellulär signifikant stärker als die Imatinib-Aufnahme nach intrazellulär und außerdem durch spezifische ABCB1-Inhibitoren hemmbar (Illmer et al., 2004; Mahon et al., 2003; Thomas et al., 2004).

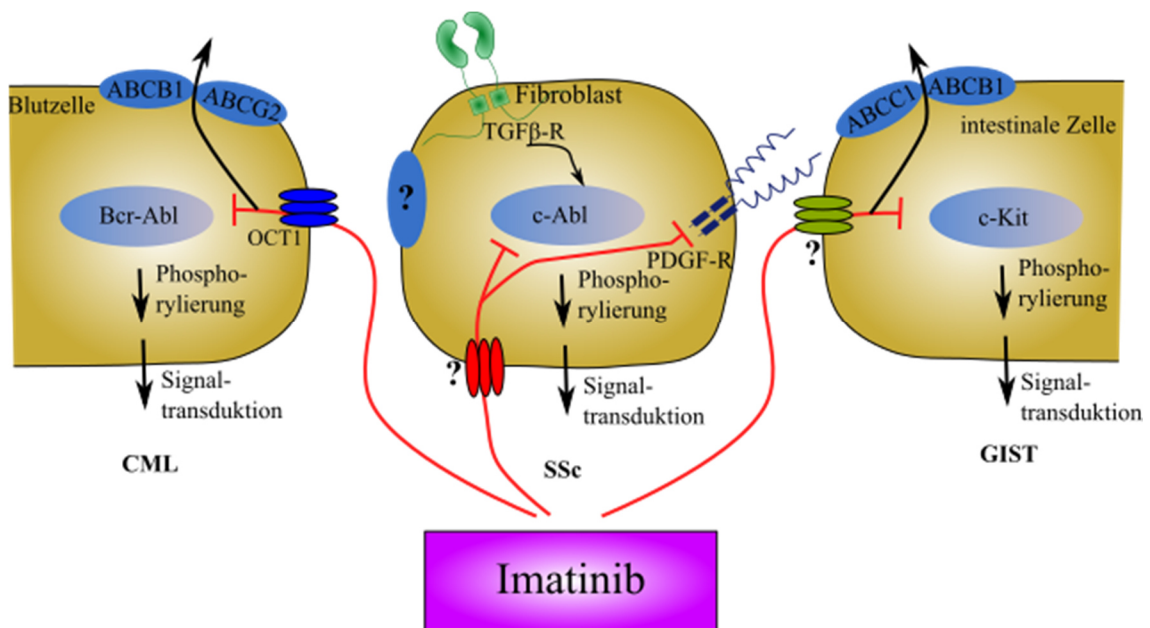
Vor Beginn der Therapie bei CML scheint keine signifikante Korrelation zwischen der Expression der ABCB1, ABCG2 und ABCC1 und dem Therapie-Erfolg zu bestehen (Crossman et al., 2005; Eechoute et al., 2011; Wang et al., 2008). Im Gegensatz dazu führt die kontinuierliche Exposition mit Imatinib zu einer deutlichen Heraufregulation der ABC-Transporter-Expression, 17-fach bei ABCG2 und 5-fach bei ABCB1, sodass die intrazelluläre Akkumulation von Imatinib bei CML im Verlauf der Therapie signifikant sinkt (Burger et al., 2005). Darüber hinaus zeigten Patienten mit einer hohen ABCC3-mRNA-Expression ein schlechteres Ansprechen auf die Imatinib-Therapie (Giannoudis et al., 2014).

Interessanterweise konnten Hu et al. 2008 in einer Mikroarray-Analyse nachweisen, dass es bei CML-Zellen bezüglich der mRNA-Expression der SLC- und ABC-Transporter eine Wechselbeziehung gibt. Diese Verknüpfung zwischen OCT1 und OATP1A2, ABCB1, ABCC3 und ABCG2 könnte eine weitere Erklärung dafür sein, warum die OCT1-Expression als Prädiktor für den Therapie-Erfolg dienen kann (Hu et al., 2008).

Zur klinischen Bedeutung von genetischen Varianten, wie SNP, bezüglich des Imatinib-Efflux durch die ABC-Transporter gibt es unterschiedliche, z. T. widersprüchliche Ergebnisse. Einige Polymorphismen scheinen das Ansprechen auf eine Imatinib-Therapie zu verbessern (Ni et al., 2011) und andere zu verschlechtern (Eechoute et al., 2011; Kim et al., 2009).

Bei den GIST spielen für den Efflux unter Imatinib-Therapie ABCB1 und ABCC1 eine Rolle; ABCG2 scheint nicht exprimiert zu sein (Eechoute et al., 2011; Pérez-Gutiérrez et al., 2007; Plaats et al., 2000; Théou et al., 2005).

Trotz der großen pharmakologischen Bedeutung der ABC-Transporter bei der Imatinib-Therapie gibt es noch ungeklärte Fragen. Bisher adressiert keine Arbeit die Ausschleusungsmechanismen bei SSc sowie den Imatinib-Influx bei GIST.



**Abb. 1.7.: Imatinib-Signalkaskade bei CML, SSc und GIST.** Imatinib wird über SLC-Transporter in die Effektorzellen (CML-Zellen, Fibroblasten und GIST-Zellen) aufgenommen und wirkt als TKI hemmend auf die Bcr-Abl, c-Abl, den PDGF-R und c-kit. Dadurch wird die, durch diese TK/RTK vermittelte, Phosphorylierung und Signaltransduktion verhindert. Bei CML ist vermutlich OCT1 für die Aufnahme verantwortlich, bei SSc und GIST sind die Transporter bis jetzt unbekannt. Bei CML können die ABC-Transporter ABCB1 und ABCG2 und bei GIST die ABC-Transporter ABCB1 und ABCC1 einen Efflux des Imatinib bewirken. Zu SSc liegen bisher keine Daten vor. Modifiziert nach <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA164713427#PGG>, Connie Oshiro, abgerufen am 6.12.2015, 21.33 Uhr.

## **2. Ziel der Arbeit**

Das Ziel meiner Arbeit ist die Untersuchung der Aufnahme von Imatinib in dermale Fibroblasten, wobei die SSc-Fibroblasten (SSc-F) mit humanen Hautfibroblasten (hH-F) von gesunden Probanden als Kontrolle verglichen wurden.

Ein Aspekt war die Charakterisierung der Transporter-Vorgänge bezüglich ihrer Abhängigkeit von Temperatur, Kinetik und pH.

Darüber hinaus wurde untersucht, welche Transporter in SSc-F und hH-F exprimiert sind und welche Transporter aufgrund ihrer Eigenschaften für die Imatinib-Aufnahme in die Fibroblasten in Frage kommen.

Im Weiteren wurde eruiert, ob sich durch die zwei Schlüsselmediatoren der SSc, TGF $\beta$  und PDGF, die Expression der Transporter oder die Imatinib-Akkumulation ändert.

Für die Charakterisierung der Transporter-Vorgänge und die Imatinib-Aufnahme wurden zwei Methoden angewandt: Die indirekte Mikrofluorimetrie-Methode, bei der die Aufnahme eines fluoreszierenden organischen Kations (OC) durch Imatinib gehemmt und mit einem Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Lesegerät vermessen wurden, sowie der direkte Imatinib-Nachweis in Zelllysaten per HPLC (*high performance liquid chromatography*) nach Inkubation mit einer Imatinib-Lösung.

Für die Bestimmung der Expression der Transporter basal und nach Stimulation mit den Mediatoren fanden die semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die quantitative PCR Anwendung.

## 2.1. Vorarbeiten

### 2.1.1. Kompetitive Inhibition der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme durch Imatinib: IC<sub>50</sub>-Werte

Die medizinische Doktorandin Meike Fischer, die Diplomandin Marion Viktor und die naturwissenschaftliche Doktorandin Saliha Harrach führten jeweils kompetitive Inhibitions-Experimente mit HEK 293-Zellen, die stabil mit den organischen Kationentransportern hOCT1-3, hOCTN1-2 und hMATE1 transfiziert wurden, durch. Mit der Mikrofluorimetrie-Methode konnten sie an den verschiedenen Zelltypen zeigen, dass die Aufnahme des fluoreszierenden organischen Kations 4-(4-(Dimethylamino)styryl)-N-Methylpyridinium Iodid (ASP<sup>+</sup>) mit steigenden Imatinib-Konzentrationen abnahm. Hierdurch ließ sich für die apparente Affinität ein IC<sub>50</sub>-Wert, eine mittlere inhibitorische Konzentration, bestimmen, bei dem durch einen Antagonisten, bzw. Inhibitor, eine halbmaximale Inhibition des Transportvorganges (50 %) erreicht wird. Für die mit hOCTN2 transfizierten HEK 293-Zellen konnte kein IC<sub>50</sub>-Wert der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme bestimmt werden, da ASP<sup>+</sup> kein spezifisches Substrat des hOCTN2 darstellt (Victor, 2010) (Daten nicht gezeigt), was auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte (Grigat et al., 2009).

**Tabelle 2.1.: IC<sub>50</sub>-Werte für Imatinib an hOCTs.** Die Bestimmung der apparenten Affinitäten (IC<sub>50</sub>-Werte) der verschiedenen Transporter für Imatinib wurde mittels Hemmung der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme in, mit dem entsprechenden Transporter, stabil transfizierten HEK 293-Zellen durchgeführt. Diese Werte wurden durch Meike Fischer, Marion Viktor und Saliha Harrach bestimmt.

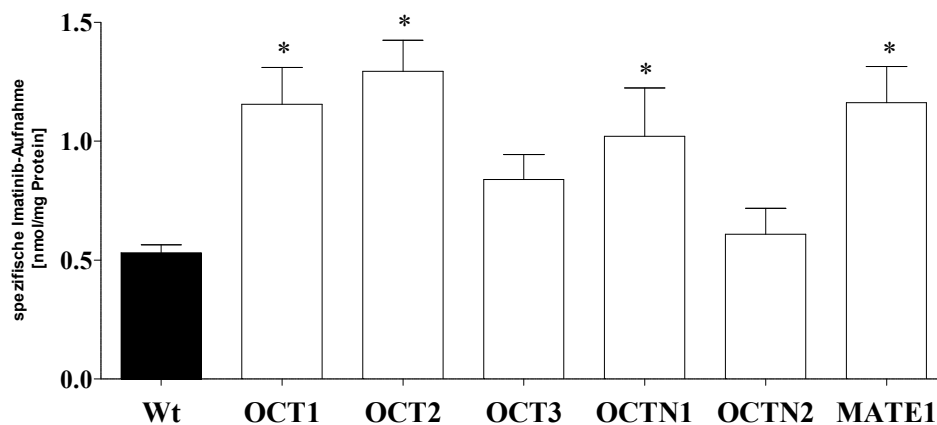
hOCT	IC <sub>50</sub> -Wert Imatinib
hOCT1	5 µmol
hOCT2	3 µmol
hOCT3	53 µmol
hOCTN1	31 µmol
hMATE1	21 nmol

Imatinib führt zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme (siehe Tabelle 2.1.). Während die IC<sub>50</sub>-Werte für hOCT1 und hOCT2 mit 5 µmol und 3 µmol beide im einstelligen µmol-Bereich liegen, zeigen hOCT3 und hOCTN1 deutlich höhere IC<sub>50</sub>-Werte im zweistelligen µmol-Bereich. Mit einer apparenten Affinität von 21 nmol stellt sich Imatinib als potentester Inhibitor der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme bei hMATE1 heraus.

### 2.1.2. Transporter-vermittelte Aufnahme von Imatinib in transfizierte HEK-Zellen

Die direkte Aufnahme von Imatinib in die transfizierten HEK-Zellen wurde durch Meike Fischer und Saliha Harrach mit der Imatinib-Akkumulations-Methode untersucht, bei der die SLC-überexprimierenden HEK 293-Zellen 10 min mit einer 10  $\mu$ mol Imatinib-Lösung bei 37 °C inkubiert und der Imatinib-Gehalt der Zelllysate in der HPLC vermessen wurde.

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass HEK 293-Zellen, die hOCT3 und hOCTN2 überexprimieren, keine signifikant unterschiedliche Imatinib-Aufnahme zum HEK 293-Wildtyp zeigen (s. Abb. 2.1.). Demnach besitzen sie nur eine geringe Funktion in der Imatinib-Aufnahme. Im Gegensatz dazu weisen HEK 293-Zellen mit einer Überexpression von hOCT1 und hOCT2 ( $1,2 \pm 0,2$  und  $1,3 \pm 0,1$  nmol/mg Protein) sowie hOCTN1 und hMATE1 ( $1,0 \pm 0,2$  und  $1,2 \pm 0,2$  nmol/mg Protein) eine signifikant höhere Imatinib-Konzentration in den Lysaten im Vergleich zur Kontrolle ( $0,5 \pm 0,03$  nmol/mg Protein) auf. Diese Tatsache bestätigt, dass diese SLC Imatinib in signifikanter Weise transportieren können und qualifiziert sie als mögliche Imatinib-Transporter in verschiedenen Zelltypen.



**Abb. 2.1.:** Ergebnisse der Imatinib-Akkumulation bei HEK 293-Wildtyp-Zellen (= Wt) und stabil mit hOCT1-3, hOCTN1-2 und hMATE1 transfizierten HEK 293-Zellen. Zur Bestimmung wurde die Imatinib-Akkumulations-Methode angewendet, Normalisierung auf nmol/mg Protein. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 4-12$ . \* = signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (HEK 293-Wildtyp-Zellen) mit one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test. Darstellung von Saliha Harrach.



## 3. Material

### 3.1. Geräte

Tabelle 3.1.: Für die experimentellen Arbeiten verwendete Geräte.

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Abzug	Abzug Köttermann	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze
	Abzug Waldner	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen
Autoklav	Varioklav	HP Labortechnik GmbH, Oberschleissheim
	System VX-75	System GmbH, Linden
Chemilumineszenz-Detektor	Lumi-Imager F1 Workstation	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
CO <sub>2</sub> -Inkubatoren	Heraeus BB 16	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
	Forma™ 311	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Einfrierbehälter	Nalgene® Mr. Frosty™	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Eismaschine	Ziegra ZBE 70-35	Ziegra Eismaschinen Isernhagen, Germany
Elektrophorese-System (SDS-PAGE)	Mini-PROTEAN Tetra Cell Elektrophorese Zelle	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gefrierschrank/ Kühlschrank/	Bosch cooler	Robert Bosch GmbH, Gerlingen
	Bosch Comfort, GSN40A31	Robert Bosch GmbH, Gerlingen
	AEG, Öko Santo electronic	AEG, Nürnberg
Gelelektrophorese-System	PerfectBlue™, Mini ExM	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Heizblock	Modell DB-2A	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK
	Thermoblock TB1	Biometra GmbH, Göttingen
HPLC ( <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> )	Accela 600 HPLC mit - Accela UV/VIS-Detector - Accela Autosampler - Accela 600 Pumpe	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
HPLC-Säule	Accucore C18 (RP18, ODS) (2.6 µm; 2.1 × 100 mm)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

HPLC-Vorsäule	Accucore C18 Defender Vorsäule (2.6 µm; 2.1 × 10 mm)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
inverses Mikroskop	Zeiss Axiovert 25 C	Carl Zeiss AG, Oberkochen
	Zeiss Axio Vert.A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Magnetrührer	Variomag® Mono	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim
	Variomag® Mono Komet	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim
	IKAMAG®, Typ RH	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikrotiterplatten- Fluoreszenz- Lesegerät	Infinite® F200	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Mikrowelle	exquisit Mikrowelle MW 2700	GGV Handelsgesellschaft mbH & Co. KG, Kaarst
Multipette	Eppendorf Multipette® Plus	Eppendorf AG, Hamburg
pH-Meter	InoLab® Labor pH-Meter 720	WTW, Weilheim
Pipette	Eppendorf Research® plus, 0.1-2.5 µL, 0.5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100- 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	Accu-jet® pro	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim
	neoAccupette	neoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH, Heidelberg
Pumpe	VWR Vakuum-Pumpe	VWR International GmbH, Darmstadt
qPCR Maschine	CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Schüttler	MS 1 Mini shaker	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Sterilbank	Hera Safe, HS18	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Stickstofftank	Forma™ Cryo 100, Modell 741	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Stromversorgungs- gerät (Elektrophorese)	Biometra Power Pack P25, 200W	Biometra GmbH, Göttingen
Thermocycler	T-Gradient Thermocycler, Model TGradient 96	Biometra GmbH, Göttingen

Tiefkühlschrank, -86 °C	Ultra-Tiefkühlschrank	Panasonic Marketing Europe GmbH, Hamburg
Ultraschallbad	Sonorex, TK30	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
UV Transilluminator	AlphaImager® Mini	Cell Biosciences, Inc., Santa Clara, USA
UV/VIS- Spektrophotometer	Picodrop 100, Modell PICOPET01	Picodrop Limited, Hinxton, UK
Vortex	Vibrofix VF 1	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
	Heidolph™ Reax Top Vortex Mixer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
	Vortex-Genie 2, Model G560E	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
	Vortex Mixer Wizard	VELP Scientifica, Usmate, Italien
Waage	Sartorius MC1 Laboratory LC 620 S	Sartorius AG, Göttingen
	Typ ABS 120-4	Kern & Sohn GmbH, Balingen
	KERN 572-45	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Wägetisch	Köttermann Wägetisch	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze
Wasserbad	JB Nova	Grant Instruments, Cambridge, UK
Wasservoll- entsalzer	behropur®, Typ B5	behr Labor Technik GmbH, Düsseldorf
Wippschüttler	Biometra WT 16	Biometra GmbH, Göttingen
Zellzähler	Roche Innovatis Casy TTC Cell Counter & Analyser System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Zentrifuge	5804R	Eppendorf AG, Hamburg
	Rotilabo®-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
	MIKRO 200 R, Typ 2405	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
	Centrifuge MiniSpin®	Eppendorf AG, Hamburg
	Centrifuge MiniSpin® plus	Eppendorf AG, Hamburg
	FVL-2400N Combi-Spin	biosan, Riga, Lettland
	Hettich Mikro 20, Modell 200424	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

### 3.2. Chemikalien

**Tabelle 3.2.: Für die experimentellen Arbeiten verwendete Chemikalien.**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
1-Methyl-4-phenylpyridinium Iodid (MPP <sup>+</sup> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
2-Propanol 70 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure-Natriumsalz (HEPES-Na <sup>+</sup> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
4-(4-(Dimethylamino)styryl) - N-Methylpyridinium Iodid (ASP <sup>+</sup> )	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Acetonitril, HPLC für die Gradientenanalyse	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Ameisensäure, ~98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase mit Puffer I und Puffer II	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Betain PCR Reagenz, 5 M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Biozym LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bromophenol Blau	AMRESCO LLC, Solon, USA
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumgluconat Monohydrat (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> CaO <sub>14</sub> * H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA, Darmstadt
cOmplete™, EDTA-freie Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
cOmplete™, Mini, EDTA-freie Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
D(+)-Glucose, wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 3 H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DNA Clean & Concentrator™-5	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg
Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP) Mix, 10 mmol	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Doxycyclinhyclat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DPBS ( <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

DPBS, modifiziert, ohne Calcium- und Magnesium-Chlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DreamTaq™ DNA Polymerase, 5 U/μL	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Essigsäure, 100 %	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 70 % vergällt	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung 1 % in Wasser, 10 mg/mL	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat (Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
FCS ( <i>Fetal Calf Serum</i> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Gelantine aus Fischhaut, 40-50 % in H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Gene Ruler 100 bp DNA ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Glycerol	AMRESCO LLC, Solon, USA
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Imatinib Mesylat	LC Laboratories, Woburn, USA
Kalilauge (KOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
L-Carnitin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
L-(+)-Ergothionein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Lumi-Light <sup>PLUS</sup> Western Blotting Substrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgO <sub>4</sub> S * 7 H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol 100 % zur Analyse	AppliChem GmbH, Darmstadt
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Natriumacetat-Trihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumpropionat, ≥99.0 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natronlauge (NOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
N-Methyl-D-glucamin, 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
NuPAGE® LDS Sample Buffer, 4X	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Oligo(dT)15 Primer, 500 μg/mL	Promega, Mannheim
Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PDGF-AB, rekombinant, 10 ng/mL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Penicillin-Streptomycin, 10,000 U/mL Penicillin und 10 mg/mL Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pyrimethamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Random Primer	Promega, Mannheim
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden
Roti®-Stocklösung, 20 % SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
SuperScript® III Reverse Transcriptase, 200 U/µL	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
TGFβ1, rekombinant, 10 ng/mL	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tris Hydrochlorid, ≥99 %, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton® X-100	Merck KGaA, Darmstadt
Trypsin EDTA (1x) 0,05 %/0,02 % in DPBS	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Wasser (H <sub>2</sub> O), DEPC-behandelt, steril filtriert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Wasser (H <sub>2</sub> O), HPLC für die Gradientenanalyse	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg

### 3.3. Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3.3.: Für die experimentellen Arbeiten verwendete Verbrauchsmaterialien.**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Blotting Papier	ALBET LabScience, Hahnemühle FineArt GmbH, Dassel
CASY Gefäß	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
CASY ton	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Combitips advanced®, 10 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Einfriergefäß CryoPure 1,6 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Filterpapier	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Handschuhe Vasco® Sensitive, small/medium/large	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Handschuhe Peha-soft® nitrile fino, small/medium/large	Paul Hartmann AG, Heidenheim
HPLC-Durchstechflasche, Flasche G 1-ME, braun	Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe

HPLC-Mikroeingang, G30r, 250 µL	Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe
HPLC-Schraubverschluss für Durchstechflasche G8-L+DS	Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe
MicroAmp® Optical Adhesive Covers	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Mikroreaktionsgefäß 1,5 mL, 2 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Mikroreaktionsgefäß 1,5 mL schwarz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mikrotiterplatte, 384 well für qPCR	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mini-Protean® TGX™ Precast Gels (4-20 %)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Nonidet P40 Substitute	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pasteurpipetten	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim
PCR-Mikroreaktionsgefäß, 8-well strip	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim
Pipettenspitzen 10 µL, 200 µL, 1000 µL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen für Picodrop, P10 UVpette	Biozym Vertrieb GmbH, Hessisch Oldendorf
Proben-Tüte	Nasco, Fort Atkinson, USA
PVDF-Membran für Western Blotting	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Reinigungstücher	Kimberly-Clark Professional, Roswell, USA
Rührfisch	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Spritze Omnifix® 100 Solo	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritzen-Filter 4 mm x 0.45 µm, Polypropylenmembran	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Spritzen-Spitze, Kanüle 20 G 1 1/2 0,9 x 40 mm	BD™ Microlance, Heidelberg
serologische Pipette, Stripette® 1 mL, 2 mL, 10 mL, 20 mL, 50 mL	Corning Life Sciences, Tewksbury, USA
Zellschaber	CytoOne, USA Scientific, Inc., Ocala, USA
	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflasche Cellstar®, 75mL Flasche	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkultur-Platten Cellstar® 6-well, 12-well, 24-well, 48-well, 96-well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zentrifugengefäß 15 mL, 50 mL	Corning Life Sciences, Tewksbury, USA
	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

### 3.4. Puffer und Lösungen

Tabelle 3.4.: Für die experimentellen Arbeiten hergestellte Puffer und Lösungen.

Name des Puffers / der Lösung	Herstellung
Blaumarker für PCR (10x)	0,05 % Bromphenol Blau 40 % Glycerol 4 °C ad destilliertes Wasser
BSA-Lösung zum Blocken bei Western Blot (5 %)	5 g BSA 100 mL TBST-Puffer (s. u.)

Laufpuffer für Western Blot	25 mmol Tris 250 mmol Glycin 0,1 % SDS ad destilliertes Wasser; pH 8,3
NETN-Lysispuffer	100 mmol NaCl 20 mmol Tris-HCl; pH 8,0 0,5 mmol EDTA 0,5 % Nonidet P-40 ad destilliertes Wasser, Protease Inhibitor cOmplete™
Ponceau S-Lösung für Western Blot (1x)	0.1 % Ponceau-S 5 % Eisessig ad destilliertes Wasser
Ringer-Lösung	145 mmol NaCl 1,6 mmol K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,4 mmol KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mmol D-Glucose 1 mmol MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O 1,3 mmol Ca <sup>2+</sup> -Gluconat ad destilliertes Wasser; pH 7,4
Ringer-Acetat-Lösung (60 mmol)	85 mmol NaCl 60 mmol Na <sup>+</sup> -Acetat 1,6 mmol K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,4 mmol KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mmol D-Glucose 1 mmol MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O 1,3 mmol Ca <sup>2+</sup> -Gluconat ad destilliertes Wasser; pH 7,4
Ringer-Propriolat-Lösung (30 mmol)	115 mmol NaCl 30 mmol Propriolat 1,6 mmol K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,4 mmol KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mmol D-Glucose 1 mmol MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O 1,3 mmol Ca <sup>2+</sup> -Gluconat ad destilliertes Wasser; pH 7,4
TAE-Puffer (50x) für Gelelektrophorese	2 M Tris-HCl 50 mmol EDTA-Na <sub>2</sub> 1 mol Eisessig ad 1 L mit destilliertem Wasser; pH 8
TBST (1x) (Tris-buffered saline + Tween 20)	100 mmol Tris 150 mmol NaCl 0,05 % Tween 20 ad destilliertes Wasser, filtrieren; pH 7,6
TRIS-Lysispuffer	20 mmol Tris-HCl; pH 7,5 ad destilliertes Wasser, Protease Inhibitor cOmplete™



Transferpuffer für Western Blot	25 mmol Tris 192 mmol Glycin 10 % Ethanol ad destilliertes Wasser
Waymouth-Puffer	135 mmol NaCl 135 mmol HEPES-Natrium 2,5 mmol CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O 1,2 mmol MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O 0,8 mmol MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O 28 mmol D-Glucose ad destilliertes Wasser; pH 7,4

### 3.5. Primer

Tabelle 3.5.: Liste mit Primersequenzen (jeweils *Sense*-Strang (S) und *Anti-Sense*-Strang (AS)) für die PCR und qPCR.

Name	Gen	Größe	Basenpaarcode
GAPDH Real	<i>GAPDH</i>	179 bp	S 5' CAA GCT CAT TTC CTG GTA TGA C 3'
			AS 5' GTG TGG TGG GGG ACT GAG TGT GG 3'
hOCT1	<i>SLC22A1</i>	601 bp	S 5' GAC CAC ATC GCT CAA AAG AAT 3'
			AS 5' CCA ACA CCG CAA ACA AAA T 3'
hOCT1 Real	<i>SLC22A1</i>	206 bp	S 5' CAT CAT AAT CAT GTG TGT TGG CC 3'
			AS 5' CAA ACA AAA TGA GGG GCA AGG CTT 3'
hOCT2	<i>SLC22A2</i>	255 bp	S 5' TTG GTT GCT GGA GGT CTG GT 3'
			AS 5' TGG TTG AGT TGT ATG GGC TTT GT 3'
hOCT2 Real 1	<i>SLC22A2</i>	151 bp	S 5' CAT TGA ACT AAG AAG AGA GAC CG 3'
			AS 5' CCA CAG TGT ACA ATA GAC TCC A 3'
hOCT2 Real 2	<i>SLC22A2</i>	145 bp	S 5' CGC CAT TCC TGG TCT ACC GGC 3'
			AS 5' GCT TCC TCG ATG GTC TCA GGC 3'
hOCT3 Real 1	<i>SLC22A3</i>	173 bp	S 5' AGA AGG AGC TAT CCA GGA GCT GC 3'
			AS 5' CTT CAA CAG CAT TAC AAA TCC TA 3'
hOCT3 Real 2	<i>SLC22A3</i>	167 bp	S 5' GGA ATA GCA TGG TGG AGG ACC A 3'
			AS 5' GGG GCT ATG ATT CCC CCA AAA 3'
hOCT3 Real 3	<i>SLC22A3</i>	431 bp	S 5' GAC AAG AGA AGC CCC CAA CCT GAT 3'
			AS 5' CAC TAA AGG AGA GCC AAA AAT GTC 3'
hOCTN1 Real 1	<i>SLC22A4</i>	109 bp	S 5' TC CAG AAA CCT TAG AGC AGA TGC 3'
			AS 5' GA ATG CAG TTA TTA GAA CCT TGG G 3'
hOCTN1 Real 2	<i>SLC22A4</i>	205 bp	S 5' GTG CTG TGT GTC CCG CTG TG 3'
			AS 5' CGA GTC CTG AAC AGG TCC AG 3'
hOCTN2 Real 1	<i>SLC22A5</i>	126 bp	S 5' GTA CCC CAC TCC CAG ACA CC 3'
			AS 5' GCT GTG CTT TTA AGG ATT GTG GG 3'
hOCTN2 Real 2	<i>SLC22A5</i>	195 bp	S 5' CAT GCA GAC AGG CTT CAG CTT C 3'
			AS 5' ATG CAC ACT CCT AAC GTA GAG 3'

MATE1	<i>SLC47A1</i>	287 bp	<b>S</b> 5' GCT CAG GTA CAC GCC AAT TTG A 3'
			<b>AS</b> 5' CTC ACT AA ATC CCC ACC AGC 3'
MATE1 Real 1	<i>SLC47A1</i>	175 bp	<b>S</b> 5' GCA ACC ACA CTT GGA GTG ATG G 3'
			<b>AS</b> 5' GAG CAG AAT TCC CAC TCC GAG 3'
MATE1 Real 2	<i>SLC47A1</i>	179 bp	<b>S</b> 5' AAG CTG GAG CTG GAT GCA GTC 3'
			<b>AS</b> 5' CAG CAG AGG AGC AGG ACG AGC 3'
MATE2	<i>SLC47A2</i>	529 bp	<b>S</b> 5' GTC TAT GGC GGA GTT CTG AGA G 3'
			<b>AS</b> 5' GCC TGG TGG CTA GGA TCC TGA C 3'
hOATP1A2	<i>SLC21A3</i>	207 bp	<b>S</b> 5' GCA GGA TAT ATG ATT CCA CCA CC 3'
			<b>AS</b> 5' GAC TTT TGG TAT ATA TCT TTG CAC TC 3'
hOATP1B3	<i>SLC21A8</i>	138 bp	<b>S</b> 5' TTC TAG CTC CAA TAT ATT TTG GGG 3'
			<b>AS</b> 5' GCT ATA GAT AAG CCC AAG TAG ACC 3'

Die verwendeten Primer stammen von den Herstellern MWG Biotech AG, Ebersberg und Biometra GmbH, Göttingen.

### 3.6. Primäre und sekundäre Antikörper

**Tabelle 3.6.: Liste der primären und sekundären Antikörper für den Western Blot.**

<b>Antikörper</b>	<b>aus</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung für Western Blot</b>	<b>Molekulargewicht</b>
GAPDH	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA	1/1000	37 kDa
OCTN1	Maus	Abnova, Taipeh, Taiwan	1/500	70/75 kDa
Anti-Kaninchen Immunoglobuline/HRP ( <i>Horseradish peroxidase</i> )	Ziege	Dako Deutschland GmbH, Hamburg	1/2000	
Anti-Maus Immunoglobuline/HRP ( <i>Horseradish peroxidase</i> )	Ziege	Dako Deutschland GmbH, Hamburg	1/1000	

## 4. Methoden

### 4.1. Zellkultur

#### 4.1.1. Herkunft der Zellen

Die SSc-Fibroblasten (SSc8, 28, 71, 78) wurden freundlicherweise von Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Distler, Medizinische Klinik 3, Universitätsklinikum Erlangen bereitgestellt. Alle SSc-Zelllinien wurden aus Stanz-Hautbiopsien kultiviert, die aus sklerotisch-betroffenen Hautarealen der Patienten an der Beugeseite des Unterarms stammten. Alle vier Patienten, drei weibliche Spenderinnen und ein männlicher Spender, erfüllten die SSc-Kriterien der **limitierten** systemischen Sklerodermie nach LeRoy und hatten bis zur Biopsie keine DMARD erhalten. Das Medianalter lag bei 35 Jahren, mit einem Intervall von 20-52 Jahren (20, 33, 38, 50). Die mediane Krankheitsdauer lag bei 6 Jahren mit einem Intervall von 1-13 Jahren. Die Patienten hatten der Entnahme, die durch die Ethikkommission genehmigt worden war, zugestimmt.

Als Kontrolle wurden humane Hautfibroblasten gesunder Spender (hH22, 33, 52, 168) verwendet, die ich freundlicherweise von Dr. rer. nat. Uwe Hansen, Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie in Münster, erhalten habe. Die Probe hH168 stammt von einem männlichen Spender, der bei der Spende etwa 49 Jahre alt war. Alle übrigen hH-Zellen sind von weiblichen Spenderinnen in einem Alter zwischen 20 und 40 Jahren. Die Entnahme erfolgte mit Zustimmung der Probanden und ebenfalls an der Beugeseite des Unterarms.

Das entnommene Gewebe der SSc-Patienten und der gesunden Probanden wurde zur Anlage einer Primärkultur genutzt. Für meine Arbeit wurden mir in Passage 3 angelegte Proben der humanen Hautfibroblasten (hH-F) und der systemischen Sklerose-Fibroblasten (SSc-F) zur Verfügung gestellt.

#### 4.1.2. Herstellen des Mediums

Die Kultivierung der Fibroblasten erfolgte in DMEM, „*Dulbecco's Modified Eagle Medium*“. DMEM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, #D5796) enthielt einen hohen Glucose-Anteil von 4500 mg/L, L-Glutamin, Pyridoxin und Natriumbikarbonat als Puffer. Zu jeder 500 mL-DMEM-Flasche wurden vor Gebrauch unter der Sterilbank jeweils 50 mL FCS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, #F7524) und 10 mL Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich Chemie

GmbH, München, #P4333) mit 10.000 Units/mL Penicillin und 10 mg Streptomycin/mL hinzugefügt.

#### **4.1.3. Auftauen der Proben**

Zum Anlegen einer Zellkultur wurden die im flüssigen Stickstoff tiefgefrorenen Einfriergefäße im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Die in 90 % FCS und 10 % DMSO eingefrorenen Fibroblasten wurden mit etwa 12 mL DMEM High Glucose in eine 75 mL-Zellkulturflasche (Cellstar®, Greiner Bio-One, Frickenhausen, #658175) überführt. Die Zellen wurden für 24 h im Brutschrank (Thermo Electron corporation, Karlsruhe, Forma™ 311) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um das restliche DMSO aus der Kultur zu entfernen.

#### **4.1.4. Mediumwechsel**

Ein Mediumwechsel fand 1x/Woche oder 24 h nach dem Auftauen von Fibroblasten statt. Dazu wurden die Zellen zuerst unter dem Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Axiovert 25 C) kontrolliert und das alte Medium mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig vom adhärenen Zell-Monolayer abgesaugt. Die Zellen wurden einmal mit 7 mL vorgewärmtem DPBS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, #D8537) gewaschen, um toxische Stoffwechselprodukte, Detritus etc. zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden 12 mL vorgewärmtes DMEM hinzugefügt, die Zellen nochmals unter dem Mikroskop kontrolliert und wieder im Inkubator gelagert.

#### **4.1.5. Passagierung / Splitten**

Bei einer Konfluenz der Zellen von etwa 90 % wurden sie entweder 1:2 oder 1:3 auf mehrere neue Zellkulturflaschen aufgeteilt oder zur Aussaat verwendet. Zuerst wurden die Zellen dafür mit 7 mL vorgewärmtem DPBS gewaschen, um die Reste des Mediums und Zelldetritus zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden in die 75 mL Zellkulturflasche 2 mL vorgewärmtes Trypsin (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, L11-004) gegeben. Die Flasche wurde mit dem Trypsin für 5 min im Inkubator belassen. Die Fibroblasten sind physiologischerweise länglich bis spindelförmig geformt und runden sich durch das Trypsin ab. Beim Herausnehmen wurde der Erfolg der Trypsinisierung mikroskopisch kontrolliert und, bei Bedarf, die Zellen durch leichtes Klopfen gegen die Flaschenseite gelöst. Je 1 mL dieser Zellsuspension wurde in eine neue, sterile 75 mL-Zellkulturflasche pipettiert. Zum Abstoppen der Trypsinreaktion wurde 11 mL Medium hinzugegeben, die Flasche leicht geschwenkt, um die Zellen ausgewogen zu verteilen, und bei

37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bebrütet. Bei jeder Teilung der Zellen nimmt die Passage um eins zu. Weil es sich um Zelllinien handelt und diese nicht immortalisiert sind, nimmt das Wachstum mit zunehmender Passage stetig ab, bis die Zellen bei Passage 13 kaum noch Wachstumstendenzen mehr zeigen oder absterben.

Für die mikrofluorimetrischen Messungen mit ASP<sup>+</sup> und die Imatinib-Akkumulationen wurden die Zellen aus Passagen 4-12 mit dieser Methode gleichmäßig auf 96- bzw. 6-/12-well Platten (Cellstar®, Greiner Bio-One, Frickenhausen, #655180, #657160, #665180) ausgesät und ein Wachstum bis zur 90%igen Konfluenz abgewartet (ca. 1-1 1/2 Wochen).

#### **4.1.6. Einfrieren der Proben**

Zum Einfrieren von Zellen wurde die 2 mL Trypsin-Zell-Suspension aus dem vorherigen Protokoll mit ca. 8 mL DMEM in ein 50 mL-Zentrifugengefäß (Corning®, Tewksbury, USA, #430829) überführt und für 5 min bei 500 g zentrifugiert (Eppendorf, Hamburg, Centrifuge 5804R). Der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Pellet wurde in 1,5 mL einer Lösung aus 90 % FCS und 10 % DMSO (Sigma, St. Louis, USA, #D8418) resuspendiert. Diese Suspension wurde in spezielle Einfriergefäße (Sarstedt, Nümbrecht, #72.380) überführt. Für die ersten 24 h blieben die Gefäße bei -80 °C in einem Einfrier-Container (Sigma, St. Louis, USA, Nalgene® Mr. Frosty, #C1562) mit 2-Propanol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, #6752.1), der für ein langsames Einfrieren mit einem Temperaturabfall von 1 °C/min sorgte, und wurden danach im Stickstofftank (Thermo Electron corporation, Karlsruhe, Forma™ Cryo 100, Model 741) bei -196 °C gelagert.

#### **4.1.7. Inkubation mit den Mediatoren TGFβ und PDGF**

Für die mikrofluorimetrischen Messungen, die Imatinib-Akkumulations-Experimente und die qPCR zur Bestimmung der Transporter-Expression wurden Inkubationen mit TGFβ und PDGF durchgeführt.

Die Inkubation mit, aus CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*) gewonnenem, rekombinantem TGFβ1 (#240B, R+D Systems Minneapolis, USA) in DMEM erfolgte mit 10 ng/mL für 24 h. Beim rekombinanten PDGF-AB aus *Escherichia coli* (#P3326, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) wurde mit Konzentrationen von 10 ng/mL in DMEM gearbeitet und der Mediator für 12-96 Stunden auf den Zellen belassen.

Bei den zugehörigen unbehandelten Kontrollen wurde jeweils ein Mediumwechsel mit reinem DMEM durchgeführt, um auszuschließen, dass es sich um einen durch den Mediumwechsel ausgelösten Effekt handelt.

## **4.2. Molekularbiologische Methoden**

### **4.2.1. RNA-Isolation**

Die RNA-Isolation diente zur Extraktion der RNA und wurde zur Analyse der Genexpression genutzt.

Zur Isolierung von RNA aus Zellen wurde das GenElute RTN 350 von Sigma nach Herstellerangaben genutzt. Zur Inaktivierung von RNasen verwendet das Set Guanidiniumthiocyanat und Mercaptoethanol, das der Denaturierung und Reduktion von Proteinen dient (Chomczynski und Sacchi, 1987; Cox, 1968).

Im ersten Schritt wurden 500 µL des Lysispuffers, bestehend aus 49,5 mL „*Lysis-Solution*“-Puffer mit Guanidiniumthiocyanat und 500 µL Mercaptoethanol, auf die Zellen gegeben und diese solange lysiert, bis sich ein trübes Lysat entwickelte. Dieses Lysat wurde auf die GenElute „*Filtration-Column*“ pipettiert und 2 min bei 2000 g zentrifugiert, um Zelldebris und DNA zu entfernen. Die Probe wurde im zweiten Schritt 1:1 mit 70 %-Ethanol gemischt, zweimal auf die Silica-haltige „*Binding-Colum*“ gegeben und zentrifugiert, sodass die RNA an die *Binding-Column* gebunden wurde. Nachfolgend wurde die RNA auf der *Binding-Column* mit 2 Wasch-Lösungen überschichtet, um sie zu reinigen, bei 2000 g zentrifugiert und das Zentrifugat jeweils verworfen. Im letzten Schritt wurde die RNA mit 50 µL Elutions-Lösung aus der Säule ausgewaschen und die hochreine RNA-Lösung entweder bei -80 °C tiefgefroren oder zur Transkription zu cDNA genutzt.

### **4.2.2. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion: RT-PCR**

Die RT-PCR bezeichnet die Kombination aus der Transkription von mRNA zu cDNA und einer anschließenden PCR zur Amplifikation des Genmaterials. Auf diese Weise kann die Expression von spezifischen Genen in Zellen und Geweben nachgewiesen werden

Das zentrale Enzym der RT-PCR, die Reverse Transkriptase (RT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Baltimore, 1970; Temin und Mizutani, 1970), benötigt Startsequenzen, um die Synthese der cDNA zu initiieren (Spiegelman et al., 1971). Genutzt wurden Oligo(dT)-Primer,

d. h. 12-20 Desoxythymidin-Basen, die sich am Poly-A-Schwanz am 3'-Ende der mRNA anlagern, oder zufällige Sequenzen von sechs oder neun Deoxynukleotiden, sogenannte Random Primer.

