

¹Christian Beyer, ²Christoph Zenzmaier, ¹Alfiya Distler, ¹Helena Reichert, ¹Hümeayra Akan, ¹Sonia C. Schindler, ³Andreas Friebe, ⁴Peter Sandner, ⁵Oliver Distler, ²Peter Berger, ¹Georg Schett, ¹Jörg H.W. Distler

¹Department of Internal Medicine 3 and Institute for Clinical Immunology, University of Erlangen-Nuremberg, Germany; ²Institute for Biomedical Aging Research, Austrian Academy of Sciences, Innsbruck, Austria; ³Institute for Physiology, Julius-Maximilians-University Würzburg, Würzburg, Germany; ⁴Bayer Health Care, Global Drug Discovery – Common Mechanism Research, Wuppertal, Germany; ⁵Department of Rheumatology, University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland

Hintergrund: Die lösliche Guanylatzyklase (sGC) nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation von Gefäßtonus und Gefäßmüdigkeit ein. Klinische Phase-3-Studien zeigen die Wirksamkeit von Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase in der pulmonal-arteriellen Hypertonie, einer häufigen Komplikation bei Patienten mit systemischer Sklerose (SSc). Dabei fanden sich neben vasodilatatorischen Effekten an den Pulmonalarterien auch eine anti-proliferative Wirkung, welche uns veranlasste, die lösliche Guanylatzyklase auf ihre anti-fibrotische Wirkung in präklinischen Fibrosemodellen der SSc zu testen.

Material und Methoden: Zur Aktivierung des sGC-cGMP-Signalweges verwendeten wir BAY 41-2272 oder 8-Bromo-cGMP, eine stabile Form des cGMPs, welche nicht durch Phosphodiesterasen abgebaut wird. Die anti-fibrotische Wirksamkeit der sGC hinsichtlich pathologischer Fibroblastenaktivierung und Kollagenfreisetzung wurde an normalen und SSc-Fibroblasten nach Stimulation mit dem zentralen pro-fibrotischen Mediator TGF- β untersucht. Die Spezifität der Effekte wurde in murinen sGC-KO-Fibroblasten bestätigt. Die Interaktion des sGC-Signalweges mit dem kanonischen TGF- β -Signalweg wurde mittels Bestimmung der Phosphorylierung der Second Messenger Smad2 und Smad3 sowie der Transkription des TGF- β -Zielgenes Smad7 untersucht. In vivo untersuchten wir die Wirksamkeit und Verträglichkeit des sGC-Stimulators BAY 41-2272 in Modellen der Bleomycin-induzierten Hautfibrose, der Tight-skin-1-Maus und der TGF- β -induzierten Hautfibrose. Als Fibrose-Readouts dienten Hautdicke, Hydroxyprolinegehalt (Maß für den Kollagengehalt) und α -Smooth-muscle-actin (α -SMA)-positive Myofibroblasten. Die spezifische Verträglichkeit der sGC Stimulation wurde mittels Telemetrie ermittelt.

Fortsetzung Resultate: Die sGC-Stimulation wurde von allen Versuchstieren gut vertragen, gemessen am Gewicht, der Felltextur und der Aktivität (Daten nicht gezeigt). Es zeigten sich keine Hinweise für eine systemische Hypotension (Abb. 3a, b) in den anti-fibrotischen Dosen. Schließlich war die Stimulation nicht nur in der Prävention von experimenteller Fibrose, sondern auch in der Behandlung bereits etablierter experimenteller Fibrose im Bleomycin-Modell und der Tight-skin-1 Maus effektiv (nicht gezeigt).

