

Antifibrotischer Effekt von Koffein bei chronischer Leberschädigung

Epidemiologische Beobachtungen und pathophysiologische Hintergründe

O. A. Gressner

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie sowie Klinisch-Chemisches Zentrallaboratorium, RWTH-Universitätsklinikum Aachen

Schlüsselwörter

Kaffee, Koffein, Paraxanthin, CTGF, TGF- β , Smad2, Smad3, PPAR γ , Leberfibrose

Zusammenfassung

Laut Studien der amerikanischen National Institutes of Health ist gesteigerter Kaffeekonsum bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen mit einer langsameren Fibroseprogression, insbesondere bei alkoholischer Leberschädigung, assoziiert. Eine kausale, mechanistische Erklärung für dieses Phänomen konnte die Forschung lange nicht vorlegen. Neueste Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass dieser Effekt auf das Methylxanthin Koffein selbst zurückzuführen sein könnte. Der nachfolgende Artikel fasst die klinisch-epidemiologischen Beobachtungen sowie pathophysiologischen Hintergründe zusammen und eröffnet Vorschläge zum therapeutischen Einsatz von Methylxanthinderivaten in der Behandlung fibrosierender Lebererkrankungen.

Keywords

Coffee, caffeine, paraxanthine, CTGF, TGF- β , Smad2, Smad3, PPAR γ , liver fibrosis

Summary

Scientists of the American National Institutes of Health reported that increased coffee consumption is associated with a slower progression of fibrogenesis in patients with chronic, particularly alcoholic, liver disease. However, a causal, mechanistic explanation was pending. New results indicate, that the methylxanthine caffeine, major component of coffee and the most widely consumed pharmacologically active substance in the world, might be responsible for this phenomenon as it inhibits the synthesis of Connective Tissue Growth Factor in liver parenchyma cells. The latter plays a crucial role in the fibrotic remodeling of various organs. This article summarizes the clinical-epidemiological observations as well as the pathophysiological background, and provides suggestions for the therapeutic use of methylxanthine derivatives in the management of fibrogenic liver diseases.

[Antifibrotic effects of caffeine on chronic liver diseases – epidemiologic observations and pathophysiological background](#)

Med Welt 2008; 59: ■–■

Epidemiologische Beobachtungen

„A coffee with your brandy, Sir?“. Dieser Ausspruch steht nicht nur für englische Clubtradition – jüngste Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass diesem vielmehr ein medizinisch begründbarer Sinn zu Grunde zu liegen scheint.

Durch Untersuchungen an 5994 erwachsenen Patienten wiesen US-amerikanische Wissenschaftler in der dritten National Health And Nutrition Examination Survey

(NHANES III) des National Center for Health Statistics und des Centers for Disease Control eindeutig nach, dass erhöhter Kaffeekonsum einen hepatoprotektiven Effekt hat. Ähnliche Daten wurden bereits zuvor durch NHANES I sowie kürzlich im Rahmen einer weiteren Studie des National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease/National Institutes of Health (NIDDK/NIH; Bethesda/MD, USA) erhoben. Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass ein höherer Kaffeekonsum bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen mit einer langsameren Fibroseprogression

(1, 2), insbesondere bei alkoholischer Leberschädigung (2–4), sowie mit niedrigeren ALT- (3, 4) und γ GT-Aktivitäten im Serum (4) assoziiert ist. Schon der Konsum von mehr als zwei Tassen Kaffee pro Tag verringere das Leberfibrosierisiko merklich.

Forscher um Dr. Taichi Shimazu vom Tohoku Universitätsklinikum in Sendai/Japan werteten darüber hinaus Mehrjahres-Daten von 60 000 Patienten mit hepatozellulärem Karzinom auf der Basis einer chronisch fibrosierenden Lebererkrankung sowie mit und ohne Kaffeekonsum aus und konnten darlegen, dass regelmäßige Kaffeetrinker im Vergleich zu Personen, welche sich abstinert gegenüber Kaffee verhielten, ein um 42% geringeres Risiko hatten, ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln (5).

Eine kausale, mechanistische Erklärung für diese beschriebenen Phänomene konnte die Forschung jedoch lange nicht vorlegen.

Struktur, Stoffwechsel und Wirkmechanismus von Koffein

Auf Anregung Goethes untersuchte der Breslauer Apotheker und Chemiker Friedlieb Ferdinand Runge Kaffeebohnen mit dem Ziel, die wirksame Substanz im Kaffee zu identifizieren. 1820 gelang es Runge erstmals, aus den Kaffeebohnen reines Koffein zu isolieren. 1832 konnten der Kieler Christoph Heinrich Pfaff und Justus von Liebig von der Universität Gießen mit Hilfe von Verbrennungsdaten die Summenformel $C_8H_{10}N_4O_2$ bestimmen. In seiner Habilitationsschrift von 1875 leitete schließlich der Würzburger Chemiker und Pharmazeut Ludwig Medicus die Struktur des Koffeins als 1,3,7-Trimethylxanthin her, jedoch wurde diese erst nach lan-