Es wurde das M-MLV Reverse Transkriptase-Set der Firma promega genutzt. Zuerst wurden 0,5 µL Oligo(dT)-Primer, 0,5 µL Random Primer, 1 µL dNTP-Mix (10 mmol) und 10 µL RNA (Gesamtvolumen von 12 µL) in einem PCR-Mikroreaktionsgefäß vorsichtig gemischt, für 5 min bei 65 °C im Thermocycler erhitzt und für die folgenden 5 min bei 4 °C gekühlt. Nun wurden 4 µL 5 x Puffer und 2 µL 0,1 mol Dithiothreitol (DTT) zugegeben, vermischt und bei 37 °C für 2 min inkubiert. Im nächsten Schritt wurde 1 µL (200 Units) M-MLV RT dazu pipettiert, herunterzentrifugiert, 10 min bei 25 °C inkubiert und danach für 50 min auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurde die Reaktion durch das Erhitzen auf 70 °C für 15 min gestoppt, die Proben auf 4 °C heruntergekühlt und die entstandene cDNA nach dem PCR-Protokoll (s. 4.2.3. PCR) amplifiziert.

#### **4.2.3. Polymerase-Kettenreaktion: PCR**

Die PCR dient zur Amplifikation eines durch Primer bestimmten DNA-Abschnitts (Mullis und Faloona, 1987). Im ersten Schritt, dem Denaturierungs-Schritt, werden bei 96 °C in einem Thermocycler die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Doppelsträngen aufgebrochen, sodass DNA-Einzelstränge entstehen. Dies ermöglicht in einem zweiten Schritt bei 55-65 °C die Primer-Hybridisierung, d. h. die Anlagerung der Startsequenzen der DNA-Amplifikation (Primer) an korrespondierende, spezifische Sequenzen. Im letzten Schritt, der Elongation, verlängert eine hitzestabile DNA-Polymerase bei ca. 72 °C, vom 3'-Ende des Primers beginnend, den Strang und vervollständigt ihn so zu einem DNA-Doppelstrang (Saiki et al., 1988). Dieser PCR-Zyklus läuft, je nach Bedarf, 20-50 Mal hintereinander ab.

Die PCR wurde mit Hilfe des DreamTaq™ DNA-Polymerase-Systems und des AmpliTaq® Gold DNA-Polymerase-Systems von Thermo Fisher Scientific durchgeführt.

Vor Beginn der PCR wurden alle Reagenzien behutsam aufgetaut und gevortext. In einem PCR-Mikroreaktionsgefäß auf Eis wurde jeweils ein 1 µL der zu untersuchenden cDNA vorgelegt und ein PCR-Mastermix mit allen erforderlichen Bestandteilen (s. Tabelle 4.1.) hergestellt. Nach der Vermengung von cDNA, Primer und Mastermix wurde die Lösung herunterzentrifugiert und in den Thermocycler eingebracht. Die einzelnen Temperaturstufen der Amplifikation zeigt Tabelle 4.2.

**Tabelle 4.1.: Rezept für PCR-Mastermix-Lösung.**

<b>DreamTaq™ DNA Polymerase (pro Probe)</b>	<b>AmpliTaq® Gold DNA Polymerase (pro Probe)</b>
1 µL cDNA	1 µL cDNA
jeweils 1 µL Primer (Sense und Anti-Sense)	jeweils 1 µL Primer (Sense und Anti-Sense)
2 µL dNTPS	2 µL dNTPS
5 µL 10x Puffer	5 µL 10x PCR Puffer Gold
0,25 µL DreamTaq™ DNA Polymerase	0,25 µL AmpliTaq® Polymerase
Ad 50 µL mit H <sub>2</sub> O (DEPC-behandelt und steril filtriert)	5 µL 25 mmol MgCl <sub>2</sub> -Lösung
	Ad 50 µL mit H <sub>2</sub> O (DEPC-behandelt und steril filtriert)

**Tabelle 4.2.: Thermocycler-Programm für die PCR mit den verschiedenen Temperaturstufen und Zeiträumen der Amplifikation.**

<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit</b>	
95	5 min	} x 31
95	30 s	
60	30 s	
72	1 min	
72	10 min	
4	∞	

Danach wurden die Proben bei -20 °C weggefroren oder zur Gelelektrophorese aufgetragen.

#### 4.2.4. Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten mithilfe eines elektrischen Gradienten. Die Wanderung der Nucleinsäuren beruht auf den negativ geladenen Phosphatgruppen im Zucker-Phosphat-Rückgrat. Die kürzeren Fragmente laufen dabei schneller als die längeren Fragmente im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Des Weiteren laufen DNA-Fragmente mit definierter Größe mit, die als Standard dienen (Gene Ruler 100 bp DNA ladder, Waltham, USA, # SM0241).

Die Anfärbung der DNA erfolgt durch Ethidiumbromid, das in die Nucleinsäuresequenz interkaliert, dadurch sein Absorptionsspektrum ändert und bei Anregung mit UV-Licht eine stark erhöhte Fluoreszenz-Emission (Faktor 50-100) zeigt.

Zur Herstellung eines 1%igen Agarose-Gels wurde 1 g Agarose in 100 mL 1x TAE in einem Erlenmeyerkolben aufgelöst und ca. 3 min bei 600 W in einer Mikrowelle erhitzt, bis eine blasenfreie Lösung entstanden war. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurde 1 µL Ethidiumbromid-Lösung/50mL 1x TAE hinzu pipettiert, durch Schwenken vermischt und in die Gelkammer, die



mit einem Kamm zur Erstellung von Taschen für die Proben versehen war, blasenfrei eingegossen. Nach Erkalten des Gels wurde der Kamm entfernt, das Gel in die Gelelektrophoresekammer transferiert und mit 1x TAE-Puffer bedeckt. Die PCR-Proben wurden mit je 5 µL Blaumarker versetzt und zusammen mit dem Größenstandard aufgetragen. Bei einer angelegten Spannung von 100 V wurde die Elektrophorese durchgeführt und gestoppt, sobald das Bromophenolblau des Markers noch etwa 3 cm vom Rand entfernt war. Anschließend wurde das Gel aus der Kammer entfernt und eine Fotodokumentation unter UV-Licht (302 nm oder 365 nm) angefertigt.

#### **4.2.5. Real-Time quantitative PCR: qPCR**

Mit der Real-Time qPCR sollte die Transporter-Expression der *hOCTNI* und *hMATE1* quantifiziert und der potenzielle Effekt einer Inkubation mit den Mediatoren PDGF und TGFβ auf die Expression untersucht werden.

Die Real-Time quantitative PCR ist eine modifizierte PCR, die durch eine Fluoreszenz-Messung in der exponentiellen Phase eine Quantifizierung der PCR-Produkte erlaubt. Als Fluoreszenz-Farbstoff wurde SYBR Green I verwendet, der in die Doppelstrang-DNA (dsDNA) interkaliert. Der Komplex aus Fluoreszenzfarbstoff und DNA absorbiert blaues Licht bei  $\lambda_{\max} = 494$  nm und emittiert grünes Licht bei  $\lambda_{\max} = 521$  nm (Giglio et al., 2003; Zipper et al., 2004), das proportional zur Menge der PCR-Produkte ist und dadurch eine Quantifizierung erlaubt.

Da die Bindung von SYBR Green I an dsDNA unspezifisch ist und u. a. auch unspezifische Primer-Dimere gebunden werden, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wird die Temperatur im Thermocycler kontinuierlich von 50 °C auf 95 °C erhöht. Die dsDNA denaturiert bei einer spezifischen Temperatur zu zwei Einzelsträngen und durch die Freisetzung des Farbstoffes kann eine Änderung der Fluoreszenz detektiert werden (Ririe et al., 1997). Die Schmelzkurve ist eine Funktion der Länge, der Sequenz der Fragmente und des GC-Gehaltes. Weil die spezifischen dsDNA-Produkte durch ihre größere Länge einen höheren Schmelzpunkt haben, kann über den Schmelzpunkt zwischen spezifischen und unspezifischen Produkten differenziert werden, wobei die Höhe des Peaks der Schmelzkurve mit der Menge der Produkte korreliert. Bei nur einem amplifizierten Produkt, ohne unspezifische Dimere, sollte nur ein Peak auftreten.

Der  $C_q$ -Wert (*Crossing point*) markiert den Punkt, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt (Bustin et al., 2009). Zwischen dem  $C_q$ -Wert

und dem Logarithmus der eingesetzten Menge/der Fluoreszenz besteht eine lineare, antiproportionale Beziehung. In meiner Arbeit wurden nur  $C_q$ -Werte verwendet, bei denen ein Peak im Schmelzkurven-Diagramm identifizierbar war.

Die korrekte Quantifizierung ist aufgrund der Reaktionsbedingungen nur in der exponentiellen Phase der PCR möglich, da nur zu diesem Zeitpunkt optimale Reaktionsbedingungen vorliegen und sich die Anzahl der PCR-Produkte in jedem Zyklus verdoppelt (Pannetier et al., 1993; Scheffé et al., 2006). Die exponentielle Amplifikation des Templates lässt sich durch die Formel:

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n$$

darstellen (Livak und Schmittgen, 2001). Dabei ist  $X_n$  die Anzahl der Templates bei Zyklus  $n$  der qPCR,  $X_0$  die initiale Anzahl des Templates,  $E_x$  die Effizienz der Amplifikation des Zielgens und  $n$  die Anzahl der Zyklen.

Die Quantifizierung kann als relative Quantifizierung durch einen Vergleich mit einem stabil exprimierten Referenz-Gen, z. B. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), erfolgen. Zur Normalisierung kann die  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Methode genutzt werden, bei der die Differenz zwischen dem  $C_q$  des Zielgens/ $C_q$  des Calibrators (cb) und der  $C_q$  der GAPDH gebildet wird (Livak und Schmittgen, 2001).

$$\Delta C_q = C_{q \text{ Gen}} - C_{q \text{ GAPDH}} \quad \text{und} \quad \Delta C_q = C_{q \text{ cb}} - C_{q \text{ GAPDH cb}}$$

Unter der Annahme, dass die Effizienz der Amplifikation vom Zielgen  $E_x$  und vom Referenzgen  $E_R$  gleich sind

$$E_x = E_R = E$$

ergibt sich über mehrere Schritte der Umformung der initialen Gleichung die Formel

$$X_{N,q} / X_{N,cb} = (1 + E)^{-\Delta\Delta C_q}.$$

$X_{N,q}$  stellt die normalisierte Anzahl der Templates für ein beliebiges Gen  $q$  dar. Dabei wurde  $X_0$  durch  $R_0$ , die initiale Anzahl der Referenzgene, dividiert ( $X_{0,q}/R_{0,q}$ ).  $X_{N,cb}$  ist die normalisierte Anzahl der Templates des Calibrators ( $X_{0,cb}/R_{0,cb}$ ). Wenn  $E$  unter idealen Bedingungen ungefähr 1 entspricht, ergibt sich die Endformel:

$$X_{N,q} / X_{N,cb} = (1 + 1)^{-\Delta\Delta Cq}$$

$$\Rightarrow \text{relative Konzentration des Zielgens} = 2^{-\Delta\Delta Cq} = 2^{-[(Cq \text{ Gen} - Cq \text{ GAPDH}) - (Cq \text{ cb} - Cq \text{ GAPDH cb})]}$$

Da es sich bei meinen Experimenten um verschiedene Zelllinien von Patienten handelt und die Expression der Zielgene nur als normalisierte, individuelle Datenpunkte dargestellt werden sollten, wurde die  $2^{-\Delta Cq}$ -Methode, eine Modifikation der  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Methode nach Schmittgen und Livak, verwendet (Schmittgen und Livak, 2008).

$$\Rightarrow \text{relative Konzentration des Zielgens} = 2^{-\Delta Cq} = 2^{-(Cq \text{ Gen} - Cq \text{ GAPDH})}$$

Vor Verwendung der RNA wurde der RIN-Wert (*RNA integrity number*) bestimmt, der, mit einem Maximum von 10 und einem Minimum von 1, eine Aussage über die Integrität der RNA trifft (Schroeder et al., 2006). Bei mir lagen RIN-Werte zwischen 8,4 und 10 vor, die für eine gute Integrität und Eignung der RNA für die qPCR sprechen.

Bei der Durchführung der qPCR wurde zuerst eine 1:10 Verdünnung der cDNA erstellt (5  $\mu$ L cDNA + 45  $\mu$ L DEPC-behandeltes Wasser). Zu 10  $\mu$ L dieser 1:10-verdünnten cDNA wurden in einem PCR-Mikroreaktionsgefäß 0,5  $\mu$ L des Real-Time-Primers (Sense und Anti-Sense) und 12,5  $\mu$ L Power SYBR® Green (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) zugegeben und mit 1,5  $\mu$ L DEPC-behandeltem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25  $\mu$ L aufgefüllt. Nach vorsichtigem Mischen und Herunterzentrifugieren wurde die Mischung mit einer Multipette auf eine 384-well Platte aufgetragen. Jede Probe wurde zur Doppelbestimmung zwei Mal zu je 10  $\mu$ L auf der Platte aufgetragen und ein arithmetischer Mittelwert ( $C_q \text{ mean}$ ) errechnet. Die Platte wurde mit einem adhäsiven Film verschlossen und zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen. Die Messung erfolgte mit dem Bio-Rad CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (#185-5484, Bio-Rad, Hercules, USA) mit einem Thermocycler-Programm mit folgenden Konditionen (s. Tabelle 4.3.). Die Auswertung erfolgte mit dem Software-Programm Bio-Rad CFX Manager 3.1.

**Tabelle 4.3.: Thermocycler-Programm für die qPCR mit den verschiedenen Temperaturstufen und Zeiträumen der Amplifikation.**

Temperatur [°C]	Zeit
50	2 min
95	2 min
95	15 s
60	1 min
65	5 s

} x 40

Anschließend wurde vom Thermocycler zur Schmelzkurvenanalyse die Temperatur, von 65 °C ausgehend, alle 5 s um ein halbes °C erhöht, bis 95 °C erreicht worden waren.

Die Primer (s. Kapitel 3.5. Primer) der qPCR hatten eine Länge von ~ 200 bp und sind von Dr. rer. nat. Bayram Edemir in der Experimentellen Nephrologie mit dem Programm Primer-BLAST des National Center for Biotechnology Information, NCBI, entworfen worden (Link: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

### 4.3. Mikrofluorimetrische Messungen

Zur Quantifizierung der Transporteraktivität wurde als Substrat der Fluoreszenz-Farbstoff ASP<sup>+</sup>, 4-(4-(Dimethylamino)styryl)-N-Methylpyridinium Iodid, genutzt (Cetinkaya et al., 2003; Mehrens et al., 2000; Pietig et al., 2001). ASP<sup>+</sup>, ein organisches Kation, weist durch die Methylgruppe am Stickstoff des Pyridin-Ringes eine positive Ladung auf und ist ein Substrat für OCT1-3, OCTN1 und MATE1 (s. Kapitel 2.1.1. Kompetitive Inhibition der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme durch Imatinib: IC<sub>50</sub>-Werte).

Die mikrofluorimetrischen Messungen der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme wurden mit einem Tecan Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Lesegerät (Infinite® F200, Tecan, Männedorf, Schweiz), das mit einem Monochromator-System ausgestattet ist (Exzitation bei 465 nm ± 35 nm Wellenlänge, Emission bei 590 nm ± 20 nm Wellenlänge), bei 37 °C Temperatur semi-automatisch durchgeführt (Ciarimboli et al., 2004, 2012; Massmann et al., 2014; Pietig et al., 2001; Schlatter et al., 2014).

Das Fluorophor ASP<sup>+</sup> hat als Exzitationsmaximum eine Wellenlänge von 450 nm und gibt diese Anregungsenergie nach einigen Nanosekunden als spontane, energieärmere Emission mit einem Maximum bei 515 nm ab, was als Stokesverschiebung bezeichnet wird (James, 1983). Bei der Transporter-vermittelten Aufnahme in Zellen durchläuft ASP<sup>+</sup> einen detektierbaren Wandel seines Emissions-Spektrums von 515 nm zu 590 nm, den andere fluoreszierende Substrate nicht aufweisen (Wilde et al., 2009). Der initiale, lineare Fluoreszenz-Anstieg innerhalb der ersten 100 Sekunden spiegelt die spezifische zelluläre Aufnahme des ASP<sup>+</sup> wieder. Je länger ASP<sup>+</sup> auf den Zellen verbleibt, desto eher sind Änderungen der Fluoreszenzemission durch Prozesse wie z. B. Kompartimentierung zu erwarten (Ciarimboli et al., 2005; Mehrens et al., 2000; Pietig et al., 2001).

Für die Durchführung der Messung wurden SSc- und hH-Fibroblasten nach dem unter 4.1. beschriebenen Protokoll kultiviert und in eine 96-well Mikrotiterplatte eingebracht. Das Medium

wurde verworfen, die Zellen zweimal mit 100  $\mu\text{L}$  Ringer-Lösung (37 °C; pH 7,4) gewaschen und anschließend mit 100  $\mu\text{L}$  frischer Ringer-Lösung bedeckt.

Die Platten wurden auf einer Vorrichtung in das Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Lesegerät gefahren, sodass die Experimente mit dem lichtinstabilen  $\text{ASP}^+$  unter lichtgeschützten Verhältnissen ablaufen konnten. Vor jedem Versuch wurden die Bedingungen, d. h. die Anzahl der Messzyklen, das Absorptions- und Emissions-Maximum, die Injektionsgeschwindigkeit, die Temperatur etc. mit dem Software-Programm Tecan i-control 1.6. eingestellt.

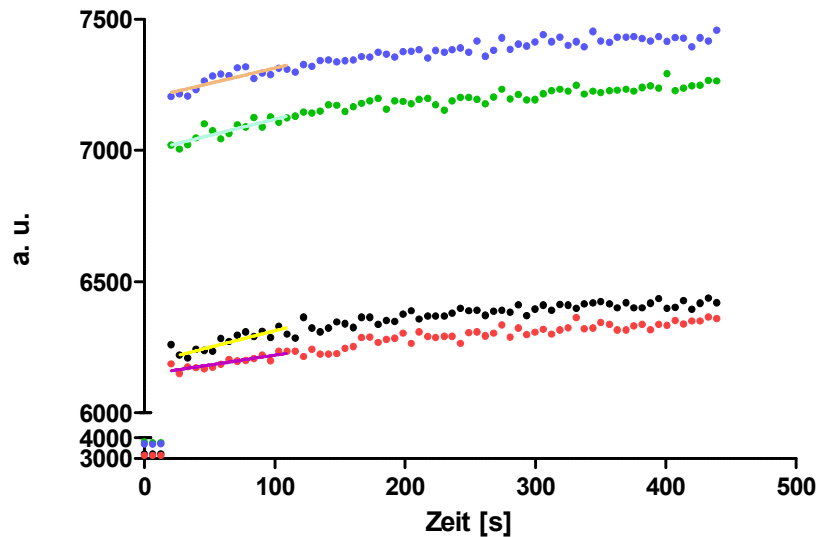
Die Fluoreszenzmessung erfolgte dynamisch in jeder Vertiefung vor und nach der  $\text{ASP}^+$ -Zugabe. Die ersten drei Messpunkte vor  $\text{ASP}^+$ -Zugabe entsprachen der Grundfluoreszenz. Ab der vierten Messung zeigte sich durch die Zugabe des  $\text{ASP}^+$  über den Injektor ein sprunghafter Anstieg der Fluoreszenz. Zur Detektion der Fluoreszenz wurden von einer Xenon-Blitzlampe im Gerät Blitze (3/s) erzeugt, mit einem Kondensator fokussiert und über eine Blende auf den ersten Monochromator geleitet. Dieser Monochromator brach das Licht und filterte zusammen mit einer zweiten Blende das Licht der Wellenlänge 465 nm heraus, mit welchem die Zellen in der Mikrotiterplatte angeregt wurden. Das Emissionslicht der Bandbreite 590 nm wurde über zwei weitere Blenden und einen weiteren Monochromator selektiert und über einen Kondensator zum Detektor weitergegeben, der die Photonen (Photonen/s) zählte.

Die Emission des kompletten Bodens der Vertiefungen wurde insgesamt neun Mal vom Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Lesegerät aufgezeichnet, ein Mittelwert mit Standardabweichung berechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Die Anzahl der Messzyklen pro Vertiefung betrug bei Fibroblasten zwischen 70 und 100.

Das Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Lesegerät verfügte über zwei separate, lichtgeschützte Injektoren mit Spritzenpumpen und Injektornadeln. Nach der dritten Fluoreszenz-Messung wurden 25  $\mu\text{L}$   $\text{ASP}^+$  (5  $\mu\text{mol}$ ) mit einer Geschwindigkeit von 200  $\mu\text{L}/\text{s}$  über die Injektoren eingespritzt, woraufhin ein linearer Anstieg der Fluoreszenz messbar wurde. Durch die 100  $\mu\text{L}$  der, bereits in den Vertiefungen befindlichen, Ringer-Lösung ergab sich eine 1:5-Verdünnung und eine Endkonzentration des  $\text{ASP}^+$  von 1  $\mu\text{mol}$ .  $\text{ASP}^+$  lag als 1 mmol-Aliquot à 1 mL in Ringer-Lösung vor, wurde bei -20 °C gelagert und vor Gebrauch frisch aufgetaut.

Die Daten wurden mit dem Programm Tecan i-control 1.6. aufgezeichnet und mit dem Programm GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, Inc. San Diego, USA) linear gefittet. Auf der y-Achse der Diagramme wurde der  $\text{ASP}^+$ -Uptake als Fluoreszenz-Zunahme (dimensionslose Zahl, a. u.)

aufgetragen. Die Geschwindigkeit der Aufnahme wurde durch eine lineare Regressionsanalyse der Fluoreszenz-Zunahme in den ersten 100 s nach ASP<sup>+</sup>-Zugabe berechnet.



**Abb. 4.1.:** Exemplarischer linearer Fit der, mit Tecan i-control 1.6. aufgezeichneten, mikrofluorimetrischen Messungen. x-Achse = Zeit [s], y-Achse = Steigung der Aufnahme [a. u.]. Nach den ersten drei Messpunkten (Grundfluoreszenz) zeigt sich ein sprunghafter Anstieg durch das Einbringen des ASP<sup>+</sup> über den Injektor. Der lineare Fit durch GraphPad Prism über 100 s in vier, gleichzeitig dargestellten, Vertiefungen der Mikrotiterplatte ist auch gezeigt.

#### 4.4. Imatinib-Akkumulation

Für die Untersuchung der Aufnahme des Imatinib wurden Imatinib-Akkumulations-Experimente, gefolgt von HPLC-Messungen, durchgeführt. Dazu wurden die SSc- und hH-Fibroblasten mit einer 10  $\mu\text{mol}$  Imatinib-Lösung ( $\pm$  Inhibitoren) inkubiert, mit eiskalter Ringer-Lösung gewaschen, mit 0,1 % Ameisensäure lysiert und die Lysate mit der HPLC vermessen.

Die Fibroblasten für die Akkumulations-Experimente wurden nach dem Protokoll in Kapitel 4.1.5. auf 6- oder 12-well Platten ausgesät und ein Wachstum bis zur 90%igen Konfluenz abgewartet. Die Platten, folglich alle gleichen Alters und der gleichen Passage, wurden alle am gleichen Tag verarbeitet.

Eine 1 mmol Imatinib-/Ringer-Lösung wurde hergestellt, aliquotiert, bei -20 °C verwahrt und für jedes Experiment frisch aufgetaut. Dazu waren 29,49 mg Imatinib (#I-5508, LC Laboratories, Woburn, USA) eingewogen und in 50 mL Ringer-Lösung (pH 7,4; 37 °C) gelöst worden.

Für die Inhibitoren wurden Konzentrationen verwendet, die den doppelten  $K_m$ -Werten entsprachen (s. Tabelle 4.4.). Von allen Inhibitoren wurden 10 mmol-Lösungen in Ringer-Lösung (für Pyrimethamin in DMSO) hergestellt, aliquotiert und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren.

**Tabelle 4.4.:  $K_m$ -Werte der Inhibitoren an den SLC-Transportern, Quellennachweis und die verwendeten Konzentrationen in den Imatinib-Akkumulations-Experimenten.** Die verwendete Konzentration der Inhibitoren lag circa im Bereich der doppelten  $K_m$ .

Inhibitor	$K_m$ -Wert	Quelle	verwendete Konzentration
<b>MPP<sup>+</sup></b>	$K_m$ hOCT1 = 15 / 32 $\mu\text{mol}$	(Koepsell et al., 2007; Zhang et al., 1997)	100 $\mu\text{mol}$
	$K_m$ hOCT2 = 19 / 78 $\mu\text{mol}$	(Koepsell et al., 2007)	
	$K_m$ hOCT3 = 47 $\mu\text{mol}$	(Wu et al., 2000)	
<b>Ergothionein</b>	$K_m$ hOCTN1 = 21 $\mu\text{mol}$	(Gründemann et al., 2005)	40 $\mu\text{mol}$
<b>L-Carnitin</b>	$K_m$ hOCTN2 = 4,3 / 8,5 $\mu\text{mol}$	(Ohashi et al., 1999; Tamai et al., 1998)	20 $\mu\text{mol}$
<b>Pyrimethamin</b>	$K_m$ hMATE1 = 77 nmol	(Ito et al., 2010)	200 nmol

Für die Experimente wurden die Kontroll- und Inhibitor-Lösungen jeweils zwei Mal hergestellt, bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  / pH 7,4 und bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  / pH 7,4. Da es sich bei Imatinib um ein Hitze-instabiles Molekül handelt, wurde die Inkubation direkt mit der  $37\text{ }^\circ\text{C}$ -Lösung begonnen und die  $4\text{ }^\circ\text{C}$ -Lösung bis zur Verwendung im Kühlschrank verwahrt.

Die 0,1 % Ameisensäure wurde unter der Sicherheitswerkbank produziert, indem 1 mL 98 %ige Ameisensäure (#56302, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) in 999 mL Aquadest gegeben und der pH überprüft wurde (ca. pH 2,5). Die Lösung wurde in der Zeit zwischen den Experimenten bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  im Kühlschrank gelagert.

Bei der Durchführung des Experiments wurde zuerst das DMEM abgenommen und die Zellen entweder bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  im Brutschrank oder bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  auf Eis für 10 min mit 1 mL einer 10  $\mu\text{mol}$ -Imatinib-Lösung ( $\pm$  spezifische Inhibitoren) inkubiert. Nach 10 min wurde die Lösung zügig abgenommen und die Vertiefungen zweimal mit  $4\text{ }^\circ\text{C}$ -kalter Ringer-Lösung gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 0,1 %iger Ameisensäure für 15 min auf Eis sauer hydrolysiert (300  $\mu\text{L}$  bei 6-well Platte, 200  $\mu\text{L}$  bei 12-well Platte). Nach 15 min wurden die Zellen mit einem Zellschaber (#CC7600-0220, CytoOne, Ocala, USA) gelöst, die Lyse unter dem inversen Mikroskop kontrolliert und die Lysate mit der Pipette in vorbereitete 1,5 mL Mikroreaktionsgefäße überführt. Die Gefäße wurden für 15 min bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  im Ultraschallbad (Sonorex, TK30, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin) behandelt, um letzte, bisher noch

intakte, Zellen zu lysieren. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 20000 g und 4 °C in der Zentrifuge (MIKRO 200 R, Typ 2405, Hettich Lab Technology, Tuttlingen). Der Überstand wurde per Pipette abgenommen, in neue 1,5 mL Mikroreaktionsgefäße überführt und das Zell-Pellet verworfen. Die zentrifugierten Lysate wurden bis zur Vermessung in der HPLC bei -20 °C gelagert.

#### **4.5. Vermessen der Proben mit der HPLC**

Die Menge des aufgenommenen Imatinib wurde mit Hilfe der HPLC, der „*High Performance Liquid Chromatography*“, bestimmt, die für Imatinib in humanem Blutplasma zum ersten Mal durch Widmer 2004 etabliert worden war (Widmer et al., 2004).

Das Chromatographie-System Accela 600 HPLC (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) ist eine Kompaktanlage und besteht aus 3 Komponenten: Einem UV/VIS-Detektor, einem Autosampler und einer Pumpe, die Drücke bis 600 bar aufbauen kann. Der UV/VIS-Detektor (190-800 nm) beinhaltet eine Wolfram-/Deuterium-Lichtquelle mit 300 mA und einen Detektor, der die Anzahl der Moleküle pro Volumen der strömenden Flüssigkeit bestimmt. Bei monochromatischer Strahlung von 261 nm liegt das Absorptions-Maximum von Imatinib im UV-Spektrum. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Absorption und Konzentration des Analyten. Über den Autosampler wurde die Probe vollautomatisch und drucklos mit der Injektorspritze in ein System von Probeschleifen injiziert. Der von der Pumpe aufgebaute Laufmittelstrom wurde durch Umschalten durch die Probenschleife geleitet, sodass die Probe zur Säule gelangte.

Imatinib liegt als polare Substanz vor, weshalb die Trennung der Substanzen als Umkehrphasen-HPLC (*Reversed Phase Chromatography*, RP-HPLC) erfolgte. Bei der RP-HPLC, der mittlerweile gängigsten HPLC-Methode, wird eine unpolare stationäre Phase (= Säule) und eine polare mobile Phase (= Elutionsmittel) genutzt.

Die stationäre Phase besteht bei der Normalphasen-HPLC aus Kieselgel, das durch freie –OH-Gruppen sehr polar ist und dementsprechend polare Substanzen wie Imatinib durch Wasserstoffbrückenbindungen fest und nicht-eluiert binden würde. Im Gegensatz dazu wird bei der Umkehrphasen-HPLC *Reversed-Phase*-Kieselgel genutzt, welches mit unpolaren, C18-Ketten substituierten Silanen (Octadecylsilan) modifiziert wurde. Für die Messungen wurde eine C18 Accucore-Säule (RP18, #17126-102130, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) mit einem Innendurchmesser von 2,1 mm, einer Länge von 10 cm und einer Partikelgröße von 2,6 µm



verwendet. Zum Schutz der Säule wurde eine Vorsäule (Accucore C18 Defender Guard Cartridges, #17126-012105, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) vorgeschaltet.

Die Elutionskraft der polaren mobilen Phase richtet sich nach der Hydrophobizität und sinkt mit steigender Polarität. Deshalb ist die elutrope Reihe hier in reverser Reihenfolge gültig, wobei Wasser die geringste Elutionskraft besitzt (Wasser < Acetonitril < Aceton < Benzol < n-Pentan). Die mobile Elutionsmittel-Phase bestand aus Wasser (Injektor A) und Acetonitril (Injektor B), die beide zu 0,1 % mit 98 %iger Ameisensäure angesäuert worden waren. Die Flussrate betrug 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  und wurde in einem Gradienten-Programm appliziert. Bei dieser Gradienten-Trennung wird die Zusammensetzung des Eluenten kontinuierlich über die Zeit verändert, was eine stärkere Wechselwirkung zwischen Eluent und Säule und eine schnellere Verdrängung der Probensubstanz von der Säule bewirkt.

In der von mir angewendeten Methode wurden während der ersten 15 min über einen Laufmittelgradient von 80 (Injektor A) \_20 (Injektor B) die Substanzen getrennt. In den letzten 5 min wurde die Säule über Spülen mit 100 % 0,1 %iger Ameisensäure gesäubert und re-equilibriert (s. Tabelle 4.5.).

**Tabelle 4.5.: HPLC-Gradientenprogramm.**

<b>Zeit [min]</b>	<b>Injektor A</b>	<b>Injektor B</b>
0	100 %	0 %
1	100 %	0 %
10	80 %	20 %
11	0 %	100 %
15	100 %	0 %
20	100 %	0 %

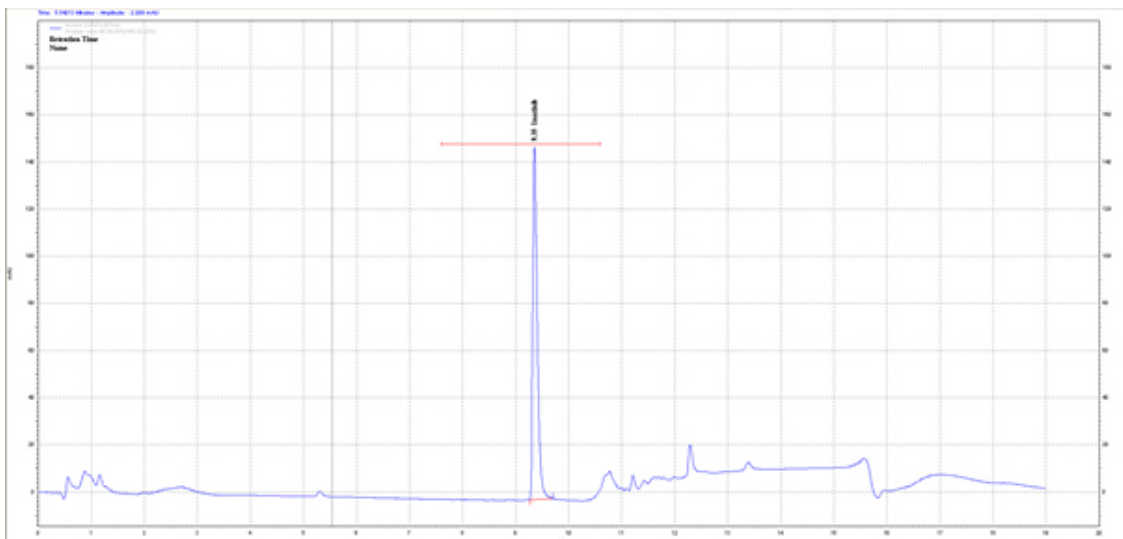
Das von der Probe verwendete Volumen lag bei 20  $\mu\text{L}$  und die Retentionszeit bei ca. 9,34 min (s. Abb. 4.2.). Um das hitzeinstabile Imatinib zu schützen, wurde die Temperatur des Probeneinsatzes auf 4  $^{\circ}\text{C}$  eingestellt. Die Säule arbeitete bei einer Temperatur von 25  $^{\circ}\text{C}$ . Die Proben wurden über eine Spritze und eine von der Probe nur teilweise gefüllte Schleife (*partial loop*) mit einer Geschwindigkeit von 100  $\mu\text{L}/\text{s}$  und einem Volumen von 500  $\mu\text{L}$  in das Gerät injiziert.

Die angesäuerten Laufmittel-Lösungen wurden aus Sicherheitsgründen und, um Verschmutzungen zu vermeiden, unter der Sicherheitswerkbank hergestellt. Für die 0,1 %ige

Ameisensäure wurde 2,5 mL 98 % Ameisensäure mit einer großvolumigen Nadel (#301300, Kanüle 20 G 1 1/2, 0,9 x 40 mm, BD™ Microlance, Heidelberg) in 2497,5 mL HPLC-Wasser (#10449380, Fisher Scientific, Schwerte) pipettiert und der pH kontrolliert (pH  $\approx$  2,5). Genauso wurde bei dem zu 0,1 % mit 98 %iger Ameisensäure angesäuerten Acetonitril (#10660131, Fisher Scientific, Schwerte) vorgegangen. Bei der *Flush-Syringe*-Lösung wurden die obigen Lösungen in einem Verhältnis von 80 %/20 % gemischt.

Vor jeder Messung wurde zuerst die Spritze mit einem Volumen von 2,5 mL und einer Geschwindigkeit von 100  $\mu$ L/s gespült und das gesamte System mit einer Flussrate von 5 mL/min und offenem Ventil entgast. Außerdem wurde ein Probedurchlauf durchgeführt (*Preview run*) und anschließend das System bei etablierter Baseline gestartet. Vor die zu vermessende Sequenz wurde jeweils ein Blindgradient mit 0,1 %iger Ameisensäure („*blanc*“) und eine Kalibriergerade (Imatinib-Konzentrationen [ $\mu$ mol]: 50, 30, 10, 5, 3, 1) vorgeschaltet. Um Probenvolumen zu sparen, wurden in die HPLC-Gefäße Mikroinsätze mit 250  $\mu$ L Volumen eingelassen (G30r, #1.300402, Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe). Jede Probe wurde zweimal vermessen und aus den Ergebnissen ein arithmetisches Mittel gebildet.

Das Messergebnis wurde als Elutionskurve (= Chromatogramm) dargestellt. Die Berechnung der Imatinib-Konzentration [ $\mu$ mol/L] erfolgte in Bezug auf die vorher gemessenen Standards über die Fläche der peaks (*area under curve*, AUC) und wurde vom Programm Chrom Quest™ 4.0 (ThermoFinnigan, San Jose, USA) ausgeführt.



**Abb. 4.2.: Exemplarisches Chromatogramm einer 37 °C-Probe.** Auf der x-Achse: Zeit [min], auf der Y-Achse: milli absorbation units (mAU). Deutlicher Imatinib-Peak nach einer Retentionszeit von 9,35 min, mAU von 146.

## 4.6. Normierung der Imatinib-Akkumulation

Um ein Verhältnis der Imatinib-Aufnahme zu einer Bezugsgröße herzustellen, erfolgte eine Normierung. Dazu wurden in meiner Arbeit zwei verschiedene Methoden genutzt: Die Normierung auf die absolute Zellzahl, die mit dem CASY-Zellzählgerät (CASY Innovatis Model TT, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bestimmt wurde, und die Normierung auf die Proteinmenge (mg/mL) mit dem Picodrop UV/VIS-Spektrophotometer (Picodrop 100, Modell PICOPET01, Picodrop Limited, Hinxton, UK).

### 4.6.1. Zellzählung mit CASY

Für die Zellzählung mit dem CASY-Gerät wurden die Wells für die Zellzählung drei Mal mit 4 °C kaltem DPBS gewaschen. Pro Well wurde 500 µL Trypsin auf die Zellen gegeben, die Platten für 5 min im Inkubator bei 37 °C bebrütet und die Zellen danach durch leichtes Klopfen gelöst. Die Trypsinreaktion wurde mit 1 mL DMEM pro Well gestoppt, die Zellsuspension in vorbereitete 1,5 mL Mikroreaktionsgefäße (#72.690.001, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht) überführt und für 10 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, verworfen, und das Pellet vorsichtig in 1 mL CASY ton, einem isotonischen Messpuffer für die Zellzählung (#05651808001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), resuspendiert. 10 µL dieser 1 mL-Suspension wurden in ein, mit 9,99 mL CASY ton gefülltes, CASY-Gefäß (#05651794001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) pipettiert (1:1000-Verdünnung), durch Schwenken gemischt und mit dem CASY-Zellzählgerät vermessen.

Das CASY-Zellzählgerät nutzte zur Messung eine 150 µm Kapillare, 3 Zyklen pro Messung, ein Probenvolumen von 400 µL pro Zyklus und eine Verdünnung von 1:1000. Das Messergebnis wurde als „lebende Zellen/mL“ angegeben.

### 4.6.2. Proteinbestimmung mit Picodrop

Für die Normierung des Imatinib-Uptakes auf die Proteinmenge wurde das Picodrop UV/VIS-Spektrophotometer genutzt, mit dem die Proteinmenge [mg/mL] in 2 µL Proben-Volumen bestimmt werden konnte. Bei der Probenvermessung wurde von einer UV/Xenon-Lichtquelle ultraviolettes und sichtbares Licht einer Wellenlänge von 220 nm bis 950 nm ausgesendet und durch die 1 mm dicke Pipettenspitze (#311110, P10 UVpette, Biozym, Hessisch Oldendorf) auf einen Detektor geleitet. Zu Beginn und nach 15 Proben musste dem Gerät ein Leerwert („blanc“) angegeben werden.

zum Vergleich der Proben zur Verfügung gestellt werden. Dazu wurden jeweils 2  $\mu\text{L}$  des Lysispuffers (0,1 %ige Ameisensäure) vermessen.

Jede Probe wurde mit dem Programm „*direct protein*“ dreimal vermessen, ein arithmetischer Mittelwert berechnet und danach mit der HPLC untersucht.

Es besteht ein linearer, proportionaler Zusammenhang zwischen der Zellzahl und der zu messenden Proteinmenge, sodass ein Korrekturfaktor berechnet wurde, mit dem die Proteinmenge in die Zellzahl umgerechnet werden konnte.

#### **4.7. Western Blot**

Nachdem Edwin Southern 1975 mit dem Southern Blot eine Technik zur Auftrennung und Hybridisierung von DNA-Fragmenten entwickelt hatte (Southern, 1975), wurde diese Methode von W. Neal Burnette, George R. Stark und Harry Towbin zum sogenannten Western Blot, einer Auftrennungs- und Hybridisierungstechnik für Proteine auf Nitrocellulose, weiterentwickelt (Burnette, 1981; Renart et al., 1979; Towbin et al., 1979).

Mit dem Western Blot werden Proteine durch eine Natriumdodecylsulfat (SDS)-Elektrophorese ihrer Größe und Ladung nach aufgetrennt, auf eine Trägermembran übertragen, über Markerenzym-Antikörperkonjugate gebunden und anschließend per Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

Für die Durchführung eines Western-Blots wurden zuerst die Zellen vorbereitet, indem sie 1x mit DPBS gewaschen wurden. Das DPBS wurde abgenommen, die Zellen trypsinisiert, die Reaktion mit DMEM gestoppt, die Suspension in ein 15 mL-Zentrifugengefäß überführt und für 5 min bei 200 g zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt, das entstandene Pellet in 1 mL DPBS unsteril resuspendiert, in ein 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäß pipettiert und für 5 min bei 4 °C und 2000 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das DPBS erneut abgenommen und das Pellet, je nach Experiment, in 100-300  $\mu\text{L}$  Lysispuffer (TRIS-Lysispuffer, NETN-Lysispuffer, s. Kapitel 3.4.) für 20 min auf Eis lysiert. Im nächsten Schritt wurde die Proteinkonzentration mit Picodrop bestimmt (s. Kapitel 4.6.2.) und die höher konzentrierten Proben auf den Wert der niedrigsten Konzentration mit dem entsprechenden Lysispuffer verdünnt.