In vitro-Untersuchungen fanden sich erste Hinweise für einen möglichen Mechanismus der anti-fibrotischen Wirkung der sGC: An normalen und SSc-Fibroblasten zeigte sich, dass die sGC-Stimulation die TGF- β -abhängige Kollagensynthese- und Freisetzung auf mRNA- und Proteinebene dosisabhängig hemmen konnte (Abb. 4a-c). Weitere in vitro-Analysen zeigten, dass die sGC-Stimulation die Aktivierung von ruhenden Fibroblasten durch TGF- β hemmt: mRNA- und Protein-Level der Fibroblastenaktivitätsmarker α -Smooth muscle actin, Calponin-1 und Insulin-like growth factor-bindendes Protein 3 (IGFBP3) dienten als Readouts (Abb. 5a-f). Die sGC-Stimulation konnte die Fibroblastenaktivierung nicht nur präventiv hemmen, sondern auch nach Stimulation mit TGF- β rückgängig machen (Abb. 6a-f). Mittels sGC-Knockoutfibroblasten und der Gabe von 8-Bromo-cGMP, einem stabilen cGMP-Analogon, konnten wir bestätigen, dass die Wirkung des sGC-Stimulators BAY 41-2272 über die sGC-cGMP-Achse vermittelt wird (Abb. 7a-f). Darüber hinaus wiesen wir nach, dass die Interaktion von sGC- und TGF- β -Signalkaskade über den kanonischen TGF- β -Signalweg vermittelt wird. Sowohl der sGC-Stimulator BAY 41-2272 als auch 8-Bromo-cGMP reduzierten die nukleäre Fraktion von phosphoryliertem Smad 2 und 3 als auch die Expression von Smad 7, einem klassischen TGF- β -Zielgen. In sGC-KO-Fibroblasten konnten wir bestätigen, dass die Effekte über die sGC-cGMP-Achse vermittelt werden (Abb. 8a-d). Schließlich bestätigten wir die in vitro neu etablierte Interaktion zwischen dem sGC- und dem TGF- β -Signalweg in einem Modell der TGF- β -abhängigen Hautfibrose. Stimulation der sGC mittels BAY 41-2272 reduzierte dosisabhängig die Aktivierung des kanonischen TGF- β -Signalweges und die Entstehung von Hautfibrose in vivo (Abb. 9 a-f).

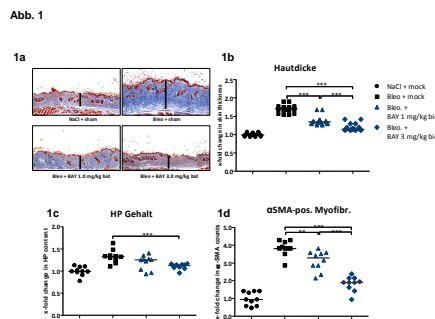


Abbildung 1: Stimulation der sGC beugt der Entstehung Bleomycin-induzierter Hautfibrose vor. Die Behandlung mit dem sGC-Stimulator BAY 41-2272 wurde gleichzeitig mit der s.c.-Applikation des pro-fibrotischen Agens Bleomycin begonnen. BAY 41-2272 wurde in zwei Dosen (1 und 3 mg/kg KG bid) appliziert. **Fig. 1a)** Representative Trichrom-Färbungen, in welchen Kollagen blau gefärbt sind. **Fig. 1b)** Hautdicke. **Fig. 1c)** Hydroxyprolinegehalt. **Fig. 1d)** Anzahl der α -SMA-positiven Myofibroblasten. Alle Experimente sind als ein Vielfaches zur NaCl-Kontrollgruppe dargestellt. N = 10 für alle Gruppen.