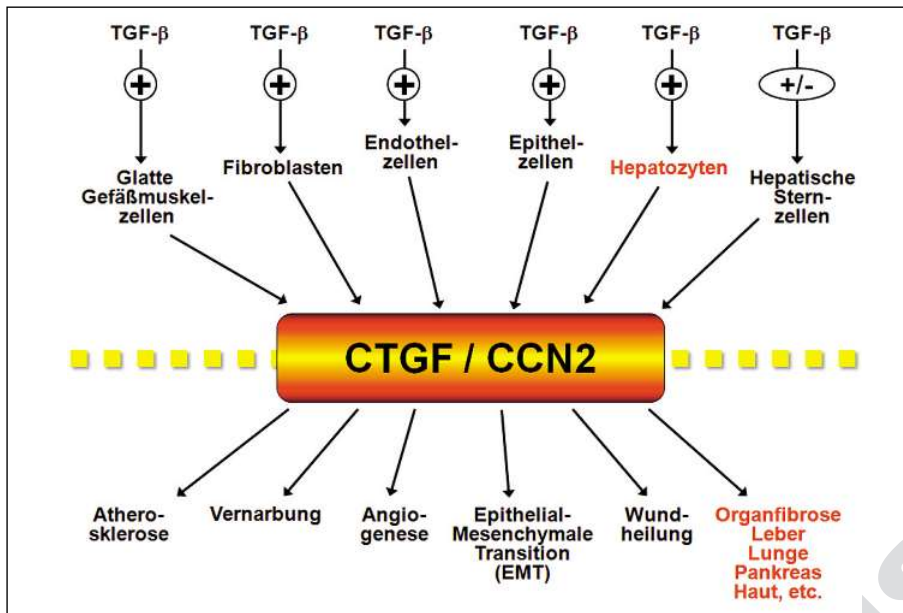


Abb. 1 TGF- β abhängige CTGF-Expression in verschiedenen Zellsystemen. CTGF ist auf Grund seines TGF- β -response-Elements und der funktionellen Smad-Bindungsstelle unmittelbar als ein TGF- β -reguliertes Protein bekannt und wird als zentraler Stimulator von Wundheilungsprozessen und Matrixmodulierung angesehen. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass CTGF diese Prozesse über eine Steuerung von proliferativer Aktivität, Zelldifferenzierung, ECM-Synthese, Zelladhäsion an extrazelluläre Matrixmoleküle, Zellmigration und Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) zu regulieren scheint

gen Auseinandersetzungen mit dem Berliner Chemiker und Nobelpreisträger Hermann Emil Fischer 1895 schließlich durch dessen erste chemische Synthese des Koffeins offiziell als solche anerkannt.

Koffein wird in der Leber – und hier primär im Hepatozyten – metabolisiert. Die Biotransformation erfolgt über Demethylierungsprozesse zu 80% in Paraxanthin (1,7-Dimethylxanthin), zu 11% in Theobro-

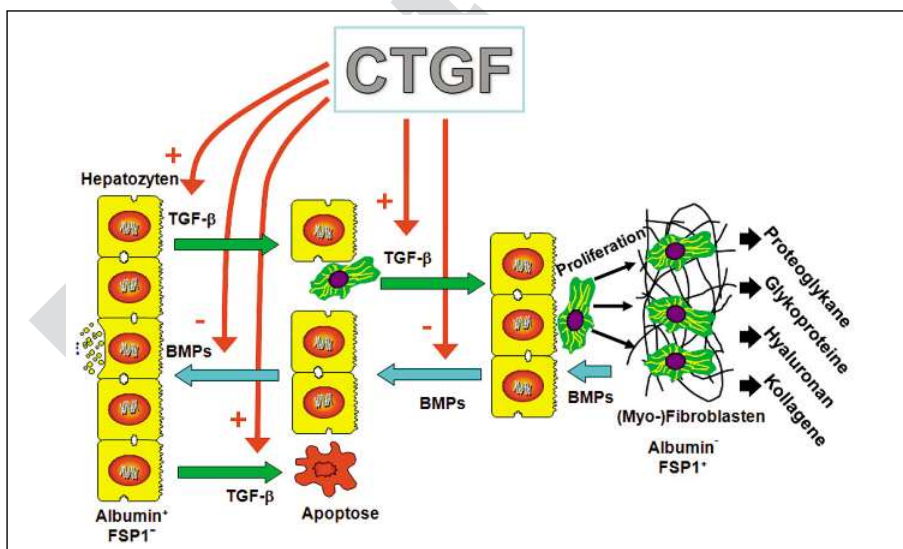


Abb. 2 Der Einfluss von CTGF auf die epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Durch eine Modulation der Rezeptorbindung von TGF- β und BMP, wichtige Gegenspieler in der Regulation der EMT, wird durch CTGF als Nettoeffekt eine Verschiebung der Balance in Richtung mesenchymaler Aktivität bewirkt, wodurch dieses (potenziell) profibrogen wirkt. Abkürzung: FSP1, Fibroblast Specific Protein 1.

min (3,7-Dimethylxanthin) und zu 4% in Theophyllin (1,3-Dimethylxanthin). Diese durch erneute Demethylierungs- sowie Oxidationsprozesse teilweise zu Uraten und Uracilderivaten weiter abgebauten Primärmetabolite werden zu 70–90% renal eliminiert (6, 7).

Koffein agiert über multiple Mechanismen, welche sowohl Rezeptoraktivierung bzw. Interaktion mit Zellmembrankanälen als auch intrazelluläre Modulation der Kalzium- und zyklischen-Adenosinmonophosphat (cAMP)-Konzentrationen beinhalten (8). Durch seine Purin-Grundstruktur kann es an Zielzellen als Adenosin-ähnlicher Nukleotid oder Nukleosid agieren, d. h. sowohl intrazelluläre Ryanodin-Rezeptoren (welche das physiologische Ziel für cADPR [cyclic ADP Ribose] darstellen) aktivieren als auch die cAMP-spezifische Phosphodiesterase (cAMP-PDE) sowie die Zelloberflächenrezeptoren für Adenosin (insbes. Rezeptorsubtypen 1 und A2) kompetitiv inhibieren (9, 10).

Koffein und seine 3 bioaktiven Primärmetabolite zeichnen sich durch ähnliche Wirkmechanismen aus. Der Anteil eines jeden Signalwegs an der Signaltransduktion variiert jedoch zwischen den verschiedenen Methylxanthinen. Im physiologischen Zustand beruht die Koffeinwirkung weniger auf verstärkter Ryanodin-Rezeptor-Aktivierung, da diese eine Koffeinkonzentration oberhalb der mittleren letalen Dosis (LD₅₀) voraussetzt, als vielmehr auf einer Inhibition der Adenosinrezeptoren A1 bzw. A2A bzw. der cAMP-PDE (11–13). Insbesondere letzteres bewirkt, dass es zu einer intrazellulären Akkumulation von cAMP kommt.

cAMP war einer der zuerst identifizierten second messenger welcher Signale zahlreicher Rezeptorliganden über G-Proteingekoppelte Rezeptoren und die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) in den Zellen vermittelt (14).