Alle Proben wurden danach mit dem Probenpuffer NuPAGE (NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X), #NP0007, Life Technologies GmbH, Darmstadt) 1:5 verdünnt, gevortext, für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend zentrifugiert. Das im Probenpuffer NuPAGE enthaltene

Lithiumdodecylsulfat (LDS) wirkt als anionisches Tensid und überdeckt die Eigenladung der Proteine. Dadurch besitzen alle Proteine eine konstant negative Ladung und werden zusätzlich durch die Denaturierung beim Aufkochen linearisiert, was die Auftrennung der Proteine der Kettenlänge nach im elektrischen Feld ermöglicht. Für die Auftrennung wurde ein diskontinuierliches Gel (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, 4-20 %, #456-1096/#456-1094, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) mit einer Sammel- und einer Trenngel-Phase nach Ulrich Laemmli (Laemmli, 1970) genutzt. Die Mini-PROTEAN Elektrophorese-Zelle wurde gemäß Hersteller-Angaben aufgebaut, mit Laufpuffer (s. Kapitel 3.4.) gefüllt, die Taschen des Gels mit ddH<sub>2</sub>O gespült, die Proben jeweils mit 20-30 µL und der Marker (Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder, #SM1811, Fisher Scientific, Schwerte) mit 6 µL Volumen aufgetragen. Die SDS-Elektrophorese wurde für ca. 35 min bei anfangs 100 V und nach Einlaufen der Proben bei 200 V durchgeführt.

Für den Transfer wurde eine PVDF-Membran (#03010040001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) angepasst, für 1-3 min unter der Sicherheitswerkbank mit 100 % Methanol (#A0688, AppliChem GmbH, Darmstadt) aktiviert und für 10 min im Transferpuffer (s. Kapitel 3.4.) gewaschen. Nach der SDS-Elektrophorese wurde das Gel aus der Plastikhalterung genommen, die Überstände mit dem Skalpell abgezupft und das Gel im Transferpuffer equilibriert. Der Transfer wurde nach dem Prinzip des „nassen Tank-Transfers“ mit Transferpuffer durchgeführt. Die Transfer-Apparatur hatte einen Sandwich-artigen Aufbau: In der Mitte die aktivierte PVDF-Membran und das Gel, zu beiden Seiten ein, mit Transferpuffer getränktes, Filterpapier (#BP005080100, ALBET LabScience, Hahnemühle FineArt GmbH, Dassel) und ein getränkter Schwamm. Dieser Aufbau wurde vom Halteapparat zusammengedrückt, Luftblasen mit einem Roller ausgedrückt und vertikal im, mit Transferpuffer gefüllten, Tank befestigt, wobei sich die PVDF-Membran näher an der Anode und das Gel näher an der Kathode befand. Der Blotting-Prozess fand mit diesem Aufbau für 30-40 min bei 100 V auf einer Magnetrührplatte mit einem Rührfisch und einem Eispack im Behälter statt, um der Hitzeentwicklung entgegen zu wirken.

Nach dem Blotting wurde die PVDF-Membran zur Ladekontrolle mit Ponceau-Rot (s. Kapitel 3.4.) gefärbt und durch dreimaliges Waschen mit TBST à 5 min wieder entfärbt. Die Membran wurde mit 5 % BSA in TBST für 30 min bei Raumtemperatur geblockt, um freie Bindungsstellen zu sperren. Der Primäantikörper wurde 1:1.000/1:500 in TBST verdünnt, die Membran mit der Antikörper-Lösung in einer Proben-Tüte für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3x 5 min mit TBST gewaschen. Der Primäantikörper bindet über die Antigen-Antikörper-Bindung spezifisch an sein Epitop und unspezifisch gebundene Antikörper werden durch das TBST entfernt.

Der polyklonale Sekundärantikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) als Markerenzym gekoppelt war, wurde 1:1000/1:2000 in TBST verdünnt, die Membran damit 45-60 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert und anschließend 3x 5 min mit TBST gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgt über diesen Sekundärantikörper, der als Immunkonjugat mit einem Markerenzym verbunden ist und an die Fc-Region des Primärantikörpers bindet.

Die zwei Komponenten des Belichtungsreagenzes (Luminol/Verstärker-Lösung und stabile Peroxid-Lösung) wurden 1:1 gemischt (Lumi-Light<sup>PLUS</sup> Western Blotting Substrate, #12015196001, Roche, Mannheim), in die Proben-Tüte gegeben, Blasen entfernt und die Membran entweder direkt für 5-15 min am Lumi-Imager (Lumi-Imager F1 Workstation, Roche, Mannheim) belichtet oder lichtdicht abgedeckt. Das in der Lösung des Lumi-Light<sup>PLUS</sup> enthaltene Luminol reagiert mit der stabilen Peroxid-Lösung in Anwesenheit des Katalysators HRP mit Chemolumineszenz, die mit dem Lumi-Imager detektiert werden kann.

#### **4.8. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism 5.3. (Graph Pad Software Inc., San Diego, USA). Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. N bezieht sich auf die Anzahl der untersuchten Zelllinien, n auf die Anzahl der untersuchten Wells. Um eine statistische Signifikanz nachzuweisen wurde ein ungepaarter zweiseitiger Student-t-Test oder eine ANOVA-Analyse mit einem Tukey-Post-Test oder einem Dunnet-Post-Test durchgeführt. Zum Vergleich von Graphen wurde ein Extra-Gesamtquadratsummen F-Test verwendet. Ein p-Wert  $< 0.05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

Als Zitationsprogramm wurde Zotero 4.0 (Center for History and New Media at George Mason University, Virginia, USA) verwendet.

## 5. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Transporter-vermittelten Aufnahme von Imatinib in die Effektorzellen der SSc, die dermalen Fibroblasten, die Identifikation des verantwortlichen Transporters sowie die Beeinflussung dieses Prozesses durch die Schlüssel-Mediatoren der SSc. Vor dem Hintergrund der bis jetzt unzureichenden Therapiemöglichkeiten der SSc könnte das Wissen um die zelluläre Aufnahme des Imatinib in die SSc-F ein wichtiger Prädiktor für das Ansprechen auf eine Imatinib-Therapie sein.

Aus dem Institut der Experimentellen Nephrologie gibt es bereits mehrere Vorarbeiten zur Aufnahme von Imatinib und anderen TKI in dermale Fibroblasten und in synoviale Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis sowie zur Imatinib-Akkumulation in transfizierten HEK 293-Zellen (Schmidt-Lauber et al., 2012; Harrach, 2014; Victor, 2010) (s. Kapitel 2.1.).

### 5.1. Imatinib-Aufnahme in hH-F und SSc-F

#### 5.1.1. Temperaturabhängige und spezifische Imatinib-Aufnahme

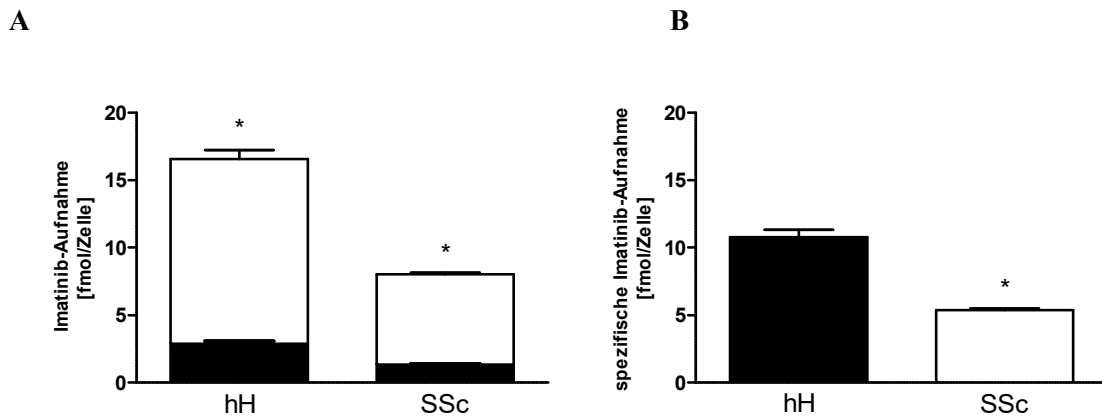
Im ersten Abschnitt meiner Arbeit habe ich mich mit der Charakterisierung des Imatinib-Transports in SSc- und hH-Fibroblasten befasst. Zu Beginn untersuchte ich mit der Imatinib-Akkumulations-Methode, ob eine Temperaturabhängigkeit der Imatinib-Aufnahme besteht. Dazu wurde in SSc-F und hH-F jeweils die basale Imatinib-Aufnahme bei Inkubation mit einer 10  $\mu\text{mol}$ -haltigen Imatinib-Lösung bei 4 °C und 37 °C, der physiologischen menschlichen Körpertemperatur, durchgeführt.

Die gewählte Imatinib-Konzentration von 10  $\mu\text{mol}$  (= 5,8971  $\mu\text{g/mL}$ ) lag im Maximalbereich der für therapeutische Zwecke im Patienten-Serum erreichten Imatinib-Spiegel (Schmidli et al., 2005). Die Konzentration des Pharmakons im Serum war interindividuell verschieden, abhängig von der eingenommenen Menge, Tal- und Spitzenspiegeln etc., lag aber meist zwischen 0,9  $\mu\text{g/mL}$  und 2,6  $\mu\text{g/mL}$  (Blasdel et al., 2007; le Coutre et al., 2004; De Francia et al., 2014; Peng et al., 2005; Picard et al., 2007).

Bei den Experimenten zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Aufnahme bei 4 °C ( $2,88 \pm 0,19$  fmol/Zelle für hH;  $1,34 \pm 0,03$  fmol/Zelle für SSc) und der Aufnahme bei 37 °C ( $13,67 \pm 0,67$  fmol/Zelle für hH;  $6,7 \pm 0,11$  fmol/Zelle für SSc) (s. Abb. 5.1. A.)). Die Aufnahme bei 4 °C muss als unspezifische Aufnahme gedeutet werden, da bei dieser Temperatur sowohl die

passiven als auch die primär und sekundär aktiven Transporte auf ein Minimum reduziert sind. Da ein signifikanter Unterschied zu 37 °C besteht, weist dies auf eine wichtige Beteiligung eines aktiven, temperaturabhängigen Mechanismus zur Imatinib-Aufnahme hin.

Bei Bildung der Differenz zwischen der unspezifischen und der totalen Aufnahme ergibt sich für die spezifische Aufnahme ein signifikanter Unterschied für die dermalen Fibroblasten aus dem pathologischen SSc-Umfeld im Vergleich zur Kontrolle hH, was auf eine Bedeutung dieser Krankheits-Entität für die Imatinib-Aufnahme hindeutet ( $10,78 \pm 0,54$  fmol/Zelle für hH;  $5,36 \pm 0,11$  fmol/Zelle für SSc). Insgesamt haben die SSc-Fibroblasten eine 49,7 % niedrigere Imatinib-Aufnahme als die hH-Fibroblasten (s. Abb. 5.1. B.)). Für meine Experimente standen mir insgesamt jeweils 4 hH-F-Typen und 4 SSc-F-Typen zur Verfügung, die je von drei weiblichen und einem männlichen Spender stammten.



**Abb. 5.1.: Temperaturabhängige und spezifische Imatinib-Aufnahme in hH- und SSc-Fibroblasten.**

A.) Temperaturabhängige Imatinib-Aufnahme in dermale Fibroblasten. Normalisierung auf die Zellzahl, schwarze Säule = 4 °C-Messung, weiße Säule = 37 °C-Messung. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 98$  und  $227$ , jeweils  $N = 4$ . \* = signifikanter Unterschied zwischen der Aufnahme bei 4 °C und bei 37 °C, Auswertung mit einem ungepaarten zweiseitigen Student-t-Test,  $p < 0,05$ .

B.) Spezifische Imatinib-Aufnahme in dermale Fibroblasten. Zur Bestimmung wurde die Imatinib-Akkumulations-Methode angewendet und die Differenz zwischen der Aufnahme bei 4 °C und bei 37 °C gebildet (s. 5.1. A.)). Normalisierung auf die Zellzahl, schwarze Säule = hH-F, weiße Säule = SSc-F. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 98$  und  $227$ , jeweils  $N = 4$ . \* = signifikanter Unterschied von SSc zur Kontrolle hH, Auswertung mit einem ungepaarten zweiseitigen Student-t-Test,  $p < 0,05$ .



### 5.1.2. Transport-Kinetik: Michaelis-Menten-Kinetik

Im zweiten Schritt der Transport-Charakterisierung habe ich die Transport-Kinetik bezüglich der Zeitabhängigkeit und der Michaelis-Menten-Kinetik untersucht.

Die Transport-Kinetik unterliegt der Michaelis-Menten-Gleichung, wobei die Umsatzrate durch die Anzahl der Carrier und die Affinität zwischen Substrat und Carrier limitiert ist. Die Michaelis-Menten-Gleichung beschreibt die Umwandlung eines Substrates S in das Produkt P mithilfe eines Enzyms E. In einem Zwischenschritt wird der Enzym-Substrat-Komplex ES gebildet, der entweder wieder in E + S zerfällt oder einen Übergangszustand durchläuft, wodurch das Substrat das Enzym E als Produkt P verlässt (Michaelis und Menten, 1913).



Die Reaktionsgeschwindigkeit V einer enzymkatalysierten Reaktion hängt von der Konzentration des [ES] ab. Diese lässt sich durch die Erhöhung der Substratkonzentration S bis zu einem Maximalwert  $V_{\max}$  steigern, bei der das Enzym gesättigt ist und alle Enzyme als [ES] vorliegen. Die Geschwindigkeit steigt zu Beginn steil-linear an und nähert sich im Michaelis-Menten-Diagramm mit zunehmender Konzentration S asymptotisch der  $V_{\max}$ . Die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  gibt eine Aussage über die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat: Je größer die  $K_m$ , desto geringer die Affinität. Die  $K_m$  ist die Konzentration, bei der 50 % der Enzyme mit Substrat beladen sind (Michaelis und Menten, 1913).

Als weiterer Kinetik-Parameter kann, analog zur katalytischen Effizienz von Enzymen, die Transporteffizienz als Quotient  $k_{\text{cat}} / K_m$  berechnet werden (Gründemann et al., 1999). Die Variable  $k_{\text{cat}}$  bezeichnet dabei die molekulare Aktivität („turn over“) des Transporters und ist definiert als  $k_{\text{cat}} = V_{\max} / ([E] + [ES])$  bzw.  $k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E_{\text{total}}]$ . Unter der Voraussetzung, dass  $[E_{\text{total}}]$  konstant ist, ergibt sich somit für die Transporteffizienz  $V_{\max} / K_m$  (s. Tabelle 5.1.) (Gründemann et al., 1999).

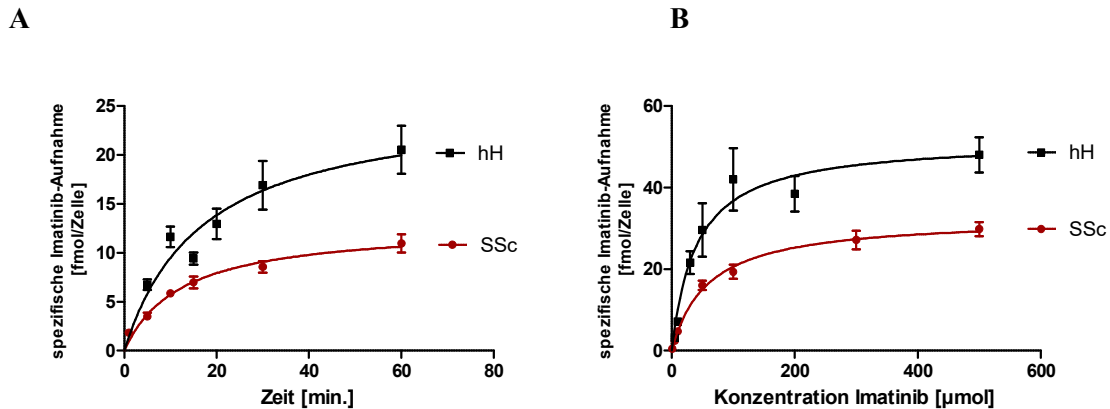
Zur Analyse der Transport-Kinetik wurden zeitabhängige Aufnahme-Experimente mit den SSc- und hH-Fibroblasten durchgeführt, in denen die Zellen mit der fixen Kontroll-Konzentration von 10  $\mu\text{mol}$  Imatinib für 1-60 min inkubiert wurden. Dabei ergibt sich ein Graph mit einem zuerst steil-linearen Anstieg und einem anschließenden Plateau ab 10 min (s. Abb. 5.2. A.)). Trotz der langen Inkubations-Zeit von 60 min zeigt sich ein Unterschied zwischen hH-F und SSc-F bezüglich der nichtlinearen Regression und der berechneten  $V_{\max}$ -Werte, der mit einem Vergleich

der Graphen mit dem Extra-Gesamtquadratsummen F-Test signifikant ausfällt,  $p = 0,0007$  ( $V_{\max} = 25,65 \pm 3,59$  fmol/Zelle für hH;  $V_{\max} = 12,83 \pm 0,88$  fmol/Zelle für SSc).

Weiterhin wurden in Inkubations-Experimenten für die Michaelis-Menten-Kinetik nach der Imatinib-Akkumulations-Methode die Fibroblasten für 10 min mit ansteigenden Imatinib-Konzentrationen in der Ringer-Lösung von 1-500  $\mu\text{mol}$  inkubiert. Es zeigt sich eine Kinetik mit einem primär linearen Anstieg bis ca. 50  $\mu\text{mol}$  Imatinib und einem späteren Plateau (s. Abb. 5.2. B.)). Mit einer nichtlinearen Regressions-Analyse der Michaelis-Menten-Diagramme konnten die  $V_{\max}$ - und die  $K_m$ -Werte bestimmt werden ( $K_m = 40,81 \pm 12,7$   $\mu\text{mol}$  für hH;  $V_{\max} = 51,7 \pm 4,72$  fmol/Zelle für hH;  $K_m = 58,98 \pm 8,46$   $\mu\text{mol}$  für SSc;  $V_{\max} = 32,71 \pm 1,5$  fmol/Zelle für SSc) (s. Tabelle 5.1. und Abb. 5.2. B.)). Wie bei der basalen Imatinib-Aufnahme (s. Abb. 5.1. B.)), besteht auch bei der konzentrationsabhängigen Aufnahme ein sichtbarer Unterschied zwischen hH- und SSc-Fibroblasten bezüglich der Michaelis-Menten-Kinetik und der  $K_m$ - und  $V_{\max}$ -Werte. Mit einem Vergleich der Graphen mit dem Extra-Gesamtquadratsummen F-Test zeigt sich für  $V_{\max}$  ein signifikant höherer Wert für hH-F (s. Abb. 5.2. B.)) ( $p = 0,002$ ), was im Einklang mit der erhöhten basalen Aufnahme der hH-F steht. Für  $K_m$  ergibt sich mit der genannten Vergleichsmethode kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,4$ ).

Das Sättigungs-Plateau deutet auf einen Carrier-vermittelten Transport hin, da ab einer bestimmten Konzentration alle Transporter mit Imatinib besetzt sind und, selbst durch weitere Konzentrationserhöhungen, keine weitere Steigerung der Aufnahme möglich ist. Der Wert von 10  $\mu\text{mol}$  Imatinib liegt noch im linearen Anstiegs-Bereich, sodass man von einem geringen Efflux ausgehen kann und sich diese Konzentration als Kontrollwert eignet.

Die Transporteffizienz, gebildet als Quotient aus  $V_{\max}$  und  $K_m$ , ergibt für die hH-F im Vergleich zu den SSc-F einen mehr als doppelt so großen Wert ( $1,27 \pm 0,37$  nmol/Zelle/10 min für hH-F;  $0,55 \pm 0,18$  nmol/Zelle/10 min für SSc-F) (s. Tabelle 5.1.), was ebenfalls zur höheren basalen Imatinib-Aufnahme und den höheren  $V_{\max}$ -Werten der hH-F passt.



**Abb. 5.2.: Transport-Kinetik: Michaelis-Menten-Kinetik in hH-F und SSc-F.**

A.) Zeitabhängige Imatinib-Aufnahme in hH- und SSc-F mit der Imatinib-Akkumulations-Methode, Zeit 1-60 Minuten, Imatinib-Konzentration jeweils 10 µmol, Normalisierung auf die Zellzahl. Auftragung in XY-Grafik, schwarze Kurve = hH-F, rote Kurve = SSc-F, Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 7-9$ , Zusammenfassung der SSc-F ( $N = 2$ ) und hH-F ( $N = 3$ ). x-Achse = Zeit [min], y-Achse = spezifische Imatinib-Aufnahme [fmol/Zelle]. Bestimmung der  $V_{max}$ -Werte mit einer nichtlinearen Regressions-Analyse mit einem Michaelis-Menten-Fit durch GraphPad Prism.

B.) Konzentrationsabhängige Imatinib-Aufnahme in hH-F und SSc-F mit der Imatinib-Akkumulations-Methode, Konzentrationen von 1-500 µmol, Inkubationszeit jeweils 10 min, Normalisierung auf die Zellzahl. Auftragung in XY-Grafik, schwarze Kurve = hH-F, rote Kurve = SSc-F, Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 7-19$ , Zusammenfassung der SSc-F und hH-F,  $N = 3$ . x-Achse = Imatinib-Konzentration [µmol], y-Achse = spezifische Imatinib-Aufnahme [fmol/Zelle]. Bestimmung der  $V_{max}$ - und  $K_m$ -Werte mit einer nichtlinearen Regressions-Analyse mit einem Michaelis-Menten-Fit durch GraphPad Prism.

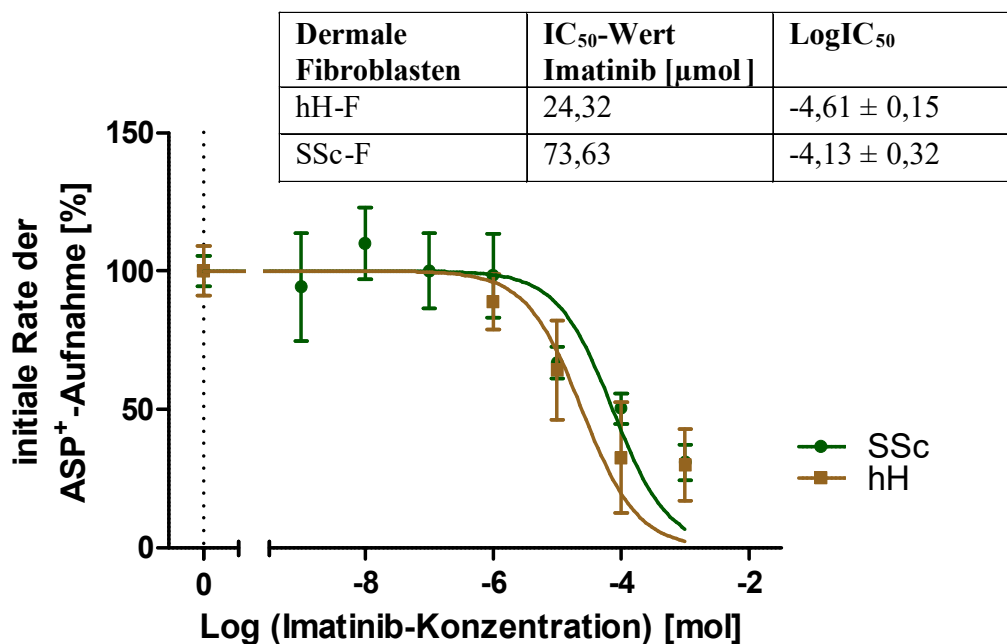
**Tabelle 5.1.: Transport-Kinetik:  $V_{max}$ ,  $K_m$ -Werte und Transporteffizienz.**  $V_{max}$ - und  $K_m$ -Werte bestimmt durch eine nichtlineare Regressions-Analyse des Michaelis-Menten-Diagramms (s. Abb. 5.2. B.)), Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SE. Berechnung der Transporteffizienz als Quotient aus  $V_{max}$  und  $K_m$  [nmol/Zelle/10 min]. \* = signifikanter Unterschied zwischen  $V_{max}$  bei hH-F und SSc-F ( $p = 0,002$ ) bei einem Vergleich der Graphen mit dem Extra-Gesamtquadratsummen F-Test; kein signifikanter Unterschied bei  $K_m$  ( $p = 0,4$ ).

Dermale Fibroblasten	$V_{max}$ [fmol/Zelle]	$K_m$ [µmol]	Transporteffizienz $V_{max} / K_m$ [nmol/Zelle/10 min]
hH-F	$51,7 \pm 4,72$	$40,81 \pm 12,7$	$1,27 \pm 0,37$
SSc-F	$32,71 \pm 1,5^*$	$58,98 \pm 8,46$	$0,55 \pm 0,18$

### 5.1.3. $IC_{50}$ -Werte für Imatinib an hH- und SSc-Fibroblasten

Im nächsten Schritt habe ich mithilfe der mikrofluorimetrischen Methode die apparente Affinität von Imatinib als Inhibitor der  $ASP^+$ -Aufnahme an den hH- und SSc-Fibroblasten untersucht. Dazu wurden die auf 96-well Platten ausgesäten Zellen mit abnehmenden Konzentrationen von

Imatinib, von  $10^{-3}$  mol bis  $10^{-9}$  mol, und einer fixierten Konzentration von 1  $\mu\text{mol}$  des Fluoreszenz-Farbstoffs  $\text{ASP}^+$  über den Injektor inkubiert und der initiale, lineare Fluoreszenz-Anstieg mit dem Tecan Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Lesegerät vermessen. Durch die Interferenz des Imatinib mit der  $\text{ASP}^+$ -Aufnahme konnte die Konzentration des Imatinib berechnet werden, bei der eine halbmaximale Inhibition (50 %) der  $\text{ASP}^+$ -Aufnahme vorliegt ( $\text{IC}_{50}$ -Wert für hH-F 24,32  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{IC}_{50}$ -Wert für SSc-F 73,63  $\mu\text{mol}$ ) (s. Abb. 5.3.). Imatinib interagiert folglich mit der  $\text{ASP}^+$ -Aufnahme in SSc-F und hH-F, wobei der niedrigere  $\text{IC}_{50}$ -Wert bei den hH-F auf eine stärkere apparente Affinität des Imatinib am aufnehmenden Transporter hinweisen könnte. Der höherer  $\text{IC}_{50}$ -Wert der SSc-F könnte eine geringere Interferenz des Imatinib an der  $\text{ASP}^+$ -Aufnahme und somit vermutlich eine geringere apparente Affinität am Imatinib-aufnehmenden Transporter anzeigen. Für  $\text{LogIC}_{50}$  errechnet sich, bei Anwendung des Extra-Gesamtquadratsummen F-Tests, allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen SSc-F und der Kontrolle ( $\text{LogIC}_{50}$   $-4,61 \pm 0,15$  für hH-F;  $\text{LogIC}_{50}$   $-4,13 \pm 0,32$  für SSc-F),  $p = 0,39$ .



**Abb. 5.3.:**  $\text{IC}_{50}$ -Werte für Imatinib an hH-F und SSc-F mit der Mikrofluorimetrie-Methode. Imatinib-Konzentrationen von  $10^{-3}$ - $10^{-9}$  mol in logarithmischer Darstellung. Auftragung in XY-Grafik, Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 4-39$  bei hH ( $\text{IC}_{50}$ -Wert = 24,32  $\mu\text{mol}$ ) und  $n = 20-138$  bei SSc, Zusammenfassung ( $\text{IC}_{50}$ -Wert SSc71 = 84  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{IC}_{50}$ -Wert SSc78 = 135  $\mu\text{mol}$ , Daten nicht gezeigt). x-Achse = Imatinib-Konzentration in Log [mol], y-Achse = initiale Rate der  $\text{ASP}^+$ -Aufnahme in % von Kontrollexperimenten ohne Imatinib-Zugabe. Berechnung der  $\text{IC}_{50}$ - und  $\text{LogIC}_{50}$ -Werte mit einer nichtlinearen Regressions-Analyse durch GraphPad Prism, „Dose-response – Inhibition, log (Inhibitor) vs. normalized response“. Bei einem Vergleich der Graphen mit dem Extra-Gesamtquadratsummen F-Test zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei  $\text{LogIC}_{50}$  ( $p = 0,39$ ).

#### 5.1.4. pH-abhängige Imatinib-Akkumulation in dermalen Fibroblasten

Mithilfe der Imatinib-Akkumulations-Methode und der mikrofluorimetrischen Methode wurde weiterhin die pH-Abhängigkeit der Imatinib- und der  $ASP^+$ -Aufnahme in die hH-F und SSc-F beleuchtet. Dafür wurde mit NaOH und HCl via pH-Meter der pH der Imatinib-Inkubations-Lösungen und der Lösungen für die mikrofluorimetrischen Experimente um den physiologischen pH-Wert von 7,4 herum variiert, mit einem Minimum von 6,0/6,4 und einem Maximum von 8,4/8,6 (Imatinib-Akkumulations-Methode/Mikrofluorimetrie-Methode). Bei den Imatinib-Akkumulations-Experimenten wurde statt der Ringer-Lösung mit dem Waymouth-Puffer gearbeitet (s. Tabelle 3.4.).

Bei den hH-F zeigt sich für den pH 6,4 eine um 60,5 % signifikant erniedrigte Imatinib-Aufnahme und für den basischen pH 8,4 eine um 38,7 % signifikant erhöhte Imatinib-Aufnahme (hH: Kontrolle pH 7,4:  $9,7 \pm 0,5$  fmol/Zelle; pH 6,4:  $3,83 \pm 0,46$  fmol/Zelle; pH 8,4:  $13,45 \pm 0,78$  fmol/Zelle) (s. Abb. 5.4. A)). Für die SSc-F ergeben sich vergleichbare Verhältnisse mit einer deutlicheren pH-Abhängigkeit. Die Abnahme der Imatinib-Aufnahme beträgt beim pH von 6,4 in den SSc-F 71,2 % und die Steigerung beim pH von 8,4 108 % (SSc: Kontrolle pH 7,4:  $4,07 \pm 0,36$  fmol/Zelle; pH 6,4:  $1,18 \pm 0,16$  fmol/Zelle; pH 8,4:  $8,47 \pm 0,74$  fmol/Zelle) (s. Abb. 5.4. B.)).

Bei den Mikrofluorimetrie-Experimenten wird nicht der Imatinib-Uptake direkt, sondern die  $ASP^+$ -Aufnahme untersucht, die ebenfalls eine pH-Abhängigkeit aufweist. Es wurde mit den pH-Werten 7,4/6,0/8,6 gearbeitet. Die hH-F zeigen beim azidischen pH von 6,0 eine um 27,7 % signifikant niedrigere  $ASP^+$ -Aufnahme und beim basischen pH von 8,6 eine um 21,2 % erhöhte Aufnahme. Die SSc-F demonstrieren beim basischen pH von 8,6 eine um 43 % signifikant höhere  $ASP^+$ -Aufnahme, während die Aufnahme beim pH von 6 mit der Aufnahme der Kontrolle vergleichbar ist (hH: Kontrolle pH 7,4:  $1,58 \pm 0,14$  a. u.; pH 6,0:  $1,14 \pm 0,07$  a. u.; pH 8,6:  $1,9 \pm 0,17$  a. u.) (SSc: Kontrolle pH 7,4:  $1,01 \pm 0,06$  a. u.; pH 6,0:  $0,95 \pm 0,06$  a. u.; pH 8,6:  $1,45 \pm 0,1$  a. u.) (s. Abb. 5.4. C.) + D.)). Wie in Kapitel 5.1.3, Abb. 5.3. (s. o.) gezeigt, kann die  $ASP^+$ -Aufnahme durch Imatinib konzentrationsabhängig inhibiert werden, woraus folgt, dass  $ASP^+$  und Imatinib zumindest teilweise vom gleichen Transporter in die dermalen Fibroblasten aufgenommen werden. Insofern ist anzunehmen, dass nicht nur der Transporter für  $ASP^+$ , sondern auch der aufnehmende Transporter für Imatinib pH-abhängig arbeiten muss.

In einem weiteren Experiment wurde das membrangängige Puffer-System Acetat/Essigsäure verwandt, um eine Azidifizierung des Zytoplasmas zu erreichen. Essigsäure kann aufgrund seines

ungeladenen Zustands frei bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes in die Zelle diffundieren. Durch den mittelstarken  $pK_s$ -Wert von 4,75 für Essigsäure dissoziiert sie bevorzugt zu Acetat und Protonen, die intrazellulär zu einer pH-Erniedrigung führen. Für das Acetat-Experiment wurde eine 60 mmol/L Acetat-Lösung hergestellt, für die 60 mmol/L des NaCl einer Ringer-Lösung durch Acetat ersetzt wurden. Durch die Verdünnung mit weiterer Ringer-Lösung wurden die anderen Konzentrationen erreicht (s. Tabelle 3.4.). Es zeigt sich eine konzentrationsabhängig signifikant gesteigerte Imatinib-Akkumulation mit Erhöhung der Aufnahme um 16 % bei 10 mmol/L Acetat und um 44 % bei 40 mmol/L Acetat (Kontrolle: 0 mmol/L Acetat = 100 %; 10 mmol/L Acetat: + 16 %  $\pm$  1,4 %; 20 mmol/L Acetat: + 22 %  $\pm$  1,1 %; 30 mmol/L Acetat: + 42 %  $\pm$  3,3 %; 40 mmol/L Acetat: + 44 %  $\pm$  5,4 %) (s. Abb. 5.4. F.).

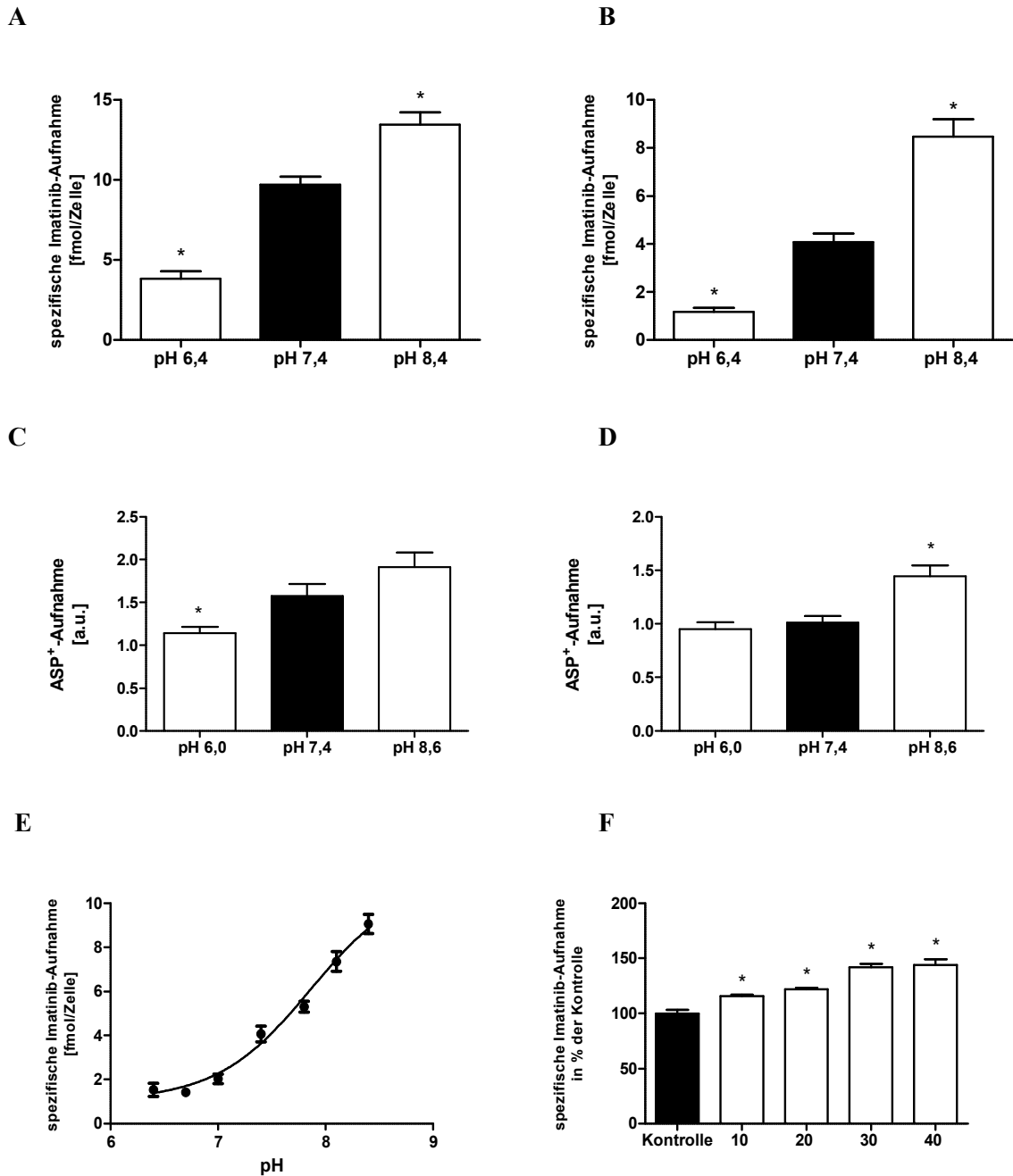
In der Theorie werden dabei die intrazellulären Protonen, die durch Dissoziation frei geworden sind, durch einen Transporter aus der Zelle befördert, während im Gegenzug im gleichen Schritt durch den Transporter Imatinib als Substrat in die Zelle aufgenommen wird. Insgesamt deuten die Ergebnisse somit auf einen pH-abhängigen Imatinib-Transporter, mit der Funktion eines Antiporters.

### 5.1.5. Efflux-Experimente

Für die Efflux-Experimente wurden die Kontrollen in etablierter Weise nach dem Imatinib-Akkumulations-Protokoll inkubiert, zwei Mal mit kalter Ringer-Lösung gewaschen und mit 0,1 %iger Ameisensäure lysiert. In den Wells für die Efflux-Bestimmung wurden die Zellen ebenfalls mit der Imatinib-Lösung inkubiert, zwei Mal gewaschen und die Waschlösung abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit auf 37 °C und 4 °C temperierter Ringer-Lösung mit pH 7,4 und pH 6,4 für die angegebenen Zeiträume inkubiert, sodass hier ebenfalls die spezifische Imatinib-Aufnahme berechnet werden konnte; die Zellen wurden im nächsten Schritt nochmals gewaschen, mit 0,1 %iger Ameisensäure lysiert und die Lysate in der HPLC vermessen.

In Abb. 5.5. zeigt sich eine zeitabhängige Zunahme des Efflux des Imatinib aus den Zellen. Bei einem extrazellulären pH von 6,4 kommt es bei den hH ab 30 min zu einem signifikanten Efflux mit einer Abnahme des Imatinib-Gehalts des Lysats um 51,2 % (hH: Kontrolle: 12,9  $\pm$  1,4 fmol/Zelle; Efflux nach 30 min bei pH 6,4: 6,3  $\pm$  0,86 fmol/Zelle) (s. Abb. 5.5. A.)). Für die SSc-F ergibt sich schneller ein signifikanter Efflux. Bereits nach 5 min ist der Efflux beim pH 6,4 mit einem 26,5 % niedrigeren Imatinib-Gehalt signifikant (s. Abb. 5.5. B.)), was auf eine zügigere Abgabe des Imatinib aus pathologischen SSc-Fibroblasten hindeuten könnte (SSc: Kontrolle: 4,9  $\pm$  0,36 fmol/Zelle; Efflux nach 5 min bei pH 6,4: 3,6  $\pm$  0,18 fmol/Zelle).

Aufgrund der postulierten pH-Abhängigkeit des Antiporters sollte eine Azidifizierung im extrazellulären Raum zu einem verstärkten Efflux von Imatinib führen. Bei Anwendung des Extra-Gesamtquadratsummen F-Tests ergibt sich aber kein signifikanter Unterschied zwischen dem Efflux bei pH 7,4 und 6,4 (bei hH  $p = 0,98$ ; bei SSc  $p = 0,46$ ).



**Abb. 5.4.: pH-abhängige Imatinib-Aufnahme in hH-F und SSc-F.**

A.) pH-abhängige Imatinib-Aufnahme in hH-Fibroblasten mit der Imatinib-Akkumulationsmethode. Normalisierung auf die Zellzahl. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 18$ ,  $N = 3$ . \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle pH 7,4 mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test,  $p < 0,05$ .

B.) pH-abhängige Imatinib-Aufnahme in SSc-Fibroblasten mit der Imatinib-Akkumulationsmethode. Normalisierung auf die Zellzahl. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 4-10$ ,  $N = 2$ . \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle pH 7,4 mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test,  $p < 0,05$ .

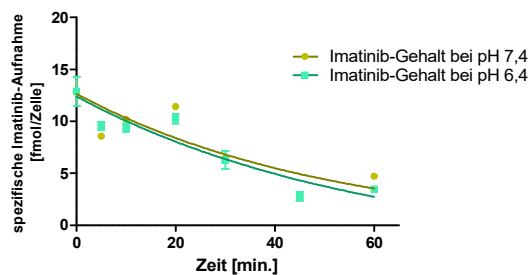
C.) pH-abhängige ASP<sup>+</sup>-Aufnahme in hH-F mit der mikrofluorimetrischen Methode. Angabe der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme-Steigung in a. u. (arbitrary unit). Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 23-27$ ,  $N = 1$ . \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle pH 7,4 mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test,  $p < 0,05$ .

D.) pH-abhängige ASP<sup>+</sup>-Aufnahme in SSc-F mit der mikrofluorimetrischen Methode. Angabe der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme-Steigung in a. u. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 101-123$ ,  $N = 2$ . \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle pH 7,4 mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test,  $p < 0,05$ .

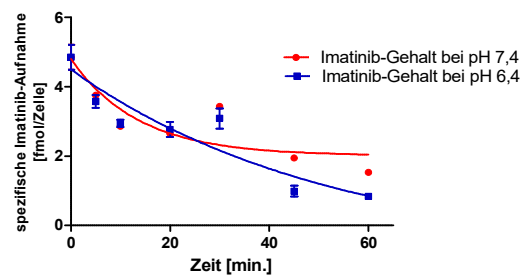
E.) pH-abhängige Imatinib-Aufnahme in SSc-Fibroblasten mit der Imatinib-Akkumulationsmethode. Normalisierung auf die Zellzahl. Auftragung in XY-Grafik, Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 4-10$ ,  $N = 2$ . x-Achse = pH, y-Achse = spezifische Imatinib-Aufnahme [fmol/Zelle]. Nichtlinearer Fit des Graphen mit sigmoidaler *dose-response* durch GraphPad Prism.  $\text{LogEC}_{50} 7,86 \pm 0,12$ .