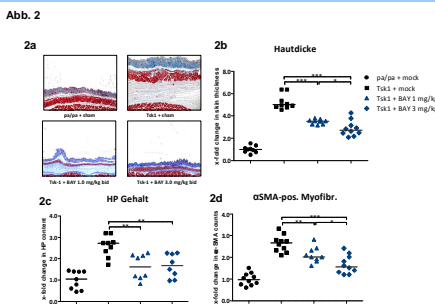


Abbildung 2: Stimulation der sGC beugt der Entstehung der Hautfibrose in der Tight-skin-1 (Tsk-1) Maus vor. Die Behandlung mit dem sGC-Stimulator BAY 41-2272 wurde im Alter von 5 bis zum Alter von 10 Wochen durchgeführt. BAY 41-2272 wurde in zwei Dosen (1 und 3 mg/kg KG bid) appliziert. **Fig. 2a)** Representative Trichrom-Färbungen, in welchen Kollagen blau gefärbt sind. **Fig. 2b)** Dicke der Hypodermis. **Fig. 2c)** Hydroxyprolinegehalt. **Fig. 2d)** Anzahl der α -SMA-positiven Myofibroblasten. Alle Experimente sind als das Vielfache zur pa/pa-Kontrollgruppe dargestellt. N = 10 für alle Gruppen.

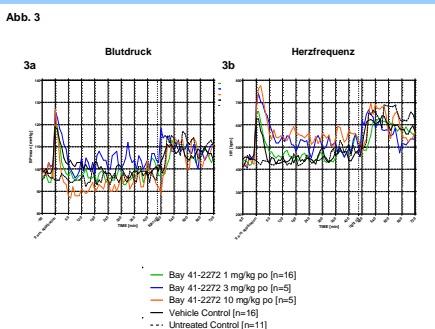


Abbildung 3: Telemetrie-Studien in CD1-Mäusen. Die Messsonde wurde in die linke A. carotis implantiert, die Signale über eine Receiverplatte abgeleitet. BAY 41-2272 wurde in drei Dosen (1 mg/kg KG, 3 mg/kg KG und 10 mg/kg KG) appliziert. Eine unbehandelte Kontrolle und eine Vehikalkontrolle wurden mitgeführt. **Fig. 3a)** Ableitung des Blutdrucks. **Fig. 3b)** Ableitung der Herzfrequenz.

Resultate: Stimulation der löslichen Guanylatzyklase mit BAY 41-2272 zeigte eine dosis-abhängige Reduktion der Hautdicke, des Kollagengehaltes (mittels Hydroxyprolin-Assay) und der Myofibroblasten (aktivierte Fibroblasten) im Modell der Bleomycin-induzierten Hautfibrose (entzündliches Modell; Abb. 1a-d) und der Tight-skin-1-Maus (nicht-entzündliches Modell; Abb. 2a-d).

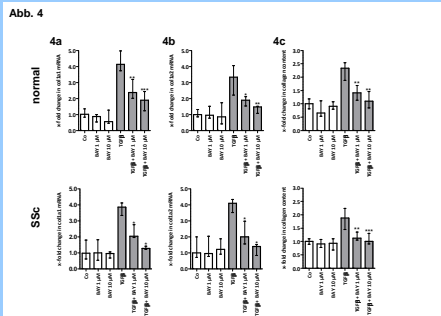


Abbildung 4: sGC-Stimulation mit BAY 41-2272 reduziert die TGF- β -abhängige Kollagenfreisetzung von gesunden und SSc-Fibroblasten in vitro. BAY 41-2272 wurde in Dosen von 1 μ M und 10 μ M mit der TGF- β -Stimulation verabreicht. **Fig. 4a)** Col1a1 mRNA. **Fig. 4b)** Col1a2 mRNA. **Fig. 4c)** Kollagengehalt im Überstand mittels Bestimmung durch den SirCol assay. N = 6 für alle Experimente. Alle Experimente sind als das Vielfache zur unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. N = 6 für alle Gruppen.