Im inaktiven Zustand ist die PKA im Zytoplasma lokalisiert. Nach Induktion durch cAMP werden dessen katalytischen Untereinheiten freigelegt, welche hierdurch befähigt wird, in den Kern zu translozieren und dort bestimmte Transkriptionsfaktoren, z. B. das cAMP-Response-Element-Binding-Protein (CREB) zu aktivieren (15). Aktivierung der PKA führt zu einer Serin-

133-Phosphorylierung im CREB-Protein, welches anschließend in Form eines Dimers cAMP-abhängige Zielgene durch Anlagerung an deren konservierte cAMP-Response-Elemente (CRE) transkriptionell aktiviert. Mehr als 100 Gene mit funktionellen CREs wurden bisher identifiziert (16) und die Modulation zahlreicher Signaltransduktionsprozesse durch cAMP wurde beschrieben.

Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2)

Wie bereits erwähnt handelt es sich bei Koffein und seinen Primärmetaboliten um kompetitive Inhibitoren der cAMP-PDE, welche cAMP (8) in seine non-zyklische Form (17) konvertiert, sodass es in Gegenwart dieser Methylxanthine zu einer intrazellulären Akkumulation von cAMP kommt. Dies ist insofern von besonderer Relevanz, da gezeigt werden konnte, dass cAMP in der Lage ist, die durch das profibrogene Masterzytokin Transforming Growth Factor (TGF)- β (18) induzierte Expression von Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2) zu supprimieren (19–21).

CTGF gehört zur Familie der CYR61, CTGF und NOV (CCN) Proteine, welche strukturell durch ihre Cystein-reiche Sequenz und modulare Struktur mit 4 funktionellen Domänen charakterisiert sind. Das codierende Gen liegt auf Chromosom 6q 23.1 und umfasst 5 Exons, 5 Introns und vier 5'-regulatorische Elemente [AP1, TATA, SP1, TGF- β -Response Element] welche in einem einzelnen 2,4 kB Transkript resultieren (22).

Das funktionelle Spektrum erstreckt sich auf Stimulation der Matrixsynthese, Zellmigration, Osteogenese und Angiogenese sowie auf Vermittlung der Zelladhäsion, Bindung an Matrixkomponenten und an Integrine (23). Sowohl Wachstumsstimulation als auch Wachstumsinhibition, in Abhängigkeit vom Zelltyp, sind beschrieben. Die funktionelle Vielfalt von CTGF ist teilweise auf die modulare Struktur (4 Module) zurückzuführen, die Bindungsstellen für IGF-1, Zellbindungs- und Oligomerisierungsaktivität aufweisen.

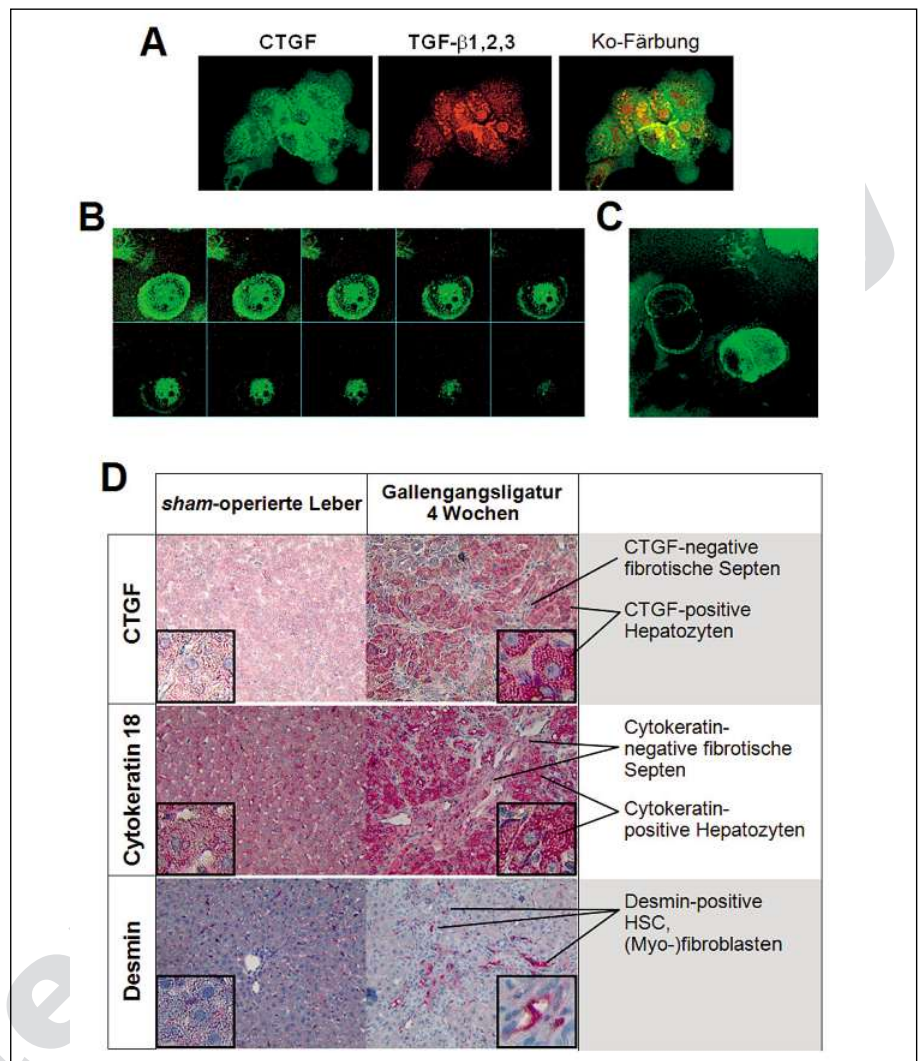


Abb. 3 Immunchemische Analyse der CTGF-Expression in kultivierten Hepatozyten und in der Gesamtleber. (A) Konfokale Laserscanmikroskopie von CTGF und TGF- β -Isoformen. Hepatozyten wurden über einen Zeitraum von 24 h kultiviert, anschließend in 4% Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und mit einem CTGF-spezifischen Antikörper immungefärbt, gefolgt von einem Biotin-Streptavidin-FITC-abhängigen Detektionsverfahren. Die unterschiedlichen TGF- β Isoformen (TGF- β 1, 2, 3) wurden mit einem polyklonalen panspezifischen Antikörper und einem CY3-markierten Zweitantikörper dargestellt. (B) und (C) Konfokaler Bildstapel („Stack“) von CTGF im Hepatozyten. Deutlich wird dessen v. a. membranständige Lokalisation. (D) Immunzytochemische Darstellung von CTGF in gesunden und gallengangsligierten, fibrotischen Rattenlebern. Auffällig ist die deutliche Anfärbung von CTGF in Cytokeratin-18-positiven Hepatozyten, während sich hingegen Desmin-positiv (Myo)-fibroblasten weitestgehend negativ für CTGF darstellen. Abkürzung: FITC, Fluorescein-5-isothiocyanat.