F.) Imatinib-Aufnahme abhängig zur Acetat-Konzentration in SSc-F, mit der Imatinib-Akkumulations-Methode bestimmt. Werte als Mittelwerte  $\pm$  SEM in % der Kontrolle,  $n = 3-8$ ,  $N = 1$ . \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test,  $p < 0,05$ .

A



B



**Abb. 5.5.: Efflux-Bestimmung mit einem extrazellulären pH von 7,4 und 6,4 bei hH-F und SSc-F.**

A.) Efflux-Bestimmung bei hH-F mit Messung des spezifischen Imatinib-Gehalts der Lysate in der HPLC. Imatinib-Aufnahme nach der Imatinib-Akkumulations-Methode. Extrazellulärer pH bei Efflux 7,4 und 6,4. Normalisierung auf die Zellzahl. Auftragung in XY-Grafik, Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 6$  bei Kontrolle,  $n = 1$  bei pH 7,4;  $n = 3$  bei pH 6,4;  $N = 1$ . x-Achse = Zeit [min], y-Achse = spezifische Imatinib-Akkumulation [fmol/Zelle]. Nichtlinearer Fit durch GraphPad Prism, exponentiell, "one phase decay".

B.) Efflux-Bestimmung bei SSc-F mit Messung des spezifischen Imatinib-Gehalts der Lysate in der HPLC. Imatinib-Aufnahme nach der Imatinib-Akkumulations-Methode. Extrazellulärer pH bei Efflux 7,4 und 6,4. Normalisierung auf die Zellzahl. Auftragung in XY-Grafik, Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 5$  bei Kontrolle,  $n = 1$  bei pH 7,4;  $n = 3$  bei pH 6,4;  $N = 1$ . x-Achse = Zeit [min], y-Achse = spezifische Imatinib-Akkumulation [fmol/Zelle]. Nichtlinearer Fit durch GraphPad Prism, exponentiell, "one phase decay".



Am Abschluss des ersten Kapitels meiner Arbeit, das den Imatinib-Transport in SSc- und hH-Fibroblasten untersucht, muss gesagt werden, dass es sich um eine temperatur-, zeit- und konzentrationsabhängige Imatinib-Aufnahme handelt, die in den gesunden hH-F signifikant höher ausfällt als in den pathologischen SSc-F. Es liegt ein zeitabhängiger Efflux vor, der bei den SSc-F schneller abläuft, als bei den hH-F. Darüber hinaus handelt es sich beim Imatinib-Uptake um einen deutlich pH-abhängigen Prozess mit einer erhöhten Aktivität bei basischem pH.

## 5.2. Transporter-Expression der *SLC22A* und *SLC47A* in hH-F und SSc-F

Nach der Charakterisierung des Imatinib-Uptake in die dermalen Fibroblasten stellt sich die Frage, welche Transporter der *SLC22A*- und *SLC47A*-Familie in den Fibroblasten exprimiert werden. Dazu wurden semiquantitative PCRs der *hOCT*, *hOCTN* und *hMATE* sowie, vor dem Hintergrund der bereits bestimmten Charakteristika, qPCRs der zwei möglichen Transporter durchgeführt.

### 5.2.1. Semiquantitative PCR der *hOCT*, *hOCTN* und *hMATE1* in hH-F

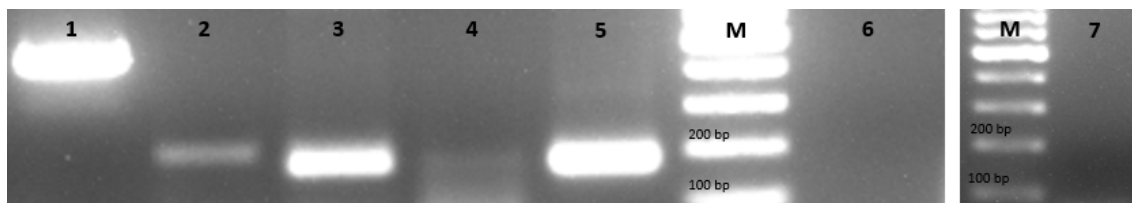


Abb. 5.6.: Semiquantitative PCR der *hOCT*, *hOCTN* und *hMATE1* in hH-F. M = Fermentas Gene Ruler 100 bp DNA-Marker, 100 und 200 bp beschriftet.

1 = <i>hOCT3</i> , Real 3, Größe 431 bp	2 = <i>hOCTN1</i> , Real 2, Größe 205 bp	3 = <i>hOCTN2</i> , Real 2, Größe 195 bp	4 = <i>hMATE1</i> , Real 2, Größe 179 bp
5 = <i>hGAPDH</i> -Kontrolle, Größe 179 bp	6 = <i>hOCT2</i> , Real 1, Größe 151 bp	7 = <i>hOCT1</i> , Real 1, Größe 206 bp	

Für die hH zeigen sich in verschiedenen semiquantitativen PCRs jeweils positive Banden für *hOCT3* (1), *hOCTN1* (2), *hOCTN2* (3) und eine schwache Bande für *hMATE1* (4) mit Primer-Dimeren; positive *hGAPDH*-Kontrolle = (5). Für *hOCT1* (7) und *hOCT2* (6) ist keine Bande sichtbar, sodass bei einem Standard-PCR-Ansatz kein Nachweis für diese beiden *hOCT* in hH vorhanden ist (s. Abb. 5.6.).

In einem Reamplifikations-Ansatz, bei dem statt 1  $\mu$ L cDNA 1  $\mu$ L des vorherigen PCR-Produktes vervielfältigt wurde, zeigt sich bei *hOCT1* und *hOCT2* eine Bande auf der entsprechenden Höhe, sodass vermutet werden kann, dass diese beiden OCT nur in geringem Maß in den hH-F exprimiert werden (Bild nicht gezeigt). Insgesamt enthalten hH-F, mit semiquantitativer PCR nachweisbar: *hOCT3*, *hOCTN1*, *hOCTN2* und *hMATE1*.

### 5.2.2. Semiquantitative PCR der *hOCT*, *hOCTN* und *hMATE* in SSc-F

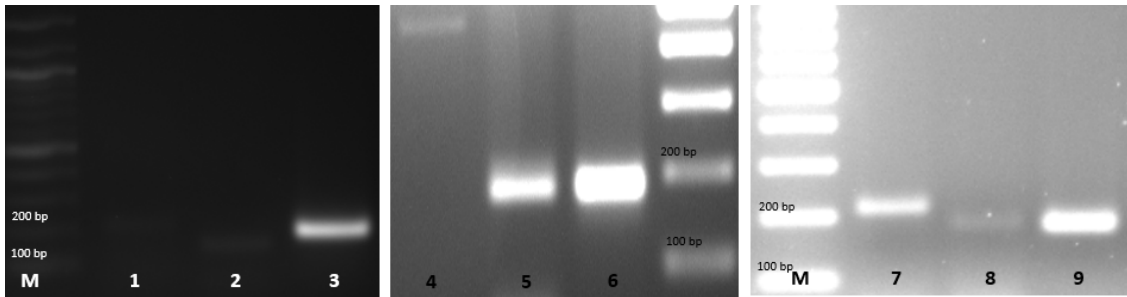


Abb. 5.7.: Semiquantitative PCR der *hOCT*, *hOCTN* und *hMATE1* in SSc-F. M = Fermentas Gene Ruler 100 bp DNA-Marker, 100 und 200 bp beschriftet.

1 = <i>hOCT1</i> , Real 1, Größe 206 bp	2 = <i>hOCT2</i> , Real 1, Größe 151 bp	3 = <i>hGAPDH</i> -Kontrolle, Größe 179 bp
4 = <i>hOCT3</i> , Real 3, Größe 431 bp	5 = <i>hOCTN2</i> , Real 2, Größe 195 bp	6 = <i>hGAPDH</i> -Kontrolle, Größe 179 bp
7 = <i>hOCTN1</i> , Real 2, Größe 205 bp	8 = <i>hMATE1</i> , Real 2, Größe 179 bp	9 = <i>hGAPDH</i> -Kontrolle, Größe 179 bp

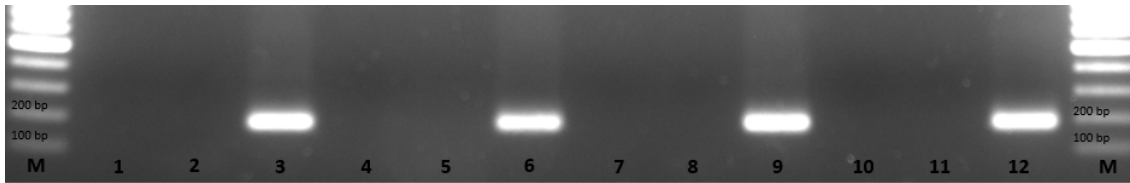
Bei den pathologischen SSc-Fibroblasten gibt es, wie bei den hH-F, jeweils in mehreren semiquantitativen PCRs positive Banden für *hOCT3* (4), *hOCTN1* (7), *hOCTN2* (5) und *hMATE1* (8). Die positiven *hGAPDH*-Kontrollen sind in Abb. 5.7. (3) / (6) / (9) sichtbar.

Für die *hOCT1* (1) und *hOCT2* (2) sind bei den SSc-F, im Gegensatz zu den hH-F, ohne Reamplifikation schwache positive Bande auf der richtigen Höhe erkennbar, 206 bp und 151 bp. Somit werden in SSc-F *hOCTN1*, *hOCTN2*, *hMATE1*, *hOCT1*, *hOCT2* und *hOCT3* nachgewiesen.

Der *hMATE2*-K wird nur in den proximalen Tubuli der humanen Niere exprimiert, sodass eine semiquantitative PCR sowohl bei hH-F als auch bei SSc-F ein negatives Ergebnis erbrachte (keine Abb. gezeigt).

Die Schnittmenge, die hH-F und SS-F bezüglich der detektierbaren exprimierten Transporter teilen, sind daher *hOCT3*, *hOCTN1*, *hOCTN2* und *hMATE1*.

### 5.2.3. Semiquantitative PCR der *hOATP* in hH-F und SSc-F



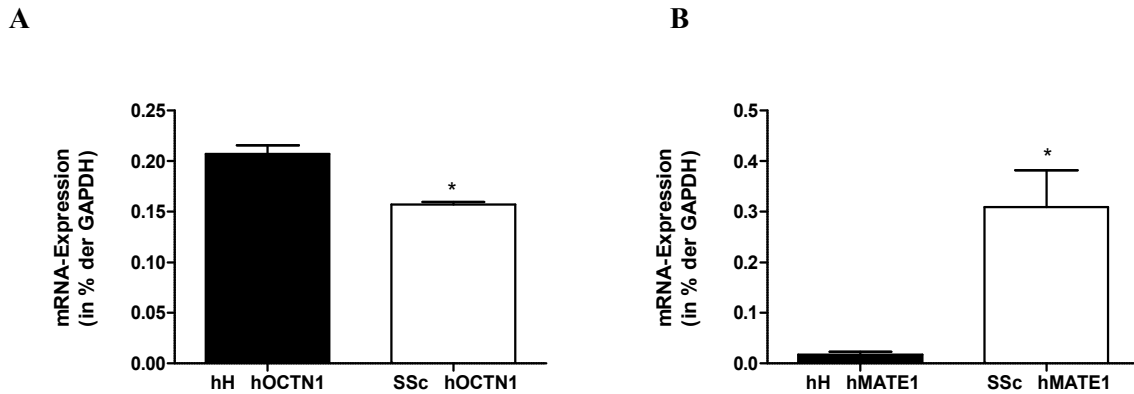
**Abb. 5.8.:** Semiquantitative PCR der *hOATP1A2* und *hOATP1B3* in hH-F und SSc-F. M = Fermentas Gene Ruler 100 bp DNA-Marker, 100 und 200 bp beschriftet. 1-3: hH52, 4-6: SSc71, 7-9: SSc78, 10-12: SSc28. *hOATP1A2* = 1 / 4 / 7 / 10, Größe 207 bp. *hOATP1B3* = 2 / 5 / 8 / 11, Größe 138 bp. *hGAPDH*-Kontrolle = 3 / 6 / 9 / 12, Größe 179 bp.

Hu et al. haben 2008 *hOATP1A2* und *hOATP1B3* aus der Familie der SCL21 als weitere mögliche Imatinib-Transporter in Diskussion gebracht. In *Xenopus laevis*-Oozyten, in die entweder die Transporter-cRNA oder Wasser als Kontrolle injiziert worden war, zeigte sich bei *hOATP1A2*- und *hOATP1B3*-überexprimierenden Oozyten eine signifikant höhere Imatinib-Aufnahme (Hu et al., 2008).

Daher wurde die cDNA der dermalen Fibroblasten auf das Vorhandensein dieser organischen Anionen-Transporter aus der Familie der SLC21 getestet (s. Abb. 5.8.). Für hH-F (1-3) sowie verschiedene SSc-F (4-12) zeigten sich keine Banden für *hOATP1A2* und *hOATP1B3* bei positiven hGAPDH-Kontrollen, sodass eine Expression und Beteiligung dieser Transporter am Imatinib-Uptake in die Fibroblasten unwahrscheinlich ist.

### 5.2.4. qPCR von *hOCTN1* und *hMATE1* in hH-F und SSc-F

Von den für die Transporter-vermittelte Imatinib-Aufnahme in Frage kommenden hOCTs (s. Kapitel 2.1.2., Abb. 2.1.), hOCT1-2, hOCTN1 und hMATE1, kommen aufgrund der Transport-Charakteristik, insbesondere der deutlichen pH-Abhängigkeit, nur hMATE1 und hOCTN1 für die Imatinib-Aufnahme in Frage. Zusammen mit hOCT3 und hOCTN2 sind sie die einzigen Transporter, die in der semiquantitativen PCR bei hH-F und SSc-F nachgewiesen werden können (s. Kapitel 5.2.1-2). Daher wurde von *hOCTN1* und *hMATE1* eine Real-Time qPCR durchgeführt (s. Abb. 5.9.).



**Abb. 5.9.: Real-Time qPCR-Ergebnis: Transporter-Expression von *hOCTN1* und *hMATE1* in hH-F und SSc-F.**

A.) Real-Time qPCR: Relative mRNA-Expression der hH-F und SSc-F für *hOCTN1*. Schwarze Säule = hH-F als Kontrolle, weiße Säule = SSc-F, Normalisierung auf die Expression des Referenzgens *hGAPDH* in Prozent. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM; bei hH-F: n = 1-2, N = 2; bei SSc-F: n = 1-2, N = 4. \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle hH-F, Auswertung mit einem ungepaarten zweiseitigen Student-t-Test,  $p < 0,05$ .

B.) Real-Time qPCR: Relative mRNA-Expression der hH-F und SSc-F für *hMATE1*. Schwarze Säule = hH-F als Kontrolle, weiße Säule = SSc-F, Normalisierung auf die Expression des Referenzgens *hGAPDH* in Prozent. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM; bei hH-F: n = 1-2, N = 2; bei SSc-F: n = 1-2, N = 4. \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle hH-F, Auswertung mit einem ungepaarten zweiseitigen Student-t-Test,  $p < 0,05$ .

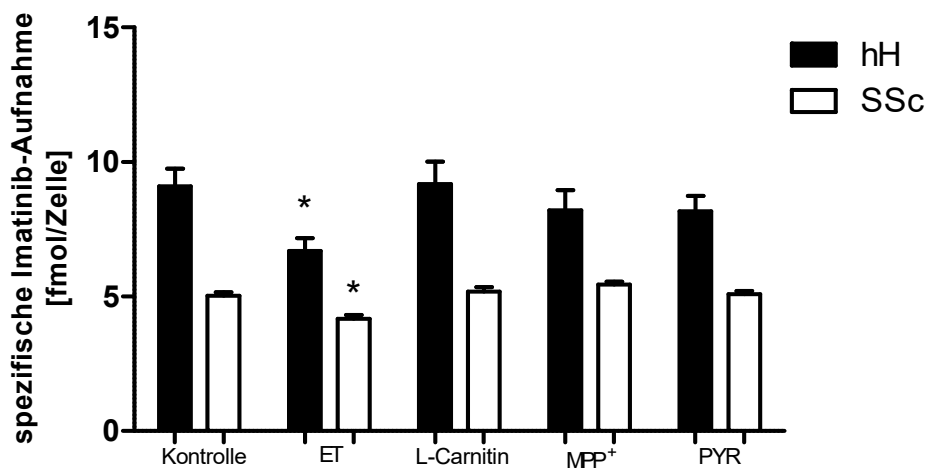
Die höchste Expression zeigt sich für *hMATE1* bei den SSc-F mit einer basalen Expression von  $0,31 \pm 0,07$  in % der *hGAPDH*. Die Expression des *hMATE1* bei den hH-F als Kontrolle ist, im Gegensatz dazu, etwa 18-fach erniedrigt ( $0,017 \pm 0,006$  in % der *hGAPDH*) und entspricht der niedrigsten Expression (s. Abb. 5.9. B.)).

Für die Expression des *hOCTN1* in hH-F und SSc-F ergeben sich Werte im Bereich zwischen den zwei vorher Genannten, wobei die Expression von *hOCTN1* in SSc-F um 25,2 % signifikant niedriger ist als in den gesunden Fibroblasten (hH-F:  $0,21 \pm 0,008$  in % der *hGAPDH*; SSc-F:  $0,16 \pm 0,002$  in % der *hGAPDH*) (s. Abb. 5.9. A.)).

### 5.3. Funktioneller Aktivitäts-Assay mit spezifischen Inhibitoren

Es bleibt die Frage, welcher der Transporter funktionell für die Imatinib-Aufnahme verantwortlich ist. Dafür wurden Inhibitions-Experimente durchgeführt. Der Carrier-Transport via SLC22A und SLC47A ist kompetitiv hemmbar. Bei der kompetitiven Hemmung konkurrieren Substrat und Inhibitor um die gleiche Bindungsstelle am Transporter, sodass die Transportrate sinkt.

Für die Hemmung der Imatinib-Aufnahme wurden spezifische Inhibitoren der hOCT, hOCTN und des hMATE1 verwendet. Hiermit lässt sich ein funktioneller Aktivitäts-Assay durchzuführen, wie er von Thomas et al. 2004 etabliert worden war (White et al., 2006; Thomas et al., 2004). Als Konzentrationen wurden die zweifachen  $K_m$ -Werte eingesetzt: Für hOCT1-3 100  $\mu\text{mol}$  MPP<sup>+</sup>, für hOCTN1 40  $\mu\text{mol}$  Ergothionein, für hOCTN2 20  $\mu\text{mol}$  L-Carnitin und für hMATE1 200 nmol Pyrimethamin (s. Tabelle 4.4.). Dazu wurden die Zellen nach der Imatinib-Akkumulations-Methode verarbeitet und die Inkubations-Lösungen jeweils mit den entsprechenden Konzentrationen der Inhibitoren versetzt (s. Abb. 5.10.). Auf diese Weise wurden funktionelle Inhibitions-Profile der hH-F und SSc-F erstellt (s. Abb. 5.11. + 5.12.).



**Abb. 5.10.: Übersicht: Spezifische Imatinib-Aufnahme in hH-F und SSc-F bei Hemmung mit spezifischen Inhibitoren mit der Imatinib-Akkumulations-Methode.** Inhibitoren: ET = Ergothionein 40  $\mu\text{mol}$ , L-Carnitin 20  $\mu\text{mol}$ , MPP<sup>+</sup> 100  $\mu\text{mol}$  und PYR = Pyrimethamin 200 nmol. Normalisierung auf die Zellzahl. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Zusammenfassung der hH-F und der SSc-F; hH-F: n = 20-30, N = 4; SSc-F: n = 35-60, N = 3 (einzelne Profile s. u.). \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test,  $p < 0,05$ .

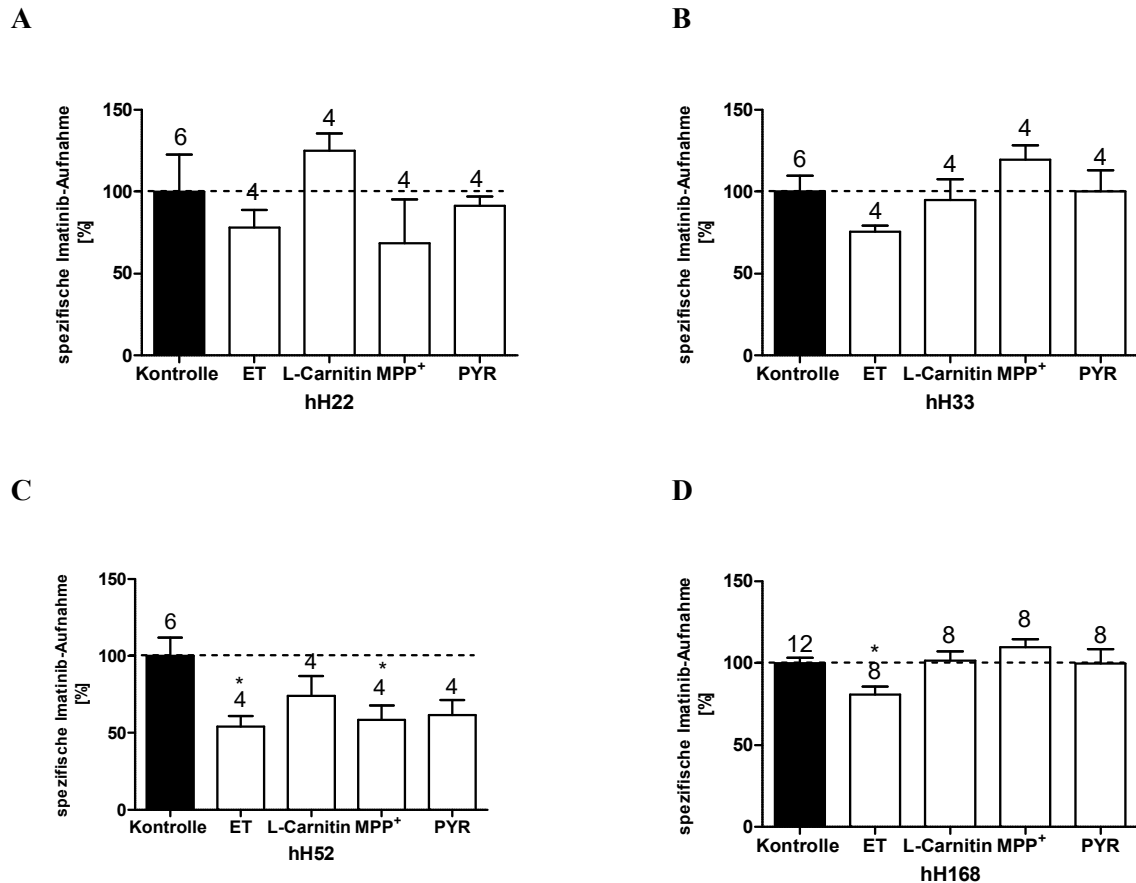
Sowohl für die gesunden Fibroblasten hH-F als auch für die SSc-F zeigt sich in der Zusammenfassung bei der Inkubation mit Imatinib und 40  $\mu\text{mol}$  Ergothionein eine um 26 % bzw. 17 % signifikant niedrigere Imatinib-Aufnahme. Bei den anderen Inhibitoren, insbesondere bei Pyrimethamin, einem potenten Inhibitor des hMATE1, ergeben sich in der Zusammenfassung keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle (s. Abb. 5.10.) (Für hH-F: Kontrolle  $9,09 \pm 0,67$  fmol/Zelle; Ergothionein:  $6,7 \pm 0,47$  fmol/Zelle; L-Carnitin:  $9,2 \pm 0,83$  fmol/Zelle; MPP<sup>+</sup>:  $8,2 \pm 0,75$  fmol/Zelle; Pyrimethamin:  $8,17 \pm 0,57$  fmol/Zelle) (Für SSc-F: Kontrolle  $5,03 \pm 0,13$  fmol/Zelle; Ergothionein:  $4,17 \pm 0,15$  fmol/Zelle; L-Carnitin:  $5,18 \pm 0,17$  fmol/Zelle; MPP<sup>+</sup>:  $5,45 \pm 0,11$  fmol/Zelle; Pyrimethamin:  $5,09 \pm 0,12$  fmol/Zelle).

Bei Betrachtung der Einzelprofile für hH-F (Abb. 5.11. A.) – D.) ist ersichtlich, dass nur bei hH52 und hH168 eine signifikante Inhibition der Imatinib-Aufnahme mit einer jeweils um 46 % und 19 % reduzierten Imatinib-Aufnahme vorliegt. Obwohl angedeutet, ist die Inhibition mit Ergothionein bei hH22 und hH33 im Einzel-Profil nicht signifikant.

Darüber hinaus zeigt sich bei hH52 eine signifikante Inhibition mit 100  $\mu\text{mol}$  MPP<sup>+</sup>. hOCT1 und hOCT2 weisen  $K_m$ -Werte von 15/32  $\mu\text{mol}$  und 19/78  $\mu\text{mol}$  auf (s. Tabelle 4.4.) (Koepsell et al., 2007). Obwohl hOCT1 und hOCT2 in hH-F nur in geringem Maß exprimiert werden, könnte durch die hohe MPP<sup>+</sup>-Konzentration, die für hOCT3 gewählt worden war, bei hH52 eine signifikante Inhibition dieser hOCT durch MPP<sup>+</sup> vorliegen.

Bei den SSc-F ist die Inhibition durch Ergothionein bei SSc8 (14,5 % Reduktion) und SSc71 (24 % Reduktion) signifikant. Durch die anderen Inhibitoren lässt sich keine Beeinflussung des Imatinib-Uptake erkennen (Abb. 5.12. A.) – C.).

Zusammengefasst implizieren die Ergebnisse dieser Inhibitions-Experimente, dass hOCTN1 primär für die Imatinib-Aufnahme in die hH- und die SSc-Fibroblasten verantwortlich sein muss. Es zeigen sich darüber hinaus Unterschiede bezüglich der Inhibition zwischen den einzelnen hH-F- und SSc-F-Typen (s. Profile).



**Abb. 5.11.: Einzel-Profil: Spezifische Imatinib-Aufnahme in hH-F bei Hemmung mit spezifischen Inhibitoren mit der Imatinib-Akkumulations-Methode.**

A.) Inhibitor-Profil hH22. Normalisierung auf 100 % der Kontrolle. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. n = 4-6. Analyse mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test, kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

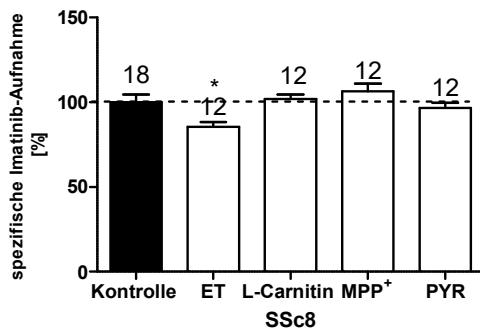
B.) Inhibitor-Profil hH33. Normalisierung auf 100 % der Kontrolle. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. n = 4-6. Analyse mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test, kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

C.) Inhibitor-Profil hH52. Normalisierung auf 100 % der Kontrolle. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. n = 4-6. \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test,  $p < 0,05$ .

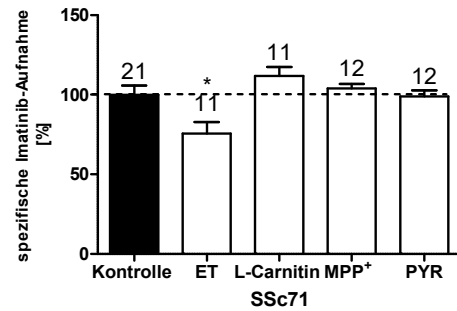
D.) Inhibitor-Profil hH168. Normalisierung auf 100 % der Kontrolle. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. n = 8-12. \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test,  $p < 0,05$ .



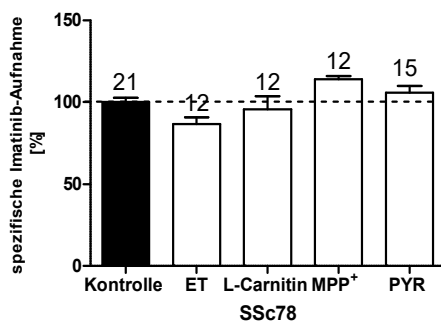
A



B



C



**Abb. 5.12.: Einzel-Profil: Spezifische Imatinib-Aufnahme in SSc-F bei Hemmung mit spezifischen Inhibitoren mit der Imatinib-Akkumulations-Methode.**

A.) Inhibitor-Profil SSc8. Normalisierung auf 100 % der Kontrolle. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. n = 12-18. \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test,  $p < 0,05$ .

B.) Inhibitor-Profil SSc71. Normalisierung auf 100 % der Kontrolle. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. n = 11-21. \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test,  $p < 0,05$ .

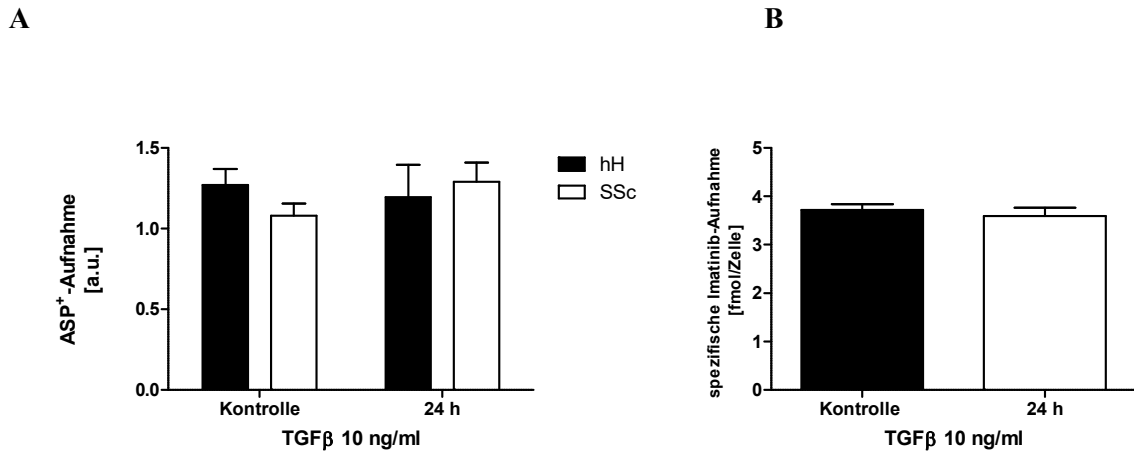
C.) Inhibitor-Profil SSc78. Normalisierung auf 100 % der Kontrolle. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. n = 12-21. Analyse mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test, kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

## 5.4. Einfluss der Schlüsselmediatoren TGF $\beta$ und PDGF auf die Imatinib-Aufnahme

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der zwei Schlüsselmediatoren TGF $\beta$  und PDGF auf die Imatinib-Aufnahme in die hH-F und die SSc-F untersucht. TGF $\beta$  und PDGF spielen als Schlüsselmediatoren in der Pathogenese der SSc eine wichtige Rolle bei den Schritten der Autoimmunität und Fibrose (s. Kapitel 1.1.7.4.). In den Experimenten wurde daher die Imatinib-Aufnahme mit der Imatinib-Akkumulations-Methode, die Fluoreszenz-Zunahme mit dem Mikrofluoreszenz-Assay und die Transporter-Expression durch qPCR unter pathologischen Bedingungen analysiert. Es wurde dabei mit Konzentrationen von 10 ng/mL TGF $\beta$  für 24 h und 10 ng/mL PDGF für 12-96 h gearbeitet (s. 4.1.7. Inkubation mit den Mediatoren TGF $\beta$  und PDGF).

### 5.4.1. Stimulation mit TGF $\beta$

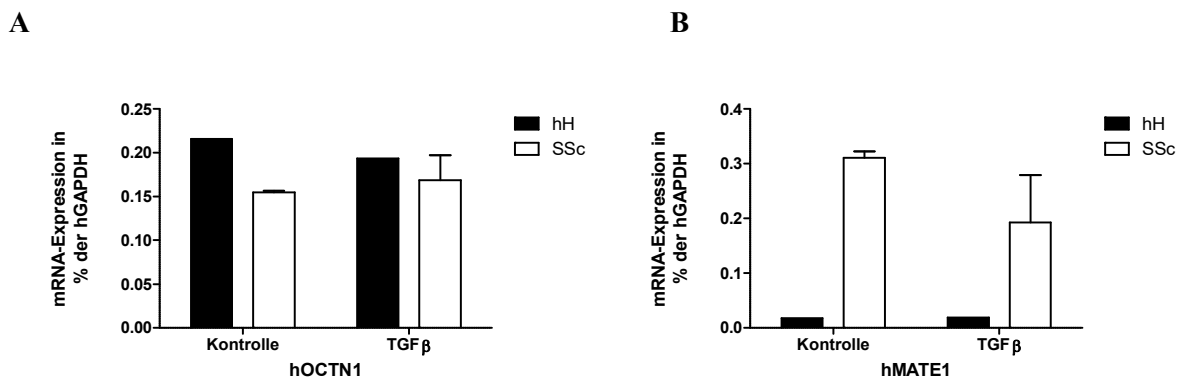
Bei der Stimulation mit TGF $\beta$  mit 10 ng/mL für 24 h zeigte sich im Fluoreszenz-Uptake, vermessen mit der mikrofluorimetrischen Methode, bei hH-F und SSc-F kein signifikanter Unterschied zwischen der Aufnahme vor und nach Stimulation (hH: Kontrolle:  $1,27 \pm 0,1$  a. u.; nach 24 h Stimulation:  $1,2 \pm 0,2$  a. u.; SSc: Kontrolle:  $1,1 \pm 0,08$  a. u.; nach 24 h Stimulation:  $1,29 \pm 0,12$  a. u.) (s. Abb. 5.13. A.)). Obwohl es sich bei den mikrofluorimetrischen Messungen um indirekte Messungen handelt, wird impliziert, dass der TGF $\beta$  keinen nennenswerten Einfluss auf den ASP<sup>+</sup>- und somit auch auf den Imatinib-aufnehmenden Transporter hat. Bezüglich der Imatinib-Akkumulation in SSc-F lässt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Uptake durch die Behandlung mit TGF $\beta$  feststellen (SSc: Kontrolle:  $3,72 \pm 0,12$  fmol/Zelle; nach 24 h Stimulation:  $3,6 \pm 0,17$  fmol/Zelle) (s. Abb. 5.13. B.)). Im nächsten Schritt wurde die Transporter-Expression des *hOCTN1* und des *hMATE1* unter Stimulationsbedingungen untersucht (s. Abb. 5.14. A.) und B.)). Weder bei *hMATE1* noch bei *hOCTN1* findet sich eine signifikant veränderte Expression der Transporter (*hOCTN1*: hH: Kontrolle: Expression 0,22 % der *hGAPDH*; nach 24 h Stimulation mit TGF $\beta$ : 0,19 % der *hGAPDH*; SSc: Kontrolle:  $0,15 \pm 0,002\%$  der *hGAPDH*; nach 24 h Stimulation mit TGF $\beta$ :  $0,17 \pm 0,03$  % der *hGAPDH*) (*hMATE*: hH: Kontrolle: 0,02 % der *hGAPDH*; nach 24 h Stimulation mit TGF $\beta$ : 0,02 % der *hGAPDH*; SSc: Kontrolle:  $0,31 \pm 0,01$  % der *hGAPDH*; nach 24 h Stimulation mit TGF $\beta$ :  $0,2 \pm 0,09$  % der *hGAPDH*). Insgesamt kann gesagt werden, dass der, durch *hOCTN1* vermittelte, Imatinib-aufnehmende Transport-Mechanismus durch TGF $\beta$  nicht beeinflusst wird.



**Abb. 5.13.: ASP<sup>+</sup>-Aufnahme und Imatinib-Akkumulation nach Stimulation mit TGFβ 10 ng/mL für 24 h.**

A.) ASP<sup>+</sup>-Aufnahme in hH-F (schwarze Säulen) und SSc-F (weiße Säulen) nach Stimulation mit TGFβ mit der Mikrofluorimetrie-Methode. Angabe der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme-Steigung in a. u. Werte angegeben als Mittelwerte ± SEM; hH: n = 63/17, N = 2; SSc: n = 120/63, N = 3. Auswertung jeweils mit einem ungepaarten zweiseitigen Student-t-Test, keine Signifikanz, p = 0,12 und p = 0,72.

B.) Spezifische Imatinib-Aufnahme in SSc-F nach Stimulation mit TGFβ mit der Imatinib-Akkumulations-Methode. Normalisierung auf die Zellzahl. Werte angegeben als Mittelwerte ± SEM, n = 8/12, N = 2. Auswertung mit einem ungepaarten zweiseitigen Student-t-Test, keine Signifikanz, p = 0,59.



**Abb. 5.14.: Ergebnisse Real-Time qPCR: Transporter-Expression von *hOCTN1* und *hMATE1* nach Stimulation mit TGFβ 10 ng/mL für 24 h.**

A.) Real-Time qPCR: Relative mRNA-Expression der hH-F und SSc-F für *hOCTN1* nach Stimulation. Schwarze Säule = hH-F als Kontrolle, weiße Säule = SSc-F, Normalisierung auf die Expression des Referenzgens *hGAPDH* in Prozent. Werte angegeben als Mittelwerte ± SEM; bei hH-F: n = 1, N = 1; bei SSc-F: n = 1, N = 3. Analyse bei SSc-F mit einem ungepaarten zweiseitigen Student-t-Test, keine Signifikanz, p = 0,65.

B.) Real-Time qPCR: Relative mRNA-Expression der hH-F und SSc-F für *hMATE1* nach Stimulation. Schwarze Säule = hH-F als Kontrolle, weiße Säule = SSc-F, Normalisierung auf die Expression des Referenzgens *hGAPDH* in Prozent. Werte angegeben als Mittelwerte ± SEM; bei hH-F: n = 1, N = 1; bei SSc-F: n = 1, N = 2. Analyse bei SSc-F mit einem ungepaarten zweiseitigen Student-t-Test, keine Signifikanz, p = 0,31.

### 5.4.2. Stimulation mit PDGF

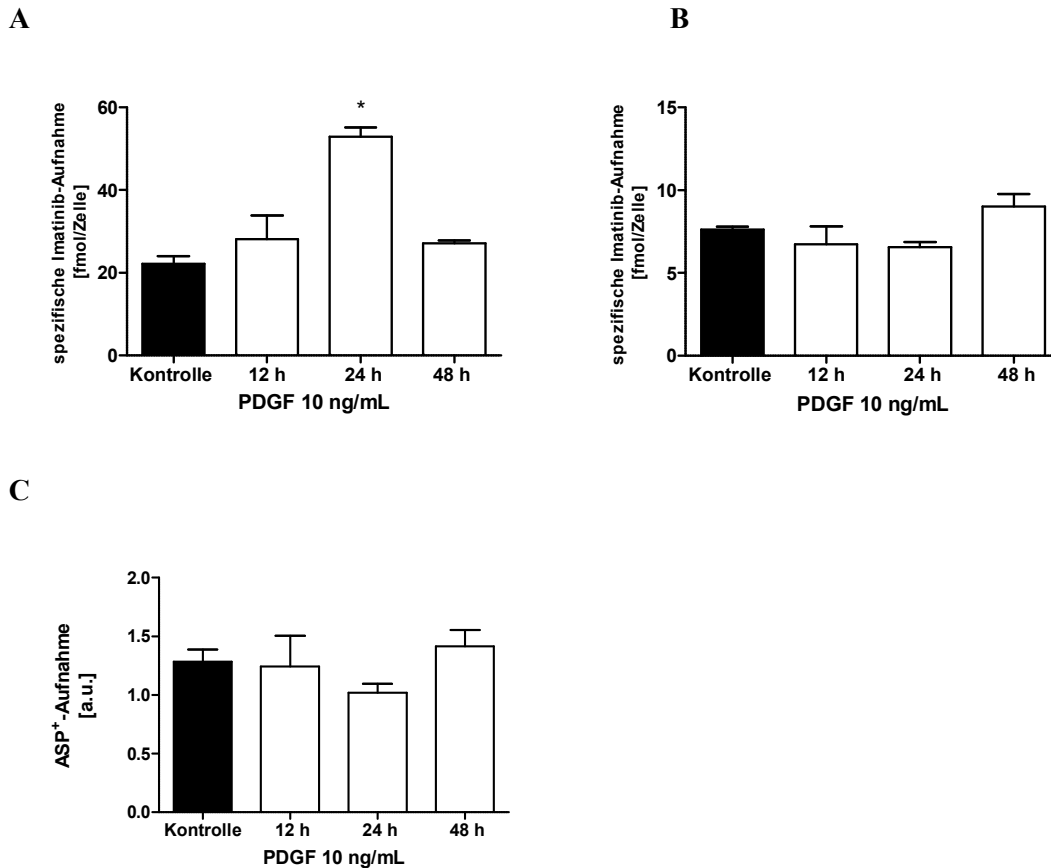
Zur Charakterisierung des Effekts von PDGF auf die hH-F und SSc-F wurden Imatinib-Akkumulations-Experimente nach der etablierten Methode durchgeführt. Vor der Inkubation mit der 10  $\mu\text{mol}$ -Imatinib-Lösung wurden die Zellen für 12 h, 24 h und 48 h mit PDGF 10 ng/mL stimuliert. Da PDGF eine stimulierende Wirkung auf das Zellwachstum und die Zellteilung hat, wurde die Zellzahl hier pro Inkubations-Zeitraum und nicht pro Platte bestimmt, um diesen Effekt auszuschließen.

Für die hH-F zeigt sich nach 12 h Stimulation eine um 27 % leicht und nach 24 h Stimulation eine um 139 % signifikant erhöhte Imatinib-Aufnahme (s. Abb. 5.15. A.) (hH-F: Kontrolle:  $22,15 \pm 1,87$  fmol/Zelle; 12 h:  $28,1 \pm 5,79$  fmol/Zelle; 24 h:  $52,88 \pm 2,3$  fmol/Zelle; 48 h:  $27,09 \pm 0,68$  fmol/Zelle). Im Gegensatz dazu weisen die SSc-F keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Imatinib-Akkumulation auf (s. Abb. 5.15. B.) (SSc-F: Kontrolle:  $7,62 \pm 0,19$  fmol/Zelle; 12 h:  $6,74 \pm 1,1$  fmol/Zelle; 24 h:  $6,56 \pm 0,32$  fmol/Zelle; 48 h:  $9,03 \pm 0,75$  fmol/Zelle).

