



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Rezumat teza doctorat

**EFFECTUL ANTIFIBROTIC AL CIPROFLOXACINEI-
POTENTIAL TERAPEUTIC ALTERNATIV IN TRATAMENTUL
BOLILOR CARACTERIZATE DE O DEPUNERE
ACCENTUATA A COLAGENULUI**

Doctorand: **Andreea Monica Bujor**

Conducator stiintific: **Prof. Dr. Lia Monica Junie**

Cluj-Napoca 2016

CUPRINS

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOASTERII	
1. Ciprofloxacin as an antifibrotic	5
1.1. Ciprofloxacin, the antibiotic	5
1.1.1. Mechanism of action	5
1.1.2. Pharmacodynamics and pharmacokinetics	6
1.1.3. Side effects	6
1.1.4. Effects on tendon and cartilage	7
1.2. Ciprofloxacin as an antifibrotic	7
1.2.1. Ciprofloxacin in systemic sclerosis	8
1.2.2. Ciprofloxacin in animal models of fibrosis	9
1.2.3. Evidence that Ciprofloxacin regulates the expression of matrix metalloproteinases	9
2. Systemic sclerosis, the prototype of multiorgan fibrotic disease	11
2.1. Definition and classification	11
2.2. Manifestations	12
2.2.1. Raynaud's phenomenon	12
2.2.2. Skin involvement	12
2.2.3. Lung involvement	12
2.2.4. Gastrointestinal manifestations	13
2.2.5. Other complications	13
2.3. Diagnosis	14
3. Disease pathogenesis	15
3.1. Vascular disease	15
3.2. Autoimmunity	15
3.3. Fibrosis and the extracellular matrix	16
3.4. Collagen	17
3.4.1. Collagen gene regulation	17
3.4.1.1. TGFbeta	17
3.4.1.2. Akt	18
3.4.1.3. PKCdelta	19
3.4.1.4. Fli1	19
3.4.1.5. c-abl	21
3.4.1.6. PTEN	21
3.5. Matrix metalloproteinase-1	22
3.5.1. MMP1 gene regulation	22
4. Antifibrotic therapies in systemic sclerosis	25
4.1. Immunomodulators	25
4.1.1. Cyclophosphamide	25
4.1.2. Mycophenolate mofetil	25
4.1.3. Autologous stem cell transplantation	26

4.1.4. Methotrexate	26
4.2. Other proposed therapies	26
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Hypothesis and objectives	31
2. General Methods	31
2.1. Reagents	31
2.1.1. Antibodies	31
2.1.2. Cell culture solutions, specific inhibitors, antibiotics	32
2.2. Tissue collection and cell culture	33
2.2.1. Skin biopsies	33
2.2.2. Fibroblast isolation and propagation	34
2.2.3. Cell storage using liquid nitrogen tanks	37
2.3. Western blot analysis	37
2.4. Quantitative real time RT-PCR	38
2.5. Immunocytochemistry	38
2.6. Inhibition of protein expression by small interfering RNA (siRNA)	39
2.7. Statistical analysis	39
3. Specific aim 1: To examine the effects of Ciprofloxacin on profibrotic gene expression in dermal fibroblasts	40
3.1. Introduction	40
3.2. Hypothesis	40
3.3. Materials and methods	41
3.4. Results	43
3.4.1. Increased sensitivity of SSc fibroblasts	43
3.4.2. Ciprofloxacin downregulates CCN2 and COMP	45
3.5. Discussions	46
3.6. Conclusions	49
4. Specific aim 2: To examine the effects of Ciprofloxacin on MMP1 gene expression in dermal fibroblasts	50
4.1. Introduction	50
4.2. Hypothesis	50
4.3. Materials and methods	51
4.4. Results	53
4.4.1. Ciprofloxacin increases MMP1 in dermal fibroblasts	53
4.4.2. Ciprofloxacin induces MMP1 expression via an Erk1/2 mechanism	54
4.5. Discussions	55
4.6. Conclusions	56
5. Specific aim 3: To examine the effects of Ciprofloxacin on signalling pathways deregulated in fibrosis	57
5.1. Introduction	57
5.2. Hypothesis	57
5.3. Materials and methods	58
5.4. Results	60
5.4.1. Combined treatment with Ciprofloxacin and Akt inhibitor	60

5.4.2. Akt inhibition up-regulates basal and TGFβ-induced CCN2 levels	61
5.4.3. Akt inhibition results in MMP1 upregulation that parallels CCN2 induction	63
5.4.4. CCN2 up-regulation stimulates MMP1 production	65
5.4.5. CCN2 mediates MMP1 up-regulation in response to Akt blockade	66
5.4.6. Inhibition of Akt enhances TGFβ-mediated Erk1/2 phosphorylation	69
5.4.7. CCN2-induced MMP1 expression is mediated via Erk1/2 and	69
5.4.8. Ciprofloxacin and Imatinib	71
5.4.9. C-abl is required for the TGFβ phosphorylation of Fli1	73
5.4.10. Scleroderma has increased levels of P-Fli1	76
5.4.11. Inhibition of c-abl signaling increases total protein levels of Fli1	77
5.4.12. Constitutively active PKCdelta rescues Imatinib mediated collagen downregulation	79
5.4.13. Imatinib inhibits PKCδ nuclear localization in SSc dermal fibroblasts	81
5.5 Discussions	83
5.6 Conclusions	88
6. Specific aim 4: To examine the effects of Ciprofloxacin on Fli1 expression	89
6.1. Introduction	89
6.2. Hypothesis	90
6.3. Materials sand Methods	90
6.4. Results	92
6.4.1. Ciprofloxacin increases Fli1 levels in SSc fibroblasts	92
6.4.2. Ciprofloxacin decreases Dnmt1 levels in SSc fibroblasts	93
6.4.3. Ciprofloxacin is a negative regulator of HDAC1 and HDAC6	93
6.4.4. Ciprofloxacin negatively regulates PTEN levels in scleroderma	94
6.5. Discussions	97
6.6. Conclusions	97
7. Specific aim 5: To evaluate whether Ciprofloxacin has antifibrotic effects on lung fibroblasts isolated from SSc patients with ILD	99
7.1. Introduction	99
7.2. Hypothesis	100
7.3. Materials and methods	100
7.4. Results: Ciprofloxacin has dual antifibrotic effects in lung fibroblasts from SSc-ILD	102
7.5. Discussion	103
7.6. Conclusions	104
8. General conclusions and discussions	106
9. Thesis novelty and originality	109
REFERENCES	111

Cuvinte cheie: Ciprofloxacina, sclerodermie, fibroblasti, fibroza, collagen tip I, matrix metaloproteinaza 1

INTRODUCERE

În urma a producerii de leziuni la nivel cutanat, se declanșează un mecanism fiziologic de regenerare a țesutului afectat. În bolile fibroproliferative, acest mecanism fiziologic de regenerare celulară este dereglat, rezultând în activarea continuă a fibroblaștilor, cu producerea de molecule profibrotice. În pofida impactului imens pe care bolile fibroproliferative le au asupra sănătății populației, în prezent nu există tratamente eficiente care să afecteze direct mecanismele fibrotice. O mai bună înțelegere a mecanismelor moleculare ale fibrozei, este o condiție esențială pentru descoperirea de tratamente antifibrotice eficiente.

Sclerodermia este o boală autoimună a tesutului conjunctiv care se distinge prin fibroza extensivă a pielii și a organelor interne. Fibroza pulmonară este una din cauzele principale de mortalitate, în timp ce scleroza cutanată poate fi desfigurantă. Activarea patologică a căilor de semnalizare celulară PI3K/Akt și PKCdelta/Fli1, în aval de TGFbeta, a fost implicată în patogeniza sclerodermiei. În prezent nu există tratament efficient pentru sclerodermie.