Allgemein wird CTGF als ein Modulator von TGF- β abhängigen Effekten angesehen, sodass eine pluripotente Rolle u. a. in Zellproliferation und Apoptose vermutet werden kann (Abb. 1). Die TGF- β -abhängige CTGF-Expression wird über die TGF- β -Rezeptoren II und I sowie über eine Aktivierung (Phosphorylierung) der TGF- β -Effektor-Smads 2 und 3, welche in der Lage sind nach Translokation in den Zellkern bestimmte Zielgene zu aktivieren, vermittelt (24).

Wenngleich die genaue pathophysiologische Rolle von CTGF erst noch definiert werden muss, so wird bereits eine Funktion im Rahmen der seit einiger Zeit als supportiver Fibrosemechanismus viel diskutierten epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) von Leberparenchymzellen (Hepatozyten) in apoptoseresistente, bindgewebssynthetisierende Fibroblasten vermutet. Dieser Prozess wird v. a. durch TGF- β induziert, während ein anderes Mitglied der

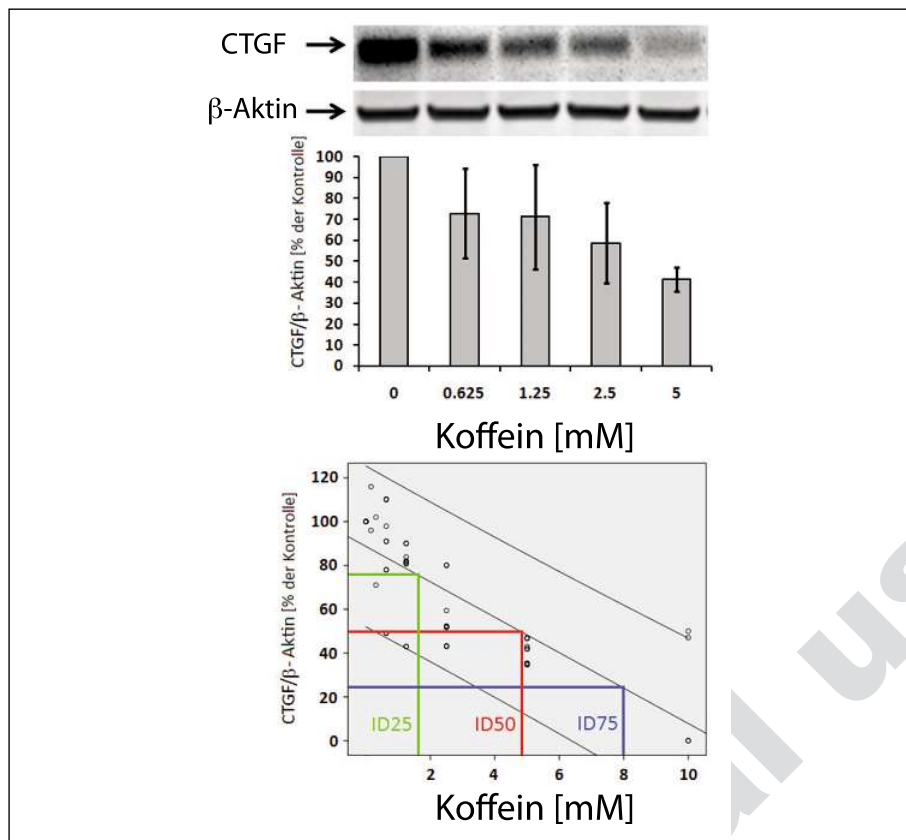


Abb. 4 Dosisabhängigkeit der inhibitorischen Kapazität von Koffein auf die hepatozelluläre CTGF-Synthese. Dargestellt sind Western Blots auf CTGF von serumfrei kultivierten Hepatozyten, welche zuvor mit den angegebenen Konzentrationen von Koffein behandelt wurden. Blots wurden relativ zu β -Aktin quantifiziert. Das obere Diagramm zeigt die mittlere CTGF Proteinexpression (CTGF/ β -actin [BLU]) von Dreifachbestimmungen aus mindestens 4 verschiedenen Zellkulturen. Ein repräsentativer Blot ist dargestellt.

Die untere Grafik zeigt ein Punktediagramm mit Regressionsgerade und individuellem 95% Konfidenzintervall zur Darstellung der Korrelation von CTGF-Proteinexpression und Koffeinkonzentration. Die Punkte im Diagramm stehen für Mittelwerte von Dreifachbestimmungen aus jeweils einer Zellkultur. Grüne, rote und blaue Linien markieren die Koffeinkonzentrationen, welche für eine 25%- (ID25), 50%- (ID50) oder 75%- (ID75) Hemmung der hepatozellulären CTGF Proteinexpression benötigt werden.

TGF- β -Superfamilie, bone morphogenetic protein (BMP), antagonistisch wirkt. CTGF scheint an dieser Stelle als extrazelluläres trapping Protein für BMP und TGF- β eine zentrale Modulatorrolle einzunehmen, indem es die Rezeptoraffinität von TGF- β erhöht, während es die Affinität von BMP zu seinem Rezeptor herabsetzt (25) (Abb. 2). Somit wird durch CTGF als Nettoeffekt eine Verschiebung der Balance in Richtung mesenchymaler (fibrogener) Aktivität bewirkt. Die hieraus abzuleitende pathophysiologische Bedeutung von CTGF für die Leberfibrogenese wurde durch jüngste *In-vivo*-Experimente mit siRNA-Einsatz bei induzierten Leberfibrosen im Tiermodell eindrucksvoll bestätigt, in denen CTGF-Si-

lencing einen ausgeprägten antifibrotischen und somit potenziell therapeutischen Effekt hatte (26, 27). Darüber hinaus findet man eine Überexpression des Proteins in nahezu allen fibrotischen Läsionen, so auch der Leber (28), sowie im Rahmen von Wundheilung und angiogenetischen Prozessen.