Dieses Ergebnis lässt sich mit dem Mikrofluoreszenz-Assay für die SSc-F bestätigen (SSc: Kontrolle:  $1,3 \pm 0,1$  a. u.; 12 h:  $1,2 \pm 0,26$  a. u.; 24 h:  $1,0 \pm 0,08$  a. u.; 48 h:  $1,4 \pm 0,14$  a. u.) (s. Abb. 5.15. C.)).

Im nächsten Schritt stellte sich die Frage, ob die signifikante Steigerung der Imatinib-Aufnahme in die hH-F mit einer Expressions-Änderung der aufnehmenden Transporter assoziiert ist. Dazu wurde eine qPCR des *hMATE1* und des für den Imatinib-Uptake zuständigen *hOCTN1* durchgeführt, für die die Zellen vorher mit 10 ng/mL PDGF für 12-96 h inkubiert wurden. Der *hOCTN1* weist bei 24-stündiger Stimulation eine um 36 % signifikant erhöhte Expression auf, was mit der erhöhten Imatinib-Akkumulation der hH-F korreliert (s. Abb. 5.16. A.)). Die SSc-F besitzen bei 12 h und 24 h Stimulation eine signifikant höhere *hOCTN1*-Expression (290 % und 95,5 % höhere Expression), obwohl die unstimulierte Kontrolle sogar signifikant niedriger als die der hH-F ausfällt (s. Abb. 5.16. A.)). Die erhöhte Expression des *hOCTN1* ist aber nicht, wie bei den hH-F, mit einer höheren Imatinib-Aufnahme assoziiert (s. Abb. 5.15. B.)). Dieses Ergebnis lässt eine Änderung der Antwort auf die PDGF-Stimulation in den SSc-Fibroblasten vermuten, die schon während des Krankheitsprozesses erhöhten PDGF-Konzentrationen ausgesetzt gewesen sein müssen.

Für den *hMATE1* zeigt sich über den Inkubations-Zeitraum weder für hH-F noch für SSc-F ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ohne Mediator-Stimulation in der Transporter-Expression (s. Abb. 5.16. B.)). Wie bereits vorher gezeigt, besteht ein Unterschied zwischen der *hMATE1*-Expression in hH-F und SSc-F, der bei der nicht stimulierten Kontrolle signifikant ist.

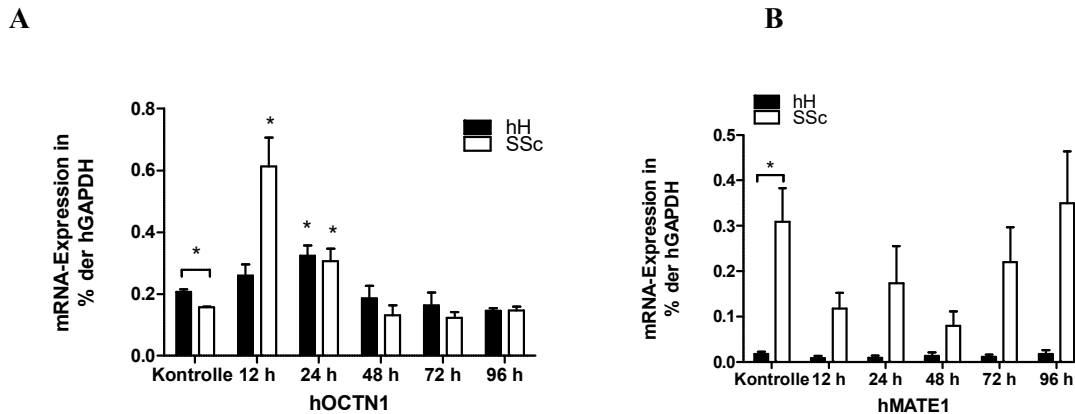


**Abb. 5.15.: Spezifische Imatinib-Akkumulation in hH-F und SSc-F und ASP<sup>+</sup>-Aufnahme in SSc-F nach Stimulation mit PDGF 10 ng/mL für 24 h.**

A.) Spezifische Imatinib-Aufnahme in hH-F nach Stimulation mit PDGF für 12 h, 24 h und 48 h mit der Imatinib-Akkumulations-Methode. Normalisierung auf die Zellzahl. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3-12$ ,  $N = 1$ . \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test,  $p < 0,05$ .

B.) Spezifische Imatinib-Aufnahme in SSc-F nach Stimulation mit PDGF für 12 h, 24 h und 48 h mit der Imatinib-Akkumulations-Methode. Normalisierung auf die Zellzahl. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3-12$ ,  $N = 1$ . Analyse mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test, kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

C.) ASP<sup>+</sup>-Aufnahme in SSc-F nach Stimulation mit PDGF für 12 h, 24 h und 48 h mit der mikrofluorimetrischen Methode. Angabe der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme-Steigung in a. u. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n = 9-60$ ,  $N = 4$ . Analyse mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test, kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle.



**Abb. 5.16.: Ergebnisse Real-Time qPCR: Transporter-Expression von *hOCTN1* und *hMATE1* nach Stimulation mit PDGF 10 ng/mL für 12-96 h.**

A.) Real-Time qPCR: Relative mRNA-Expression der hH-F und SSc-F für *hOCTN1* nach Stimulation. Schwarze Säule = hH-F als Kontrolle, weiße Säule = SSc-F, Normalisierung auf die Expression des Referenzgens *hGAPDH* in Prozent. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM; hH-F: n = 1-2, N = 2-3; SSc-F: n = 1-2, N = 4. \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test,  $p < 0,05$ . \* über Linie = signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle *hOCTN1* bei hH-F und SSc-F mit einem ungepaarten zweiseitigen Student-t-Test,  $p < 0,05$ .

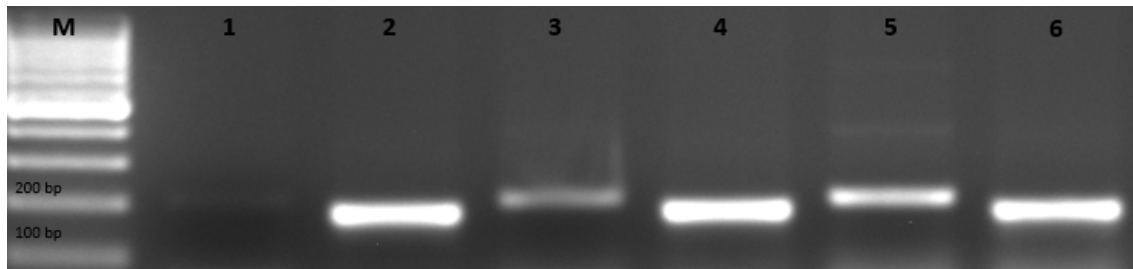
B.) Real-Time qPCR: Relative mRNA-Expression der hH-F und SSc-F für *hMATE1* nach Stimulation. Schwarze Säule = hH-F als Kontrolle, weiße Säule = SSc-F, Normalisierung auf die Expression des Referenzgens *hGAPDH* in Prozent. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM; bei hH-F: n = 1-2, N = 2-3; SSc-F: n = 1-2, N = 4. Analyse mit der one-way ANOVA, Dunnett-Post-Test, kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. \* über Linie = signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle *hMATE1* bei hH-F und SSc-F mit einem ungepaarten zweiseitigen Student-t-Test,  $p < 0,05$ .

## 5.5. Western Blot für hOCTN1

Im vorangegangenen Teil meiner Arbeit konnte hOCTN1 als aufnehmender Transporter für Imatinib in die SSc-F und hH-F identifiziert werden. Per semiquantitativer PCR und qPCR wurde *hOCTN1* in den Fibroblasten nachgewiesen (s. 5.2.1/2/4). Um diesen SLC22A-Transporter auf Proteinebene nachzuweisen, wurde ein Western Blot mit einem Antikörper gegen hOCTN1 durchgeführt.

Als Positivkontrolle wurden mit hOCTN1 transfizierte HEK 293-Zellen verwendet, die in der Experimentellen Nephrologie durch Marion Victor etabliert worden sind (Victor, 2010). Die HEK 293-Zellen besitzen einen Plasmidvektor pEBTet, auf dem das Gen für den *hOCTN1* lokalisiert ist und dessen Expression durch die Inkubation mit einem Tetracyclin induziert werden kann. Daher wurden die transfizierten HEK 293-hOCTN1-Zellen nach einem Protokoll für 24 h mit Doxycyclin (1 mg/L) inkubiert, um die Expression zu induzieren.

In Abb. 5.17. sieht man eine semiquantitative PCR von HEK 293-Wildtyp-Zellen, nicht-induzierten und induzierten HEK 293-hOCTN1-Zellen. Bei den HEK 293-Wildtyp-Zellen (1) zeigt sich eine sehr schwache Bande auf der korrekten Höhe von 205 bp. Bei den nicht-induzierten (3) und den mit Doxycyclin induzierten HEK 293-hOCTN1-Zellen (5) wird eine jeweils stärkere Bande für *hOCTN1* nachgewiesen. In (2), (4) und (6): positive *hGAPDH*-Kontrolle.

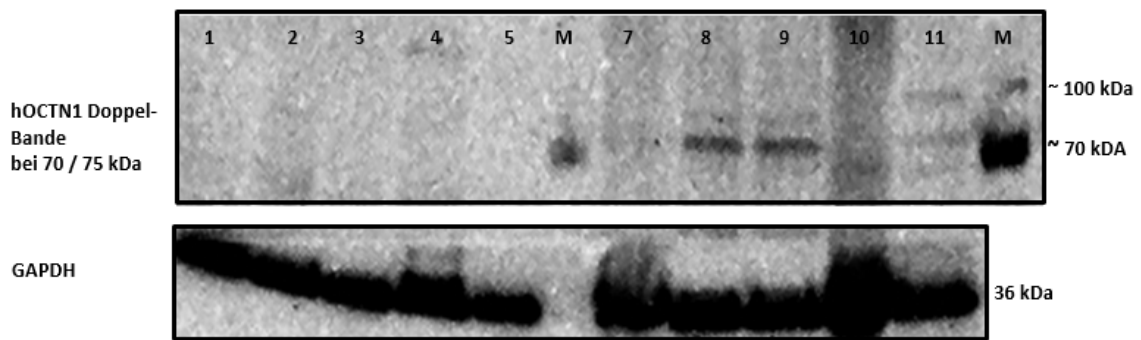


**Abb. 5.17.:** Semiquantitative PCR von HEK 293-Wildtyp-Zellen, nicht-induzierten und induzierten HEK 293-hOCTN1-Zellen. M = Fermentas Gene Ruler 100 bp DNA Marker, 100 und 200 bp beschriftet.

<b>1</b> = HEK 293-Wildtypzellen, <b>hOCTN1</b> , Real 2, Größe 205 bp	<b>2</b> = HEK 293-Wildtypzellen, <b>hGAPDH</b> -Kontrolle, Größe 179 bp	<b>3</b> = nicht mit Doxycyclin induzierte HEK 293- hOCTN1- Zellen, <b>hOCTN1</b> , Real 2, Größe 205 bp
<b>4</b> = nicht mit Doxycyclin induzierte HEK 293- hOCTN1- Zellen, <b>hGAPDH</b> -Kontrolle, Größe 179 bp	<b>5</b> = mit Doxycyclin induzierte HEK 293- hOCTN1- Zellen, <b>hOCTN1</b> , Real 2, Größe 205 bp	<b>6</b> = mit Doxycyclin induzierte HEK 293- hOCTN1- Zellen, <b>hGAPDH</b> -Kontrolle, Größe 179 bp

Der Western-Blot (s. Abb. 5.18.) wurde mit den nicht-induzierten (8) und induzierten HEK 293-hOCTN1-Zellen (9) als Positiv-Kontrolle durchgeführt. Die HeLa-Zellen (11) wurden durch die Firma Abnova als Positivkontrolle empfohlen. Aufgetragen wurden Lysate der SSc-F, SSc78 (1), SSc71 (2) und SSc28 (3), sowie der hH-F, hH168 (4); weiterhin ein Lysat der synovialen Fibroblasten eines Patienten mit rheumatoider Arthritis (5), kurz RASF, und ein Lysat der humanen Niere (10).

Der Antikörper für hOCTN1 zeigt sich als Doppel-Bande bei 70/75 kDa. Im unteren Bildabschnitt ist die positive hGAPDH-Kontrolle auf der Höhe von 36 kDa für alle Proben abgebildet. Für die induzierten und die nicht-induzierten HEK 293-hOCTN1-Zellen sowie die HeLa-Zellen sieht man als Positiv-Kontrolle eine Doppelbande auf der entsprechenden Höhe. Bei den Fibroblasten sieht man keine deutlichen Doppelbanden, allenfalls angedeutete Banden für SSc71 (2) und hH168 (4), was an einer zu geringen Expression des hOCTN1 in den Zellen liegen könnte.



**Abb. 5.18.: Western Blot mit einem hOCTN1-Antikörper an Fibroblasten und HEK 293-Zellen.** Oberer Bildabschnitt: hOCTN1 Doppel-Bande bei 70/75 kDa. M = Marker: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 1 = SSc78, 2 = SSc71, 3 = SSc28, 4 = hH168, 5 = RASF857, 7 = HEK 293-Wildtyp-Zellen, 8 = mit hOCTN1-transfizierte HEK 293-Zellen, keine Induktion mit Doxycyclin; 9 = mit hOCTN1-transfizierte HEK 293-Zellen, 24 h Induktion mit Doxycyclin; 10 = humane Niere; 11 = HeLa-Zellen als Positivkontrolle. Unterer Bildabschnitt: hGAPDH-Kontrolle als Referenzprotein bei 36 kDa. [RASF = synovialer Fibroblast eines Patienten mit rheumatoider Arthritis]



## 6. Diskussion

### 6.1 Imatinib in der SSc-Therapie

Die SSc ist eine komplexe rheumatische Erkrankung aus dem Formenkreis der Kollagenosen, die sich durch eine Vaskulopathie, Autoimmunität, und im Endstadium durch eine extensive Fibrose auszeichnet (Gabrielli et al., 2009; Varga und Abraham, 2007). Die hohe Morbidität und Mortalität der SSc ist v. a. in der, durch die Fibrose mitverursachte, ILD und PAH begründet (Steen und Medsger, 2007; Sabnani et al., 2009). Bisher liegen keine klinisch effektiven antifibrotischen Therapie-Optionen vor (Denton et al., 2006).

Schon 2002 entdeckten Beham-Schmid et al. und Hasserjian et al., dass es bei CML-Patienten mit einer nachweisbaren Knochenmarks-Fibrose unter Imatinib-Therapie als Nebeneffekt zu einer signifikanten Regression der Fibrose kam (Hasserjian et al., 2002; Beham-Schmid et al., 2002). Diese morphologischen Veränderungen stellten sich als unabhängig vom eigentlichen zytogenetischen Ansprechen auf das Imatinib heraus (Bueso-Ramos et al., 2004; Hasserjian et al., 2002). Aus diesem Grund wurde der Ansatz untersucht, primär auf Fibrose beruhende Krankheits-Entitäten wie die Bleomycin-induzierte Lungenfibrose oder die nephrogene systemische Fibrose mit Imatinib zu therapieren (Kay und High, 2008; Daniels et al., 2004).

Die SSc-Fibroblasten zeichnen sich durch eine Hochregulation der Transkription profibrotischer Gene wie Kollagen Typ I aus, die auch *in vitro* über mehrere Passagen erhalten bleibt (Derk und Jimenez, 2003; LeRoy, 1974). 2007 konnten Distler et al. weiterhin nachweisen, dass Imatinib *in vitro* in SSc-F COL1A1, COL1A2 und Fibronectin auf mRNA- und Proteinlevel ohne toxische Nebenwirkungen inhibieren konnte (Distler et al., 2007). Angesichts der Tatsache, dass für Patienten mit SSc keine zufriedenstellende antifibrotische Therapie zur Verfügung stand, rückte damit Imatinib als Therapiemöglichkeit bei SSc in den Fokus (Beyer et al., 2010; Mendoza und Jiménez, 2011; Distler und Distler, 2009; van Daele et al., 2008). Nach zunächst vielversprechenden Fallstudien und klinischen Interventionsstudien (Guo et al., 2012; Spiera et al., 2011; Tamaki et al., 2012) zeigten sich in weiteren Studien keine oder nicht signifikante Verbesserungen bezüglich Hautfibrose und FVC sowie teilweise starke Nebenwirkungen, die zum Therapieabbruch führten (Prey et al., 2012; Khanna et al., 2011). Daher kann momentan keine Empfehlung für die systematische Therapie mit Imatinib bei SSc durch die EULAR/EUSTAR gegeben werden (Kowal-Bielecka et al., 2009; Walker et al., 2011).

Allerdings handelt es sich bei Imatinib um eine Substanz, die mit der simultanen Inhibition der TK des PDGF-R und der Inhibition der c-Abl, einer TK aus der Signalkaskade des TGF $\beta$ -Rezeptors, einen theoretisch vielversprechenden Therapieansatz verfolgt und auch einige positive Therapieergebnisse in vitro und in vivo erzielen konnte (Chung et al., 2009; Fraticelli et al., 2014; Gordon et al., 2014; Daniels et al., 2004; Distler et al., 2007). Aus diesem Grund werden nun weitere TKI, z. B. Nilotinib, auf ihre Wirkung bei SSc untersucht (Gordon et al., 2015).

## 6.2 Imatinib-Influx und -Efflux als möglicher Aspekt beim Therapieerfolg

Bezüglich der teilweise ernüchternden Studien-Ergebnisse könnte vermutet werden, dass diese auf unzureichenden Konzentrationen des Imatinib intrazellulär beruhen – durch einen ungenügenden Influx des TKI nach intrazellulär oder durch einen unerwünschten Efflux nach extrazellulär. Da Imatinib im Blut zu einem Drittel als polares Mono-Kation vorliegt, ist eine freie Diffusion für diesen Anteil nicht möglich (Szakács et al., 2005). Für die Wirkung auf die ATP-Bindungsstelle der c-Abl und des PDGF-R muss Imatinib aber nach intrazellulär gelangen, sodass von einem Carrier-vermittelten Prozess ausgegangen werden muss, an dem potenziell SLC beteiligt sein könnten.

Insgesamt werden den Influx- und Efflux-Transportern, den Interaktionen und den klinischen Auswirkungen auf die intrazelluläre TKI-Aufnahme zunehmend Beachtung geschenkt (Minematsu und Giacomini, 2011; Hu et al., 2008). Bei CML konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition mit hOCT1-spezifischen Inhibitoren eine signifikant niedrigere Imatinib-Aufnahme in humane T-Lymphoblasten bewirkt und die hOCT1-Expression ein guter Prädiktor für das zytogenetische Ansprechen auf die Imatinib-Therapie darstellt (Crossman et al., 2005; Nardinelli et al., 2012; Wang et al., 2008; White et al., 2006; Thomas et al., 2004). Darüber hinaus stellten sich bei CML die Efflux-Transporter der Familie der *ATP-Binding Cassette Transporter* als wichtig heraus (Slot et al., 2011). Die Überexpression des ABCB1, auch P-Glykoprotein 1 oder MDR1 (*Multi-Drug-Resistance Protein 1*) genannt, reduzierte die intrazelluläre Imatinib-Akkumulation und führte zur Entwicklung einer Imatinib-Resistenz (Hirayama et al., 2008; Mahon et al., 2003; Widmer et al., 2003; Thomas et al., 2004). Ein weiterer für den Imatinib-Efflux verantwortlicher Transporter ist der ABCG2, der auch als BCRP1 (*Breast Cancer Resistance Protein*) bezeichnet wird (Burger et al., 2004, 2005; Dohse et al., 2010). Beim GIST entwickelt sich in der Imatinib-Langzeit-Therapie eine pharmakologische Resistenz mit einer um 30 % gesunkenen systemischen Exposition, bei der ebenfalls eine Verbindung zum ABCB1 oder zu hOCT/hOATP vermutet wird (Echoute et al., 2011, 2012).

Während zum Imatinib-Influx und -Efflux bei CML und GIST bereits einige Vorarbeiten existieren, gibt es zum Imatinib-Transport bei SSc nur wenige Untersuchungen. Deshalb habe ich die intrazelluläre Aufnahme des Imatinib in die dermalen Fibroblasten und die mögliche Beteiligung der hOCT, hOCTN und hMATE am Influx analysiert, was ein wichtiger Prädiktor für den Imatinib-Therapieerfolg sein könnte.

### 6.3 Transporter-vermittelte Imatinib-Aufnahme

Im ersten Abschnitt meiner Arbeit habe ich die basale Imatinib-Aufnahme in die SSc-F, die hH-F und die Transporter-Kinetik untersucht. Bei den SSc sowie den hH bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Aufnahme bei 4 °C und bei 37 °C (s. Abb. 5.1. A.)). Diese deutliche Temperaturabhängigkeit des Influx unterstreicht, dass es sich bei der Aufnahme um einen aktiven Prozess handeln muss. Die freie Diffusion, die aufgrund der positiven Ladung des kationischen Imatinib nicht möglich ist (Szakács et al., 2005), ist vom Konzentrationsgradienten und von der Temperatur abhängig (s. Diffusionskoeffizient, 1. Fick'sches Gesetz).

Der Carrier-vermittelte Transport ist eine Form der erleichterten Diffusion, daher ebenfalls temperaturabhängig (s. Abb. 5.1.) und besitzt das Konzentrationsgefälle als treibende Kraft. Er ist sättigbar, ähnlich einer Michaelis-Menten Kinetik (s. Abb. 5.2.), und aufgrund der hohen Strukturspezifität durch Inhibitoren kompetitiv hemmbar (s. Abb. 5.10.) (Markl et al., 2011), was sich ausnahmslos mit den anderen Aufnahme-Charakteristika des Imatinib in die dermalen Fibroblasten aus meiner Arbeit vereinbaren lässt. Die Überfamilie der *Solute-Carrier*-Transporter, kurz SLC-Transporter, beinhaltet die hOCT, hOCTN (SLC22A) und die hMATE (SLC47A), die den Transport von organischen Kationen vermitteln. Bezüglich der Transporter-Kategorie gehören sie zur Untergruppe der Porter, die Uniport (hOCT1-3, OCTN2), Symport (hOCTN2) und Antiport (hOCTN1, hMATE1) katalysieren können (Ciarimboli, 2008; Hediger et al., 2004; Koepsell und Endou, 2004; Motohashi und Inui, 2013a).

Bei Bildung der Differenz zwischen der Aufnahme bei 4 °C und 37 °C fällt auf, dass ein markanter Unterschied zwischen der intrazellulären Imatinib-Akkumulation bei SSc-F und bei hH-F besteht (s. Abb. 5.1. B.)). Die SSc-F aus dem pathologischen, fibrotisch veränderten Krankheitsmilieu nehmen ca. 49,7 % weniger Imatinib auf als die gesunden hH-F. Diese interessante Tatsache könnte erklären, warum es in den verschiedenen Studien mit Imatinib zu wenig überzeugenden klinischen Verbesserungen kam (Pope et al., 2011; Prey et al., 2012; Bournia et al., 2013; Khanna et al., 2011). Durch die verminderte Aufnahme in die Zellen konnte intrazellulär bei den Kranken eventuell keine effektive Konzentration erreicht werden. Umgekehrt könnte spekuliert werden,

dass die teilweise beträchtlichen Nebenwirkungen wie Ödeme und Diarrhoe, die meist während der ersten Behandlungswoche auftraten und partiell zum Therapieabbruch führten (Pope et al., 2011; Khanna et al., 2011), der starken Imatinib-Aufnahme in eigentlich gesunde Zellen geschuldet sein könnten. Korrespondierend zu diesen Ergebnissen fielen die  $V_{\max}$ -Werte der SSc-F in der Sättigungskinetik (s. Abb. 5.2. B.)) und die  $V_{\max}$ -Werte in der zeitabhängigen Imatinib-Akkumulation (s. Abb. 5.2. A.)) signifikant niedriger aus als die Werte der hH-F.

Bei den mikrofluorimetrischen Messungen und der Ermittlung der  $IC_{50}$ -Werte zeigte sich eine  $ASP^+$ -Aufnahme in die hH-F und SSc-F, die durch steigende Imatinib-Konzentrationen inhibierbar ist (s. Abb. 5.3.), was darauf hindeutet, dass  $ASP^+$  und Imatinib um den gleichen Carrier konkurrieren. Der niedrigere  $IC_{50}$ -Wert an den hH-F (24,32  $\mu\text{mol}$ ) könnte auf eine höhere apparente Affinität am Imatinib-aufnehmenden Transporter hindeuten, was sich mit der signifikant höheren spezifischen Imatinib-Aufnahme in die hH-F (s. Abb. 5.1. B.)) in Einklang bringen lässt. Vice versa könnte der höhere  $IC_{50}$ -Wert des Imatinib an den SSc-F (73,63  $\mu\text{mol}$ ) zu einer niedrigeren Affinität an diesen Fibroblasten und zu einer schwächeren spezifischen Aufnahme passen (s. Abb. 5.1. B.)).

#### **6.4 Weiteres Charakteristikum der Aufnahme: pH-Abhängigkeit**

Als weitere Eigenschaft zeigten sowohl die SSc-F als auch die hH-F darüber hinaus in den Imatinib-Akkumulations-Experimenten und in den mikrofluorimetrischen Versuchen eine signifikante pH-Abhängigkeit (s. Abb. 5.4.). Das Optimum lag im basischen Bereich mit einer Mehraufnahme von 39 % bei hH und 108 % bei SSc. Ein azidischer pH im extrazellulären Milieu bewirkte eine minimierte Imatinib-Aufnahme mit einem um 71 % bei SSc und um 60 % bei hH gesenkten Uptake (s. Abb. 5.4. A.-B.)). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen könnte spekuliert werden, dass der aufnehmende Transporter ein  $H^+$ -/OC-Antiporter sein muss. Bei wenig Protonen extrazellulär/basischem pH wird ein Proton nach extrazellulär und simultan Imatinib nach intrazellulär transportiert, was das Aufnahme-Maximum beim pH von 8,4 erklärt. Im Gegensatz dazu sinkt der Uptake bei azidischem pH/vielen Protonen extrazellulär, da ein Proton zum Ausgleich nach intrazellulär und Imatinib zeitgleich nach extrazellulär bewegt wird.

Unter Beachtung dieses Charakteristikums wäre eine, rein theoretische, Therapie-Option, mit der mehr Imatinib in die SSc-F befördert werden könnte, eine Erhöhung des Blut-pH auf einen leicht basischen Wert. Da dieser Parameter vom Körper strengstens reguliert wird, bleibt dies eine abstrakte Überlegung.

## 6.5 Transporter-Expression in den dermalen Fibroblasten

Nach diesen Überlegungen zu den Charakteristika des aufnehmenden Transporters wurde die genetische Expression in den dermalen Fibroblasten ermittelt. Mithilfe der semiquantitativen PCR konnten in den hH-F *hOCT3*, *hOCTN1*, *hOCTN2* und *hMATE1* als mögliche Transporter-Kandidaten nachgewiesen werden (s. Abb. 5.6.). In den SSc-F zeigten sich neben *hOCTN1*, *hOCTN2* und *hMATE1* noch Banden für *hOCT1*, *hOCT2* und *hOCT3* (s. Abb. 5.7.). Die Schnittmenge, die sich die dermalen Fibroblasten bezüglich der Expression teilen, sind daher *hOCT3*, *hOCTN1*, *hOCTN2* und *hMATE1*.

Unter Berücksichtigung der starken pH-Abhängigkeit (s. Abb. 5.4.) bleiben von den gefundenen exprimierten Transportern nur zwei Kandidaten für die Imatinib-Aufnahme übrig: *hOCTN1* und *hMATE1*, die beide als  $H^+$ -/OC-Antiporter pH-abhängig arbeiten (Tamai et al., 1997; Tanihara et al., 2007). Deshalb habe ich von diesen beiden Transportern eine qPCR durchgeführt. Auf der Transkriptions-Ebene zeigte sich beim *hOCTN1* eine signifikant niedrigere Expression in den SSc-F als in den hH-F (s. Abb. 5.9. A.)). Außerdem stellte sich die Expression des *hMATE1* in den hH-F interessanterweise als 18-fach niedriger heraus als in den SSc-F (s. Abb. 5.9. B.)).

## 6.6 Inhibition der Imatinib-Akkumulation durch Ergothionein

Zur eindeutigen Bestimmung des verantwortlichen Transporters wurde ein funktioneller Aktivitäts-Assay durchgeführt, bei dem die Imatinib-Akkumulation kompetitiv durch spezifische Inhibitoren der Transporter gehemmt wurde (s. Abb. 5.10.). In der Zusammenfassung wies nur die Inhibition mit Ergothionein in Höhe des doppelten  $K_m$ -Wertes eine signifikante Inhibition bei SSc-F und hH-F auf. Alle anderen eingesetzten spezifischen Inhibitoren zeigten keinen sichtbaren Effekt. Da Ergothionein als spezifisches Substrat für *hOCTN1* gilt und kein anderer Metabolit durch *hOCTN1* effizienter transportiert wird als Ergothionein (Gründemann et al., 2005; Koepsell et al., 2007), muss daraus geschlossen werden, dass der *hOCTN1* hauptsächlich für die Imatinib-Aufnahme in die dermalen Fibroblasten zuständig ist.

Bei individueller Betrachtung der Fibroblasten-Zellreihen fällt auf, dass nicht alle SSc-F (SSc78) oder hH-F (hH22, hH33) signifikant, sondern teilweise nur diskret inhibiert wurden (s. Abb. 5.11. + 5.12.). Die Zellreihen der Primärkulturen stammen aus Hautbiospien unterschiedlicher Patienten (s. 4.1.1. Herkunft der Zellen), sodass die unterschiedliche Höhe der Inhibition möglicherweise auf interindividuelle Unterschiede der Proteinexpression zurückzuführen ist. Diese Vermutung würde mit dem Vergleich der basalen spezifischen

Imatinib-Aufnahme der SSc-F und hH-F korrespondieren, die teilweise signifikant unterschiedlich ausfällt (keine Abb. gezeigt). Bei den hOCT1 und hOCT2 konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass hinsichtlich der apparenten Substrat-Affinität eine signifikante Beeinflussung durch regulatorische Kinasen wie Proteinkinase A, Proteinkinase C oder Calmodulin-abhängige Kinase II möglich ist (Biermann et al., 2006; Ciarimboli et al., 2004). Außerdem können genetische Polymorphismen in den hOCT die renale Metaboliten-Clearance beeinflussen (Tzvetkov et al., 2009). Obwohl nicht in meiner Arbeit untersucht, könnten diese Unterschiede theoretisch durch genetische Polymorphismen im hOCTN1 oder durch Aktivierung/Deaktivierung von regulatorischen Signalkaskaden oder Kinasen verursacht sein.

### **6.7 hOCTN1 als verantwortlicher Transporter für die Imatinib-Aufnahme**

Die gezeigten experimentellen Ergebnisse belegen die kardinale Bedeutung des hOCTN1 als Transporter für die Aufnahme von Imatinib in die dermalen Fibroblasten SSc-F und hH-F. Grundsätzlich wurde der hOCTN1 als Imatinib-transportierender Carrier, neben hMATE1, hOCT1 und hOCT2, bereits in Vorarbeiten identifiziert (s. Abb. 2.1.) (Harrach, 2014). Die deutliche pH-Abhängigkeit mit einem Maximum im basischen Bereich (s. Abb. 5.4.), die auf der Funktion als H<sup>+</sup>/OC-Antiporter beruht, der bidirektionale Transport sowie die zusammengefasst signifikante Inhibition durch Ergothionein (s. Abb. 5.10.) sprechen für den hOCTN1 (Gründemann et al., 2005; Tamai et al., 1997; Yabuuchi et al., 1999).

Ein weiteres Argument für die Aufnahme durch den hOCTN1 kann der IC<sub>50</sub>-Wert (s. Abb. 5.3) darstellen. Beim Vergleich der Imatinib-IC<sub>50</sub>-Werte an den transfizierten HEK 293-Zellen wird deutlich, dass die von mir bestimmten IC<sub>50</sub>-Werte, die im zweistelligen µmol-Bereich liegen, am ehesten zu den IC<sub>50</sub>-Werten von hOCT3 (53 µmol) und hOCTN1 (31 µmol) passen, was eine Beteiligung dieser Transporter am Imatinib-Uptake wahrscheinlich werden lässt.

Die qPCR (s. Abb. 5.9.) unterstreicht die Bedeutung des hOCTN1. Der hOCTN1 ist in den hH-F im Vergleich zu den SSc-F signifikant höher exprimiert, was sich sehr gut mit der höheren spezifischen Imatinib-Aufnahme der hH (s. Abb. 5.1.) in Einklang bringen lässt. Weiterhin exprimieren die SSc-F 18-fach mehr hMATE1 als die hH-F. Der hMATE1 ist als OC-Exporter bekannt und nachgewiesenermaßen an der Exkretion von Xenobiotika und Metaboliten beteiligt (Omote et al., 2006; Otsuka et al., 2005; Motohashi und Inui, 2013a). Hier liegt die Vermutung nahe, dass der hMATE1 in den SSc-F ebenfalls zu einer Exkretion des Imatinib beitragen und somit für die niedrige basale Aufnahme in die SSc-F (s. Abb. 5.1.) verantwortlich sein könnte.

Außerdem könnte die vergleichsweise hohe hMATE1-Expression in den SSc-F zum schneller signifikanten Efflux aus den Fibroblasten (s. Abb. 5.5.) beitragen.

Nach der Identifikation des hOCTN1 als aufnehmender Transporter stellt sich die Frage nach seiner Bedeutung in den Fibroblasten. Der hOCTN1 wird aufgrund seines spezifischen Substrates auch als Ergothionein-Transporter bezeichnet (Gründemann et al., 2005). Seit seiner Entdeckung 1990 (Hartman, 1990) gilt Ergothionein als ein stabiles intrazelluläres Antioxidans. Es dient als Radikalfänger u. a. für  $H_2O_2$  und einige toxische organische Moleküle und verzögert die Oxidation von oxygeniertem Hämoglobin (Arduini et al., 1992; Chaudière und Ferrari-Iliou, 1999; Gründemann, 2012). Humane Zellen mit hOCTN1 akkumulieren Ergothionein spezifisch und Zellen ohne hOCTN1 können das Molekül nicht aufnehmen (Gründemann et al., 2005). Dennoch ist die genaue physiologische Nutzung des Ergothionein weiter unklar. Wahrscheinlich leistet der hOCTN1 mit der Aufnahme von Ergothionein als Antioxidans in die Fibroblasten einen Beitrag zum Abbau von oxidativem Stress und verhindert dadurch Krankheiten.

Während der letzten Jahre haben sich außerdem die Hinweise gemehrt, dass Polymorphismen und Varianten vom *hOCTN1* mit der Suszeptibilität für verschiedene Krankheits-Entitäten, wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und anderen autoimmunen Erkrankungen wie Diabetes Typ 1, in Verbindung gebracht werden können (Fisher et al., 2006; Gazouli et al., 2005; Lin et al., 2010; Peltekova et al., 2004; Rioux et al., 2001; Russell et al., 2006; Santiago et al., 2006; Tokuhiro et al., 2003). Ursächlich ist, dass das *hOCTN1*-Gen in der chromosomalen Region 5q31 liegt, in der viele Gene des Autoimmun- und des inflammatorischen Systems codiert sind, sodass es zu einem empfindlichen Überschneidungspunkt kommt (Maeda et al., 2007). Es konnte nachgewiesen werden, dass bei rheumatoider Arthritis, bei der in refraktären Fällen ebenfalls Imatinib erfolgreich eingesetzt worden ist (Eklund und Joensuu, 2003; Miyachi et al., 2003; Pereira et al., 2010), gleichermaßen eine Assoziation zu *hOCTN1* besteht. Ein intrinsischer SNP, ein Einzelnukleotid-Polymorphismus, in einer Bindungsstelle für RUNX1, einem Transkriptionsfaktor zur Regulation der hämatopoetischen Stammzellen, senkt die transkriptionelle Effizienz und ist auf diese Art mit der rheumatoiden Arthritis verbunden (Maeda et al., 2007; Tokuhiro et al., 2003). Durch Mutationen im *hOCTN1*-Gen kam es zu veränderten Transporteigenschaften (Kawasaki et al., 2004) und *octn1*<sup>-/-</sup> Knockout-Mäuse zeigten, vermutlich aufgrund eines erniedrigten intrazellulären Ergothionein-Spiegels, bei intestinaler Ischämie eine niedrigere Toleranzschwelle (Kato et al., 2010). Bei GIST-Patienten, die mit Imatinib therapiert wurden, zeigte sich ein Polymorphismus im *hOCTN1*, der mit einer verbesserten Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert war, was die Bedeutung des hOCTN1 für die Imatinib-Aufnahme bei GIST unterstreicht (Angelini et al., 2013). Vor dem Hintergrund dieser Resultate

könnte es hilfreich sein, eine Genotypisierung des *hOCTN1* bei den SSc-Patienten vor der Imatinib-Therapie durchzuführen, um mögliche Varianten/Polymorphismen zu identifizieren, die mit einem verbesserten/verschlechterten Outcome assoziiert sind. Auf diesem Weg hätte man mit dem *hOCTN1* eventuell einen diagnostischen Marker für eine individualisierte Therapie an der Hand, der als Prädiktor für die Prognose dienen könnte.

### **6.8 Einfluss von TGF $\beta$ und PDGF auf die Imatinib-Aufnahme**

Die von mir verwendeten Konzentrationen der Mediatoren TGF $\beta$ 1 und PDGF (10 ng/mL) orientieren sich an Konzentrationen aus der Literatur (Chen et al., 1999; Czuwara-Ladykowska et al., 2001; Ghosh et al., 2000; Kirchberg et al., 1995; Yang et al., 1997; Yamakage et al., 1992).

Bei der Stimulation der Fibroblasten mit den beiden SSc-Schlüsselmediatoren zeigte sich für TGF $\beta$  bei den Mikrofluoreszenz-Assays und der Imatinib-Akkumulation kein signifikant unterschiedliches Ergebnis im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 5.13. A.-B.)). Die Erklärung könnte hier in der Transporter-Expression des *hOCTN1* als zuständigem Uptake-Transporter liegen. Da die TGF $\beta$ -Inkubation keinen sichtbaren Einfluss auf die Expression des *hOCTN1* besitzt (s. Abb. 5.14. A.)), korrespondiert dieses Ergebnis mit der gleichbleibenden Akkumulation.

TGF $\beta$  wirkt profibrotisch, indem es die Bildung von Myofibroblasten induziert und Zytokine wie CTGF, das selbst profibrotisch wirkt, sowie Zytokin-Rezeptoren, PDGF-R und TGF $\beta$ -R, hochreguliert (Gabrielli et al., 2009). Während ein Teil der Effekte per SMAD2/3-Signalweg reguliert wird, erfolgt die Hochregulation des CTGF und der Kollagen-Transkription SMAD-unabhängig über den ERK1/2-Signalweg (Pannu et al., 2007; Trojanowska, 2009). Durch die konstitutiv aktivierten Fibroblasten in den SSc-Läsionen kommt es zur Aktivierung eines autokrinen TGF $\beta$ -Zytokin-Loops im Sinne eines Ultrashort-Feedback-Mechanismus, in dem das von den aktivierten Fibroblasten ausgeschüttete TGF $\beta$  direkt an die überexprimierten TGF $\beta$ -R bindet (Kawakami et al., 1998; Pannu und Trojanowska, 2004; Pannu et al., 2006). Hier könnte argumentiert werden, dass in den SSc-F durch den autokrinen Zytokin-Loop die TGF $\beta$ -Signalkaskade bereits so stark aktiviert ist, dass eine extrazelluläre Stimulation mit weiterem TGF $\beta$  keinen Unterschied bezüglich der Gen-Transkription/-Expression bewirken kann.

Im Gegensatz dazu löste die Inkubation mit PDGF für verschiedene Zeiträume interessanterweise eine signifikant gesteigerte Imatinib-Akkumulation in den hH-F aus. Nach 24 h Stimulation nahmen die hH-F deutlich mehr Imatinib auf (s. Abb. 5.15. A.)), während die SSc-F Imatinib in



unveränderter Menge transportierten (s. Abb. 5.15. B.) + C.)). Entsprechend fand sich in der qPCR für die hH nach 24 h eine signifikant erhöhte Expressionen des *hOCTN1* (s. Abb. 5.16. A.)), was nochmals die Funktion des hOCTN1 als aufnehmenden Transporter akzentuiert. Mit der erhöhten Expression des *hOCTN1* als Erklärungsgrundlage zeigten die SSc-F hingegen einen konstanten Uptake, obwohl die Expression des *hOCTN1* nach 12 h und 24 h ebenfalls signifikant erhöht war (s. Abb. 5.16. A.)).

PDGF spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der SSc, indem es Myofibroblasten in ihrer Proliferation und Migration stimuliert und ihr Gesamtüberleben verlängert (Trojanowska, 2008). Das von mir verwendete PDGF-AB stimuliert PDGF-R $\alpha\alpha$ -Homodimere und PDGF-R $\alpha\beta$ -Heterodimere (Betsholtz, 2003; Heidaran et al., 1991; Heldin und Westermark, 1999). Die Signal-Transduktion verläuft via PI3-Kinase-, MAP-Kinase- und Phospholipase C $\gamma$ -Signalweg (Trojanowska, 2008). Eine interessante Beobachtung, die SSc-F und hH-F unterscheidet, ist, dass hH-F bei einer Behandlung mit TGF $\beta$  keine Unterschiede in der PDGF-R $\alpha$ -Expression zeigen, während die SSc-F mit einer Hochregulation von PDGF-R $\alpha$  reagieren (Ichiki et al., 1995; Yamakage et al., 1992). Somit scheint bei den SSc-F ein positives Wechselspiel zwischen dem TGF $\beta$ - und dem PDGF-Signalweg zu bestehen, der sie, vor dem Hintergrund der autokrinen TGF $\beta$ -Zytokin-Schleife, für die PDGF-Stimulation sensibilisiert.