Ciprofloxacina este un antibiotic cu spectru de acțiune larg care face parte din clasa fluorochinolonelor și care are ca țintă ADN giraza bacteriană, precum și o distribuție celulară satisfăcătoare. Cercetări anterioare au sugerat posibilitatea că acest antibiotic ar putea avea efecte antifibrotice în tendoane, prin alterarea metabolismului și expresiei colagenului.

Lucrarea de față își propune să examineze efectele Ciprofloxacinei asupra fibroblaștilor dermici și pulmonari recoltați de la bolnavii cu sclerodermie. Alegerea acestui model se bazează pe faptul că sclerodermia este prototipul de boală fibrotică multiorganică. Ca și control au fost utilizați fibroblaști izolați de la persoane sănătoase, și cu caracteristici similare în ceea ce privește genul, vârsta și rasa.

Pentru început ne-am propus să stabilim dacă Ciprofloxacina afectează fenotipul fibrotic exprimat de fibroblaștii sclerodermici, și dacă aceste celule sunt mai sensibile decât fibroblaștii de la persoane sănătoase. Am examinat astfel efectele pe care tratamentul cu Ciprofloxacina le are asupra anumitor gene care au fost implicate în fibroză în general, inclusiv în sclerodermie. Printre aceste gene se numără colagenul de tip I, CCN2, COMP și MMP1.

După descrierea efectelor pe care Ciprofloxacina le are asupra acestor gene majore pro-fibrotice, următorul obiectiv al acestei lucrări a fost definirea mecanismului de acțiune prin care antibioticul își exercită efectele antifibrotice în fibroblaști. În acest scop, ne-am îndreptat atenția către căile de semnalizare celulară majore care până în prezent au fost implicate în fibroză în general, și sclerodermie în special, și am examinat sistematic efectele pe care Ciprofloxacina le are asupra acestora. Următoarele căi de semnalizare celulară au fost studiate: TGFbeta/Smad, PI3K/Akt, c-abl, și calea PKCdelta/Fli1. Am evaluat efectele tratamentului combinat dintre Ciprofloxacina și inhibitori specifici ai acestor căi de semnalizare celulară, cu scopul de a caracteriza dacă aceștia funcționează în mod antagonistic, sinergistic sau aditiv. Pe parcursul studiilor noastre, un alt scop a fost să caracterizăm mai bine mecanismul fibrozei, deoarece înțelegerea detaliată a semnalizării celulare în fibroză poate rezulta în dezvoltarea unor terapii antifibrotice mai eficiente.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Sclerodermia este o boală caracterizată prin vasculopatie, activarea sistemului imunitar și depozitia accentuată de țesut extracelular în tegumente și organele interne. Fibroza cutanată în sclerodermie poate fi dramatică, afectând grav mobilitatea pacientului și calitatea vieții acestuia, în timp ce complicațiile pulmonare sunt responsabile pentru majoritatea deceselor. Câteva opțiuni terapeutice sunt disponibile pentru pacienții cu sclerodermie, inclusiv agenți imunomodulatori, dar eficacitatea acestora în a reversa fibroza este controversată, fiind considerați cel mult eficienți doar în a opri progresia acesteia. Astfel, dezvoltarea unor agenți terapeutici alternativi este necesară.

Ciprofloxacina este un antibiotic cu spectru larg de acțiune din clasa fluorochinolonelor, care are care țintă ADN giraza bacteriană, având o distribuție tisulară satisfăcătoare. Studii anterioare efectuate *in vivo* în

modele animale de fibroză, au sugerat că Ciprofloxacina ar avea un rol antifibrotic. Astfel, tratamentul cu Ciprofloxacina a scăzut în mod considerabil fibroza hepatică în două modele diferite în șobolani de laborator. Adicional, ciprofloxacina aplicată topic, a crescut incidența perforațiilor corneei, întârziind vindecarea leziunilor acesteia, și într-un studiu separat, a prelungit timpul de vindecare al perforațiilor timpanice. O producție crescută de matrix metaloproteinaza 1 (MMP1) în răspuns la tratamentul cu Ciprofloxacina a fost raportat în mai multe tipuri celulare, inclusiv în celule tendinoase, condrocite, celule epiteliale și cheratinocite izolate din cornee.

Un recent studiu clinic randomizat dublu orb, a comparat diferențele în scorul cutanat între pacienții tratați cu placebo și Ciprofloxacina. Folosind scorul Rodnan modificat, autorii au demonstrat că tratamentul timp de șase luni cu Ciprofloxacina, a rezultat într-un scor cutanat semnificativ mai redus decât în placebo (58 vs. 18%). Important, în acest studiu nu s-au notat efecte adverse semnificative în nici un grup, astfel sugerând că utilizarea pe termen lung a acestui medicament nu este periculoasă în pacienții cu sclerodermie. În timp ce acest studiu sugerează că Ciprofloxacina are efecte antifibrotice în sclerodermia cutanată, mecanismul de acțiune este complet necunoscut.

Friend leukemia integration factor 1 (Fli1) este un membru al familiei Ets de factori de transcripție, care este preferențial exprimat în celule hematopoietice. Deși găsit la nivel scăzut în fibroblaști, Fli1 joacă un rol crucial în reglarea genelor matricei extracelulare, inclusiv a colagenului tip I, și CCN2. Fli1 este un inhibitor potent al expresiei colagenului în fibroblaștii dermici, și nivelul scăzut de Fli1 găsit în fibroblaștii dermici afectați, se corelează cu expresia exagerată de colagen în aceste celule, sugerând că Fli1 are un rol în fibroza din sclerodermie. Am demonstrat anterior că în răspuns la transforming growth factor β (TGF β), Fli-1 este represat printr-o serie de modificări posttranslaționale secvențiale, constând în fosforilarea Fli1 la residuul Thr312 de către proteina kinaza C δ (PKC δ), urmată de acetilarea de către p300/CREB binding protein-associated factor, și detașarea de pe promotorul colagenului.

Akt (acutely transforming retrovirus AKT8 in rodent T-cell lymphoma), deasemenea numită protein kinase B, este o serin treonin kinază cu roluri importante în multe procese biologice inclusiv supraviețuirea celulară, proliferarea, migrarea, angiogeneza și metabolism. Studii efectuate în laboratorul nostru au demonstrat că blocarea semnalizării prin Akt are efecte antifibrotice prin două mecanisme: stimularea sintezei MMP1 (matrix metalloproteinase 1) și reducerea producției de colagen tip I. Cu toate acestea, mecanismul stimulării MMP1 în răspuns la blocarea Akt și semnificația sa funcțională nu sunt cunoscute.

Connective tissue growth factor (CCN2) este un membru al familiei CNN și un important mediator al inducerii colagenului tip I de către TGF β . CCN2 este exprimat din abundență în variate boli fibrotice, fiind considerat un jucător major în fibroză. Cu toate acestea, conform unor studii recente, rolul CCN2 în reglarea matricei extracelulare se pare că este mult mai complex. Câteva studii publicate au implicat CCN2 în stimularea unor matrix metaloproteinaze diferite, inclusiv MMP1, dar mecanismul stimulării MMP1 de către CCN2 nu a fost adresat în mod adecvat până în prezent.

MMP1 este o colagenază interstițială, membră a familiei matrix metalloproteinaze, care are abilitatea de a degrada moleculele fibrilare de colagen, inclusiv colagenul de tip I și III. Această enzimă este implicată în numeroase procese fiziologice și patologice, și s-a dovedit că are rol important în vindecarea tisulară. Un control strâns al activității și secreției acestei enzime este foarte important pentru a preveni degradarea necorespunzătoare a matricei extracelulare.