Kürzlich konnten Hepatozyten als Hauptsyntheseort von CTGF in der Leber identifiziert werden (29, 30). Im Gegensatz zu hepatischen Sternzellen, wird hier hepatozelluläres CTGF spontan unter zellulärem Stress hochreguliert, die Expression kann jedoch, wie bereits erwähnt, durch TGF- β deutlich verstärkt werden (29–31). Toxische Schädigungen der Rattenleber *in vivo* führen ebenfalls zu einem Anstieg der hepato-

zellulären CTGF-Expression, wie in immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt wurde (Abb. 3).

Koffein hemmt die TGF- β -abhängige CTGF Synthese des Hepatozyten durch Inhibition der TGF- β -Effektor Smads 2 und 3

Im Rahmen kürzlich veröffentlichter Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Koffein sowohl die TGF- β stimulierte CTGF-Expression als auch dessen Spontansynthese im Hepatozyten durch eine Hemmung der Smad2/3-abhängigen Signaltransduktion hemmt (32). Die halbmaximale Hemmdosis (ID₅₀) liegt bei 4,42mM (Abb. 4). Dabei induziert Koffein eine verstärkte intrazelluläre Degradation des TGF- β -Effektor Smads 2 sowie eine Hemmung der Smad-3-Aktivierung mittels Phosphorylierung (32). Insbesondere die Aktivität der Ubiquitin-Ligase SMURF2 scheint durch Koffein gesteigert zu werden (32), wodurch Smad 2 vermehrt kovalent mit Ubiquitin verknüpft (33–35) und dessen proteasomaler Abbau gesteigert wird.

Der Terminus Proteasom beschreibt hierbei eine multikatalytische Peptidase, die polyubiquitinierte Proteine rasch in kleine Oligopeptide spaltet. Darüber hinaus kann SMURF2 auch an den aktivierten TGF- β -Rezeptorkomplex binden, dessen proteasomale Degradation und somit eine Hemmung der Smad2/3-Phosphorylierung, wie nach Koffeingabe beobachtet, bewirken (34, 36).

Somit konnte ein entscheidender Pathomechanismus der antifibrotischen Wirkung des Koffeins identifiziert werden (Abb. 5).

Koffein fördert die Hemmung der TGF- β induzierten CTGF-Synthese des Hepatozyten über Hochregulation des nukleären Peroxisom Proliferator Aktivierten Rezeptors γ

Bei Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptoren (PPARs) handelt es sich um eine Gruppe nukleär lokalisierter Rezeptor-Isomere mit unmittelbarer Rolle in zellulärem

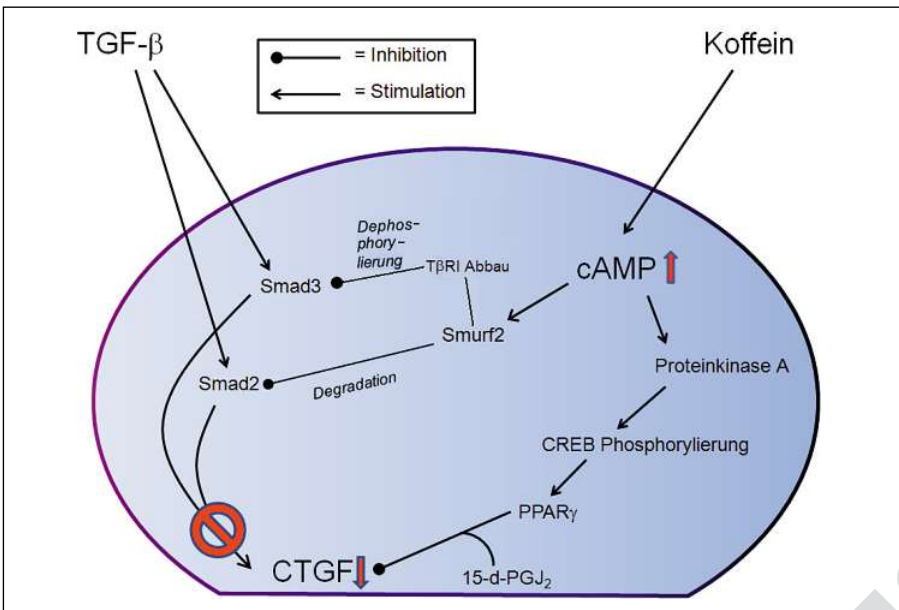


Abb. 5 Vereinfachter und schematisierter Überblick der beschriebenen Effekte von Koffein auf die TGF- β -abhängige CTGF-Expression im Hepatozyten. Koffein hemmt die TGF- β -Signaltransduktion zum CTGF-Promotor durch eine Stimulation der Ubiquitinligase SMURF2 vermittelten proteasomalen Degradation des TGF- β -Effektor-Smads 2 und durch eine Hemmung der Smad 3 Phosphorylierung, eventuell verursacht durch einen ebenfalls proteasomalen Abbau von T β RI. Auch bewirkt Koffein eine Hochregulation des nukleären Peroxisom Proliferator Aktivierten Rezeptors γ . Letzterer bewirkt nach Bindung seines physiologischen Liganden 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ eine Dissoziation des Smad2/3-Transkriptionskomplexes und unterbindet somit eine Smad2/3-medierte transkriptionelle Aktivierung von TGF- β -abhängigen Zielgenen wie CTGF.

Lipidmetabolismus und Zelldifferenzierung (37–39). Drei Subtypen von PPARs wurden bisher identifiziert, α , γ und δ (β). Ohne die pathophysiologischen Hintergründe weiter zu beleuchten konnte gezeigt werden, dass das Prostaglandin-Analogon 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (15-d-PGJ₂), physiologischer PPAR γ -Ligand, einen stark inhibitorischen Effekt auf die TGF- β -induzierte CTGF-Expression in der Leber hat (40, 41). Daher scheint hepatisches CTGF ein unmittelbar PPAR γ -reguliertes Gen zu sein. Dies wurde durch Studien in anderen Zellsystemen, wie z. B. glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta, untermauert, die zeigen konnten, dass PPAR γ die TGF- β -induzierte CTGF-Expression durch direkte Interferenz mit dem Smad3-Signalweg und seinem transkriptionellen Kofaktor p300 unterbindet (42–44).