Eine Erklärung für die von mir gefundenen Ergebnisse könnte in der Transkriptions-Ebene liegen. Bei den dermalen Fibroblasten könnte PDGF-AB via Signalkaskaden Einfluss auf die *hOCTN1*-Transporter-Expression nehmen, z. B. durch Aktivierung des Promoters. Bis jetzt finden sich in der Literatur keine genauen Untersuchungen zur Wirkung von PDGF auf die Expression von *hOCTN1*. Aber Maeda et al. studierten 2007 die transkriptionelle Regulation des *hOCTN1* und identifizierten dabei Konsensussequenzen für die Transkriptionsfaktoren Sp1 (Kadonaga et al., 1987), RUNX1 (Tokuhiro et al., 2003) und NF- $\kappa$ B (Maeda et al., 2007). Sie konnten darüber hinaus nachweisen, dass die inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  via Transkription eine erhöhte *hOCTN1*-mRNA-Expression bewirken und dass der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B die Promoter-Aktivität steigert (Maeda et al., 2007). NF- $\kappa$ B ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor für Apoptose, Immunantwort und Inflammation und wird, in chronisch entzündetem Gewebe, primär endogen durch TNF- $\alpha$  und IL-1 induziert (Baeuerle, 1998). NF- $\kappa$ B spielt außerdem eine wichtige Rolle im PDGF-Signalweg, denn PDGF induziert die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungs-Aktivität und stimuliert diesen Transkriptionsfaktor durch Ras, PI3-Kinase und Akt (Olashaw et al., 1992; Romashkova und Makarov, 1999). Ein anderer möglicher Aspekt in meinem Experiment ist die Stimulation von Sp1 durch PDGF. Moon et al. zeigten 2003, dass PDGF den Promoter von *p21*, einem Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase, durch die

Stimulation des Transkriptionsfaktors Sp1, der an die TATA-Box des *p21*-Promoters bindet, aktiviert (Moon et al., 2003). Aus diesem Grund könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass PDGF in meinen Experimenten durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und Sp1 den *hOCTN1*-Promoter stimuliert und somit die verstärkte Expression von *hOCTN1* induziert hat.

Bei SSc ist die Transkription des *hOCTN1* nach 24 h ebenfalls erhöht, aber der Effekt, d. h. die gesteigerte Imatinib-Aufnahme durch den hOCTN1, fehlt. Insofern lässt sich postulieren, dass es durch eine SSc-spezifische funktionelle Veränderung nach der Transkription oder Änderungen bei der Implementierung des Transporters zu dieser Umstellung kommt. Bei der SSc liegen permanent erhöhte PDGF-Spiegel vor (Ludwicka et al., 1995), die durch Auto-Antikörper oder eine autokrine PDGF-A/PDGF-R $\alpha$ -Zytokin-Schleife verursacht sein können, in der von den SSc-F sezerniertes IL-1 $\alpha$  wiederum IL-6 und PDGF-A induziert (Baroni et al., 2006; Kawaguchi et al., 1999; Trojanowska, 2008). Bei gesunden Fibroblasten ist PDGF hingegen praktisch nicht detektierbar (Trojanowska, 2008). Die experimentell durchgeführte Stimulation mit diesem Zytokin ist somit artifiziell und etabliert ein pathologisches Milieu, vergleichbar mit der Situation bei SSc-Patienten. Die dauerhaft erhöhten PDGF-Spiegel in den SSc-F und die daraus resultierende vermutete post-transkriptionelle oder funktionelle Veränderung des hOCTN1 könnten somit Teil der Ursache darstellen, warum die basale spezifische Imatinib-Aufnahme in den SSc-F signifikant erniedrigt ist. Weitere Studien müssten folgen, um diese Hypothese zu stützen.

## 7. Ausblick

In meiner Arbeit konnte ich darlegen, dass dermale Fibroblasten, hH-F und SSc-F, Imatinib-Transporter-vermittelt aufnehmen. Die gesunden Fibroblasten und jene aus dem pathologisch-fibrotischen Milieu der SSc unterscheiden sich in der Aufnahme-Kinetik, der apparenten Affinität und der basalen spezifischen Imatinib-Aufnahme, die in den SSc-F signifikant niedriger ausfällt.

Die Aufnahme des Imatinib in dermalen Fibroblasten stellt sich als temperatur-, konzentrations- und zeitabhängig heraus. Darüber hinaus lassen eine pH-Abhängigkeit mit einem Optimum im basischen Bereich und eine Bidirektionalität des Transports nachweisen.

Durch Inhibitions-Experimente mit Ergothionein, einem spezifischen Hemmstoff für den hOCTN1, konnte ich zeigen, dass dieser Transporter hauptsächlich für die Imatinib-Aufnahme in die dermalen Fibroblasten verantwortlich ist.

Während eine Inkubation mit TGF $\beta$  keinen sichtbaren Effekt auf die Imatinib-Akkumulation in SSc-F und hH-F zeigt, bewirkt die Stimulation mit PDGF, vermutlich durch Eingriffe des Wachstumsfaktors auf der Transkriptionsebene, eine erhöhte Expression des verantwortlichen Transporters hOCTN1.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der hOCTN1 eine wichtige Funktion in der Imatinib-Aufnahme einnimmt. Die teilweise ernüchternden Studienergebnisse bei der Therapie von SSc mit Imatinib könnten der erniedrigten Expression dieses kritischen Transporters in den SSc-F geschuldet sein. Offen bleibt die Frage, ob hOCTN1 tatsächlich der einzige Aufnahmetransporter des Imatinib ist. Angesichts der molekularbiologischen Komplexität der SSc erscheint dies unwahrscheinlich. Mithilfe von Untersuchungen der DNA- und Proteinexpression werden in Zukunft sicher weitere Kandidaten identifiziert werden, die zum Imatinib-Transport beitragen.

Influx, Efflux sowie die Transporter-Expression der SLC sind bezüglich der zellulären Aufnahme und Wirksamkeit von Medikamenten grundlegende Aspekte. Aus klinischer Sicht ist die therapeutische Optimierung des Imatinib-Influx wünschenswert. Veränderungen des (extra-)zellulären Mikromilieus, z. B. durch lokale Veränderungen des pH-Wertes, haben momentan rein spekulativen Charakter, sind jedoch prinzipiell denkbar. Hingegen bietet eine gezielte Manipulation des hOCTN1 Angriffspunkte für die Entwicklung neuer Medikamente, z. B. indem gezielt die Genexpression angeregt wird, um den Mangel dieses kritischen Transporters in den SSc-F auszugleichen.

Auch in der vorliegenden Arbeit zeigt sich ein differentes Ansprechen zwischen den Zellen unterschiedlicher Patienten, möglicherweise in Folge eines unterschiedlich hohen hOCTN1-Niveaus. Insofern hängt vielleicht der Therapieerfolg der SSc-Behandlung direkt von der Menge des exprimierten hOCTN1 ab, der damit zum Prädiktor für ein Ansprechen der Imatinib-Therapie avanciert. Sollte diese Theorie stimmen, wäre eine prätherapeutische Analyse der Gen- und Proteinexpression des hOCTN1 bei jedem Patienten mit SSc von Wert. So ließe sich der potentielle Nutzen der Therapie mit Imatinib a priori evaluieren und ins Verhältnis zu möglichen Nebenwirkungen setzen.

Somit spielen bei Verlauf und Prognose der SSc vielleicht weniger klinische Ausprägungen eine Rolle als molekularbiologische Charakteristika. Wir befinden uns erst am Anfang des Verständnisses einer „molekularen Medizin“, doch ich hoffe mit der hier vorliegenden Arbeit einen kleinen Beitrag hierzu geleistet zu haben.

## 8. Abkürzungen

Abkürzung	Entsprechung
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABL1	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ACEA	Antikörper gegen endotheliale Zellen
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ANA	Anitnukleäre Antikörper
AK	Antikörper
AS	<i>antisense-DNA-Strang</i>
ASP <sup>+</sup>	4-(4-(Dimethylamino)styryl)-N-Methylpyridinium Iodid
a. u.	<i>arbitrary unit</i>
c-Abl	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
BAFF	<i>B cell activating factor of the TNF family</i>
BCR	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
BSA	bovines Serumalbumin
ca.	circa
cb	Calibrator
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CML	chronisch myeloische Leukämie
COL1A1	Kollagen, Typ I, Alpha 1-Kette
COL1A2	Kollagen, Typ I, Alpha 2-Kette
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CTFG	<i>connective tissue growth factor</i>
CYP	Cytochrom P450
dcSSc	<i>diffuse cutaneous systemic sclerosis</i>
ddH <sub>2</sub> O	doppelt-destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMARD	<i>Disease-modifying antirheumatic drugs</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DTT	Dithiothreitol
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	<i>extracellular matrix</i>

<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ERK</b>	<i>extracellular-signal-regulated kinases</i>
<b>ET-1</b>	Endothelin-1
<b>ET</b>	Ergothionein
<b>EULAR</b>	<i>European League Against Rheumatism</i>
<b>EUSTAR</b>	<i>The European Scleroderma Trials and Research group</i>
<b>FCS</b>	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
<b>FVC</b>	forcierte Vitalkapazität
<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>GIST</b>	Gastrointestinaler Stromatumor
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>hH-F</b>	humane Hautfibroblasten
<b>HLA</b>	humanes Leukozyten-Antigen/Histokompatibilitätsantigen
<b>HNF-4<math>\alpha</math></b>	<i>Hepatocyte nuclear factor 4 <math>\alpha</math></i>
<b>HPLC</b>	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
<b>HRP</b>	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
<b>ICAM-1</b>	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
<b>IL</b>	Interleukin
<b>ILD</b>	interstitielle Lungenerkrankung
<b>INF</b>	Interferon
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminale Kinase
<b>Lck</b>	<i>lymphocyte specific protein tyrosine kinase</i>
<b>lcSSc</b>	<i>limited cutaneous systemic sclerosis</i>
<b>LDS</b>	Lithiumdodecylsulfat
<b>MAP-Kinase</b>	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
<b>mA</b>	Milliampere
<b>mAU</b>	<i>milli absorption units</i>
<b>MDR1</b>	<i>Multi-Drug-Resistance Protein 1</i>
<b>MEK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
<b>mRss</b>	<i>modified Rodnan Skin score</i>
<b>min</b>	Minute
<b>MPP<sup>+</sup></b>	1-Methyl-4-phenylpyridinium
<b>MSC</b>	mesenchymale Stammzelle
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natrium
<b>NADPH</b>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
<b>NHE-RF3</b>	<i>Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 3</i>

<b>nm</b>	Nanometer
<b>OAT</b>	Organischer Anionen-Transporter
<b>OATP</b>	<i>organic anion-transporting polypeptide</i>
<b>OC</b>	Organisches Kation
<b>OCT</b>	Organischer Kationen-Transporter
<b>OCTN</b>	<i>organic cation transporter, novel</i>
<b>p38 MAPK</b>	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
<b>PAH</b>	pulmonale arterielle Hypertonie
<b>PAK</b>	p21-aktivierte Kinase
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
<b>PDGF</b>	<i>platelet-derived growth factor</i>
<b>PDGF-R</b>	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
<b>PI3-Kinase</b>	Phosphoinositid-3-Kinase
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PKB</b>	Proteinkinase B
<b>PKG</b>	Proteinkinase G
<b>qPCR</b>	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
<b>PYR</b>	Pyrimethamin
<b>Ras</b>	<i>Rat sarcoma</i>
<b>RASF</b>	Rheumatoide Arthritis synoviale Fibroblasten
<b>RCT</b>	<i>randomised controlled study</i>
<b>Rho</b>	<i>Ras homologue</i>
<b>RIN</b>	<i>RNA integrity number</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i>
<b>RP-HPLC</b>	<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i>
<b>RT</b>	reverse Transkriptase
<b>RTK</b>	Rezeptor-Tyrosinkinase
<b>RT-PCR</b>	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
<b>RUNX1</b>	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
<b>s.</b>	siehe
<b>s</b>	Sekunde
<b>S</b>	<i>sense</i> -DNA-Strang
<b>SBE</b>	<i>SMAD-binding element</i>
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SH2</b>	<i>Sarcoma Homology 2</i>
<b>SLC</b>	<i>Solute Carrier</i>
<b>SMA</b>	<i>smooth muscle actin</i>
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
<b>s. o.</b>	siehe oben
<b>SSc</b>	Systemische Sklerose
<b>SSc-F</b>	Systemische Sklerose-Fibroblast

<b>s. u.</b>	siehe unten
<b>TBST</b>	<i>Tris-buffered saline + Tween 20</i>
<b>TEA<sup>+</sup></b>	Tetraethylammonium
<b>TGF<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
<b>TGF<math>\beta</math>-R</b>	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math> receptor</i>
<b>TMD</b>	Transmembrandomäne
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>TK</b>	Tyrosinkinase
<b>TKI</b>	Tyrosinkinase-Inhibitor
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>u. a.</b>	unter anderem
<b>UV</b>	Ultraviolettstrahlung
<b>V</b>	Volt
<b>v. a.</b>	vor allem
<b>VCAM-1</b>	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
<b>VIS</b>	<i>visibile light</i>
<b>VEGF</b>	<i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>z. B.</b>	zum Beispiel
<b>Z. n.</b>	Zustand nach
<b>z. T.</b>	zum Teil



## 9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.: Makroskopische kutane Manifestationen der systemischen Sklerose. ....	13
Abb. 1.2.: Mikroskopische kutane Manifestationen der systemischen Sklerose. ....	14
Abb. 1.3.: Übersicht: 3 Komponenten der Pathogenese der SSc. ....	24
Abb. 1.4.: Aktivierung der Fibroblasten durch molekulare Signalwege. ....	28
Abb. 1.5.: Chemische Struktur von Imatinib. ....	30
Abb. 1.6.: Molekulare Topologie des hOCT1. ....	37
Abb. 1.7.: Imatinib-Signalkaskade bei CML, SSc und GIST. ....	45
Abb. 2.1.: Ergebnisse der Imatinib-Akkumulation bei HEK 293-Wildtyp-Zellen (=Wt) und stabil mit hOCT1-3, hOCTN1-2, und hMATE1 transfizierten HEK 293-Zellen. ....	48
Abb. 4.1.: Exemplarischer Fit der mit Tecan i-control 1.6. aufgezeichneten mikrofluorimetrischen Messungen. ....	70
Abb. 4.2.: Exemplarisches Chromatogramm einer 37 °C-Probe. ....	74
Abb. 5.1.: Temperaturabhängige und spezifische Imatinib-Aufnahme in hH- und SSc-Fibroblasten. ....	80
Abb. 5.2.: Transport-Kinetik: Michaelis-Menten-Kinetik in hH-F und SSc-F. ....	83
Abb. 5.3.: IC <sub>50</sub> -Werte für Imatinib an hH-F und SSc-F mit der Mikrofluorimetrie-Methode. ...	84
Abb. 5.4.: pH-abhängige Imatinib-Aufnahme in hH-F und SSc-F. ....	87
Abb. 5.5.: Efflux-Bestimmung mit einem extrazellulären pH von 7,4 und 6,4 bei hH-F und SSc-F. ....	88
Abb. 5.6.: Semiquantitative PCR der <i>hOCT</i> , <i>hOCTN</i> und <i>hMATE</i> in hH-F. ....	90
Abb. 5.7.: Semiquantitative PCR der <i>hOCT</i> , <i>hOCTN</i> und <i>hMATE</i> in SSc-F. ....	91
Abb. 5.8.: Semiquantitative PCR der <i>OATPIA2</i> und <i>OATPIB3</i> in hH-F und SSc-F. ....	92
Abb. 5.9.: Real-Time qPCR-Ergebnis: Transporter-Expression von <i>hOCTN1</i> und <i>hMATE1</i> in SSc-F und hH-F. ....	93
Abb. 5.10.: Übersicht: Spezifische Imatinib-Aufnahme in SSc-F und hH-F bei Hemmung mit spezifischen Inhibitoren mit der Imatinib-Akkumulations-Methode. ....	94
Abb. 5.11.: Einzel-Profile: Spezifische Imatinib-Aufnahme in hH-F bei Hemmung mit spezifischen Inhibitoren mit der Imatinib-Akkumulations-Methode. ....	96
Abb. 5.12.: Einzel-Profile: Spezifische Imatinib-Aufnahme in SSc-F bei Hemmung mit spezifischen Inhibitoren mit der Imatinib-Akkumulations-Methode. ....	97
Abb. 5.13: ASP <sup>+</sup> -Aufnahme und Imatinib-Akkumulation nach Stimulation mit TGFβ 10 ng/mL für 24 h. ....	99

Abb. 5.14.: Ergebnisse Real-Time qPCR: Transporter-Expression von <i>hOCTN1</i> und <i>hMATE1</i> nach Stimulation mit TGF $\beta$ 10 ng/mL für 24 h. ....	99
Abb. 5.15: Spezifische Imatinib-Akkumulation in hH-F und SSc-F und ASP <sup>+</sup> -Aufnahme in SSc-F nach Stimulation mit PDGF 10 ng/mL für 24 h. ....	101
Abb. 5.16.: Ergebnisse Real-Time qPCR: Transporter-Expression von <i>hOCTN1</i> und <i>hMATE1</i> nach Stimulation mit PDGF 10 ng/mL für 12-96 h. ....	102
Abb. 5.17.: Semiquantitative PCR von HEK 293-Wildtyp-Zellen, nicht-induzierten und induzierten HEK 293-hOCTN1-Zellen. ....	103
Abb. 5.18.: Western Blot mit einem hOCTN1-Antikörper an Fibroblasten und HEK 293-Zellen. ....	104

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.: IC <sub>50</sub> -Werte für Imatinib an hOCTs.....	47
Tabelle 3.1.: Für die experimentellen Arbeiten verwendete Geräte.....	49
Tabelle 3.2.: Für die experimentellen Arbeiten verwendete Chemikalien.....	52
Tabelle 3.3.: Für die experimentellen Arbeiten verwendete Verbrauchsmaterialien.....	54
Tabelle 3.4.: Für die experimentellen Arbeiten hergestellte Puffer und Lösungen.....	55
Tabelle 3.5.: Liste mit Primersequenzen (jeweils <i>Sense</i> -Strang (S) und <i>Anti-Sense</i> -Strang (AS)) für die PCR und qPCR.....	57
Tabelle 3.6.: Liste der primären und sekundären Antikörper für den Western Blot.....	58
Tabelle 4.1.: Rezept für PCR-Mastermix-Lösung.....	64
Tabelle 4.2.: Thermocycler-Programm für die PCR mit den verschiedenen Temperaturstufen und Zeiträumen der Amplifikation.....	64
Tabelle 4.3.: Thermocycler-Programm für die qPCR mit den verschiedenen Temperaturstufen und Zeiträumen der Amplifikation.....	67
Tabelle 4.4.: Km-Werte der Inhibitoren an den SLC-Transportern, Quellennachweis und die verwendeten Konzentrationen in den Imatinib-Akkumulations-Experimenten.....	71
Tabelle 4.5.: HPLC-Gradientenprogramm.....	73
Tabelle 5.1.: Transport-Kinetik: V <sub>max</sub> -, K <sub>m</sub> -Werte und Transporteffizienz.....	83

## 11. Literaturverzeichnis

- Abdollahi, A., Li, M., Ping, G., Plathow, C., Domhan, S., Kiessling, F., Lee, L.B., McMahon, G., Gröne, H.-J., Lipson, K.E., et al. (2005). Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. *J. Exp. Med.* *201*, 925–935.
- Abe, R., Donnelly, S.C., Peng, T., Bucala, R., and Metz, C.N. (2001). Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 7556–7562.
- Abraham, D.J., and Varga, J. (2005). Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol.* *26*, 587–595.
- Abraham, D.J., Vancheeswaran, R., Dashwood, M.R., Rajkumar, V.S., Pantelides, P., Xu, S.W., du Bois, R.M., and Black, C.M. (1997). Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease. *Am. J. Pathol.* *151*, 831–841.
- Abraham, D.J., Eckes, B., Rajkumar, V., and Krieg, T. (2007). New developments in fibroblast and myofibroblast biology: implications for fibrosis and scleroderma. *Curr. Rheumatol. Rep.* *9*, 136–143.
- Abreu, J.G., Ketpura, N.I., Reversade, B., and De Robertis, E.M. (2002). Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat. Cell Biol.* *4*, 599–604.
- Advani, A.S., and Pendergast, A.M. (2002). Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects. *Leuk. Res.* *26*, 713–720.
- Akhmetshina, A., Venalis, P., Dees, C., Busch, N., Zwerina, J., Schett, G., Distler, O., and Distler, J.H.W. (2009). Treatment with imatinib prevents fibrosis in different preclinical models of systemic sclerosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum.* *60*, 219–224.
- Altmeyer, P., and Paech, V. (2010). *Enzyklopädie Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin* (Berlin: Springer).
- Andrae, J., Gallini, R., and Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* *22*, 1276–1312.
- Angelini, S., Pantaleo, M.A., Ravegnini, G., Zenesini, C., Cavrini, G., Nannini, M., Fumagalli, E., Palassini, E., Saponara, M., Di Battista, M., et al. (2013). Polymorphisms in OCTN1 and OCTN2 transporters genes are associated with prolonged time to progression in unresectable gastrointestinal stromal tumours treated with imatinib therapy. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* *68*, 1–6.
- Apperley, J.F. (2007). Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* *8*, 1018–1029.
- Apperley, J.F. (2014). Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*.

- Arduini, A., Mancinelli, G., Radatti, G.L., Hochstein, P., and Cadenas, E. (1992). Possible mechanism of inhibition of nitrite-induced oxidation of oxyhemoglobin by ergothioneine and uric acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 294, 398–402.
- Arnett, F.C., Cho, M., Chatterjee, S., Aguilar, M.B., Reveille, J.D., and Mayes, M.D. (2001). Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum.* 44, 1359–1362.
- Artlett, C.M. (2005). Immunology of systemic sclerosis. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 10, 1707–1719.
- Asano, Y., Ihn, H., Yamane, K., Jinnin, M., Mimura, Y., and Tamaki, K. (2005). Involvement of alphavbeta5 integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta1 in autocrine transforming growth factor beta signaling in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 52, 2897–2905.
- Astorga, B., Ekins, S., Morales, M., and Wright, S.H. (2012). Molecular determinants of ligand selectivity for the human multidrug and toxin extruder proteins MATE1 and MATE2-K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 341, 743–755.
- Atallah, E., Kantarjian, H., and Cortes, J. (2007). Emerging safety issues with imatinib and other Abl tyrosine kinase inhibitors. *Clin. Lymphoma Myeloma* 7 *Suppl* 3, S105-112.
- Atamas, S.P., Yurovsky, V.V., Wise, R., Wigley, F.M., Goter Robinson, C.J., Henry, P., Alms, W.J., and White, B. (1999). Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 42, 1168–1178.
- Atfi, A., Djelloul, S., Chastre, E., Davis, R., and Gespach, C. (1997). Evidence for a Role of Rho-like GTPases and Stress-activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal Kinase (SAPK/JNK) in Transforming Growth Factor  $\beta$ -mediated Signaling. *J. Biol. Chem.* 272, 1429–1432.
- Avouac, J., Fransen, J., Walker, U.A., Riccieri, V., Smith, V., Muller, C., Miniati, I., Tarner, I.H., Randone, S.B., Cutolo, M., et al. (2011). Preliminary criteria for the very early diagnosis of systemic sclerosis: results of a Delphi Consensus Study from EULAR Scleroderma Trials and Research Group. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 476–481.
- Badesch, D.B., Tapson, V.F., McGoon, M.D., Brundage, B.H., Rubin, L.J., Wigley, F.M., Rich, S., Barst, R.J., Barrett, P.S., Kral, K.M., et al. (2000). Continuous intravenous epoprostenol for pulmonary hypertension due to the scleroderma spectrum of disease. A randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 132, 425–434.
- Bauerle, P.A. (1998). Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF-kappaB puzzle? *Curr. Biol. CB* 8, R19-22.
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209–1211.
- Barcellos-Hoff, M.H., and Dix, T.A. (1996). Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 10, 1077–1083.

Baroni, S.S., Santillo, M., Bevilacqua, F., Luchetti, M., Spadoni, T., Mancini, M., Fraticelli, P., Sambo, P., Funaro, A., Kazlauskas, A., et al. (2006). Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N. Engl. J. Med.* *354*, 2667–2676.

Barst, R.J., Langleben, D., Badesch, D., Frost, A., Lawrence, E.C., Shapiro, S., Naeije, R., Galie, N., and STRIDE-2 Study Group (2006). Treatment of pulmonary arterial hypertension with the selective endothelin-A receptor antagonist sitaxsentan. *J. Am. Coll. Cardiol.* *47*, 2049–2056.

Beham-Schmid, C., Apfelbeck, U., Sill, H., Tsybrovsky, O., Höfler, G., Haas, O.A., and Linkesch, W. (2002). Treatment of chronic myelogenous leukemia with the tyrosine kinase inhibitor STI571 results in marked regression of bone marrow fibrosis. *Blood* *99*, 381–383.

Bellini, A., and Mattoli, S. (2007). The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *87*, 858–870.

Bellocq, A., Azoulay, E., Marullo, S., Flahault, A., Fouqueray, B., Philippe, C., Cadranel, J., and Baud, L. (1999). Reactive oxygen and nitrogen intermediates increase transforming growth factor-beta1 release from human epithelial alveolar cells through two different mechanisms. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *21*, 128–136.

Ben-Neriah, Y., Daley, G.Q., Mes-Masson, A.M., Witte, O.N., and Baltimore, D. (1986). The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science* *233*, 212–214.

Betsholtz, C. (2003). Biology of platelet-derived growth factors in development. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* *69*, 272–285.

Beyer, C., Distler, J.H.W., and Distler, O. (2010). Are tyrosine kinase inhibitors promising for the treatment of systemic sclerosis and other fibrotic diseases? *Swiss Med. Wkly.* *140*, w13050.

Biermann, J., Lang, D., Gorboulev, V., Koepsell, H., Sindic, A., Schröter, R., Zvirbliene, A., Pavenstädt, H., Schlatter, E., and Ciarimboli, G. (2006). Characterization of regulatory mechanisms and states of human organic cation transporter 2. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *290*, C1521-1531.

Blank, N., Max, R., and Lorenz, H.-M. (2006). The role of DMARDs in systemic sclerosis therapy. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *45 Suppl 3*, iii42-44.

Blasdel, C., Egorin, M.J., Lagattuta, T.F., Druker, B.J., and Deininger, M.W. (2007). Therapeutic drug monitoring in CML patients on imatinib. *Blood* *110*, 1699–1701; author reply 1701.

Block, J.A., and Sequeira, W. (2001). Raynaud's phenomenon. *Lancet Lond. Engl.* *357*, 2042–2048.

Bournia, V.-K., Evangelou, K., and Sfikakis, P.P. (2013). Therapeutic inhibition of tyrosine kinases in systemic sclerosis: a review of published experience on the first 108 patients treated with imatinib. *Semin. Arthritis Rheum.* *42*, 377–390.

Brinckmann, J., Kim, S., Wu, J., Reinhardt, D.P., Batmunkh, C., Metzen, E., Notbohm, H., Bank, R.A., Krieg, T., and Hunzelmann, N. (2005). Interleukin 4 and prolonged hypoxia induce

a higher gene expression of lysyl hydroxylase 2 and an altered cross-link pattern: Important pathogenetic steps in early and late stage of systemic scleroderma? *Matrix Biol.* *24*, 459–468.

Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Müller, M., Druker, B.J., and Lydon, N.B. (1996). Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* *56*, 100–104.

Buchdunger, E., Cioffi, C.L., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B.J., and Lydon, N.B. (2000). Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *295*, 139–145.

Bueso-Ramos, C.E., Cortes, J., Talpaz, M., O'Brien, S., Giles, F., Rios, M.B., Medeiros, L.J., and Kantarjian, H. (2004). Imatinib mesylate therapy reduces bone marrow fibrosis in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer* *101*, 332–336.

Burckhardt, G., and Wolff, N.A. (2000). Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *278*, F853-866.

Burger, H., and Nooter, K. (2004). Pharmacokinetic resistance to imatinib mesylate: role of the ABC drug pumps ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) in the oral bioavailability of imatinib. *Cell Cycle Georget. Tex* *3*, 1502–1505.

Burger, H., van Tol, H., Boersma, A.W.M., Brok, M., Wiemer, E.A.C., Stoter, G., and Nooter, K. (2004). Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* *104*, 2940–2942.

Burger, H., van Tol, H., Brok, M., Wiemer, E.A.C., de Bruijn, E.A., Guetens, G., de Boeck, G., Sparreboom, A., Verweij, J., and Nooter, K. (2005). Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. *Cancer Biol. Ther.* *4*, 747–752.

Burnette, W.N. (1981). “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* *112*, 195–203.

Busch, A.E., Karbach, U., Miska, D., Gorboulev, V., Akhoundova, A., Volk, C., Arndt, P., Ulzheimer, J.C., Sonders, M.S., Baumann, C., et al. (1998). Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine. *Mol. Pharmacol.* *54*, 342–352.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et al. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* *55*, 611–622.

Cambrey, A.D., Harrison, N.K., Dawes, K.E., Southcott, A.M., Black, C.M., du Bois, R.M., Laurent, G.J., and McAnulty, R.J. (1994). Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast mitogenic activity in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *11*, 439–445.

Cannell, E. (2007). Dasatinib is effective in imatinib-resistant CML. *Lancet Oncol.* *8*, 286.

Carroll, M., Ohno-Jones, S., Tamura, S., Buchdunger, E., Zimmermann, J., Lydon, N.B., Gilliland, D.G., and Druker, B.J. (1997). CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood* 90, 4947–4952.

Carvalho, D., Savage, C.O., Black, C.M., and Pearson, J.D. (1996). IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J. Clin. Invest.* 97, 111–119.

Cavazzana, I., Angela, C., Paolo, A., Stefania, Z., Angela, T., and Franco, F. (2009). Anti-RNA polymerase III antibodies: A marker of systemic sclerosis with rapid onset and skin thickening progression. *Autoimmun. Rev.* 8, 580–584.

Cepeda, E.J., and Reveille, J.D. (2004). Autoantibodies in systemic sclerosis and fibrosing syndromes: clinical indications and relevance. *Curr. Opin. Rheumatol.* 16, 723–732.

Cerinic, M.M., Valentini, G., Sorano, G.G., D'Angelo, S., Cuomo, G., Fenu, L., Generini, S., Cinotti, S., Morfini, M., Pignone, A., et al. (2003). Blood coagulation, fibrinolysis, and markers of endothelial dysfunction in systemic sclerosis. *Semin. Arthritis Rheum.* 32, 285–295.

Cetinkaya, I., Ciarimboli, G., Yalçinkaya, G., Mehrens, T., Velic, A., Hirsch, J.R., Gorboulev, V., Koepsell, H., and Schlatter, E. (2003). Regulation of human organic cation transporter hOCT2 by PKA, PI3K, and calmodulin-dependent kinases. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 284, F293–302.

Chan, L.C., Karhi, K.K., Rayter, S.I., Heisterkamp, N., Eridani, S., Powles, R., Lawler, S.D., Groffen, J., Foulkes, J.G., and Greaves, M.F. (1987). A novel abl protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 325, 635–637.

Channick, R.N., Simonneau, G., Sitbon, O., Robbins, I.M., Frost, A., Tapson, V.F., Badesch, D.B., Roux, S., Rainisio, M., Bodin, F., et al. (2001). Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 358, 1119–1123.

Chaudière, J., and Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 37, 949–962.

Cheah, I.K., and Halliwell, B. (2012). Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 784–793.

Chen, S.J., Yuan, W., Mori, Y., Levenson, A., Trojanowska, M., and Varga, J. (1999). Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3. *J. Invest. Dermatol.* 112, 49–57.

Chiffot, H., Fautrel, B., Sordet, C., Chatelus, E., and Sibia, J. (2008). Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin. Arthritis Rheum.* 37, 223–235.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.



- Chung, L., Fiorentino, D.F., Benbarak, M.J., Adler, A.S., Mariano, M.M., Paniagua, R.T., Milano, A., Connolly, M.K., Ratiner, B.D., Wiskocil, R.L., et al. (2009). Molecular framework for response to imatinib mesylate in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* *60*, 584–591.
- Ciarimboli, G. (2008). Organic cation transporters. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* *38*, 936–971.
- Ciarimboli, G., and Schlatter, E. (2005). Regulation of organic cation transport. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *449*, 423–441.
- Ciarimboli, G., Struwe, K., Arndt, P., Gorboulev, V., Koepsell, H., Schlatter, E., and Hirsch, J.R. (2004). Regulation of the human organic cation transporter hOCT1. *J. Cell. Physiol.* *201*, 420–428.
- Ciarimboli, G., Koepsell, H., Iordanova, M., Gorboulev, V., Dürner, B., Lang, D., Edemir, B., Schröter, R., Van Le, T., and Schlatter, E. (2005). Individual PKC-phosphorylation sites in organic cation transporter 1 determine substrate selectivity and transport regulation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *16*, 1562–1570.
- Ciarimboli, G., Lancaster, C.S., Schlatter, E., Franke, R.M., Sprowl, J.A., Pavenstädt, H., Massmann, V., Guckel, D., Mathijssen, R.H.J., Yang, W., et al. (2012). Proximal Tubular Secretion of Creatinine by Organic Cation Transporter OCT2 in Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* *18*, 1101–1108.
- Cipriani, P., Ruscitti, P., and Giacomelli, R. (2015). Stem cell therapies for systemic sclerosis. *Br. J. Haematol.* *168*, 328–337.
- Clements, P.J., Lachenbruch, P.A., Ng, S.C., Simmons, M., Sterz, M., and Furst, D.E. (1990). Skin score. A semiquantitative measure of cutaneous involvement that improves prediction of prognosis in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* *33*, 1256–1263.
- Clements, P.J., Lachenbruch, P.A., Seibold, J.R., Zee, B., Steen, V.D., Brennan, P., Silman, A.J., Allegar, N., Varga, J., and Massa, M. (1993). Skin thickness score in systemic sclerosis: an assessment of interobserver variability in 3 independent studies. *J. Rheumatol.* *20*, 1892–1896.
- Clements, P.J., Hurwitz, E.L., Wong, W.K., Seibold, J.R., Mayes, M., White, B., Wigley, F., Weisman, M., Barr, W., Moreland, L., et al. (2000). Skin thickness score as a predictor and correlate of outcome in systemic sclerosis: high-dose versus low-dose penicillamine trial. *Arthritis Rheum.* *43*, 2445–2454.
- Co, H.T., Block, J.A., and Sequeira, W. (2000). Scleroderma lung: pathogenesis, evaluation, and current therapy. *Am. J. Ther.* *7*, 321–324.
- Coghlan, J.G., and Mukerjee, D. (2001). The heart and pulmonary vasculature in scleroderma: clinical features and pathobiology. *Curr. Opin. Rheumatol.* *13*, 495–499.
- Coleiro, B., Marshall, S.E., Denton, C.P., Howell, K., Blann, A., Welsh, K.I., and Black, C.M. (2001). Treatment of Raynaud's phenomenon with the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *40*, 1038–1043.
- le Coutre, P., Kreuzer, K.-A., Pursche, S., Bonin, M. v., Leopold, T., Baskaynak, G., Dörken, B., Ehninger, G., Ottmann, O., Jenke, A., et al. (2004). Pharmacokinetics and cellular uptake of imatinib and its main metabolite CGP74588. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *53*, 313–323.

Cox, R.A. (1968). The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. In *Methods in Enzymology*, K.M. Lawrence Grossman, ed. (Academic Press), pp. 120–129.

Crossman, L.C., Druker, B.J., Deininger, M.W.N., Pirmohamed, M., Wang, L., and Clark, R.E. (2005). hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood* *106*, 1133–1134; author reply 1134.

Czuwara-Ladykowska, J., Gore, E.A., Shegogue, D.A., Smith, E.A., and Trojanowska, M. (2001). Differential regulation of transforming growth factor-beta receptors type I and II by platelet-derived growth factor in human dermal fibroblasts. *Br. J. Dermatol.* *145*, 569–575.

Czyzewski, K., and Styczynski, J. (2009). Imatinib is a substrate for various multidrug resistance proteins. *Neoplasma* *56*, 202–207.

van Daele, P.L.A., Dik, W.A., Thio, H.B., van Hal, P.T.W., van Laar, J.A.M., Hooijkaas, H., and van Hagen, P.M. (2008). Is imatinib mesylate a promising drug in systemic sclerosis? *Arthritis Rheum.* *58*, 2549–2552.

Dai, H., Marbach, P., Lemaire, M., Hayes, M., and Elmquist, W.F. (2003). Distribution of STI-571 to the brain is limited by P-glycoprotein-mediated efflux. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *304*, 1085–1092.

Daniels, C.E., Wilkes, M.C., Edens, M., Kottom, T.J., Murphy, S.J., Limper, A.H., and Leof, E.B. (2004). Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF- $\beta$  and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. *J. Clin. Invest.* *114*, 1308–1316.

Daoussis, D., Liossis, S.-N.C., Tsamandas, A.C., Kalogeropoulou, C., Kazantzi, A., Sirinian, C., Karampetsou, M., Yiannopoulos, G., and Andonopoulos, A.P. (2010). Experience with rituximab in scleroderma: results from a 1-year, proof-of-principle study. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *49*, 271–280.

Daoussis, D., Liossis, S.-N.C., Tsamandas, A.C., Kalogeropoulou, C., Paliogianni, F., Sirinian, C., Yiannopoulos, G., and Andonopoulos, A.P. (2012). Effect of long-term treatment with rituximab on pulmonary function and skin fibrosis in patients with diffuse systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* *30*, S17-22.

Davies, C.A., Jeziorska, M., Freemont, A.J., and Herrick, A.L. (2006). The differential expression of VEGF, VEGFR-2, and GLUT-1 proteins in disease subtypes of systemic sclerosis. *Hum. Pathol.* *37*, 190–197.

De Francia, S., D'Avolio, A., Ariaudo, A., Pirro, E., Piccione, F., Simiele, M., Fava, C., Calcagno, A., Di Perri, G., and Saglio, G. (2014). Plasma and intracellular imatinib concentrations in patients with chronic myeloid leukemia. *Ther. Drug Monit.* *36*, 410–412.

Dean, M., Hamon, Y., and Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* *42*, 1007–1017.

Del Papa, N., Quirici, N., Soligo, D., Scavullo, C., Cortiana, M., Borsotti, C., Maglione, W., Comina, D.P., Vitali, C., Fraticelli, P., et al. (2006). Bone marrow endothelial progenitors are defective in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* *54*, 2605–2615.

Dematteo, R.P., Ballman, K.V., Antonescu, C.R., Maki, R.G., Pisters, P.W.T., Demetri, G.D., Blackstein, M.E., Blanke, C.D., von Mehren, M., Brennan, M.F., et al. (2009). Adjuvant

- imatinib mesylate after resection of localised, primary gastrointestinal stromal tumour: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* *373*, 1097–1104.
- Denton, C.P. (2015). Advances in pathogenesis and treatment of systemic sclerosis. *Clin. Med. Lond. Engl.* *15 Suppl 6*, s58-63.
- Denton, C.P., Black, C.M., and Abraham, D.J. (2006). Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* *2*, 134–144.
- Derk, C.T., and Jimenez, S.A. (2003). Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis. *Autoimmun. Rev.* *2*, 181–191.
- Derk, C.T., Grace, E., Shenin, M., Naik, M., Schulz, S., and Xiong, W. (2009). A prospective open-label study of mycophenolate mofetil for the treatment of diffuse systemic sclerosis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *48*, 1595–1599.
- Desmoulière, A., Chaponnier, C., and Gabbiani, G. (2005). Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* *13*, 7–12.
- Deswal, A., and Follansbee, W.P. (1996). Cardiac involvement in scleroderma. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* *22*, 841–860.
- Distler, J.H.W., and Distler, O. (2009). Imatinib as a novel therapeutic approach for fibrotic disorders. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *48*, 2–4.
- Distler, J.H.W., Jüngel, A., Huber, L.C., Schulze-Horsel, U., Zwerina, J., Gay, R.E., Michel, B.A., Hauser, T., Schett, G., Gay, S., et al. (2007). Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum.* *56*, 311–322.
- Distler, J.H.W., Manger, B., Spriewald, B.M., Schett, G., and Distler, O. (2008). Treatment of pulmonary fibrosis for twenty weeks with imatinib mesylate in a patient with mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum.* *58*, 2538–2542.
- Distler, O., Distler, J.H.W., Scheid, A., Acker, T., Hirth, A., Rethage, J., Michel, B.A., Gay, R.E., Müller-Ladner, U., Matucci-Cerinic, M., et al. (2004). Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ. Res.* *95*, 109–116.
- Dohse, M., Scharenberg, C., Shukla, S., Robey, R.W., Volkmann, T., Deeken, J.F., Brendel, C., Ambudkar, S.V., Neubauer, A., and Bates, S.E. (2010). Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *38*, 1371–1380.
- Dong, C., Zhu, S., Wang, T., Yoon, W., Li, Z., Alvarez, R.J., ten Dijke, P., White, B., Wigley, F.M., and Goldschmidt-Clermont, P.J. (2002). Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 3908–3913.
- Druker, B.J., and Lydon, N.B. (2000). Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Invest.* *105*, 3–7.

- Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G.M., Fanning, S., Zimmermann, J., and Lydon, N.B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* 2, 561–566.
- Druker, B.J., Talpaz, M., Resta, D.J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J.M., Lydon, N.B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., et al. (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 344, 1031–1037.
- Dziadzio, M., Denton, C.P., Smith, R., Howell, K., Blann, A., Bowers, E., and Black, C.M. (1999). Losartan therapy for Raynaud's phenomenon and scleroderma: clinical and biochemical findings in a fifteen-week, randomized, parallel-group, controlled trial. *Arthritis Rheum.* 42, 2646–2655.
- Eckes, B., Mauch, C., Hüppe, G., and Krieg, T. (1996). Differential regulation of transcription and transcript stability of pro-alpha 1(I) collagen and fibronectin in activated fibroblasts derived from patients with systemic scleroderma. *Biochem. J.* 315 (Pt 2), 549–554.
- Eckes, B., Zweers, M.C., Zhang, Z.G., Hallinger, R., Mauch, C., Aumailley, M., and Krieg, T. (2006). Mechanical tension and integrin alpha 2 beta 1 regulate fibroblast functions. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res.* 11, 66–72.
- Eechoute, K., Sparreboom, A., Burger, H., Franke, R.M., Schiavon, G., Verweij, J., Loos, W.J., Wiemer, E.A.C., and Mathijssen, R.H.J. (2011). Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 406–415.
- Eechoute, K., Fransson, M.N., Reyners, A.K., de Jong, F.A., Sparreboom, A., van der Graaf, W.T.A., Friberg, L.E., Schiavon, G., Wiemer, E.A.C., Verweij, J., et al. (2012). A long-term prospective population pharmacokinetic study on imatinib plasma concentrations in GIST patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 5780–5787.
- Eklund, K.K., and Joensuu, H. (2003). Treatment of rheumatoid arthritis with imatinib mesylate: clinical improvement in three refractory cases. *Ann. Med.* 35, 362–367.
- Englert, H., Small-McMahon, J., Chambers, P., O'Connor, H., Davis, K., Manolios, N., White, R., Dracos, G., and Brooks, P. (1999). Familial risk estimation in systemic sclerosis. *Aust. N. Z. J. Med.* 29, 36–41.
- Eraly, S.A., Hamilton, B.A., and Nigam, S.K. (2003). Organic anion and cation transporters occur in pairs of similar and similarly expressed genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 333–342.
- Feghali-Bostwick, C., Medsger, T.A., and Wright, T.M. (2003). Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* 48, 1956–1963.
- Feng, X.H., Zhang, Y., Wu, R.Y., and Derynck, R. (1998). The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes Dev.* 12, 2153–2163.

Ferri, C., Valentini, G., Cozzi, F., Sebastiani, M., Michelassi, C., La Montagna, G., Bullo, A., Cazzato, M., Tirri, E., Storino, F., et al. (2002). Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients. *Medicine (Baltimore)* *81*, 139–153.

Fertin, C., Nicolas, J.F., Gillery, P., Kalis, B., Banchereau, J., and Maquart, F.X. (1991). Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. *Cell. Mol. Biol.* *37*, 823–829.

Fischer, T., Reifenrath, C., Hess, G.R., Corsetti, M.T., Kreil, S., Beck, J., Meinhardt, P., Beltrami, G., Schuch, B., Gschaidmeier, H., et al. (2002). Safety and efficacy of STI-571 (imatinib mesylate) in patients with bcr/abl-positive chronic myelogenous leukemia (CML) after autologous peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT). *Leukemia* *16*, 1220–1228.

Fisher, S.A., Hampe, J., Onnie, C.M., Daly, M.J., Curley, C., Purcell, S., Sanderson, J., Mansfield, J., Annese, V., Forbes, A., et al. (2006). Direct or indirect association in a complex disease: the role of SLC22A4 and SLC22A5 functional variants in Crohn disease. *Hum. Mutat.* *27*, 778–785.

Fleischmajer, R., and Perlish, J.S. (1980). Capillary alterations in scleroderma. *J. Am. Acad. Dermatol.* *2*, 161–170.

Francis, S., Lucas, C., Lane, S., Wang, L., Watmough, S., Knight, K., Bell, J., Kaleel-Rahman, M., Lee, E., O'Brien, D., et al. (2013). A population study showing that the advent of second generation tyrosine kinase inhibitors has improved progression-free survival in chronic myeloid leukaemia. *Leuk. Res.* *37*, 752–758.

Fraticelli, P., Gabrielli, B., Pomponio, G., Valentini, G., Bosello, S., Riboldi, P., Gerosa, M., Faggioli, P., Giacomelli, R., Del Papa, N., et al. (2014). Low-dose oral imatinib in the treatment of systemic sclerosis interstitial lung disease unresponsive to cyclophosphamide: a phase II pilot study. *Arthritis Res. Ther.* *16*, R144.

Gabrielli, A., Avvedimento, E.V., and Krieg, T. (2009). Scleroderma. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1989–2003.

Galiè, N., Ghofrani, H.A., Torbicki, A., Barst, R.J., Rubin, L.J., Badesch, D., Fleming, T., Parpia, T., Burgess, G., Branzi, A., et al. (2005). Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* *353*, 2148–2157.

Gardner, H., Broberg, A., Pozzi, A., Laato, M., and Heino, J. (1999). Absence of integrin alpha1beta1 in the mouse causes loss of feedback regulation of collagen synthesis in normal and wounded dermis. *J. Cell Sci.* *112 (Pt 3)*, 263–272.

Gay, S., Jones, R.E., Huang, G.Q., and Gay, R.E. (1989). Immunohistologic demonstration of platelet-derived growth factor (PDGF) and sis-oncogene expression in scleroderma. *J. Invest. Dermatol.* *92*, 301–303.

Gazouli, M., Mantzaris, G., Archimandritis, A.J., Nasioulas, G., and Anagnou, N.P. (2005). Single nucleotide polymorphisms of OCTN1, OCTN2, and DLG5 genes in Greek patients with Crohn's disease. *World J. Gastroenterol. WJG* *11*, 7525–7530.

Ghosh, A.K., Yuan, W., Mori, Y., and Varga, J. (2000). Smad-dependent stimulation of type I collagen gene expression in human skin fibroblasts by TGF-beta involves functional cooperation with p300/CBP transcriptional coactivators. *Oncogene* *19*, 3546–3555.

- Ghosh, A.K., Yuan, W., Mori, Y., Chen Sj, null, and Varga, J. (2001). Antagonistic regulation of type I collagen gene expression by interferon-gamma and transforming growth factor-beta. Integration at the level of p300/CBP transcriptional coactivators. *J. Biol. Chem.* 276, 11041–11048.
- Giannoudis, A., Davies, A., Harris, R.J., Lucas, C.M., Pirmohamed, M., and Clark, R.E. (2014). The clinical significance of ABCC3 as an imatinib transporter in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 28, 1360–1363.
- Giglio, S., Monis, P.T., and Saint, C.P. (2003). Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Res.* 31, e136.
- Gisler, S.M., Pribanic, S., Bacic, D., Forrer, P., Gantenbein, A., Sabourin, L.A., Tsuji, A., Zhao, Z.-S., Manser, E., Biber, J., et al. (2003). PDZK1: I. a major scaffold in brush borders of proximal tubular cells. *Kidney Int.* 64, 1733–1745.
- Gorboulev, V., Ulzheimer, J.C., Akhoundova, A., Ulzheimer-Teuber, I., Karbach, U., Quester, S., Baumann, C., Lang, F., Busch, A.E., and Koepsell, H. (1997). Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol.* 16, 871–881.
- Gordon, J., Udeh, U., Doobay, K., Magro, C., Wildman, H., Davids, M., Mersten, J.N., Huang, W.-T., Lyman, S., Crow, M.K., et al. (2014). Imatinib mesylate (Gleevec™) in the treatment of diffuse cutaneous systemic sclerosis: results of a 24-month open label, extension phase, single-centre trial. *Clin. Exp. Rheumatol.* 32, S-189-193.
- Gordon, J.K., Martyanov, V., Magro, C., Wildman, H.F., Wood, T.A., Huang, W.-T., Crow, M.K., Whitfield, M.L., and Spiera, R.F. (2015). Nilotinib (Tasigna™) in the treatment of early diffuse systemic sclerosis: an open-label, pilot clinical trial. *Arthritis Res. Ther.* 17, 213.
- Graf, K., Xi, X.P., Yang, D., Fleck, E., Hsueh, W.A., and Law, R.E. (1997). Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 29, 334–339.
- Grigat, S., Fork, C., Bach, M., Golz, S., Geerts, A., Schömig, E., and Gründemann, D. (2009). The carnitine transporter SLC22A5 is not a general drug transporter, but it efficiently translocates mildronate. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 37, 330–337.
- Groffen, J., Stephenson, J.R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C.R., and Grosveld, G. (1984). Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 36, 93–99.
- Gründemann, D. (2012). The ergothioneine transporter controls and indicates ergothioneine activity--a review. *Prev. Med.* 54 Suppl, S71-74.
- Gründemann, D., Gorboulev, V., Gambaryan, S., Veyhl, M., and Koepsell, H. (1994). Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 372, 549–552.
- Gründemann, D., Schechinger, B., Rappold, G.A., and Schömig, E. (1998). Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nat. Neurosci.* 1, 349–351.
- Gründemann, D., Liebich, G., Kiefer, N., Köster, S., and Schömig, E. (1999). Selective Substrates for Non-Neuronal Monoamine Transporters. *Mol. Pharmacol.* 56, 1–10.

- Gründemann, D., Harlfinger, S., Golz, S., Geerts, A., Lazar, A., Berkels, R., Jung, N., Rubbert, A., and Schömig, E. (2005). Discovery of the ergothioneine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 5256–5261.
- Gschwind, H.-P., Pfaar, U., Waldmeier, F., Zollinger, M., Sayer, C., Zbinden, P., Hayes, M., Pokorny, R., Seiberling, M., Ben-Am, M., et al. (2005). Metabolism and disposition of imatinib mesylate in healthy volunteers. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *33*, 1503–1512.
- Guo, L., Chen, X., Gu, Y., Zou, H., and Ye, S. (2012). Low-dose imatinib in the treatment of severe systemic sclerosis: a case series of six Chinese patients and literature review. *Clin. Rheumatol.* *31*, 1395–1400.
- Hamada, A., Miyano, H., Watanabe, H., and Saito, H. (2003). Interaction of imatinib mesilate with human P-glycoprotein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *307*, 824–828.
- Harrach, S. (2014). Regulation of tyrosine kinase inhibitor uptake in fibroblasts via organic cation transporters in rheumatic diseases. Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- Harris, M.L., and Rosen, A. (2003). Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. *Curr. Opin. Rheumatol.* *15*, 778–784.
- Hartman, P.E. (1990). Ergothioneine as antioxidant. *Methods Enzymol.* *186*, 310–318.
- Hasegawa, M., Fujimoto, M., Kikuchi, K., and Takehara, K. (1997). Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* *24*, 328–332.
- Hashimoto, N., Suzuki, F., Tamai, I., Nikaido, H., Kuwajima, M., Hayakawa, J., and Tsuji, A. (1998). Gene-dose effect on carnitine transport activity in embryonic fibroblasts of JVS mice as a model of human carnitine transporter deficiency. *Biochem. Pharmacol.* *55*, 1729–1732.
- Hasserjian, R.P., Boecklin, F., Parker, S., Chase, A., Dhar, S., Zaiac, M., Olavarria, E., Lampert, I., Henry, K., Apperley, J.F., et al. (2002). ST1571 (imatinib mesylate) reduces bone marrow cellularity and normalizes morphologic features irrespective of cytogenetic response. *Am. J. Clin. Pathol.* *117*, 360–367.
- Hatano, M., Yao, A., Shiga, T., Kinugawa, K., Hirata, Y., and Nagai, R. (2010). Imatinib mesylate has the potential to exert its efficacy by down-regulating the plasma concentration of platelet-derived growth factor in patients with pulmonary arterial hypertension. *Int. Heart. J.* *51*, 272–276.
- He, X., Szewczyk, P., Karyakin, A., Evin, M., Hong, W.-X., Zhang, Q., and Chang, G. (2010). Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter. *Nature* *467*, 991–994.
- Hediger, M.A., Romero, M.F., Peng, J.-B., Rolfs, A., Takanaga, H., and Bruford, E.A. (2004). The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Introduction. Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *447*, 465–468.
- Hediger, M.A., Cléménçon, B., Burrier, R.E., and Bruford, E.A. (2013). The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol. Aspects Med.* *34*, 95–107.

- Heidaran, M.A., Pierce, J.H., Yu, J.C., Lombardi, D., Artrip, J.E., Fleming, T.P., Thomason, A., and Aaronson, S.A. (1991). Role of alpha beta receptor heterodimer formation in beta platelet-derived growth factor (PDGF) receptor activation by PDGF-AB. *J. Biol. Chem.* *266*, 20232–20237.
- Heinrich, M.C., Griffith, D.J., Druker, B.J., Wait, C.L., Ott, K.A., and Zigler, A.J. (2000). Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* *96*, 925–932.
- Heisterkamp, N., Stam, K., Groffen, J., de Klein, A., and Grosveld, G. (1985). Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature* *315*, 758–761.
- Heldin, C.H., and Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* *79*, 1283–1316.
- Helmbold, P., Fiedler, E., Fischer, M., and Marsch, W.C. (2004). Hyperplasia of dermal microvascular pericytes in scleroderma. *J. Cutan. Pathol.* *31*, 431–440.
- Hénault, J., Robitaille, G., Sénécal, J.-L., and Raymond, Y. (2006). DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum.* *54*, 963–973.
- Hesselstrand, R., Scheja, A., Shen, G.Q., Wiik, A., and Akesson, A. (2003). The association of antinuclear antibodies with organ involvement and survival in systemic sclerosis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *42*, 534–540.
- Hirayama, C., Watanabe, H., Nakashima, R., Nanbu, T., Hamada, A., Kuniyasu, A., Nakayama, H., Kawaguchi, T., and Saito, H. (2008). Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells. *Pharm. Res.* *25*, 827–835.
- Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., et al. (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* *279*, 577–580.
- Hirschi, K.K., and D'Amore, P.A. (1996). Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc. Res.* *32*, 687–698.
- Ho, K.T., and Reveille, J.D. (2003). The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res. Ther.* *5*, 80–93.
- Höglund, P.J., Nordström, K.J.V., Schiöth, H.B., and Fredriksson, R. (2011). The solute carrier families have a remarkably long evolutionary history with the majority of the human families present before divergence of Bilaterian species. *Mol. Biol. Evol.* *28*, 1531–1541.
- Holland, J.A., Meyer, J.W., Chang, M.M., O'Donnell, R.W., Johnson, D.K., and Ziegler, L.M. (1998). Thrombin stimulated reactive oxygen species production in cultured human endothelial cells. *Endothel. J. Endothel. Cell Res.* *6*, 113–121.
- Holmes, A., Abraham, D.J., Sa, S., Shiwen, X., Black, C.M., and Leask, A. (2001). CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J. Biol. Chem.* *276*, 10594–10601.



van den Hoogen, F., Khanna, D., Fransen, J., Johnson, S.R., Baron, M., Tyndall, A., Matucci-Cerinic, M., Naden, R.P., Medsger, T.A., Carreira, P.E., et al. (2013). 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* *65*, 2737–2747.

van den Hoogen, F.H., Boerbooms, A.M., Swaak, A.J., Rasker, J.J., van Lier, H.J., and van de Putte, L.B. (1996). Comparison of methotrexate with placebo in the treatment of systemic sclerosis: a 24 week randomized double-blind trial, followed by a 24 week observational trial. *Br. J. Rheumatol.* *35*, 364–372.

Hoyles, R.K., Ellis, R.W., Wellsbury, J., Lees, B., Newlands, P., Goh, N.S.L., Roberts, C., Desai, S., Herrick, A.L., McHugh, N.J., et al. (2006). A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of corticosteroids and intravenous cyclophosphamide followed by oral azathioprine for the treatment of pulmonary fibrosis in scleroderma. *Arthritis Rheum.* *54*, 3962–3970.

Hu, P.Q., Fertig, N., Medsger, T.A., and Wright, T.M. (2003). Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* *48*, 1363–1373.

Hu, S., Franke, R.M., Filipinski, K.K., Hu, C., Orwick, S.J., de Bruijn, E.A., Burger, H., Baker, S.D., and Sparreboom, A. (2008). Interaction of imatinib with human organic ion carriers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 3141–3148.

Hudson, M., and Fritzler, M.J. (2014). Diagnostic criteria of systemic sclerosis. *J. Autoimmun.* *48–49*, 38–41.

Hudson, M., Taillefer, S., Steele, R., Dunne, J., Johnson, S.R., Jones, N., Mathieu, J.-P., and Baron, M. (2007). Improving the sensitivity of the American College of Rheumatology classification criteria for systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* *25*, 754–757.

Hunzelmann, N., Genth, E., Krieg, T., Lehmacher, W., Melchers, I., Meurer, M., Moinzadeh, P., Müller-Ladner, U., Pfeiffer, C., Riemekasten, G., et al. (2008). The registry of the German Network for Systemic Scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *47*, 1185–1192.

Ichiki, Y., Smith, E., LeRoy, E.C., and Trojanowska, M. (1995). Different effects of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta on the two platelet-derived growth factor receptors' expression in scleroderma and healthy human dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* *104*, 124–127.

Illmer, T., Schaich, M., Platzbecker, U., Freiberg-Richter, J., Oelschlägel, U., von Bonin, M., Pursche, S., Bergemann, T., Ehninger, G., and Schleyer, E. (2004). P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia* *18*, 401–408.

Inazu, M., Takeda, H., and Matsumiya, T. (2003). Expression and functional characterization of the extraneuronal monoamine transporter in normal human astrocytes. *J. Neurochem.* *84*, 43–52.

Iorio, N., Sawaya, R.A., and Friedenberg, F.K. (2014). Review article: the biology, diagnosis and management of gastrointestinal stromal tumours. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *39*, 1376–1386.

Ito, S., Kusuhara, H., Kuroiwa, Y., Wu, C., Moriyama, Y., Inoue, K., Kondo, T., Yuasa, H., Nakayama, H., Horita, S., et al. (2010). Potent and specific inhibition of mMatel-mediated efflux of type I organic cations in the liver and kidney by pyrimethamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *333*, 341–350.

Iudici, M., van der Goes, M.C., Valentini, G., and Bijlsma, J.W.J. (2013). Glucocorticoids in systemic sclerosis: weighing the benefits and risks - a systematic review. *Clin. Exp. Rheumatol.* *31*, 157–165.

Ivarsson, M., McWhirter, A., Black, C.M., and Rubin, K. (1993). Impaired regulation of collagen pro-alpha 1(I) mRNA and change in pattern of collagen-binding integrins on scleroderma fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* *101*, 216–221.

Jacobs, M.J., Jörning, P.J., Van Rhede van der Kloot, E.J., Kitslaar, P.J., Lemmens, H.A., Slaaf, D.W., and Reneman, R.S. (1991). Plasmapheresis in Raynaud's phenomenon in systemic sclerosis: a microcirculatory study. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp. Spons. Eur. Soc. Microcirc.* *10*, 1–11.

James, F.A.J.L. (1983). The Conservation of Energy, Theories of Absorption and Resonating Molecules, 1851-1854: G. G. Stokes, A. J. Ångström and W. Thomson. *Notes Rec. R. Soc. Lond.* *38*, 79–107.

Janknecht, R., Wells, N.J., and Hunter, T. (1998). TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes Dev.* *12*, 2114–2119.

Jelaska, A., and Korn, J.H. (2000). Role of apoptosis and transforming growth factor beta 1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* *43*, 2230–2239.

Jelaska, A., Arakawa, M., Broketa, G., and Korn, J.H. (1996). Heterogeneity of collagen synthesis in normal and systemic sclerosis skin fibroblasts. Increased proportion of high collagen-producing cells in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum.* *39*, 1338–1346.

Jimenez, S.A., and Derk, C.T. (2004). Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann. Intern. Med.* *140*, 37–50.

Jimenez, S.A., Freundlich, B., and Rosenbloom, J. (1984). Selective inhibition of human diploid fibroblast collagen synthesis by interferons. *J. Clin. Invest.* *74*, 1112–1116.

Jimenez, S.A., Hitraya, E., and Varga, J. (1996). Pathogenesis of scleroderma. *Collagen. Rheum. Dis. Clin. North Am.* *22*, 647–674.

Jinnin, M., Ihn, H., Yamane, K., and Tamaki, K. (2004). Interleukin-13 stimulates the transcription of the human alpha2(I) collagen gene in human dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *279*, 41783–41791.

Joensuu, H. (2012). Adjuvant therapy for high-risk gastrointestinal stromal tumour: considerations for optimal management. *Drugs* *72*, 1953–1963.

Joensuu, H., Roberts, P.J., Sarlomo-Rikala, M., Andersson, L.C., Tervahartiala, P., Tuveson, D., Silberman, S.L., Capdeville, R., Dimitrijevic, S., Druker, B., et al. (2001). Effect of the Tyrosine Kinase Inhibitor STI571 in a Patient with a Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumor. *N. Engl. J. Med.* *344*, 1052–1056.

- Jong, N.N., Nakanishi, T., Liu, J.J., Tamai, I., and McKeage, M.J. (2011). Oxaliplatin transport mediated by organic cation/carnitine transporters OCTN1 and OCTN2 in overexpressing human embryonic kidney 293 cells and rat dorsal root ganglion neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338, 537–547.
- Jordan, S., Maurer, B., Toniolo, M., Michel, B., and Distler, O. (2015a). Performance of the new ACR/EULAR classification criteria for systemic sclerosis in clinical practice. *Rheumatol. Oxf. Engl.*
- Jordan, S., Distler, J.H.W., Maurer, B., Huscher, D., van Laar, J.M., Allanore, Y., Distler, O., and EUSTAR Rituximab study group (2015b). Effects and safety of rituximab in systemic sclerosis: an analysis from the European Scleroderma Trial and Research (EUSTAR) group. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 1188–1194.
- Joseph, C.G., Darrah, E., Shah, A.A., Skora, A.D., Casciola-Rosen, L.A., Wigley, F.M., Boin, F., Fava, A., Thoburn, C., Kinde, I., et al. (2014). Association of the Autoimmune Disease Scleroderma with an Immunologic Response to Cancer. *Science* 343, 152–157.
- Jun, J.-B., Kuechle, M., Min, J., Shim, S.C., Kim, G., Montenegro, V., Korn, J.H., and Elkon, K.B. (2005). Scleroderma fibroblasts demonstrate enhanced activation of Akt (protein kinase B) in situ. *J. Invest. Dermatol.* 124, 298–303.
- Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R., and Tjian, R. (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51, 1079–1090.
- Kahaleh, M.B. (1995). Raynaud's phenomenon and the vascular disease in scleroderma. *Curr. Opin. Rheumatol.* 7, 529–534.
- Kahaleh, M.B. (2004). Raynaud phenomenon and the vascular disease in scleroderma. *Curr. Opin. Rheumatol.* 16, 718–722.
- Kahaleh, M.B., Sherer, G.K., and LeRoy, E.C. (1979). Endothelial injury in scleroderma. *J. Exp. Med.* 149, 1326–1335.
- Kalluri, R. (2009). EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J. Clin. Invest.* 119, 1417–1419.
- Kalow, W., Tang, B.K., and Endrenyi, L. (1998). Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics* 8, 283–289.
- Kantarjian, H., Giles, F., Wunderle, L., Bhalla, K., O'Brien, S., Wassmann, B., Tanaka, C., Manley, P., Rae, P., Mietlowski, W., et al. (2006a). Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N. Engl. J. Med.* 354, 2542–2551.
- Kantarjian, H., Jabbour, E., Grimley, J., and Kirkpatrick, P. (2006b). Dasatinib. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 717–718.
- Kantarjian, H.M., O'Brien, S., Cortes, J.E., Giralto, S.A., Rios, M.B., Shan, J., Giles, F.J., Thomas, D.A., Faderl, S., De Lima, M., et al. (2002). Imatinib mesylate therapy for relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 100, 1590–1595.

Karimizadeh, E., Motamed, N., Mahmoudi, M., Jafarinejad-Farsangi, S., Jamshidi, A., Faridani, H., and Gharibdoost, F. (2015). Attenuation of fibrosis with selective inhibition of c-Abl by siRNA in systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.* *307*, 135–142.

Kato, Y., Kubo, Y., Iwata, D., Kato, S., Sudo, T., Sugiura, T., Kagaya, T., Wakayama, T., Hirayama, A., Sugimoto, M., et al. (2010). Gene knockout and metabolome analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN1. *Pharm. Res.* *27*, 832–840.

Kaviratne, M., Hesse, M., Leusink, M., Cheever, A.W., Davies, S.J., McKerrow, J.H., Wakefield, L.M., Letterio, J.J., and Wynn, T.A. (2004). IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 4020–4029.

Kawaguchi, Y., Suzuki, K., Hara, M., Hidaka, T., Ishizuka, T., Kawagoe, M., and Nakamura, H. (1994). Increased endothelin-1 production in fibroblasts derived from patients with systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* *53*, 506–510.

Kawaguchi, Y., Hara, M., and Wright, T.M. (1999). Endogenous IL-1alpha from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A. *J. Clin. Invest.* *103*, 1253–1260.

Kawakami, T., Ihn, H., Xu, W., Smith, E., LeRoy, C., and Trojanowska, M. (1998). Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. *J. Invest. Dermatol.* *110*, 47–51.

Kawasaki, Y., Kato, Y., Sai, Y., and Tsuji, A. (2004). Functional characterization of human organic cation transporter OCTN1 single nucleotide polymorphisms in the Japanese population. *J. Pharm. Sci.* *93*, 2920–2926.

Kay, J., and High, W.A. (2008). Imatinib mesylate treatment of nephrogenic systemic fibrosis. *Arthritis Rheum.* *58*, 2543–2548.

Kendall, R.T., and Feghali-Bostwick, C.A. (2014). Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front. Pharmacol.* *5*, 123.

Kerb, R., Brinkmann, U., Chatskaia, N., Gorbunov, D., Gorboulev, V., Mornhinweg, E., Keil, A., Eichelbaum, M., and Koepsell, H. (2002). Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics* *12*, 591–595.

Khanna, D., Saggar, R., Mayes, M.D., Abtin, F., Clements, P.J., Maranian, P., Assassi, S., Saggar, R., Singh, R.R., and Furst, D.E. (2011). A one-year, phase I/IIa, open-label pilot trial of imatinib mesylate in the treatment of systemic sclerosis-associated active interstitial lung disease. *Arthritis Rheum.* *63*, 3540–3546.

Khurana, V., Minocha, M., Pal, D., and Mitra, A.K. (2014a). Inhibition of OATP-1B1 and OATP-1B3 by tyrosine kinase inhibitors. *Drug Metabol. Drug Interact.* *29*, 249–259.

Khurana, V., Minocha, M., Pal, D., and Mitra, A.K. (2014b). Role of OATP-1B1 and/or OATP-1B3 in hepatic disposition of tyrosine kinase inhibitors. *Drug Metabol. Drug Interact.* *29*, 179–190.

Kim, D.H.D., Sriharsha, L., Xu, W., Kamel-Reid, S., Liu, X., Siminovitch, K., Messner, H.A., and Lipton, J.H. (2009). Clinical relevance of a pharmacogenetic approach using multiple

candidate genes to predict response and resistance to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 4750–4758.

Kirchberg, K., Lange, T.S., Klein, E.C., Jungtäubl, H., Heinen, G., Meyer-Ingold, W., and Scharffetter-Kochanek, K. (1995). Induction of beta 1 integrin synthesis by recombinant platelet-derived growth factor (PDGF-AB) correlates with an enhanced migratory response of human dermal fibroblasts to various extracellular matrix proteins. *Exp. Cell Res.* 220, 29–35.

Klareskog, L., Gustafsson, R., Scheynius, A., and Hällgren, R. (1990). Increased expression of platelet-derived growth factor type B receptors in the skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 33, 1534–1541.

de Klein, A., van Kessel, A.G., Grosveld, G., Bartram, C.R., Hagemeijer, A., Bootsma, D., Spurr, N.K., Heisterkamp, N., Groffen, J., and Stephenson, J.R. (1982). A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 300, 765–767.

Kloetzer, W., Kurzrock, R., Smith, L., Talpaz, M., Spiller, M., Gutterman, J., and Arlinghaus, R. (1985). The human cellular abl gene product in the chronic myelogenous leukemia cell line K562 has an associated tyrosine protein kinase activity. *Virology* 140, 230–238.

Koenig, M., Dieudé, M., and Senécal, J.-L. (2008a). Predictive value of antinuclear autoantibodies: the lessons of the systemic sclerosis autoantibodies. *Autoimmun. Rev.* 7, 588–593.

Koenig, M., Joyal, F., Fritzler, M.J., Roussin, A., Abrahamowicz, M., Boire, G., Goulet, J.-R., Rich, E., Grodzicky, T., Raymond, Y., et al. (2008b). Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: a twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 58, 3902–3912.

Koepsell, H. (2013). The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol. Aspects Med.* 34, 413–435.

Koepsell, H., and Endou, H. (2004). The SLC22 drug transporter family. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 447, 666–676.

Koepsell, H., Lips, K., and Volk, C. (2007). Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm. Res.* 24, 1227–1251.

Koizumi, A., Nozaki, J., Ohura, T., Kayo, T., Wada, Y., Nezu, J., Ohashi, R., Tamai, I., Shoji, Y., Takada, G., et al. (1999). Genetic epidemiology of the carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotypic characterization in Japanese pedigrees with primary systemic carnitine deficiency. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2247–2254.

Konopka, J.B., Watanabe, S.M., and Witte, O.N. (1984). An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* 37, 1035–1042.

Korn, J.H., Mayes, M., Matucci Cerinic, M., Rainisio, M., Pope, J., Hachulla, E., Rich, E., Carpentier, P., Molitor, J., Seibold, J.R., et al. (2004). Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum.* 50, 3985–3993.

- Kowal-Bielecka, O., Landewé, R., Avouac, J., Chwiesko, S., Miniati, I., Czirjak, L., Clements, P., Denton, C., Farge, D., Fligelstone, K., et al. (2009). EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Ann. Rheum. Dis.* *68*, 620–628.
- Kräling, B.M., Maul, G.G., and Jimenez, S.A. (1995). Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiol. J. Immunopathol. Mol. Cell. Biol.* *63*, 48–56.
- Kubo, M., Ihn, H., Yamane, K., and Tamaki, K. (2002). Upregulated expression of transforming growth factor-beta receptors in dermal fibroblasts of skin sections from patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* *29*, 2558–2564.
- Kunjachan, S., Rychlik, B., Storm, G., Kiessling, F., and Lammers, T. (2013). Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *65*, 1852–1865.
- Kurzrock, R., Shtalrid, M., Talpaz, M., Kloetzer, W.S., and Gutterman, J.U. (1987). Expression of c-abl in Philadelphia-positive acute myelogenous leukemia. *Blood* *70*, 1584–1588.
- Kuwana, M., Kaburaki, J., Mimori, T., Tojo, T., and Homma, M. (1993). Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J. Clin. Invest.* *91*, 1399–1404.
- Kuwana, M., Okazaki, Y., Yasuoka, H., Kawakami, Y., and Ikeda, Y. (2004). Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet* *364*, 603–610.
- van Laar, J.M., Farge, D., Sont, J.K., Naraghi, K., Marjanovic, Z., Larghero, J., Schuerwegh, A.J., Marijt, E.W.A., Vonk, M.C., Schattenberg, A.V., et al. (2014). Autologous hematopoietic stem cell transplantation vs intravenous pulse cyclophosphamide in diffuse cutaneous systemic sclerosis: a randomized clinical trial. *JAMA* *311*, 2490–2498.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Lafyatis, R. (2014). Transforming growth factor  $\beta$ --at the centre of systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *10*, 706–719.
- Lamhonwah, A.-M., and Tein, I. (2006). Novel localization of OCTN1, an organic cation/carnitine transporter, to mammalian mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *345*, 1315–1325.
- Leabman, M.K., Huang, C.C., Kawamoto, M., Johns, S.J., Stryke, D., Ferrin, T.E., DeYoung, J., Taylor, T., Clark, A.G., Herskowitz, I., et al. (2002). Polymorphisms in a human kidney xenobiotic transporter, OCT2, exhibit altered function. *Pharmacogenetics* *12*, 395–405.
- Leask, A., and Abraham, D.J. (2003). The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* *81*, 355–363.
- Leask, A., and Abraham, D.J. (2004). TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *18*, 816–827.

- LeRoy, E.C. (1974). Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J. Clin. Invest.* *54*, 880–889.
- LeRoy, E.C., and Medsger, T.A. (2001). Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* *28*, 1573–1576.
- LeRoy, E.C., Black, C., Fleischmajer, R., Jablonska, S., Krieg, T., Medsger, T.A., Rowell, N., and Wollheim, F. (1988). Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J. Rheumatol.* *15*, 202–205.
- Levêque, D., and Maloisel, F. (2005). Clinical pharmacokinetics of imatinib mesylate. *Vivo Athens Greece* *19*, 77–84.
- Levy, Y., Amital, H., Langevitz, P., Nacci, F., Righi, A., Conforti, L., Generini, S., Matucci Cerinic, M., and Shoenfeld, Y. (2004). Intravenous immunoglobulin modulates cutaneous involvement and reduces skin fibrosis in systemic sclerosis: an open-label study. *Arthritis Rheum.* *50*, 1005–1007.
- Li, X., and Eriksson, U. (2003). Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine Growth Factor Rev.* *14*, 91–98.
- Lin, Z., Nelson, L., Franke, A., Poritz, L., Li, T.-Y., Wu, R., Wang, Y., MacNeill, C., Thomas, N.J., Schreiber, S., et al. (2010). OCTN1 variant L503F is associated with familial and sporadic inflammatory bowel disease. *J. Crohns Colitis* *4*, 132–138.
- Lips, K.S., Volk, C., Schmitt, B.M., Pfeil, U., Arndt, P., Miska, D., Ermert, L., Kummer, W., and Koepsell, H. (2005). Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *33*, 79–88.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* *25*, 402–408.
- Lonzetti, L.S., Joyal, F., Raynauld, J.P., Roussin, A., Goulet, J.R., Rich, E., Choquette, D., Raymond, Y., and Sénécal, J.L. (2001). Updating the American College of Rheumatology preliminary classification criteria for systemic sclerosis: addition of severe nailfold capillaroscopy abnormalities markedly increases the sensitivity for limited scleroderma. *Arthritis Rheum.* *44*, 735–736.
- Lucas, C.M., Wang, L., Austin, G.M., Knight, K., Watmough, S.J., Shwe, K.H., Dasgupta, R., Butt, N.M., Galvani, D., Hoyle, C.F., et al. (2008). A population study of imatinib in chronic myeloid leukaemia demonstrates lower efficacy than in clinical trials. *Leukemia* *22*, 1963–1966.
- Ludwicka, A., Ohba, T., Trojanowska, M., Yamakage, A., Strange, C., Smith, E.A., Leroy, E.C., Sutherland, S., and Silver, R.M. (1995). Elevated levels of platelet derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with scleroderma. *J. Rheumatol.* *22*, 1876–1883.
- Lunardi, C., Bason, C., Navone, R., Millo, E., Damonte, G., Corrocher, R., and Puccetti, A. (2000). Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. *Nat. Med.* *6*, 1183–1186.

- Lunardi, C., Dolcino, M., Peterlana, D., Bason, C., Navone, R., Tamassia, N., Beri, R., Corrocher, R., and Puccetti, A. (2006). Antibodies against human cytomegalovirus in the pathogenesis of systemic sclerosis: a gene array approach. *PLoS Med.* 3, e2.
- Maeda, T., Hirayama, M., Kobayashi, D., Miyazawa, K., and Tamai, I. (2007). Mechanism of the regulation of organic cation/carnitine transporter 1 (SLC22A4) by rheumatoid arthritis-associated transcriptional factor RUNX1 and inflammatory cytokines. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 35, 394–401.
- Magro, L., Mohty, M., Catteau, B., Coiteux, V., Chevallier, P., Terriou, L., Jouet, J.-P., and Yakoub-Agha, I. (2009). Imatinib mesylate as salvage therapy for refractory sclerotic chronic graft-versus-host disease. *Blood* 114, 719–722.
- Mahon, F.X., Deininger, M.W., Schultheis, B., Chabrol, J., Reiffers, J., Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2000). Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 96, 1070–1079.
- Mahon, F.-X., Belloc, F., Lagarde, V., Chollet, C., Moreau-Gaudry, F., Reiffers, J., Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2003). MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 101, 2368–2373.
- Maricq, H.R. (1981). Widefield capillary microscopy. technique and rating scale for abnormalities seen in scleroderma and related disorders. *Arthritis Rheum.* 24, 1159–1165.
- Markl, J., Sadava, D., Orians, G., Heller, H.C., Hillis, D., and Berenbaum, M.R. (2011). *Purves, Biologie (Spektrum Akademischer Verlag)*.
- Martel, F., Keating, E., Calhau, C., Gründemann, D., Schömig, E., and Azevedo, I. (2001). Regulation of human extraneuronal monoamine transporter (hEMT) expressed in HEK293 cells by intracellular second messenger systems. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 364, 487–495.
- Masi, A.T., and Subcommittee For Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee (1980). Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 23, 581–590.
- Maslyanskiy, A.L., Lapin, S.V., Kolesova, E.P., Penin, I.N., Cheshuina, M.D., Feist, E., and Konradi, A.O. (2014). Effects of rituximab therapy on elastic properties of vascular wall in patients with progressive systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 32, S-228.
- Massagué, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 169–178.
- Massmann, V., Edemir, B., Schlatter, E., Al-Monajjed, R., Harrach, S., Klassen, P., Holle, S.K., Sindic, A., Dobrivojevic, M., Pavenstädt, H., et al. (2014). The organic cation transporter 3 (OCT3) as molecular target of psychotropic drugs: transport characteristics and acute regulation of cloned murine OCT3. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 466, 517–527.
- Masuda, S., Terada, T., Yonezawa, A., Tanihara, Y., Kishimoto, K., Katsura, T., Ogawa, O., and Inui, K. (2006). Identification and functional characterization of a new human kidney-specific H<sup>+</sup>/organic cation antiporter, kidney-specific multidrug and toxin extrusion 2. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 17, 2127–2135.



- Matsushita, T., Hasegawa, M., Yanaba, K., Kodera, M., Takehara, K., and Sato, S. (2006). Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum.* *54*, 192–201.
- Matucci-Cerinic, M., Allanore, Y., Cziráj, L., Tyndall, A., Müller-Ladner, U., Denton, C., Valentini, G., Distler, O., Fligelstone, K., Tyrrel-Kennedy, A., et al. (2009). The challenge of early systemic sclerosis for the EULAR Scleroderma Trial and Research group (EUSTAR) community. It is time to cut the Gordian knot and develop a prevention or rescue strategy. *Ann. Rheum. Dis.* *68*, 1377–1380.
- Matucci-Cerinic, M., Denton, C.P., Furst, D.E., Mayes, M.D., Hsu, V.M., Carpentier, P., Wigley, F.M., Black, C.M., Fessler, B.J., Merkel, P.A., et al. (2011). Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 32–38.
- Mavalia, C., Scaletti, C., Romagnani, P., Carossino, A.M., Pignone, A., Emmi, L., Pupilli, C., Pizzolo, G., Maggi, E., and Romagnani, S. (1997). Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. *Am. J. Pathol.* *151*, 1751–1758.
- Mayes, M.D. (2003). Endothelin and endothelin receptor antagonists in systemic rheumatic disease. *Arthritis Rheum.* *48*, 1190–1199.
- Mayes, M.D., Lacey, J.V., Beebe-Dimmer, J., Gillespie, B.W., Cooper, B., Laing, T.J., and Schottenfeld, D. (2003). Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum.* *48*, 2246–2255.
- McQueen, F.M., and Solanki, K. (2015). Rituximab in diffuse cutaneous systemic sclerosis: should we be using it today? *Rheumatol. Oxf. Engl.* *54*, 757–767.
- Mehra, S., Walker, J., Patterson, K., and Fritzler, M.J. (2013). Autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* *12*, 340–354.
- Mehrens, T., Lelleck, S., Cetinkaya, I., Knollmann, M., Hohage, H., Gorboulev, V., Bokník, P., Koepsell, H., and Schlatter, E. (2000). The affinity of the organic cation transporter rOCT1 is increased by protein kinase C-dependent phosphorylation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *11*, 1216–1224.
- Mendoza, F.A., and Jiménez, S.A. (2011). Tyrosine kinase inhibitor therapy for systemic sclerosis: Quo Vadis? *Arthritis Rheum.* *63*, 3199–3203.
- Mendoza, F.A., Nagle, S.J., Lee, J.B., and Jimenez, S.A. (2012). A prospective observational study of mycophenolate mofetil treatment in progressive diffuse cutaneous systemic sclerosis of recent onset. *J. Rheumatol.* *39*, 1241–1247.
- Meng, T.-C., Fukada, T., and Tonks, N.K. (2002). Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol. Cell* *9*, 387–399.
- Meyer zu Schwabedissen, H.E., Verstuyft, C., Kroemer, H.K., Becquemont, L., and Kim, R.B. (2010). Human multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1/SLC47A1) transporter: functional characterization, interaction with OCT2 (SLC22A2), and single nucleotide polymorphisms. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *298*, F997–F1005.
- Michaelis, L., and Menten, M.L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. 333–369.

- Minematsu, T., and Giacomini, K.M. (2011). Interactions of tyrosine kinase inhibitors with organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion proteins. *Mol. Cancer Ther.* 10, 531–539.
- Miyachi, K., Ihara, A., Hankins, R.W., Murai, R., Maehiro, S., and Miyashita, H. (2003). Efficacy of imatinib mesylate (STI571) treatment for a patient with rheumatoid arthritis developing chronic myelogenous leukemia. *Clin. Rheumatol.* 22, 329–332.
- Moon, S.-K., Jung, S.-Y., Choi, Y.-H., Lee, Y.-C., and Kim, C.-H. (2003). Platelet-derived growth factor induces p21/WAF1 promoter in vascular smooth muscle cells via activation of an Sp1 site. *FEBS Lett.* 552, 130–134.
- Morgan, C., Knight, C., Lunt, M., Black, C.M., and Silman, A.J. (2003). Predictors of end stage lung disease in a cohort of patients with scleroderma. *Ann. Rheum. Dis.* 62, 146–150.
- Mori, Y., Chen, S.-J., and Varga, J. (2003). Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 48, 1964–1978.
- Motohashi, H., and Inui, K. (2013a). Multidrug and toxin extrusion family SLC47: physiological, pharmacokinetic and toxicokinetic importance of MATE1 and MATE2-K. *Mol. Aspects Med.* 34, 661–668.
- Motohashi, H., and Inui, K. (2013b). Organic cation transporter OCTs (SLC22) and MATEs (SLC47) in the human kidney. *AAPS J.* 15, 581–588.
- Motohashi, H., Sakurai, Y., Saito, H., Masuda, S., Urakami, Y., Goto, M., Fukatsu, A., Ogawa, O., and Inui, K. (2002). Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 13, 866–874.
- Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J. Cell Sci.* 118, 3573–3584.
- Mu, Y., Gudey, S.K., and Landström, M. (2012). Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res.* 347, 11–20.
- Mulder, K.M. (2000). Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 23–35.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Methods in Enzymology*, Ray Wu, ed. (Academic Press), pp. 335–350.
- Murrell, G.A., Francis, M.J., and Bromley, L. (1990). Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem. J.* 265, 659–665.
- Nagar, B. (2007). c-Abl tyrosine kinase and inhibition by the cancer drug imatinib (Gleevec/STI-571). *J. Nutr.* 137, 1518S–1523S; discussion 1548S.
- Nagar, B., Bornmann, W.G., Pellicena, P., Schindler, T., Veach, D.R., Miller, W.T., Clarkson, B., and Kuriyan, J. (2002). Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.* 62, 4236–4243.