CONTRIBUȚIE PERSONALĂ

Ipoieza de lucru: Pe baza datelor publicate în legătură cu efectul Ciprofloxacinei în celulele tendinoase și în modele animale de fibroză hepatică, am propus ipoteza că acest antibiotic ar putea avea un rol important antifibrotic în fibroblaștii umani dermici și pulmonari.

Material și metodă:

Biopsie cutanată și cultură fibroblaști: După consimțământul donatorilor, s-a recoltat biopsia cutanată de la nivelul antebrațului, în conformitate cu prevederile IRB (Institutional Review Board), de la

pacienții cu sclerodermie și persoanele de control, care au fost similare ca vârstă, și de același gen și rasă. Fragmentul cutanat obținut a fost plasat în condiții sterile în colagenază peste noapte apoi țesutul digerat s-a transferat în vase de cultură în mediul DMEM cu 20% ser bovin fetal. Celulele au fost utilizate în pasaje incipiente.

Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR): ARN total a fost izolat din celule tratate utilizând reactivul Tri (MRC Inc), conform instrucțiunilor producătorului. 2 μg de ARN au fost reverse transcris într-un volum de reacție de 20 μl, folosind Transcriptor First Strand synthesis kit (Roche), și apoi diluat într-un volum final de 100 μl. Real time quantitative PCR a fost efectuat utilizând IQ Sybr green mix (Biorad) și Icyler machine (Biorad), cu 1 μl de cADN în triplicat și folosind β-actin pentru control intern. Diferența în expresia genelor de interes a fost calculată prin $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Western Blot: Lizatele celulare au fost pregătite în buferul RIPA. O cantitate de 30–100 μg de proteine a fost separată în SDS-PAGE și apoi transferată pe membrane de nitroceluloză. Membranele au fost blocate cu 3% nonfat dry milk în Tween/Tris și apoi incubate cu anticorpii specifici la 4°C peste noapte. Bloturile au fost apoi incubate cu anticorpii secundari specifici și dezvoltate folosind Chemiluminiscent Kit (Pierce). Pentru control, bloturile au fost stripped și re-probed pentru β-actin.

Imunocitochimie: Fibroblaștii dermici au fost crescuți pe coverslip-uri de sticlă, celulele au fost spălate și fixate în 4% paraformaldehidă și apoi spălate în PBS și permeabilizate cu 0.25% Triton X-100. Celulele au fost apoi spălate în PBS, urmat de trei ore de blocking în 1% BSA. Celulele au fost incubate peste noapte la 4°C cu anticorpii primari, urmat de trei spălări în PBS. Anticorpii legați au fost detectați folosind anticorpi secundari specifici. Coverslip-urile cu celule au fost apoi spălate în întuneric cu PBS și montate pe lame de sticle folosind Vectashield mounting medium cu DAPI (Vector). Lamele au fost citite la microscop, fiind examinate 10 câmpuri aleatorii folosind un microscop Olympus atașat la o cameră digitală.

Inhibarea sintezei proteice cu tehnologia small interfering RNA (siRNA): Fibroblaștii dermici au fost crescuți până la 80% confluență și apoi transfectați cu 50 μM c-Abl siRNA sau nonsilencing siRNA timp de 48 ore. Celulele au fost apoi tratate cu reactivii corespunzători experimentelor respective.

Analiza statistică: Datele de qPCR au fost normalizate la expresia mRNA a unui control sănătos, la expresia beta2 microglobulinei și la media expresiei controlului. Toate analizele grafice includ expresia medie și eroarea standar medie (SEM). P values au fost calculate folosind analiza student t-test cu ajutorul GraphPad InStat Statistics Software (v 1.12). Valori mai mici sau egale cu 0.05 au fost considerate statistic semnificative.

STUDIUL 1. Examinarea efectelor Ciprofloxacinei asupra genelor profibrotice în fibroblaștii cutanați.

Ipoteza de lucru: Studii anterioare facute *in vivo* în modele animale de fibroză au sugerat că Ciprofloxacina ar avea un efect antifibrotic, dar mecanismul de acțiune nu este pe deplin cunoscut. Pe lângă acest lucru, nu există nici o informație în legătură cu efectele Ciprofloxacinei asupra fibroblaștilor izolați de la persoane cu boli fibroproliferative. Am propus să testăm ipoteza că Ciprofloxacina are efecte antifibrotice în fibroblaștii cutanați și pulmonari.

Rezultate: Pentru a compara efectele Ciprofloxacinei în celule sclerodermice și sănătoase, am tratat fibroblaștii cu doze crescânde de antibiotic, și am analizat cantitatea de collagen depusă. Ciprofloxacina a avut un efect antifibrotic mai puternic asupra collagenului tip I în celulele sclerodermice comparativ cu cele sănătoase. Astfel, s-a înregistrat o scădere semnificativă în depunerea collagenului de către fibroblaștii sclerodermici, începând cu doza de 25 μg/ml de Ciprofloxacina (~40%), în timp ce această doză nu a avut nici un efect asupra celulelor sănătoase.

Am examinat și efectul pe care tratamentul cu Ciprofloxacina îl are asupra altor gene profibrotice implicate în patogeneza sclerodermiei, inclusiv CCN2 și COMP. Nivelul proteic al CCN2, și nivelul mRNA al CCN2 și COMP au fost analizate după tratarea cu antibiotic. Am observat o scădere semnificativă în nivelul

proteic al CCN2 după tratamentul cu Ciprofloxacina, un efect care nu a mai fost descris anterior în alte tipuri celulare.

Evaluarea efectelor Ciprofloxacinei asupra genei COMP nu a demonstrat sensibilitate crescută a celulelor sclerodermice, astfel încât atât fibroblaștii sănătoși și sclerodermici au răspuns similar la doze mari de Ciprofloxacina.

Concluzii: În concluzie, datele de față demonstrează că Ciprofloxacina are efecte antifibrotice dependente de doză în fibroblaștii dermici izolați de la pacienți cu sclerodermie și persoane sănătoase, prin scăderea colagenului tip I, CCN2 și COMP. În plus, se demonstrează că fibroblaștii sclerodermici sunt mai sensibili la efectele antifibrotice ale Ciprofloxacinei decât celulele de control.

STUDIUL 2: Examinarea efectelor Ciprofloxacinei asupra sintezei de MMP1 de către fibroblaștii cutanați.

Ipoteza de lucru: Publicații anterioare sugerează că antibioticele din clasa fluorochinolonelor își exercită efectul antifibrotic prin stimularea producției unor enzime implicate în degradarea matricei extracelulare, și anume a metaloproteinazelor, inclusiv MMP1. Toate publicațiile referitoare la acest efect al antibioticului s-au efectuat în celule tendinoase, cartilajinoase sau retinale, însă în prezent nu există nici un studiu în fibroblaști care să examineze efectele Ciprofloxacinei asupra MMP1. În această parte a tezei, ne-am propus să testăm dacă Ciprofloxacina are efecte asupra MMP1 în fibroblaștii dermici umani, și să investigăm mecanismul de acțiune al acestui presupus efect.

Rezultate: Pentru a examina efectele Ciprofloxacinei asupra MMP1, am tratat fibroblaștii cu 50μg/ml, sau alternativ cu doze crescătoare de antibiotic pentru 48 de ore. Nivelul MMP1 a fost analizat cu ajutorul western blot. Similar cu datele obținute în alte tipuri celulare, Ciprofloxacina crește producția de MMP1 în fibroblaștii cutanați umani.

Pentru a aprofunda diferențele observate între celulele sclerodermice și sănătoase cu privire la răspunsul la tratamentul cu Ciprofloxacina, în continuare am analizat nivelul mRNA al MMP1 în ambele tipuri celulare în răspuns la doze crescătoare de antibiotic. Am constatat că expresia MMP1 este indusă proporțional cu doza de Ciprofloxacina utilizată atât în fibroblaștii sclerodermici cât și cei sănătoși, începând cu cea mai mică doză testată și într-o proporție similară în ambele tipuri de celule.