Die Expression des Typ-2-PPAR γ -Rezeptor (PPAR γ 2) wiederum wurde bereits zuvor als cAMP-reguliert beschrieben, indem phosphoryliertes CREB gemeinsam mit dem Activating Transcription Factor 1 (ATF1) an den Promotor des PPAR γ 2-Gens bindet und somit dessen Transkription initi-

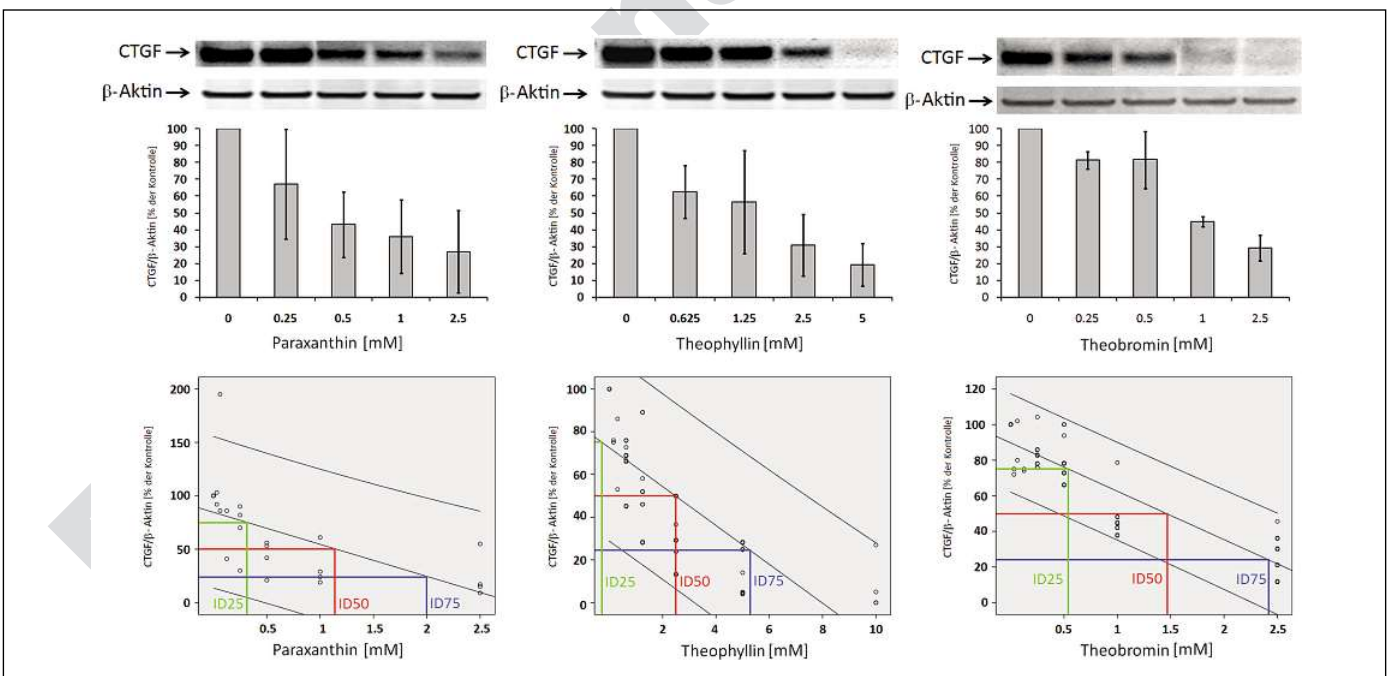


Abb. 6 Dosisabhängigkeit der inhibitorischen Kapazität von Paraxanthin (linke Säule), Theophyllin (mittlere Säule) und Theobromin (rechte Säule) auf die hepatozelluläre CTGF-Synthese. Dargestellt sind Western Blots auf CTGF von serumfrei kultivierten Hepatozyten, welche zuvor mit den angegebenen Konzentrationen von Koffein behandelt wurden. Blots wurden relativ zu β -Aktin quantifiziert. Das obere Diagramm zeigt die mittlere CTGF-Proteinexpression (CTGF/ β -aktin [BLU]) von Dreifachbestimmungen aus mindestens 4 verschiedenen Zellkulturen. Ein repräsentativer Blot ist dargestellt.

Die untere Grafik zeigt ein Punktediagramm mit Regressionsgerade und individuelles 95%-Konfidenzintervall zur Darstellung der Korrelation von CTGF-Proteinexpression und Paraxanthin-, Theophyllin- oder Theobrominkonzentration. Die Punkte im Diagramm stehen für Mittelwerte von Dreifachbestimmungen aus jeweils einer Zellkultur. Grüne, rote und blaue Linien markieren die Paraxanthin-, Theophyllin- oder Theobrominkonzentrationen, welche für eine 25%- (ID25), 50%- (ID50) oder 75%- (ID75) Hemmung der hepatozellulären CTGF-Proteinexpression benötigt werden.

Tab. 1 Zusammenfassung der pharmakologischen Eigenschaften von Koffein und seinen demethylierten Primärmetaboliten Paraxanthin, Theobromin und Theophyllin in ihrer Funktion als Inhibitoren der hepatozellulären CTGF-Synthese. In Abhängigkeit von ihrem pharmakologischem Effekt wurde jeweils eine Rangfolge erstellt (hochgestellte Ziffern), wobei 1 den schwächsten Effekt bzw. die höchste Toxizität und 4 den stärksten Effekt bzw. die geringste Toxizität beschreibt. Mit einem Gesamtpunktwert von 15 wurde Paraxanthin als das am meisten geeignete Methylxanthin identifiziert, welches in weiterführenden Untersuchungen zur therapeutischen Relevanz dieser Substanzgruppe evaluiert werden sollte.

* und +: Werte sind als %-Differenz zur Kontrolle bei Gabe von 5 mM Koffein bzw. 2,5 mM Paraxanthin, Theophyllin, Theobromin von Dreifachbestimmungen aus mindestens 4 verschiedenen Zellkulturen angegeben.