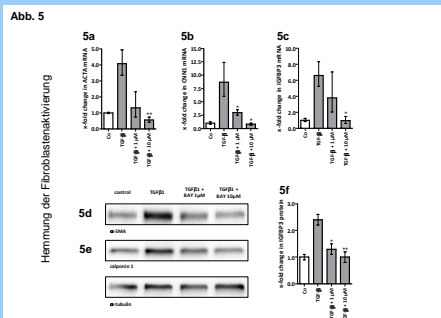


Abbildung 5: sGC-Stimulation mit BAY 41-2272 hemmt die TGF- β -abhängige Fibroblastenaktivierung. BAY 41-2272 wurde in Dosen von 1 μ M und 10 μ M mit der TGF- β -Stimulation verabreicht. **Fig. 5a)** mRNA von α -SMA. **Fig. 5b)** mRNA von Calponin-1. **Fig. 5c)** mRNA von IGFBP3. **Fig. 5d)** α -SMA Proteingehalt (WB). **Fig. 5e)** Calponin-1 Proteingehalt (WB). **Fig. 5f)** IGFBP3 Proteingehalt (ELISA). Alle Experimente sind als Vielfaches zur unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. N = 3 für alle Gruppen.

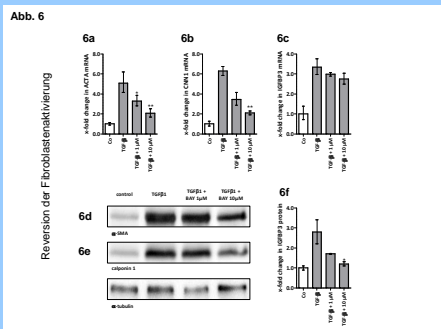


Abbildung 6: sGC-Stimulation mit BAY 41-2272 induziert die Rückbildung der TGF- β -abhängigen Fibroblastenaktivierung. BAY 41-2272 wurde in Dosen von 1 μ M und 10 μ M 48 h nach der TGF- β -Stimulation verabreicht. **Fig. 6a)** mRNA von α -SMA. **Fig. 6b)** mRNA von Calponin-1. **Fig. 6c)** mRNA von IGFBP3. **Fig. 6d)** α -SMA Proteingehalt (WB). **Fig. 6e)** Calponin-1 Proteingehalt (WB). **Fig. 6f)** IGFBP3 Proteingehalt (ELISA). Alle Experimente sind als Vielfaches zur unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. N = 3 für alle Gruppen.

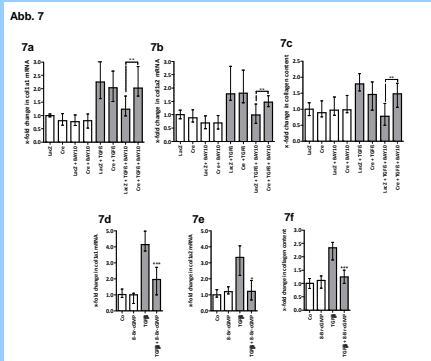


Abbildung 7: Die Effekte von BAY 41-2272 werden spezifisch über die sGC und den Second Messenger cGMP vermittelt. sGC-Knockoutfibroblasten wurden durch Isolation aus sGC^{Cre}-Mäusen und adenoviraler Cre-Rekombination erzeugt. Ein LacZ-Adenovirus diente als Kontrolle (Fig. 7a-7c). Die Effekte von cGMP wurden durch das stabile 8-Bromo-cGMP initiiert, welches resistent gegenüber dem Abbau durch Phosphodiesterasen ist (Fig. 7d-7f). **Fig. 7a)** Col1a1 mRNA. **Fig. 7b)** Col1a2 mRNA. **Fig. 7c)** Kollagengehalt im Überstand mittels Bestimmung durch den SirCol assay. **Fig. 7d)** Col1a1 mRNA. **Fig. 7e)** Col1a2 mRNA. **Fig. 7f)** Kollagengehalt im Überstand mittels Bestimmung durch den SirCol assay. Alle Experimente sind als Vielfaches zur unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. N = 6 für alle Gruppen.