Studiile anterioare au demonstrat că în fibroblaștii dermici umani expresia MMP1 este în principal controlată prin calea Erk1/2. Pentru a investiga mecanismele prin care Ciprofloxacina induce expresia MMP1 am studiat efectele acesteia asupra formei fosforilate/activate a Erk1/2 (P-Erk1/2). Tratamentul cu Ciprofloxacina a stimulat fosforilarea Erk1/2 în fibroblaștii dermici umani, iar nivelul P-Erk1/2 a crescut de aproximativ două ori, sugerând că Erk1/2 este implicat în inducția MMP1 de către Ciprofloxacina.

Concluzii: Studiul nostru demonstrează pentru prima dată că, adițional efectului în celule tendinoase, Ciprofloxacina induce expresia MMP1 și în fibroblaștii dermici umani. În plus, am demonstrat că activarea semnalizării celulare prin Erk1/2 este necesară și suficientă pentru inducerea MMP1 de către tratamentul cu Ciprofloxacina.

STUDIUL 3: Examinarea efectelor Ciprofloxacinei asupra căilor de semnalizare celulară implicate în mecanismul fibrozei în sclerodermă.

Ipoteza de lucru: Activarea anormală a unor căi de semnalizare intracelulară observată în sclerodermie ar putea sta la baza mecanismului antifibrotic al Ciprofloxacinei în celulele sclerodermice. Printre aceste căi de semnalizare fac parte și calea profibrotică majoră TGFβ, precum și PI3K/Akt și PKCdelta/c-abl/Fli1. În acest studiu, am dorit să testăm ipoteza că Ciprofloxacina scade expresia celulară a colagenului prin alterarea unor căi de semnalizare celulară cunoscute ca fiind importante în patogeneza sclerodermiei, și în bolile profibrotice în general.

Rezultate: Studiile noastre anterioare au demonstrat că inhibarea semnalizării prin Akt duce la stimularea MMP1 în fibroblaștii dermici umani. Precum am prezentat în studiul 2, Ciprofloxacina are efecte similare asupra MMP1. În continuare am dorit să evaluăm efectele combinării tratamentului cu Ciprofloxacina

și Akt inhibitor VIII asupra expresiei MMP1. Am demonstrat că tratamentul cu Ciprofloxacina și Akt inhibitor VIII rezultă în o inducție mai mică decât tratamentul separat. Acest rezultat a fost surprinzător pentru că în mod separat cele două substanțe sunt stimuloare destul de puternice ale acestei gene. Și mai surprinzător a fost faptul că Akt inhibitor VIII a stimulat puternic expresia moleculei profibrotice CCN2.

Pentru că studii publicate anterior au demonstrat că CCN2 poate regla pozitiv expresia MMP1, am examinat efectele inhibării Akt asupra expresiei CCN2. Blocarea semnalizării prin Akt folosind atât un inhibitor farmacologic cât și tehnologia siRNA a dus la o stimulare puternică a CCN2, care a corelat cu creșterea exprimării MMP1. În plus, stimularea MMP1 în răspuns la blocarea Akt a fost represată parțial de CCN2 siRNA, sugerând că CCN2 contribuie la acest efect. Experimente suplimentare au demonstrat că CCN2 induce fosforilarea lui Erk1/2, Ets1 și c-Jun. Consistent cu rolul stimulator al ERK1/2/Ets1 în expresia MMP1, inhibitorul căii ERK1/2 (U0126), a abrogat fosforilarea ERK1/2 și a Ets1, și a prevenit complet inducția MMP1 în răspuns la CCN2, în timp ce acest inhibitor nu a avut nici un efect asupra activității c-Jun.

Imatinib, la doze care au efect minim asupra colagenului (1 μ M), a stimulat puternic efectele antifibrotice ale Ciprofloxacinei. Aceasta sugerează că o combinație de medicamente antifibrotice ar putea avea efecte sinergice, rezultând în utilizarea unor doze mai mici cu același rezultat antifibrotic dar cu efecte secundare scăzute. Pentru a caracteriza mai detaliat această interacțiune, am încercat să stabilim dacă cele două substanțe blochează o cale de semnalizare comună. Analiza Western blot a lizatei celulare a demonstrat că nivelul fosfo-Fli-1 (Thr312) este crescut în fibroblaștii sclerodermici, și se corelează cu creșterea exprimării colagenului tip I și a proteinei c-abl (ținta Imatinibului). Experimente efectuate folosind o formă constitutiv activată a c-abl, siRNA împotriva c-abl, precum și Imatinib, au demonstrat că c-abl este necesar pentru fosforilarea Fli1 în răspuns la tratamentul cu TGF β . În plus, am demonstrat că activitatea de kinază a c-abl este necesară pentru localizarea nucleară a proteinei PKC δ .

Concluzii: Împreună, aceste date stabilesc CCN2 ca fiind un regulator important al inducției MMP1, via activarea căii ERK1/2/Ets1. Astfel, blocarea semnalizării prin Akt, duce la activarea exagerată a căii CCN2/MMP1, contribuind probabil la patogeniza rănilor cronice. Expresia coordonată a CCN2, Akt și MMP1, ar putea astfel fi un factor important pentru vindecarea țesutului fiziologic. O terapie promițătoare în tratamentul rănilor cronice ar putea avea la bază modularea specifică a acestor molecule.

Studiul de față demonstrează și faptul că Fli1 este fosforilat la nivel crescut în sclerodermie, și că c-abl este un activant important al PKC δ , care este esențial pentru localizarea intranucleară a acestuia, urmată de fosforilarea Fli1. Astfel, restaurarea nivelului Fli1, prin inhibarea căii TGF β /c-abl/PKC δ /P-Fli1, ar putea reprezenta o terapie atractivă împotriva fibrozei în sclerodermie.

STUDIUL 4. Examinarea efectelor Ciprofloxacinei asupra factorului de transcripție Fli1.

Ipoteza de lucru: Într-un studiu publicat de laboratorul nostru, expresia Fli1 în celulele endoteliale și fibroblaștii cutanați a fost scăzută în sclerodermie comparativ cu control, și aceasta a fost corelată cu expresia exagerată de colagen, sugerând că Fli1 are un rol în patogeniza fibrozei din sclerodermie. După cum am demonstrat în studiul 1, Ciprofloxacina este antifibrotică, scăzând expresia colagenului în fibroblaștii dermici umani. Pe baza acestor observații, am dorit să testăm ipoteza că Ciprofloxacina afectează expresia colagenului prin intermediul Fli1.

Rezultate: Pentru început am evaluat efectele Ciprofloxacinei asupra nivelului Fli1 în fibroblaștii dermici sănătoși și sclerodermici. Am demonstrat că tratamentul cu Ciprofloxacina a dus la o creștere semnificativă a nivelului mRNA și proteic al Fli1 în fibroblaștii sclerodermici, dar acest lucru nu a fost reprodus în cei sănătoși, asupra cărora tratamentul cu Ciprofloxacina nu a avut nici un efect pe sinteza Fli1.

Pentru a examina dacă Ciprofloxacina induce exprimarea Fli1 în sclerodermie prin efecte epigenetice, am tratat celulele cu antibiotic și apoi am examinat nivelul metil transferazei Dnmt1. În toate liniile celulare testate, am observat o creștere semnificativă a exprimării proteice a Dnmt1 în urma tratamentului cu Ciprofloxacina (>50%, P<0.0001).

Concluzii: Împreună, aceste rezultate sugerează că în fibroblaștii din sclerodermie, Ciprofloxacina stimulează expresia Fli1 prin mecanisme epigenetice, probabil prin modularea nivelului Dnmt1, în timp ce acest antibiotic nu are nici un efect asupra celulelor sănătoase.