^: Amerikanische Klassifikation zur Gesundheitsgefährdung des Hazardous Materials Information System[®] III (HMIS[®] III) (50) bzw. der National Fire Protection Association (NFPA) (51)

	Inhibition der CTGF-Proteinsynthese bei 1 mM (%)	Reduktion der TGF- β -induzierten CTGF-Proteinsynthese (%) [*]	Inhibitorischer Effekt von Rp-cAMP (%) ⁺	Amerikanische Klassifikation zur Gesundheitsgefährdung (HMIS/ NFPA) [^]	Gesamtpunktwert
Koffein	18 ¹	46 ⁴	140 ²	2/2 ³	10
Paraxanthin	44 ⁴	45 ³	229 ⁴	1/1 ⁴	15
Theophyllin	31 ²	36 ²	108 ¹	2/2 ³	8
Theobromin	38 ³	30 ¹	207 ³	1/1 ⁴	11

iert (45, 46). So verwundert es nicht, dass auch eine konstante Expressionssteigerung von PPAR γ durch Koffein, insbesondere in Gegenwart von TGF- β , auch im Hepatozyten gezeigt werden konnte (32). Auch hier führt die Bindung von 15-d-PGJ₂ an PPAR γ zu einer Dissoziation des Smad2/3-Transkriptionskomplexes von weiteren Kofaktoren, wodurch eine transkriptionelle Aktivierung von TGF- β -abhängigen Zielgenen (z. B. CTGF) verhindert wird (Abb. 5).

Dieser Aspekt einer Hemmung der CTGF-Expression nach Bindung von 15-d-PGJ₂ an seinen Rezeptor ist insofern von besonderer Relevanz, da neue Daten zeigen, dass Patienten mit chronisch fibrosierenden Lebererkrankungen deutlich erhöhte Serumkonzentrationen von 15-d-PGJ₂ im Vergleich zu Gesunden aufweisen (bisher un-

veröffentlichte Daten des Autors) – ein Phänomen welches sich bereits im Rattenmodell zeigte (47) und somit eine besondere Sensitivität gegenüber PPAR γ -induzierenden Substanzen (wie Koffein) aufweisen müssten. Somit kann eine Sensitivierung von Hepatozyten gegenüber PPAR γ -abhängigen Effekten (z. B. CTGF-Repression) durch Koffein im Rahmen von fibrosierenden Lebererkrankungen vermutet werden.

Inhibierender Effekt der Koffein-Primärmetabolite auf die Hepatozyten-CTGF-Synthese

Basierend auf dem beschriebenen Hemmeffekts von Koffein auf die CTGF-Synthese

oder CTGF) aus, da der Beitrag von hepatischen Sternzellen an der Entstehung der Leberfibrose unzweifelhaft ist (48, 49). Noch lässt sich keine Aussage zur Spezifität des Koffeins bzw. Paraxanthins treffen, ob nur profibrogene, nicht aber auch antifibrogene Zielgene supprimiert werden. Jedoch sollten Methylxanthinderivate, insbesondere das Paraxanthin, in Anbetracht der jüngsten Forschungsergebnisse, beeindruckender epidemiologischer Daten zur Assoziation von Kaffeekonsum und Fibrosehemmung sowie auf Grund der entscheidenden Rolle von CTGF in der Pathogenese der Leberfibrose als eine Medikamentenklasse zur Behandlung fibrosierender Lebererkrankungen weiter validiert werden.

des Hepatozyten zielten weitere Studien darauf, auch dessen durch Demethylierung entstehende Primärmetabolite, beispielsweise Paraxanthin (1,7-Dimethylxanthin), Theobromin (3,7-Dimethylxanthin) und Theophyllin (1,3-Dimethylxanthin) auf ihre inhibitorische Kapazität gegenüber hepatozellulärer CTGF-Expression hin zu untersuchen. Die Daten hieraus lassen Paraxanthin, mit einer halbmaximalen Hemmdosis (ID₅₀) von 1,15 mM (welche somit nahezu ein Viertel der für Koffein kalkulierten halbmaximalen Hemmdosis beträgt) als den diesbezüglich potentesten Metaboliten erscheinen (Abb. 6).

Bei dem durch das US-amerikanische Hazardous Materials Information System[®] III (HMIS[®] III) bzw. durch die ebenfalls amerikanische National Fire Protection Association (NFPA) festgelegten toxikologischen Schwellenwert von 1 mM für Paraxanthin kann bei diesem Metaboliten noch immer eine 44%ige Hemmung der hepatozellulären CTGF-Synthese nachgewiesen werden. Ebenso wie bei Koffein konnte auch dieser Effekt durch den spezifischen cAMP-Inhibitor Rp-cAMP aufgehoben werden, was dafür spricht, dass auch Paraxanthin seinen Hemmeffekt auf CTGF primär über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration vermittelt. Darüber hinaus reduziert Paraxanthin (1,25 mM bzw. 2,5 mM) auch die durch ansteigende TGF- β Konzentrationen (0,13–1 ng/ml) induzierte CTGF-Synthese im Hepatozyten noch um durchschnittlich 27% bzw. 45%.

Zusammenfassend ermöglichen diese Ergebnisse die evidenzbasierte Empfehlung der Überprüfung des primären Koffeinmetaboli-

Fazit für die Praxis

CTGF ist entscheidend an der Schädigung der Leber (z. B. bei Hepatitis C oder langfristigem Alkoholkonsum) beteiligt. Die Produktion in der Leber kann durch das Methylxanthin Koffein und/oder seine Primärmetabolite, hier insbesondere das Paraxanthin, inhibiert werden. Es steht außer Frage, dass die vorgestellten Daten noch vereinzelt Limitierungen in Hinblick auf Ihre unmittelbare therapeutische Relevanz aufweisen. So steht beispielsweise noch die Untersuchung des Effekts von Methylxanthinderivaten auf klassische profibrogene Zielgene in hepatischen Sternzellen (z. B. α -smooth muscle Aktin, Typ 1 Kollagen

ten Paraxanthin als potenziell starke therapeutische Substanz im Management chronisch fibrosierender Lebererkrankungen (Tab. 1).