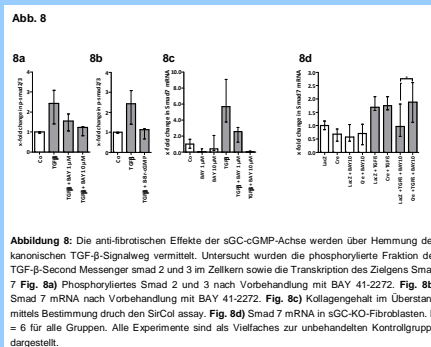


Abbildung 8: Die anti-fibrotischen Effekte der sGC-cGMP-Achse werden über Hemmung des kanonischen TGF- β -Signalweges vermittelt. Untersucht wurden die phosphorylierte Fraktion der TGF- β -Second Messenger smad 2 und 3 im Zellkern sowie die Transkription des Zielgens Smad 7 **Fig. 8a)** Phosphoryliertes Smad 2 und 3 nach Vorbehandlung mit BAY 41-2272. **Fig. 8b)** Smad 7 mRNA nach Vorbehandlung mit BAY 41-2272. **Fig. 8c)** Kollagengehalt im Überstand mittels Bestimmung durch den SirCol assay. **Fig. 8d)** Smad 7 mRNA in sGC-KO-Fibroblasten. N = 6 für alle Gruppen. Alle Experimente sind als Vielfaches zur unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt.

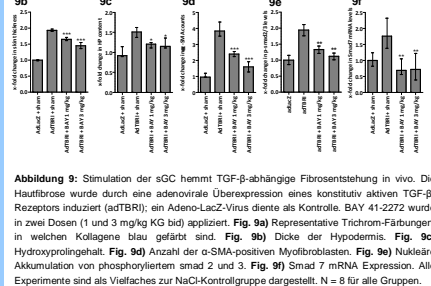


Abbildung 9: Stimulation der sGC hemmt TGF- β -abhängige Fibroseentstehung in vivo. Die Hautfibrose wurde durch eine adenovirale Überexpression eines konstitutiv aktiven TGF- β -Rezeptors induziert (adTBR); ein Adeno-LacZ-Virus diente als Kontrolle. BAY 41-2272 wurde in zwei Dosen (1 und 3 mg/kg KG bid) appliziert. **Fig. 9a)** Representative Trichrom-Färbungen, in welchen Kollagen blau gefärbt sind. **Fig. 9b)** Dicke der Hypodermis. **Fig. 9c)** Hydroxyprolinegehalt. **Fig. 9d)** Anzahl der α -SMA-positiven Myofibroblasten. **Fig. 9e)** Nukleäre Akkumulation von phosphoryliertem smad 2 und 3. **Fig. 9f)** Smad 7 mRNA Expression. Alle Experimente sind als Vielfaches zur NaCl-Kontrollgruppe dargestellt. N = 8 für alle Gruppen.

Schlussfolgerung: Hemmung des kanonischen TGF- β -Signalweges durch Aktivierung der sGC-cGMP-Achse stellt einen neuen anti-fibrotischen Mechanismus dar. Aktivatoren der sGC sind bereits in Phase-3-Studien zur pulmonal-arteriellen Hypertonie erprobt und stünden für frühe klinische Studien zur Behandlung der Fibrose in der SSc zur Verfügung. Pharmakologische Aktivierung der sGC stellt daher ein potentielles ein Verfahren zur dualen Behandlung von Fibrose und Vasculopathie in der SSc dar.

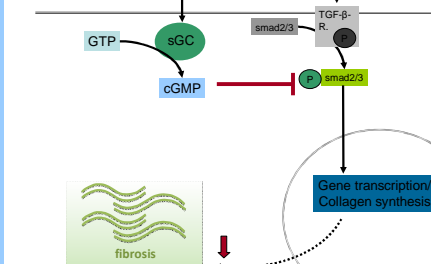


Abbildung 10: Die sGC mediiert anti-fibrotische Effekte durch Hemmung des kanonischen TGF- β -Signalweges. Stimulatoren der sGC fördern die Umsetzung von GTP zu cGMP. Erhöhter cGMP-Spiegel hemmt die nukleäre Translokation von phosphoryliertem Smad 2 und 3, die zentralen Second Messenger des kanonischen TGF- β -Signalweges. Das führt zur Hemmung der Transkription pro-fibrotischer Zielgene, der Fibroblastenaktivierung und der Kollagenfreisetzung.