STUDIUL 5: Examinarea efectelor Ciprofloxacinei asupra fibroblaștilor pulmonari izolați de la persoane cu fibroză pulmonară sclerodermică.

Ipoteza de lucru: Complicațiile pulmonare în sclerodermie includ fibroza interstițială pulmonară (ILD, interstitial lung disease) și hipertensiunea arterială pulmonară, iar aceste două complicații sunt responsabile de majoritatea deceselor în această boală. În pofida unor eforturi intense, terapiile curente pentru ILD în sclerodermie nu conferă decât beneficii modeste și transiente, în același timp având efecte secundare majore. Din aceste motive, am hotărât să evaluăm efectele Ciprofloxacinei asupra fibroblaștilor pulmonari obținuți prin biopsie de la pacienții cu sclerodermie care au afectare pulmonară cu ILD. Am pornit de la ipoteza că, în mod similar cu efectele pe care le are în fibroblaștii cutanați, Ciprofloxacina ar fi antifibrotică și în cei pulmonari.

Rezultate: Într-un experiment inițial, fibroblaștii pulmonari au fost tratați cu Ciprofloxacina și apoi nivelul proteic al colagenului tip I a fost analizat prin metoda Western blot. Am constatat în urma acestui experiment o puternică scădere a colagenului tip I după tratamentul cu Ciprofloxacina. În mod similar cu datele obținute în fibroblaștii cutanați, nivelul CCN2 a fost de asemenea scăzut după tratamentul cu antibiotic, în timp ce MMP1 a fost stimulat. În mod interesant, nivelul Dnmt1 fost și acesta scăzut în urma tratamentului cu Ciprofloxacina, în timp ce Fli1 a fost stimulat, sugerând astfel că un mecanism epigenetic stă la baza efectelor antifibrotice ale antibioticului și în fibroblaștii pulmonari.

Concluzii: Pe baza acestor rezultate, am ajuns la concluzia că Ciprofloxacina are efect antifibrotic dublu asupra fibroblaștilor pulmonari izolați de la pacienții cu ILD în sclerodermie, prin scăderea colagenului tip I, și stimularea MMP1. În plus, efectul antifibrotic ar putea fi mediat prin reglarea epigenetică a factorului de transcripție Fli1, datorită inhibării enzimei Dnmt1.

În concluzie, studiul nostru arată că Ciprofloxacina are efecte antifibrotice în fibroblaștii dermici și pulmonari din sclerodermă, prin inhibarea Dnmt1, stimularea Fli1 și inducția expresiei MMP1 prin calea Erk1/2. În timp ce aceste rezultate promițătoare susțin ipoteza că Ciprofloxacina ar fi utilă în tratamentul sclerodermiei, studii clinice randomizate pe populații mai mari de pacienți sunt necesare pentru a confirma că este eficientă în fibroza cutanată și pulmonară din această boală.

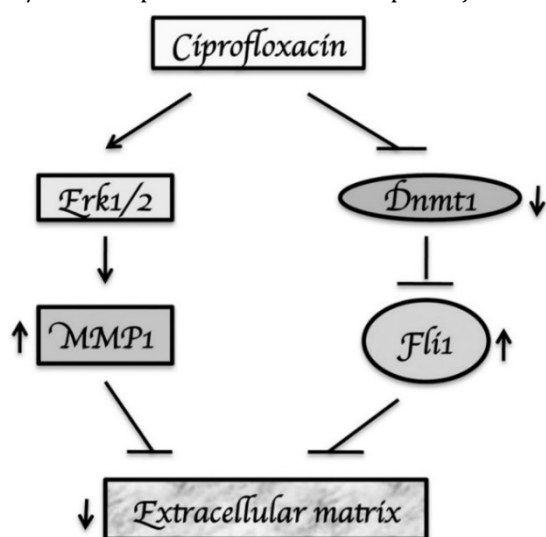


Diagrama mecanismului antifibrotic propus pentru Ciprofloxacina.



PhD THESIS ABSTRACT

The antifibrotic effect of
Ciprofloxacin, alternative
therapy for diseases with
excess collagen deposition

PhD candidate: **Andreea Monica Bujor**

PhD coordinator: **Prof. Dr. Lia Monica Junie**

Cluj-Napoca, 2016

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	1
GENERAL BACKGROUND KNOWLEDGE	
1. Ciprofloxacin as an antifibrotic	5
1.1. Ciprofloxacin, the antibiotic	5
1.1.1. Mechanism of action	5
1.1.2. Pharmacodynamics and pharmacokinetics	6
1.1.3. Side effects	6
1.1.4. Effects on tendon and cartilage	7
1.2. Ciprofloxacin as an antifibrotic	7
1.2.1. Ciprofloxacin in systemic sclerosis	8
1.2.2. Ciprofloxacin in animal models of fibrosis	9
1.2.3. Evidence that Ciprofloxacin regulates the expression of matrix metalloproteinases	9
2. Systemic sclerosis, the prototype of multiorgan fibrotic disease	11
2.1. Definition and classification	11
2.2. Manifestations	12
2.2.1. Raynaud's phenomenon	12
2.2.2. Skin involvement	12
2.2.3. Lung involvement	12
2.2.4. Gastrointestinal manifestations	13
2.2.5. Other complications	13
2.3. Diagnosis	14
3. Disease pathogenesis	15
3.1. Vascular disease	15
3.2. Autoimmunity	15
3.3. Fibrosis and the extracellular matrix	16
3.4. Collagen	17
3.4.1. Collagen gene regulation	17
3.4.1.1. TGFbeta	17
3.4.1.2. Akt	18
3.4.1.3. PKCdelta	19
3.4.1.4. Fli1	19
3.4.1.5. c-abl	21
3.4.1.6. PTEN	21
3.5. Matrix metalloproteinase-1	22
3.5.1. MMP1 gene regulation	22
4. Antifibrotic therapies in systemic sclerosis	25
4.1. Immunomodulators	25
4.1.1. Cyclophosphamide	25
4.1.2. Mycophenolate mofetil	25
4.1.3. Autologous stem cell transplantation	26
4.1.4. Methotrexate	26
4.2. Other proposed therapies	26
PERSONAL CONTRIBUTION	

1. Hypothesis and objectives	31
2. General Methods	31
2.1. Reagents	31
2.1.1. Antibodies	31
2.1.2. Cell culture solutions, specific inhibitors, antibiotics	32
2.2. Tissue collection and cell culture	33
2.2.1. Skin biopsies	33
2.2.2. Fibroblast isolation and propagation	34
2.2.3. Cell storage using liquid nitrogen tanks	37
2.3. Western blot analysis	37
2.4. Quantitative real time RT-PCR	38
2.5. Immunocytochemistry	38
2.6. Inhibition of protein expression by small interfering RNA (siRNA)	39
2.7. Statistical analysis	39
3. Specific aim 1: To examine the effects of Ciprofloxacin on profibrotic gene expression in dermal fibroblasts	40
3.1. Introduction	40
3.2. Hypothesis	40
3.3. Materials and methods	41
3.4. Results	43
3.4.1. Increased sensitivity of SSc fibroblasts	43
3.4.2. Ciprofloxacin downregulates CCN2 and COMP	45
3.5. Discussions	46
3.6. Conclusions	49
4. Specific aim 2: To examine the effects of Ciprofloxacin on MMP1 gene expression in dermal fibroblasts	50
4.1. Introduction	50
4.2. Hypothesis	50
4.3. Materials and methods	51
4.4. Results	53
4.4.1. Ciprofloxacin increases MMP1 in dermal fibroblasts	53
4.4.2. Ciprofloxacin induces MMP1 expression via an Erk1/2 mechanism	54
4.5. Discussions	55
4.6. Conclusions	56
5. Specific aim 3: To examine the effects of Ciprofloxacin on signalling pathways deregulated in fibrosis	57
5.1. Introduction	57
5.2. Hypothesis	57
5.3. Materials and methods	58
5.4. Results	60
5.4.1. Combined treatment with Ciprofloxacin and Akt inhibitor	60
5.4.2. Akt inhibition up-regulates basal and TGF β -induced CCN2 levels	61
5.4.3. Akt inhibition results in MMP1 upregulation that parallels CCN2 induction	63