- Nagy, Z., and Czirják, L. (2004). Nailfold digital capillaroscopy in 447 patients with connective tissue disease and Raynaud's disease. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 18, 62–68.
- Namboodiri, A.M., Rocca, K.M., and Pandey, J.P. (2004). IgG antibodies to human cytomegalovirus late protein UL94 in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity* 37, 241–244.
- Namboodiri, A.M., Rocca, K.M., Kuwana, M., and Pandey, J.P. (2006). Antibodies to human cytomegalovirus protein UL83 in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 24, 176–178.
- Nardinelli, L., Sanabani, S.S., Didone, A., Ferreira, P. de B., Serpa, M., Novaes, M.M.Y., Marchiani, M., Ruiz, A.L., Lima, I.S., Chamone, D. de A.F., et al. (2012). Pretherapeutic expression of the hOCT1 gene predicts a complete molecular response to imatinib mesylate in chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol.* 127, 228–234.
- Nezu, J., Tamai, I., Oku, A., Ohashi, R., Yabuuchi, H., Hashimoto, N., Nikaido, H., Sai, Y., Koizumi, A., Shoji, Y., et al. (1999). Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat. Genet.* 21, 91–94.
- Ni, L.-N., Li, J.-Y., Miao, K.-R., Qiao, C., Zhang, S.-J., Qiu, H.-R., and Qian, S.-X. (2011). Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms correlate with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 28, 265–269.
- Nietert, P.J., and Silver, R.M. (2000). Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factors. *Curr. Opin. Rheumatol.* 12, 520–526.
- Nihtyanova, S.I., Brough, G.M., Black, C.M., and Denton, C.P. (2007). Mycophenolate mofetil in diffuse cutaneous systemic sclerosis--a retrospective analysis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 46, 442–445.
- Nihtyanova, S.I., Schreiber, B.E., Ong, V.H., Rosenberg, D., Moinzadeh, P., Coghlan, J.G., Wells, A.U., and Denton, C.P. (2014a). Prediction of pulmonary complications and long-term survival in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* 66, 1625–1635.
- Nihtyanova, S.I., Ong, V.H., and Denton, C.P. (2014b). Current management strategies for systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 32, 156–164.
- Noguchi, K., Katayama, K., Mitsuhashi, J., and Sugimoto, Y. (2009). Functions of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 26–33.
- Nowell, P., and Hungerford, D. (1960a). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Sci.* 1421497.
- Nowell, P.C., and Hungerford, D.A. (1960b). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* 25, 85–109.
- O'Hare, T., Walters, D.K., Stoffregen, E.P., Sherbenou, D.W., Heinrich, M.C., Deininger, M.W.N., and Druker, B.J. (2005). Combined Abl inhibitor therapy for minimizing drug resistance in chronic myeloid leukemia: Src/Abl inhibitors are compatible with imatinib. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 6987–6993.

- Ohashi, R., Tamai, I., Yabuuchi, H., Nezu, J.I., Oku, A., Sai, Y., Shimane, M., and Tsuji, A. (1999). Na(+)-dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): its pharmacological and toxicological relevance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *291*, 778–784.
- Ohashi, R., Tamai, I., Nezu, J.I., Nikaido, H., Hashimoto, N., Oku, A., Sai, Y., Shimane, M., and Tsuji, A. (2001). Molecular and physiological evidence for multifunctionality of carnitine/organic cation transporter OCTN2. *Mol. Pharmacol.* *59*, 358–366.
- Ohta, K., Inoue, K., Yasujima, T., Ishimaru, M., and Yuasa, H. (2009). Functional characteristics of two human MATE transporters: kinetics of cimetidine transport and profiles of inhibition by various compounds. *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Société Can. Sci. Pharm.* *12*, 388–396.
- Olashaw, N.E., Kowalik, T.F., Huang, E.S., and Pledger, W.J. (1992). Induction of NF-kappa B-like activity by platelet-derived growth factor in mouse fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* *3*, 1131–1139.
- Olivieri, A., Locatelli, F., Zecca, M., Sanna, A., Cimminiello, M., Raimondi, R., Gini, G., Mordini, N., Balduzzi, A., Leoni, P., et al. (2009). Imatinib for refractory chronic graft-versus-host disease with fibrotic features. *Blood* *114*, 709–718.
- Omote, H., Hiasa, M., Matsumoto, T., Otsuka, M., and Moriyama, Y. (2006). The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol. Sci.* *27*, 587–593.
- van Oosterom, A.T., Judson, I., Verweij, J., Stroobants, S., Donato di Paola, E., Dimitrijevic, S., Martens, M., Webb, A., Scot, R., Van Glabbeke, M., et al. (2001). Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet* *358*, 1421–1423.
- Op De Beéck, K., Vermeersch, P., Verschuere, P., Westhovens, R., Mariën, G., Blockmans, D., and Bossuyt, X. (2012). Antinuclear antibody detection by automated multiplex immunoassay in untreated patients at the time of diagnosis. *Autoimmun. Rev.* *12*, 137–143.
- Orlidge, A., and D'Amore, P.A. (1987). Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* *105*, 1455–1462.
- Otsuka, M., Matsumoto, T., Morimoto, R., Arioka, S., Omote, H., and Moriyama, Y. (2005). A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 17923–17928.
- Pablos, J.L., Everett, E.T., and Norris, J.S. (2004). The tight skin mouse: an animal model of systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* *22*, S81-85.
- Pandey, J.P., and LeRoy, E.C. (1998). Human cytomegalovirus and the vasculopathies of autoimmune diseases (especially scleroderma), allograft rejection, and coronary restenosis. *Arthritis Rheum.* *41*, 10–15.
- Pane, F., Frigeri, F., Sindona, M., Luciano, L., Ferrara, F., Cimino, R., Meloni, G., Saglio, G., Salvatore, F., and Rotoli, B. (1996). Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* *88*, 2410–2414.

Pannetier, C., Delassus, S., Darce, S., Saucier, C., and Kourilsky, P. (1993). Quantitative titration of nucleic acids by enzymatic amplification reactions run to saturation. *Nucleic Acids Res.* *21*, 577–583.

Pannu, J., and Trojanowska, M. (2004). Recent advances in fibroblast signaling and biology in scleroderma. *Curr. Opin. Rheumatol.* *16*, 739–745.

Pannu, J., Gore-Hyer, E., Yamanaka, M., Smith, E.A., Rubinchik, S., Dong, J.-Y., Jablonska, S., Blaszczyk, M., and Trojanowska, M. (2004). An increased transforming growth factor beta receptor type I:type II ratio contributes to elevated collagen protein synthesis that is resistant to inhibition via a kinase-deficient transforming growth factor beta receptor type II in scleroderma. *Arthritis Rheum.* *50*, 1566–1577.

Pannu, J., Gardner, H., Shearstone, J.R., Smith, E., and Trojanowska, M. (2006). Increased levels of transforming growth factor beta receptor type I and up-regulation of matrix gene program: A model of scleroderma. *Arthritis Rheum.* *54*, 3011–3021.

Pannu, J., Nakerakanti, S., Smith, E., ten Dijke, P., and Trojanowska, M. (2007). Transforming growth factor-beta receptor type I-dependent fibrogenic gene program is mediated via activation of Smad1 and ERK1/2 pathways. *J. Biol. Chem.* *282*, 10405–10413.

Pannu, J., Asano, Y., Nakerakanti, S., Smith, E., Jablonska, S., Blaszczyk, M., ten Dijke, P., and Trojanowska, M. (2008). Smad1 pathway is activated in systemic sclerosis fibroblasts and is targeted by imatinib mesylate. *Arthritis Rheum.* *58*, 2528–2537.

Pattanaik, D., Brown, M., Postlethwaite, B.C., and Postlethwaite, A.E. (2015). Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Front. Immunol.* *6*, 272.

Pelis, R.M., and Wright, S.H. (2014). SLC22, SLC44, and SLC47 transporters--organic anion and cation transporters: molecular and cellular properties. *Curr. Top. Membr.* *73*, 233–261.

Peltekova, V.D., Wintle, R.F., Rubin, L.A., Amos, C.I., Huang, Q., Gu, X., Newman, B., Van Oene, M., Cescon, D., Greenberg, G., et al. (2004). Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat. Genet.* *36*, 471–475.

Peng, B., Dutreix, C., Mehring, G., Hayes, M.J., Ben-Am, M., Seiberling, M., Pokorny, R., Capdeville, R., and Lloyd, P. (2004). Absolute bioavailability of imatinib (Gleevec) orally versus intravenous infusion. *J. Clin. Pharmacol.* *44*, 158–162.

Peng, B., Lloyd, P., and Schran, H. (2005). Clinical pharmacokinetics of imatinib. *Clin. Pharmacokinet.* *44*, 879–894.

Pereira, I., Fialho, S., Castro, G., and Zimmermann, A. (2010). Imatinib mesylate induces clinical remission in rheumatoid arthritis. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* *77*, 372–373.

Pérez-Gutiérrez, S., González-Cámpora, R., Amérigo-Navarro, J., Beato-Moreno, A., Sánchez-León, M., Pareja Megía, J.M., Virizuela-Echaburu, J.A., and López-Beltrán, A. (2007). Expression of P-glycoprotein and metallothionein in gastrointestinal stromal tumor and leiomyosarcomas. Clinical implications. *Pathol. Oncol. Res. POR* *13*, 203–208.

Picard, S., Titier, K., Etienne, G., Teilhet, E., Ducint, D., Bernard, M.-A., Lassalle, R., Marit, G., Reiffers, J., Begaud, B., et al. (2007). Trough imatinib plasma levels are associated with

- both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 109, 3496–3499.
- Pietig, G., Mehrens, T., Hirsch, J.R., Cetinkaya, I., Piechota, H., and Schlatter, E. (2001). Properties and regulation of organic cation transport in freshly isolated human proximal tubules. *J. Biol. Chem.* 276, 33741–33746.
- Plaat, B.E., Hollema, H., Molenaar, W.M., Torn Broers, G.H., Pijpe, J., Mastik, M.F., Hoekstra, H.J., van den Berg, E., Scheper, R.J., and van der Graaf, W.T. (2000). Soft tissue leiomyosarcomas and malignant gastrointestinal stromal tumors: differences in clinical outcome and expression of multidrug resistance proteins. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 18, 3211–3220.
- Pope, J.E. (2003). Musculoskeletal involvement in scleroderma. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 29, 391–408.
- Pope, J., McBain, D., Petrlich, L., Watson, S., Vanderhoek, L., de Leon, F., Seney, S., and Summers, K. (2011). Imatinib in active diffuse cutaneous systemic sclerosis: Results of a six-month, randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept pilot study at a single center. *Arthritis Rheum.* 63, 3547–3551.
- Pope, J.E., Bellamy, N., Seibold, J.R., Baron, M., Ellman, M., Carette, S., Smith, C.D., Chalmers, I.M., Hong, P., O’Hanlon, D., et al. (2001). A randomized, controlled trial of methotrexate versus placebo in early diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum.* 44, 1351–1358.
- Prescott, R.J., Freemont, A.J., Jones, C.J., Hoyland, J., and Fielding, P. (1992). Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J. Pathol.* 166, 255–263.
- Prey, S., Ezzedine, K., Doussau, A., Grandoulier, A.-S., Barcat, D., Chatelus, E., Diot, E., Durant, C., Hachulla, E., de Korwin-Krokowski, J.-D., et al. (2012). Imatinib mesylate in scleroderma-associated diffuse skin fibrosis: a phase II multicentre randomized double-blinded controlled trial. *Br. J. Dermatol.* 167, 1138–1144.
- Rajkumar, V.S., Sundberg, C., Abraham, D.J., Rubin, K., and Black, C.M. (1999). Activation of microvascular pericytes in autoimmune Raynaud’s phenomenon and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 42, 930–941.
- Rajkumar, V.S., Howell, K., Csiszar, K., Denton, C.P., Black, C.M., and Abraham, D.J. (2005). Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis Res. Ther.* 7, R1113–1123.
- Ramirez, F., Tanaka, S., and Bou-Gharios, G. (2006). Transcriptional regulation of the human alpha2(I) collagen gene (COL1A2), an informative model system to study fibrotic diseases. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 25, 365–372.
- Ren, Q., and Paulsen, I.T. (2005). Comparative analyses of fundamental differences in membrane transport capabilities in prokaryotes and eukaryotes. *PLoS Comput. Biol.* 1, e27.
- Renart, J., Reiser, J., and Stark, G.R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 3116–3120.

- Renaudineau, Y., Revelen, R., Levy, Y., Salojin, K., Gilburg, B., Shoenfeld, Y., and Youinou, P. (1999). Anti-Endothelial Cell Antibodies in Systemic Sclerosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 156–160.
- Rioux, J.D., Daly, M.J., Silverberg, M.S., Lindblad, K., Steinhart, H., Cohen, Z., Delmonte, T., Kocher, K., Miller, K., Guschwan, S., et al. (2001). Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat. Genet.* 29, 223–228.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., and Wittwer, C.T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 245, 154–160.
- Rodnan, G.P., Lipinski, E., and Luksick, J. (1979). Skin thickness and collagen content in progressive systemic sclerosis and localized scleroderma. *Arthritis Rheum.* 22, 130–140.
- Roig, J., Tuazon, P.T., Zipfel, P.A., Pendergast, A.M., and Traugh, J.A. (2000). Functional interaction between c-Abl and the p21-activated protein kinase gamma-PAK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 14346–14351.
- Romashkova, J.A., and Makarov, S.S. (1999). NF- $\kappa$ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401, 86–90.
- Rose, S., Young, M.A., and Reynolds, J.C. (1998). Gastrointestinal manifestations of scleroderma. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 27, 563–594.
- Roskoski, R. (2015). A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol. Res.* 100, 1–23.
- Ross, R., Glomset, J., Kariya, B., and Harker, L. (1974). A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 1207–1210.
- Rottoli, P., Magi, B., Perari, M.G., Liberatori, S., Nikiforakis, N., Bargagli, E., Cianti, R., Bini, L., and Pallini, V. (2005). Cytokine profile and proteome analysis in bronchoalveolar lavage of patients with sarcoidosis, pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Proteomics* 5, 1423–1430.
- Roumm, A.D., Whiteside, T.L., Medsger, T.A., and Rodnan, G.P. (1984). Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum.* 27, 645–653.
- Rowley, J.D. (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290–293.
- Russell, R.K., Drummond, H.E., Nimmo, E.R., Anderson, N.H., Noble, C.L., Wilson, D.C., Gillett, P.M., McGrogan, P., Hassan, K., Weaver, L.T., et al. (2006). Analysis of the influence of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus on disease susceptibility and growth indices in early onset inflammatory bowel disease. *Gut* 55, 1114–1123.
- Sabnani, I., Zucker, M.J., Rosenstein, E.D., Baran, D.A., Arroyo, L.H., Tsang, P., Zubair, M., and Rivera, V. (2009). A novel therapeutic approach to the treatment of scleroderma-associated pulmonary complications: safety and efficacy of combination therapy with imatinib and cyclophosphamide. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 48, 49–52.

Saborowski, M., Kullak-Ublick, G.A., and Eloranta, J.J. (2006). The human organic cation transporter-1 gene is transactivated by hepatocyte nuclear factor-4alpha. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *317*, 778–785.

Saglio, G., Guerrasio, A., Rosso, C., Zaccaria, A., Tassinari, A., Serra, A., Rege-Cambrin, G., Mazza, U., and Gavosto, F. (1990). New type of Bcr/Abl junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* *76*, 1819–1824.

Saier, M.H. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *64*, 354–411.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* *239*, 487–491.

Sakkas, L.I., Xu, B., Artlett, C.M., Lu, S., Jimenez, S.A., and Platsoucas, C.D. (2002). Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 3649–3659.

Salmon-Ehr, V., Serpier, H., Nawrocki, B., Gillery, P., Clavel, C., Kalis, B., Birembaut, P., and Maquart, F.X. (1996). Expression of interleukin-4 in scleroderma skin specimens and scleroderma fibroblast cultures. Potential role in fibrosis. *Arch. Dermatol.* *132*, 802–806.

Sambo, P., Jannino, L., Candela, M., Salvi, A., Donini, M., Dusi, S., Luchetti, M.M., and Gabrielli, A. (1999). Monocytes of patients with systemic sclerosis (scleroderma) spontaneously release in vitro increased amounts of superoxide anion. *J. Invest. Dermatol.* *112*, 78–84.

Sambo, P., Baroni, S.S., Luchetti, M., Paroncini, P., Dusi, S., Orlandini, G., and Gabrielli, A. (2001). Oxidative stress in scleroderma: maintenance of scleroderma fibroblast phenotype by the constitutive up-regulation of reactive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway. *Arthritis Rheum.* *44*, 2653–2664.

Sandler, C., Joutsiniemi, S., Lindstedt, K.A., Juutilainen, T., Kovanen, P.T., and Eklund, K.K. (2006). Imatinib mesylate inhibits platelet derived growth factor stimulated proliferation of rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *347*, 31–35.

Santiago, B., Galindo, M., Rivero, M., and Pablos, J.L. (2001). Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum.* *44*, 1667–1676.

Santiago, J.L., Martínez, A., de la Calle, H., Fernández-Arquero, M., Figueredo, M.A., de la Concha, E.G., and Urcelay, E. (2006). Evidence for the association of the SLC22A4 and SLC22A5 genes with type 1 diabetes: a case control study. *BMC Med. Genet.* *7*, 54.

Sato, S., Fujimoto, M., Hasegawa, M., and Takehara, K. (2004). Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum.* *50*, 1918–1927.

Sato, T., Masuda, S., Yonezawa, A., Tanihara, Y., Katsura, T., and Inui, K.-I. (2008). Transcellular transport of organic cations in double-transfected MDCK cells expressing human organic cation transporters hOCT1/hMATE1 and hOCT2/hMATE1. *Biochem. Pharmacol.* *76*, 894–903.



Savage, D.G., and Antman, K.H. (2002). Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy. *N. Engl. J. Med.* *346*, 683–693.

Sawyers, C.L., Denny, C.T., and Witte, O.N. (1991). Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. *Cell* *64*, 337–350.

Sawyers, C.L., Hochhaus, A., Feldman, E., Goldman, J.M., Miller, C.B., Ottmann, O.G., Schiffer, C.A., Talpaz, M., Guilhot, F., Deininger, M.W.N., et al. (2002). Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* *99*, 3530–3539.

Scheffe, J.H., Lehmann, K.E., Buschmann, I.R., Unger, T., and Funke-Kaiser, H. (2006). Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s CT difference” formula. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *84*, 901–910.

Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W.T., Clarkson, B., and Kuriyan, J. (2000). Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* *289*, 1938–1942.

Schlatter, E., Mönnich, V., Cetinkaya, I., Mehrens, T., Ciarimboli, G., Hirsch, J.R., Popp, C., and Koepsell, H. (2002). The organic cation transporters rOCT1 and hOCT2 are inhibited by cGMP. *J. Membr. Biol.* *189*, 237–244.

Schlatter, E., Klassen, P., Massmann, V., Holle, S.K., Guckel, D., Edemir, B., Pavenstädt, H., and Ciarimboli, G. (2014). Mouse organic cation transporter 1 determines properties and regulation of basolateral organic cation transport in renal proximal tubules. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *466*, 1581–1589.

Schmidli, H., Peng, B., Riviere, G.-J., Capdeville, R., Hensley, M., Gathmann, I., Bolton, A.E., and Racine-Poon, A. (2005). Population pharmacokinetics of imatinib mesylate in patients with chronic-phase chronic myeloid leukaemia: results of a phase III study. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *60*, 35–44.

Schmidt-Lauber, C., Harrach, S., Pap, T., Fischer, M., Victor, M., Heitzmann, M., Hansen, U., Fobker, M., Brand, S.-M., Sindic, A., et al. (2012). Transport mechanisms and their pathology-induced regulation govern tyrosine kinase inhibitor delivery in rheumatoid arthritis. *PloS One* *7*, e52247.

Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* *3*, 1101–1108.

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., and Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* *7*, 3.

Serù, R., Mondola, P., Damiano, S., Svegliati, S., Agnese, S., Avvedimento, E.V., and Santillo, M. (2004). HaRas activates the NADPH oxidase complex in human neuroblastoma cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *J. Neurochem.* *91*, 613–622.

Servettaz, A., Guilpain, P., Goulvestre, C., Chéreau, C., Hercend, C., Nicco, C., Guillevin, L., Weill, B., Mouthon, L., and Batteux, F. (2007). Radical oxygen species production induced by advanced oxidation protein products predicts clinical evolution and response to treatment in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* *66*, 1202–1209.

- Sfikakis, P.P., Gorgoulis, V.G., Katsiari, C.G., Evangelou, K., Kostopoulos, C., and Black, C.M. (2008). Imatinib for the treatment of refractory, diffuse systemic sclerosis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *47*, 735–737.
- Sgonc, R., Gruschwitz, M.S., Dietrich, H., Recheis, H., Gershwin, M.E., and Wick, G. (1996). Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J. Clin. Invest.* *98*, 785–792.
- Shah, N.P., Tran, C., Lee, F.Y., Chen, P., Norris, D., and Sawyers, C.L. (2004). Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* *305*, 399–401.
- Shah, N.P., Guilhot, F., Cortes, J.E., Schiffer, C.A., le Coutre, P., Brümmendorf, T.H., Kantarjian, H.M., Hochhaus, A., Rouselot, P., Mohamed, H., et al. (2014). Long-term outcome with dasatinib after imatinib failure in chronic-phase chronic myeloid leukemia: follow-up of a phase 3 study. *Blood* *123*, 2317–2324.
- Shand, L., Lunt, M., Nihtyanova, S., Hoseini, M., Silman, A., Black, C.M., and Denton, C.P. (2007). Relationship between change in skin score and disease outcome in diffuse cutaneous systemic sclerosis: application of a latent linear trajectory model. *Arthritis Rheum.* *56*, 2422–2431.
- Shang, T., Uihlein, A.V., Van Asten, J., Kalyanaraman, B., and Hillard, C.J. (2003). 1-Methyl-4-phenylpyridinium accumulates in cerebellar granule neurons via organic cation transporter 3. *J. Neurochem.* *85*, 358–367.
- Shen, X., Hu, P.P., Liberati, N.T., Datto, M.B., Frederick, J.P., and Wang, X.F. (1998). TGF-beta-induced phosphorylation of Smad3 regulates its interaction with coactivator p300/CREB-binding protein. *Mol. Biol. Cell* *9*, 3309–3319.
- Shephard, P., Hinz, B., Smola-Hess, S., Meister, J.-J., Krieg, T., and Smola, H. (2004). Dissecting the roles of endothelin, TGF-beta and GM-CSF on myofibroblast differentiation by keratinocytes. *Thromb. Haemost.* *92*, 262–274.
- Shi-Wen, X., Denton, C.P., Dashwood, M.R., Holmes, A.M., Bou-Gharios, G., Pearson, J.D., Black, C.M., and Abraham, D.J. (2001). Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. *J. Invest. Dermatol.* *116*, 417–425.
- Shi-wen, X., Kennedy, L., Renzoni, E.A., Bou-Gharios, G., du Bois, R.M., Black, C.M., Denton, C.P., Abraham, D.J., and Leask, A. (2007). Endothelin is a downstream mediator of profibrotic responses to transforming growth factor beta in human lung fibroblasts. *Arthritis Rheum.* *56*, 4189–4194.
- Slot, A.J., Molinski, S.V., and Cole, S.P.C. (2011). Mammalian multidrug-resistance proteins (MRPs). *Essays Biochem.* *50*, 179–207.
- Smith, V., Van Praet, J.T., Vandooren, B., Van der Cruyssen, B., Naeyaert, J.-M., Decuman, S., Elewaut, D., and De Keyser, F. (2010). Rituximab in diffuse cutaneous systemic sclerosis: an open-label clinical and histopathological study. *Ann. Rheum. Dis.* *69*, 193–197.
- Smith, V., Piette, Y., van Praet, J.T., Decuman, S., Deschepper, E., Elewaut, D., and De Keyser, F. (2013). Two-year results of an open pilot study of a 2-treatment course with rituximab in patients with early systemic sclerosis with diffuse skin involvement. *J. Rheumatol.* *40*, 52–57.

- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* *98*, 503–517.
- Specchia, G., Mininni, D., Guerrasio, A., Palumbo, G., Pastore, D., and Liso, V. (1995). Ph positive acute lymphoblastic leukemia in adults: molecular and clinical studies. *Leuk. Lymphoma 18 Suppl 1*, 37–42.
- Spiegelman, S., Watson, K.F., and Kacian, D.L. (1971). Synthesis of DNA Complements of Natural RNAs: A General Approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *68*, 2843–2845.
- Spiera, R.F., Gordon, J.K., Mersten, J.N., Magro, C.M., Mehta, M., Wildman, H.F., Kloiber, S., Kirou, K.A., Lyman, S., and Crow, M.K. (2011). Imatinib mesylate (Gleevec) in the treatment of diffuse cutaneous systemic sclerosis: results of a 1-year, phase IIa, single-arm, open-label clinical trial. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 1003–1009.
- Staud, F., Cerveny, L., Ahmadimoghaddam, D., and Ceckova, M. (2013). Multidrug and toxin extrusion proteins (MATE/SLC47); role in pharmacokinetics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *45*, 2007–2011.
- Steen, V.D. (2005). Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin. Arthritis Rheum.* *35*, 35–42.
- Steen, V.D. (2014). Kidney involvement in systemic sclerosis. *Presse Médicale Paris Fr.* *1983* *43*, e305-314.
- Steen, V.D., and Medsger, T.A. (1998). Case-control study of corticosteroids and other drugs that either precipitate or protect from the development of scleroderma renal crisis. *Arthritis Rheum.* *41*, 1613–1619.
- Steen, V.D., and Medsger, T.A. (2001). Improvement in skin thickening in systemic sclerosis associated with improved survival. *Arthritis Rheum.* *44*, 2828–2835.
- Steen, V.D., and Medsger, T.A. (2007). Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972–2002. *Ann. Rheum. Dis.* *66*, 940–944.
- Steen, V.D., Medsger, T.A., Osial, T.A., Ziegler, G.L., Shapiro, A.P., and Rodnan, G.P. (1984). Factors predicting development of renal involvement in progressive systemic sclerosis. *Am. J. Med.* *76*, 779–786.
- Sticherling, M. (2012). Systemic sclerosis-dermatological aspects. Part 1: Pathogenesis, epidemiology, clinical findings. *J. Dtsch. Dermatol. Ges. J. Ger. Soc. Dermatol. JDDG* *10*, 705–718; quiz 716.
- Stratton, R.J., Wilson, H., and Black, C.M. (2001). Pilot study of anti-thymocyte globulin plus mycophenolate mofetil in recent-onset diffuse scleroderma. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *40*, 84–88.
- Sturrock, A., Cahill, B., Norman, K., Huecksteadt, T.P., Hill, K., Sanders, K., Karwande, S.V., Stringham, J.C., Bull, D.A., Gleich, M., et al. (2006). Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *290*, L661–L673.
- Sundberg, C., Ivarsson, M., Gerdin, B., and Rubin, K. (1996). Pericytes as collagen-producing cells in excessive dermal scarring. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *74*, 452–466.

- Suryanarayan, K., Hunger, S.P., Kohler, S., Carroll, A.J., Crist, W., Link, M.P., and Cleary, M.L. (1991). Consistent involvement of the bcr gene by 9;22 breakpoints in pediatric acute leukemias. *Blood* 77, 324–330.
- Svegliati, S., Canello, R., Sambo, P., Luchetti, M., Paroncini, P., Orlandini, G., Discepoli, G., Paterno, R., Santillo, M., Cuzzo, C., et al. (2005). Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2. Amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 280, 36474–36482.
- Szakács, Z., Béni, S., Varga, Z., Orfi, L., Kéri, G., and Noszál, B. (2005). Acid-base profiling of imatinib (gleevec) and its fragments. *J. Med. Chem.* 48, 249–255.
- Szúcs, G., Szamosi, S., Aleksza, M., Veres, K., and Soltész, P. (2003). [Plasmapheresis therapy in systemic sclerosis]. *Orv. Hetil.* 144, 2213–2217.
- Takehara, K., Ihn, H., and Sato, S. (2013). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial: intravenous immunoglobulin treatment in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 31, 151–156.
- Talpaz, M., Shah, N.P., Kantarjian, H., Donato, N., Nicoll, J., Paquette, R., Cortes, J., O'Brien, S., Nicaise, C., Bleickardt, E., et al. (2006). Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl. J. Med.* 354, 2531–2541.
- Tamai, I. (2013). Pharmacological and pathophysiological roles of carnitine/organic cation transporters (OCTNs: SLC22A4, SLC22A5 and Slc22a21). *Biopharm. Drug Dispos.* 34, 29–44.
- Tamai, I., Yabuuchi, H., Nezu, J., Sai, Y., Oku, A., Shimane, M., and Tsuji, A. (1997). Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett.* 419, 107–111.
- Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J., Yabuuchi, H., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y., and Tsuji, A. (1998). Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J. Biol. Chem.* 273, 20378–20382.
- Tamai, I., China, K., Sai, Y., Kobayashi, D., Nezu, J., Kawahara, E., and Tsuji, A. (2001). Na(+)-coupled transport of L-carnitine via high-affinity carnitine transporter OCTN2 and its subcellular localization in kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 1512, 273–284.
- Tamai, I., Nakanishi, T., Kobayashi, D., China, K., Kosugi, Y., Nezu, J., Sai, Y., and Tsuji, A. (2004). Involvement of OCTN1 (SLC22A4) in pH-dependent transport of organic cations. *Mol. Pharm.* 1, 57–66.
- Tamaki, Z., Asano, Y., Hatano, M., Yao, A., Kawashima, T., Tomita, M., Kinugawa, K., Nagai, R., and Sato, S. (2012). Efficacy of low-dose imatinib mesylate for cutaneous involvement in systemic sclerosis: a preliminary report of three cases. *Mod. Rheumatol. Jpn. Rheum. Assoc.* 22, 94–99.
- Tan, F.K., Zhou, X., Mayes, M.D., Gourh, P., Guo, X., Marcum, C., Jin, L., and Arnett, F.C. (2006). Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 45, 694–702.

Tang, N.L., Ganapathy, V., Wu, X., Hui, J., Seth, P., Yuen, P.M., Wanders, R.J., Fok, T.F., and Hjelm, N.M. (1999). Mutations of OCTN2, an organic cation/carnitine transporter, lead to deficient cellular carnitine uptake in primary carnitine deficiency. *Hum. Mol. Genet.* 8, 655–660.

Tanihara, Y., Masuda, S., Sato, T., Katsura, T., Ogawa, O., and Inui, K.-I. (2007). Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H(+)-organic cation antiporters. *Biochem. Pharmacol.* 74, 359–371.

Tashkin, D.P., Elashoff, R., Clements, P.J., Goldin, J., Roth, M.D., Furst, D.E., Arriola, E., Silver, R., Strange, C., Bolster, M., et al. (2006). Cyclophosphamide versus Placebo in Scleroderma Lung Disease. *N. Engl. J. Med.* 354, 2655–2666.

Temin, H.M., and Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211–1213.

Terada, T., Masuda, S., Asaka, J.-I., Tsuda, M., Katsura, T., and Inui, K. (2006). Molecular cloning, functional characterization and tissue distribution of rat H<sup>+</sup>/organic cation antiporter MATE1. *Pharm. Res.* 23, 1696–1701.

Théou, N., Gil, S., Devocelle, A., Julié, C., Lavergne-Slove, A., Beauchet, A., Callard, P., Farinotti, R., Le Cesne, A., Lemoine, A., et al. (2005). Multidrug resistance proteins in gastrointestinal stromal tumors: site-dependent expression and initial response to imatinib. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 7593–7598.

Thomas, J., Wang, L., Clark, R.E., and Pirmohamed, M. (2004). Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* 104, 3739–3745.

Thompson, A.E., and Pope, J.E. (2005). Calcium channel blockers for primary Raynaud's phenomenon: a meta-analysis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 44, 145–150.

Tokuhiro, S., Yamada, R., Chang, X., Suzuki, A., Kochi, Y., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Ohtsuki, M., Ono, M., et al. (2003). An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* 35, 341–348.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350–4354.

Trojanowska, M. (2008). Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 47 *Suppl* 5, v2-4.

Trojanowska, M. (2009). Noncanonical transforming growth factor beta signaling in scleroderma fibrosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 21, 623–629.

Tsuji-Yamada, J., Nakazawa, M., Minami, M., and Sasaki, T. (2001). Increased frequency of interleukin 4 producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in peripheral blood from patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 28, 1252–1258.

Tzvetkov, M.V., Vormfelde, S.V., Balen, D., Meineke, I., Schmidt, T., Sehr, D., Sabolić, I., Koepsell, H., and Brockmöller, J. (2009). The effects of genetic polymorphisms in the organic

- cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin. *Clin. Pharmacol. Ther.* *86*, 299–306.
- Vancheeswaran, R., Azam, A., Black, C., and Dashwood, M.R. (1994). Localization of endothelin-1 and its binding sites in scleroderma skin. *J. Rheumatol.* *21*, 1268–1276.
- Varga, J., and Abraham, D. (2007). Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J. Clin. Invest.* *117*, 557–567.
- Varga, J., and Bashey, R.I. (1995). Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. *Int. Rev. Immunol.* *12*, 187–199.
- Verhaagh, S., Schweifer, N., Barlow, D.P., and Zwart, R. (1999). Cloning of the mouse and human solute carrier 22a3 (Slc22a3/SLC22A3) identifies a conserved cluster of three organic cation transporters on mouse chromosome 17 and human 6q26-q27. *Genomics* *55*, 209–218.
- Vialou, V., Amphoux, A., Zwart, R., Giros, B., and Gautron, S. (2004). Organic cation transporter 3 (Slc22a3) is implicated in salt-intake regulation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 2846–2851.
- Victor, M. (2010). Rolle der organischen Kationentransporter in der zellulären Aufnahme von Imatinib und die Untersuchung ihrer funktionellen und molekularen Expression in normalen und pathogen veränderten synovialen Fibroblasten. Diplomarbeit. Universität Osnabrück.
- Visconti, L., Atteritano, M., Buemi, M., and Santoro, D. (2014). [Renal and extra-renal involvement in scleroderma]. *G. Ital. Nefrol. Organo Uff. Della Soc. Ital. Nefrol.* *31*.
- Wagner, C.A., Lükewille, U., Kaltenbach, S., Moschen, I., Bröer, A., Risler, T., Bröer, S., and Lang, F. (2000). Functional and pharmacological characterization of human Na(+)-carnitine cotransporter hOCTN2. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *279*, F584-591.
- Walker, J.G., and Fritzler, M.J. (2007). Update on autoantibodies in systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* *19*, 580–591.
- Walker, K.M., Pope, J., Scleroderma Clinical Trials Consortium, and Canadian Scleroderma Research Group (2011). Expert agreement on EULAR/EUSTAR recommendations for the management of systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* *38*, 1326–1328.
- Walker, U.A., Tyndall, A., Czirják, L., Denton, C., Farge-Bancel, D., Kowal-Bielecka, O., Müller-Ladner, U., Bocelli-Tyndall, C., and Matucci-Cerinic, M. (2007). Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. *Ann. Rheum. Dis.* *66*, 754–763.
- Wang, L., Giannoudis, A., Lane, S., Williamson, P., Pirmohamed, M., and Clark, R.E. (2008). Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin. Pharmacol. Ther.* *83*, 258–264.
- Wang, S., Wilkes, M.C., Leof, E.B., and Hirschberg, R. (2005). Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF-beta pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 1–11.

- Wessler, I., Roth, E., Deutsch, C., Brockerhoff, P., Bittinger, F., Kirkpatrick, C.J., and Kilbinger, H. (2001). Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Br. J. Pharmacol.* *134*, 951–956.
- White, D.L., Saunders, V.A., Dang, P., Engler, J., Zannettino, A.C.W., Cambareri, A.C., Quinn, S.R., Manley, P.W., and Hughes, T.P. (2006). OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood* *108*, 697–704.
- Whitfield, M.L., Finlay, D.R., Murray, J.I., Troyanskaya, O.G., Chi, J.-T., Pergamenschikov, A., McCalmont, T.H., Brown, P.O., Botstein, D., and Connolly, M.K. (2003). Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12319–12324.
- Widmer, N., Colombo, S., Buclin, T., and Decosterd, L.A. (2003). Functional consequence of MDR1 expression on imatinib intracellular concentrations. *Blood* *102*, 1142.
- Widmer, N., Béguin, A., Rochat, B., Buclin, T., Kovacsóvics, T., Duchosal, M.A., Leyvraz, S., Rosselet, A., Biollaz, J., and Decosterd, L.A. (2004). Determination of imatinib (Gleevec®) in human plasma by solid-phase extraction–liquid chromatography–ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. B* *803*, 285–292.
- Wight, T.N., and Potter-Perigo, S. (2011). The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *301*, G950-955.
- Wigley, F.M. (2001). When is scleroderma really scleroderma? *J. Rheumatol.* *28*, 1471–1473.
- Wilde, S., Schlatter, E., Koepsell, H., Edemir, B., Reuter, S., Pavenstädt, H., Neugebauer, U., Schröter, R., Brast, S., and Ciarimboli, G. (2009). Calmodulin-associated post-translational regulation of rat organic cation transporter 2 in the kidney is gender dependent. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *66*, 1729–1740.
- Wilkes, M.C., and Leof, E.B. (2006). Transforming growth factor beta activation of c-Abl is independent of receptor internalization and regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and PAK2 in mesenchymal cultures. *J. Biol. Chem.* *281*, 27846–27854.
- Wollheim, F.A. (2005). Classification of systemic sclerosis. Visions and reality. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *44*, 1212–1216.
- Worda, M., Sgonc, R., Dietrich, H., Niederegger, H., Sundick, R.S., Gershwin, M.E., and Wick, G. (2003). In vivo analysis of the apoptosis-inducing effect of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis by the chorionallantoic membrane assay. *Arthritis Rheum.* *48*, 2605–2614.
- Wu, X., Prasad, P.D., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (1998). cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *246*, 589–595.
- Wu, X., Huang, W., Prasad, P.D., Seth, P., Rajan, D.P., Leibach, F.H., Chen, J., Conway, S.J., and Ganapathy, V. (1999). Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *290*, 1482–1492.

Wu, X., Huang, W., Ganapathy, M.E., Wang, H., Kekuda, R., Conway, S.J., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (2000). Structure, function, and regional distribution of the organic cation transporter OCT3 in the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *279*, F449-458.

Wusirika, R., Ferri, C., Marin, M., Knight, D.A., Waldman, W.J., Ross, P., and Magro, C.M. (2003). The assessment of anti-endothelial cell antibodies in scleroderma-associated pulmonary fibrosis. A study of indirect immunofluorescent and western blot analysis in 49 patients with scleroderma. *Am. J. Clin. Pathol.* *120*, 596-606.

Wynn, T.A. (2004). Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 583-594.

Xu, L., Chen, Y.-G., and Massagué, J. (2000). The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGF $\beta$ -dependent phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* *2*, 559-562.

Xuan, W., Lamhonwah, A.-M., Librach, C., Jarvi, K., and Tein, I. (2003). Characterization of organic cation/carnitine transporter family in human sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *306*, 121-128.

Yabuuchi, H., Tamai, I., Nezu, J., Sakamoto, K., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y., and Tsuji, A. (1999). Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *289*, 768-773.

Yamakage, A., Kikuchi, K., Smith, E.A., LeRoy, E.C., and Trojanowska, M. (1992). Selective upregulation of platelet-derived growth factor alpha receptors by transforming growth factor beta in scleroderma fibroblasts. *J. Exp. Med.* *175*, 1227-1234.

Yang, C.-C., Lin, S.-D., and Yu, H.-S. (1997). Effect of growth factors on dermal fibroblast contraction in normal skin and hypertrophic scar. *J. Dermatol. Sci.* *14*, 162-169.

Yilmaz, N., Can, M., Kocakaya, D., Karakurt, S., and Yavuz, S. (2014). Two-year experience with mycophenolate mofetil in patients with scleroderma lung disease: a case series. *Int. J. Rheum. Dis.* *17*, 923-928.

Yoshiji, H., Noguchi, R., Kuriyama, S., Ikenaka, Y., Yoshii, J., Yanase, K., Namisaki, T., Kitade, M., Masaki, T., and Fukui, H. (2005). Imatinib mesylate (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *288*, G907-913.

Zhang, Y.E. (2009). Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling. *Cell Res.* *19*, 128-139.

Zhang, X., and Wright, S.H. (2009). MATE1 has an external COOH terminus, consistent with a 13-helix topology. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *297*, F263-271.

Zhang, L., Dresser, M.J., Gray, A.T., Yost, S.C., Terashita, S., and Giacomini, K.M. (1997). Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Mol. Pharmacol.* *51*, 913-921.

Zhang, Y., Zhang, Y., Gu, W., and Sun, B. (2014). TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals. *Adv. Exp. Med. Biol.* *841*, 15-44.

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., and Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* *32*, e103-e103.



Ziswiler, H.-R., Urech, R., Balmer, J., Ostensen, M., Mierau, R., and Villiger, P.M. (2007). Clinical diagnosis compared to classification criteria in a cohort of 54 patients with systemic sclerosis and associated disorders. *Swiss Med. Wkly.* 137, 586–590.

## **Literatur: Webseiten**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, 27.12.2015

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>, 27.12.2015

<https://www.pharmgkb.org/pathway/PA164713427>, 6.12.2015

## **Danksagung**

## **Lebenslauf**