Literatur

1. Modi AA et al. Higher caffeine consumption is associated with milder fibrosis in patients with chronic liver diseases. *Hepatology* 2007; 46: 835A.
2. Ruhl CE, Everhart JE. Coffee and tea consumption are associated with a lower incidence of chronic liver disease in the United States. *Gastroenterology* 2005; 129: 1928–1936.
3. Ruhl CE, Everhart JE. Coffee and caffeine consumption reduce the risk of elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology* 2005; 128: 24–32.
4. Tanaka K et al. Coffee consumption and decreased serum gamma-glutamyltransferase and aminotransferase activities among male alcohol drinkers. *Int J Epidemiol* 1998; 27: 438–443.
5. Shimazu T et al. Coffee consumption and the risk of primary liver cancer: pooled analysis of two prospective studies in Japan. *Int J Cancer* 2005; 116: 150–154.
6. Ullrich D et al. Urinary caffeine metabolites in man. Age-dependent changes and pattern in various clinical situations. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; 43: 167–172.
7. Lelo A et al. Comparative pharmacokinetics of caffeine and its primary demethylated metabolites paraxanthine, theobromine and theophylline in man. *Br J Clin Pharmacol* 1986; 22: 177–182.
8. Nguyen LN et al. Transforming growth factor-beta differentially regulates oval cell and hepatocyte proliferation. *Hepatology* 2007; 45: 31–41.
9. Belibi FA et al. The effect of caffeine on renal epithelial cells from patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2723–2729.
10. Jafari M, Rabbani A. Studies on the mechanism of caffeine action in alveolar macrophages: caffeine elevates cyclic adenosine monophosphate level and prostaglandin synthesis. *Metabolism* 2004; 53: 687–692.
11. Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 857–872.
12. Eteng MU et al. Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: a review. *Plant Foods Hum Nutr* 1997; 51: 231–243.
13. Daly JW. Mechanism of action of caffeine in caffeine, coffee and health. S. Garattini (Hrsg), Raven Press New York 1993.
14. Montminy M. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 807–822.
15. Sassone-Corsi P. Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 27–38.
16. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 599–609.
17. Jeon YH et al. Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 1198–220.
18. Gressner AM et al. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793–d807.
19. Kothapalli D et al. Inhibition of TGF-beta-stimulated CTGF gene expression and anchorage-independent growth by cAMP identifies a CTGF-dependent restriction point in the cell cycle. *Faseb J* 1998; 12: 1151–1161.
20. Stratton R et al. Prostacyclin derivatives prevent the fibrotic response to TGF-beta by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway. *Faseb J* 2002; 16: 1949–1951.
21. Heusinger-Ribeiro J et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: regulatory roles of RhoA and cAMP. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1853–1861.
22. Moussad EE, Brigstock DR. Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab* 2000; 71: 276–292.
23. Chen Y et al. CCN2 (connective tissue growth factor) promotes fibroblast adhesion to fibronectin. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 5635–5646.
24. Valcourt U et al. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 1987–2002.
25. Abreu JG et al. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 599–604.
26. George J, Tsutsumi M. siRNA-mediated knock-down of connective tissue growth factor prevents N-nitrosodimethylamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Gene Ther* 2007; 14: 790–803.
27. Li G et al. Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA prevents liver fibrosis in rats. *J Gene Med* 2006; 8: 889–900.
28. Paradis V et al. Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. *Hepatology* 1999; 30: 968–976.
29. Gressner OA et al. Differential effects of TGF-beta on connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in hepatic stellate cells and hepatocytes. *J Hepatol* 2007; 47: 699–710.
30. Weng HL et al. Profibrogenic transforming growth factor-beta/activin receptor-like kinase 5 signaling via connective tissue growth factor expression in hepatocytes. *Hepatology* 2007; 46: 1257–1270.
31. Gressner OA et al. Activation of TGF-beta within cultured hepatocytes and in liver injury leads to intracrine signaling with expression of connective tissue growth factor. *J Cell Mol Med* 2008; doi: 10.1111/j.1478-3231.2008.01729.x
32. Gressner OA et al. Pharmacological application of caffeine inhibits TGF-beta-stimulated connective tissue growth factor expression in hepatocytes via PPARgamma and Smad2/3-dependent pathways. *J Hepatol* 2008; doi: 10.1016/j.hep.2008.04.010
33. Lo RS, Massague J. Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta-activated smad2. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 472–478.
34. Zhang Y et al. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 974–979.
35. Wicks SJ et al. Reversible ubiquitination regulates the Smad/TGF-beta signalling pathway. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 761–763.
36. Ebisawa T et al. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 2001; 276: 12477–12780.
37. Kersten S et al. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 2000; 405: 421–424.
38. Forman BM et al. The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 804: 266–275.
39. Kliewer SA, Willson TM. The nuclear receptor PPARgamma – bigger than fat. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 576–581.
40. Sun K et al. PPAR gamma inhibits growth of rat hepatic stellate cells and TGF beta-induced connective tissue growth factor expression. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 715–723.
41. Zhao C et al. PPARgamma agonists prevent TGFbeta1/Smad3-signaling in human hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350: 385–391.
42. Fu M et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits transforming growth factor beta-induced connective tissue growth factor expression in human aortic smooth muscle cells by interfering with Smad3. *J Biol Chem* 2001; 276: 45888–45894.
43. Hazra S et al. PPAR Gamma and Hepatic Stellate Cells. *Comp Hepatol* 2004; 3 (Suppl. 1): S7.
44. Yavrom S et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses proximal alpha1(I) collagen promoter via inhibition of p300-facilitated NF-I binding to DNA in hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 40650–40659.
45. Fox KE et al. Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C/EBP beta, or PPAR gamma 2. *J Biol Chem* 2006; 281: 40341–40353.
46. Inoue M et al. Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 215–222.
47. Kitagawa T et al. The Role of PPAR gamma in bile duct ligation-induced hepatic injury in rats. *Hepatology* 2007; 46: 339A.
48. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655–1669.
49. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008; 88: 125–172.
50. National Paint and Coating Association, www.paint.org/hmis/index.cfm, zuletzt aufgerufen am 27.08.2008
51. NFPA, www.nfpa.org/index.asp, zuletzt aufgerufen am 27.08.2008

Korrespondenzadresse

Dr. med. O. A. Gressner
 Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie sowie Klinisch-Chemisches Zentrallaboratorium,
 RWTH-Universitätsklinikum Aachen
 Pauwelsstraße 30
 52074 Aachen
 Tel.: 02 41 / 8 08 86 71
 Fax: 02 41 / 8 08 25 12