5.4.4. CCN2 up-regulation stimulates MMP1 production	65
5.4.5. CCN2 mediates MMP1 up-regulation in response to Akt blockade	66
5.4.6. Inhibition of Akt enhances TGFβ-mediated Erk1/2 phosphorylation	69
5.4.7. CCN2-induced MMP1 expression is mediated via Erk1/2 and	69
5.4.8. Ciprofloxacin and Imatinib	71
5.4.9. C-abl is required for the TGFβ phosphorylation of Fli1	73
5.4.10. Scleroderma has increased levels of P-Fli1	76
5.4.11. Inhibition of c-abl signaling increases total protein levels of Fli1	77
5.4.12. Constitutively active PKCdelta rescues Imatinib mediated collagen downregulation	79
5.4.13. Imatinib inhibits PKCδ nuclear localization in SSc dermal fibroblasts	81
5.5 Discussions	83
5.6 Conclusions	88
6. Specific aim 4: To examine the effects of Ciprofloxacin on Fli1 expression	89
6.1. Introduction	89
6.2. Hypothesis	90
6.3. Materials and Methods	90
6.4. Results	92
6.4.1. Ciprofloxacin increases Fli1 levels in SSc fibroblasts	92
6.4.2. Ciprofloxacin decreases Dnmt1 levels in SSc fibroblasts	93
6.4.3. Ciprofloxacin is a negative regulator of HDAC1 and HDAC6	93
6.4.4. Ciprofloxacin negatively regulates PTEN levels in scleroderma	94
6.5. Discussions	97
6.6. Conclusions	97
7. Specific aim 5: To evaluate whether Ciprofloxacin has antifibrotic effects on lung fibroblasts isolated from SSc patients with ILD	99
7.1. Introduction	99
7.2. Hypothesis	100
7.3. Materials and methods	100
7.4. Results: Ciprofloxacin has dual antifibrotic effects in lung fibroblasts from SSc-ILD	102
7.5. Discussion	103
7.6. Conclusions	104
8. General conclusions and discussions	106
9. Thesis novelty and originality	109
REFERENCES	111

Key words: Ciprofloxacin, systemic sclerosis, fibroblasts, fibrosis, collagen type I, matrix metalloproteinase 1

INTRODUCTION

When tissues are damaged, a normal wound healing response comes into action, triggering a cascade of events that results in fibroblast activation and tissue remodeling. In fibroproliferative diseases, the normal wound healing response becomes dysregulated, resulting in persistent fibroblast activation and production of fibrotic molecules. Despite the impact that fibroproliferative diseases have on human health, there are no approved effective treatments that directly target the mechanisms of fibrosis. A better understanding of the molecular mechanisms of fibrosis is a prerequisite for finding appropriate effective therapies.

Systemic sclerosis is an autoimmune connective tissue disease characterized by extensive fibrosis of the skin and internal organs. Lung fibrosis is one of the leading causes of death in systemic sclerosis, and skin fibrosis can be extremely disfiguring and disabling. Pathologic activation of the PI3K/Akt and PKCdelta/Fli1 pathways, downstream of TGFbeta, have been implicated in scleroderma pathogenesis. To date, no effective therapies exist for this disease.

Ciprofloxacin is a broad-spectrum antibiotic of the fluoroquinolone class that targets bacterial DNA gyrase, with satisfactory tissue distribution. Previous *in vivo* studies in animal models of fibrosis have suggested an antifibrotic role for ciprofloxacin, presumably via alterations in collagen metabolism and degradation.

The present study was undertaken to examine the effects of Ciprofloxacin on dermal and lung fibroblasts obtained from SSc patients. Because systemic sclerosis is the prototype of fibrotic diseases, most of our studies have focused on describing the effects of Ciprofloxacin on fibroblasts isolated from scleroderma patients. Our studies also included normal control fibroblasts from the skin of healthy persons.

We first sought to determine if Ciprofloxacin affects the fibrotic phenotype expressed by SSc fibroblasts, and if these cells would be more sensitive to Ciprofloxacin than healthy controls. We studied the effects of Ciprofloxacin treatment on several genes that have been previously linked to fibrosis, including collagen type I, connective tissue growth factor, and matrix metalloproteinases.

Once establishing the effects on major fibrosis genes, the next goal was to define the exact mechanisms involved in this process. Given that several signaling pathways have been implicated in fibrosis, and have been shown to also be dysregulated in SSc fibroblasts, we examined the effect of Ciprofloxacin treatment on these pathways. The major pathways we examined were TGFbeta/Smad pathway, the PI3K/Akt, c-abl, PKCdelta/Fli1 pathways. We evaluated the effects of combined treatment of Ciprofloxacin with specific inhibitors of these pathways. We wanted to characterize whether they work in an antagonistic, synergistic or additive way. In the course of our research, we also aimed to further characterize the mechanistic aspects of fibrosis, as a better understanding of signaling in fibroproliferative diseases, can lead to development of more effective therapies.

BACKGROUND

Systemic sclerosis (SSc) is a disease characterized by vasculopathy, activation of the immune system and exaggerated deposition of extracellular matrix (ECM), resulting in stiff skin and fibrosis of internal organs. Skin fibrosis in scleroderma may be dramatic, severely affecting the mobility and quality of life of a patient, while lung complications are responsible for the majority of deaths. Several therapeutic options are available for SSc patients, including immunomodulatory agents, but their efficacy in reversing fibrosis is controversial, being considered at most only effective in halting the progression of the skin and lung disease. Therefore, the development of alternative therapeutic agents is warranted.

Ciprofloxacin is a broad-spectrum antibiotic of the fluoroquinolone class that targets bacterial DNA gyrase, with satisfactory tissue distribution. Previous *in vivo* studies in animal models of fibrosis have suggested an antifibrotic role for ciprofloxacin. Thus, ciprofloxacin treatment significantly decreased hepatic fibrogenesis in bile duct ligated and carbon tetrachloride/ethanol cirrhotic rats. Furthermore, topical

ciprofloxacin increased the incidence of corneal perforations, significantly delaying corneal wound healing and in a separate study prolonged tympanic membrane perforation healing. Increased matrix metalloproteinase (MMP) synthesis in response to ciprofloxacin treatment has been reported in several cell types, including tenocytes, chondrocytes, corneal epithelial cells and corneal stromal keratocytes.

A recent double blind randomized clinical trial compared changes in skin fibrosis in placebo and ciprofloxacin-treated scleroderma patients. Using the modified Rodnan skin score (MRSS), investigators demonstrated that after six months of treatment there was a significant decrease in MRSS in patients treated with ciprofloxacin when compared with the placebo-treated group (58 vs. 18%). Importantly, no significant side effects were reported, suggesting that long-term use of this drug may be safe in SSc patients. While this report suggests that ciprofloxacin has antifibrotic effects on SSc skin, the mechanism of action in dermal fibroblasts is completely unknown.

Friend leukemia integration factor 1 (Fli1) is a member of the Ets family of transcription factors that is preferentially expressed in hematopoietic cell lineages. Although expressed at low levels in dermal fibroblasts, Fli1 plays a pivotal role in the regulation of ECM genes, including type I collagen and the profibrotic matrix protein connective tissue growth factor (CCN2). Fli1 is a potent inhibitor of collagen gene expression in dermal fibroblasts and the downregulation of Fli1 protein in dermal fibroblasts from the affected skin of SSc patients correlates with elevated collagen deposition, thus suggesting a role of Fli-1 in SSc fibrosis. We have previously demonstrated that in response to transforming growth factor β (TGF β), Fli-1 activity is repressed through a series of sequential posttranslational modifications, consisting of protein kinase C δ (PKC δ)-induced Thr312 phosphorylation, acetylation by p300/CREB binding protein-associated factor, and detachment from the collagen promoter.

Akt (acutely transforming retrovirus AKT8 in rodent T-cell lymphoma), also referred to as protein kinase B, is a serine threonine kinase with critical roles in many biological processes including cell survival, proliferation, migration, angiogenesis and metabolism. Studies in our laboratories showed that Akt blockade has dual antifibrotic effects, increasing the synthesis of matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and reducing the production of type I collagen. However, the mechanism of MMP1 upregulation in response to Akt inhibition and its functional significance are presently unknown.

Connective tissue growth factor (CCN2) is a member of the CNN family and an important mediator of TGF β induction of type I collagen. CCN2 is overexpressed in various types of fibrotic diseases, thus being considered a major player in fibrosis. However, according to recent studies, the role of CCN2 in the regulation of ECM could be more complex. Several reports have implicated CCN2 as a positive regulator of different matrix metalloproteinases, including MMP1, but the mechanism of CCN2-induced MMP1 up-regulation has not yet been adequately addressed.

MMP1 is an interstitial collagenase, a member of the family of matrix metalloproteinases that has the ability to degrade fibrillar collagen molecules, including type I and type III collagens. It is involved in numerous biological and pathological processes and it was shown to play important roles in wound healing. Tight control of MMP1 activity is important to prevent inappropriate matrix degradation.

PERSONAL CONTRIBUTION

Hypothesis: Based on previously published data in tendon cells and animal models of liver fibrosis, we hypothesized that Ciprofloxacin may have an important role in fibrosis in human dermal and lung fibroblasts.

Materials and methods:

Fibroblast culture: After informed consent, a punch biopsy was obtained from the forearms of SSc patients and normal matched controls, in accordance to IRB protocols. The skin was placed overnight in collagenase then plated onto culture dish in DMEM with 20% fetal bovine serum. Cells were used in early passages.

Quantitative Real Time PCR: Total RNA was isolated from the fibroblasts using Tri reagent (MRC Inc) according to manufacturer's instructions. 2 µg of RNA was reverse transcribed in 20 µl reaction volume using random primers and Transcriptor First Strand synthesis kit (Roche) and then diluted to 100 µl. Real time quantitative PCR was carried out using IQ Sybr green mix (Biorad) on Icyler machine (Biorad) using 1 µl of the cDNA in triplicates with β-actin as the internal control. The fold change in the levels of genes of interest was determined by $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Western Blotting: Cell lysates were prepared in RIPA buffer. 30–100 µg of protein was separated on SDS-PAGE and then transferred on nitrocellulose membrane. The membranes were blocked with 3% nonfat dry milk in Tween/Tris buffered saline. The membranes were then probed with antibodies against the specific proteins and kept at 4°C overnight. The blots were then incubated with appropriate horseradish peroxidase coupled secondary antibodies and developed using Chemiluminiscent Kit (Pierce). For loading control, either the blots were stripped and re-probed for β-actin (Sigma) or separate gels were run and probed.

Immunocytochemistry: Dermal fibroblasts were grown on glass coverslips, cells were washed and fixed in 4% paraformaldehyde and then washed in PBS and permeabilized with 0.25% Triton X-100. Cells were then washed in PBS, followed by 3 hours of blocking in 1% BSA.. Cells were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies, followed by 3 washes in PBS. Bound antibody was detected using specific secondary antibodies. Coverslips were washed in PBS in the dark and then mounted on glass slides using Vectashield mounting medium with DAPI (Vector). Slides were blinded, and 10 random fields were examined using an Olympus microscope attached to a digital camera.

Inhibition of protein expression by small interfering RNA (siRNA): Dermal fibroblasts were grown to 80% confluence and transiently transfected with 50 µM c-Abl siRNA or nonsilencing siRNA for 48 hours. Cells were then serum starved overnight and treated as indicated.

Statistical analysis: qPCR data were normalized to mRNA expression of one healthy control, housekeeping gene expression, and average healthy control expression. All graph analyses include the mean expression with the standard error of mean (SEM). P values were calculated using the student's t-test analysis, using GraphPad InStat Statistics Software (v 1.12). Values of less than or equal to 0.05 were considered statistically significant.

SPECIFIC AIM 1. To examine the effects of Ciprofloxacin on profibrotic gene expression in dermal fibroblasts

Rationale: Previous *in vivo* studies in animal models of fibrosis have suggested an antifibrotic role for ciprofloxacin, though the exact mechanism is currently incompletely understood. Furthermore, there is no data looking at the effects of Ciprofloxacin on fibroblasts isolated from patients with fibroproliferative diseases. We hypothesised that Ciprofloxacin has antifibrotic effects in dermal and lung fibroblasts.

Results: In order to compare the effects of ciprofloxacin on SSc and normal dermal fibroblasts, quiescent SSc and control cells were treated with increasing concentrations of ciprofloxacin, and collagen protein levels were analyzed in the culture supernatants. Ciprofloxacin more potently decreased collagen type I secretion in SSc cells compared to normal fibroblasts. Thus, there was a statistically significant

decrease in secreted collagen starting with 25 µg/ml of ciprofloxacin (~40%), while the same dose had no effect on collagen type I production in normal control fibroblasts.

We next examined the effects of ciprofloxacin treatment on other fibrotic markers that have been implicated in SSc pathogenesis, including CCN2 and COMP. Protein levels of CCN2, and mRNA levels of CCN2

and COMP were analyzed after antibiotic treatment. We noted a significant decrease in CCN2 protein levels with Ciprofloxacin, an effect that has not been previously described in any other cell types.

Evaluation of Ciprofloxacin effects on COMP gene expression did not show increased sensitivity of SSc cells, with both SSc and healthy fibroblast responding to higher doses of Ciprofloxacin.

Conclusions: In summary, this shows that Ciprofloxacin has dose dependent antifibrotic effects in normal and scleroderma dermal fibroblasts, by downregulation of collagen type I, connective tissue growth factor (CCN2) and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). Furthermore, the present data also shows that scleroderma fibroblasts are more sensitive to the antifibrotic effect of Ciprofloxacin than their matched healthy control cells.

SPECIFIC AIM 2. To examine the effects of Ciprofloxacin on MMP1 gene expression in dermal fibroblasts

Rationale: Several published reports suggest that quinolone antibiotics exert their antifibrotic effects via up-regulation of enzymes involved in ECM degradation, namely matrix metalloproteinases. All these reports have examined the effects of Ciprofloxacin or other quinolones in tendon cells, cartilage cells or retina cells, but there are no published reports looking at the effects of Ciprofloxacin on MMP1 in human dermal fibroblasts. In this part of the study, we wanted to test whether Ciprofloxacin has effects on MMP1 in human dermal fibroblasts, and to investigate the potential mechanisms of this action.

Results: Quiescent, serum starved fibroblasts were treated with 50 µg/ml of Ciprofloxacin for 48 hours or with increasing doses of Ciprofloxacin. Levels of MMP1 were analyzed by western blot analysis. As previously reported in other cell types, ciprofloxacin increased MMP1 production in human dermal fibroblasts.

To further investigate potential differences in response to Ciprofloxacin treatment between SSc and healthy cells, we analyzed mRNA levels of MMP1, in both cell types, in response to increasing doses of antibiotic. MMP1 gene expression was induced in a dose-dependent manner in both SSc and normal cells, starting with the smallest dose tested and to a similar extent in both cell types.

Previous studies have demonstrated that in human dermal fibroblasts MMP1 gene expression is mainly controlled via an Erk1/2-dependent mechanism. To investigate the mechanism of Ciprofloxacin-induced MMP1 gene upregulation we examined the effect of Ciprofloxacin on phosphorylated Erk1/2 (P-Erk1/2). Ciprofloxacin significantly induced Erk1/2 phosphorylation in human dermal fibroblasts, with the levels of P-Erk1/2 almost doubling, suggesting that Erk1/2 may be involved in Ciprofloxacin-induced MMP1 gene expression.

Conclusions: Our study demonstrates for the first time that, in addition to effects on tenocytes, Ciprofloxacin also induces MMP1 gene expression in human dermal fibroblasts. Furthermore, we also show that activation of Erk1/2 signaling is required and sufficient for Ciprofloxacin induced MMP1 upregulation.

SPECIFIC AIM 3. To examine the effects of Ciprofloxacin on signaling pathways deregulated in fibrosis

Rationale: Aberrant activation of several signaling pathways implicated in the pathogenesis of SSc, might serve as target for the effect of ciprofloxacin. These include upregulation of the major profibrotic TGFβ pathway, as well as the PI3K/Akt and PKCdelta/c-abl/Fli1 pathways. In this specific aim, we hypothesized that Ciprofloxacin downregulates collagen by altering signalling through known signaling pathways involved in scleroderma pathogenesis and fibrotic diseases in general.

Results: Our previous studies showed that Akt inhibition upregulates MMP1 in human dermal fibroblasts. As presented in the Results section of Specific aim 2, Ciprofloxacin has similar effects on MMP1. We next sought evaluate the effects of combined Akt inhibitor VIII and Ciprofloxacin treatment on MMP1 gene expression. treatment with Ciprofloxacin and Akt inhibitor VIII results in less potent upregulation of MMP1 than the Akt inhibitor alone. This result was very surprising as separately, both molecules are rather potent

inducers of this gene. Even more surprising was the effects of Akt inhibitor VIII on CCN2 gene expression, which was not suppressed but in fact increased.

As previous studies showed that CCN2 can be a positive regulator of MMP1, we examined the effects of Akt inhibition on CCN2 expression. Akt blockade using a specific pharmacological inhibitor and Akt siRNA resulted in a significant up-regulation of CCN2, which correlated with the increase in MMP1. The MMP1 up-regulation following Akt blockade was partially suppressed by CCN2 siRNA, suggesting that CCN2 is contributing to this effect. Additional experiments showed that CCN2 induces phosphorylation of ERK1/2, Ets1 and c-Jun. Consistent with the stimulatory role of ERK1/2/Ets1 in the expression of MMP1, the ERK1/2 inhibitor UO126 prevented the phosphorylation of ERK1/2 and Ets1 and completely abrogated the induction of MMP1 after CCN2 overexpression, while having no effect on c-Jun activation.

Imatinib, at doses that have minimal effects on collagen gene regulation (1 μ M), significantly potentiated the antifibrotic effects of Ciprofloxacin. This suggested that a combination of antifibrotic drugs might result in synergistic effects and thus allow lower doses of Imatinib to be used for therapy with fewer resultant side effects. To further investigate the enhancement of antifibrotic effects of Ciprofloxacin in the presence of low doses of Imatinib, we wanted to evaluate whether these two molecules block a common pathway. Western blot analysis of cell lysates demonstrated that the levels of phospho-Fli-1 (Thr312) were up-regulated in SSc fibroblasts, correlating with increased levels of type I collagen and c-Abl protein. Experiments using a constitutively activated form of c-Abl, small interfering RNA against c-Abl and the specific tyrosine kinase inhibitor imatinib, demonstrated the requirement of c-Abl for the TGF β -induced phosphorylation of Fli-1. Additionally, we showed that c-Abl kinase activity was required for nuclear localization of PKC δ .

Conclusion: Taken together these results establish CCN2 as a key regulator of MMP1 induction via activation of the ERK1/2/Ets1 pathway. Down-regulation of Akt signalling leads to inappropriate activation of the CCN2/MMP1 pathway that may contribute to the pathogenesis of chronic wounds. Coordinate expression of CCN2, Akt and MMP1 could be important for normal wound healing to occur. Thus, targeting these specific proteins may represent a promising approach to the therapy of dysregulated wound healing

The present study also shows that Fli1 is constitutively phosphorylated at higher levels in SSc, and c-abl is a pivotal activator of PKC δ that is essential for its nuclear localization and phosphorylation of Fli1. Thus, increasing or restoring expression of Fli1 by blocking the TGF β /c-abl/PKC δ /P-Fli1 pathway could represent an exciting potential therapeutic possibility against SSc fibrosis.

SPECIFIC AIM 4. To examine the effects of Ciprofloxacin on Fli1 expression

Rationale: In a study from our laboratory, Fli1 was significantly under-expressed in endothelial cells and in dermal fibroblasts from SSc skin, and this correlated with elevated collagen deposition, thus suggesting a role for Fli1 in SSc fibrosis. As demonstrated in Aim 1, Ciprofloxacin has antifibrotic effects and downregulates collagen type I in human dermal fibroblasts. Based on these findings, we hypothesized that Ciprofloxacin affects collagen gene regulation via a Fli1 dependent mechanism.

Results: We first evaluated the effects of ciprofloxacin on Fli1 levels in normal and SSc dermal fibroblasts, and showed that treatment of SSc fibroblasts with ciprofloxacin resulted in a statistically significant increase in Fli1 mRNA and protein levels compared to untreated cells. These results were not reproduced by Ciprofloxacin treatment in healthy control cells, where there was no effect on Fli1 levels after Ciprofloxacin treatment.

To examine whether epigenetic changes may be implicated in the ciprofloxacin-induced Fli1 upregulation in SSc dermal fibroblasts, four different SSc cell lines were treated with ciprofloxacin and the protein levels of Dnmt1 were then analyzed in cell lysates. In all cell lines there was a significant decrease in protein levels of Dnmt1 after ciprofloxacin treatment (>50%, P<0.0001).

Conclusions: Taken together, these results suggest that in SSc dermal fibroblasts, Ciprofloxacin enhances Fli1 expression via epigenetic mechanisms, potentially by modulating the expression of Dnmt1, while having no effects on healthy control fibroblasts.

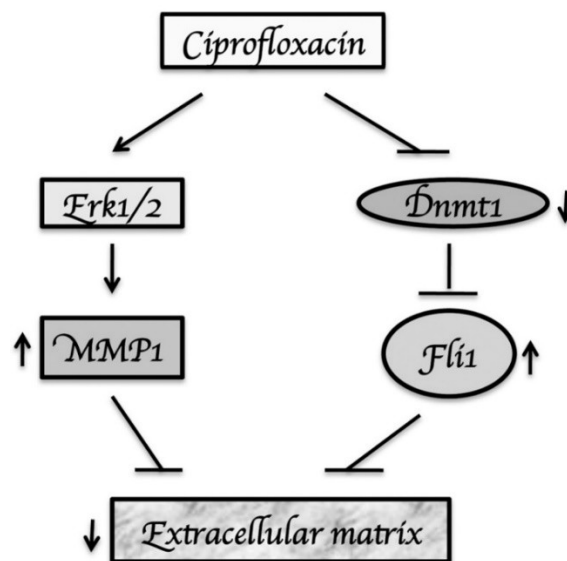
SPECIFIC AIM 5. To evaluate whether Ciprofloxacin has antifibrotic effects on lung fibroblasts isolated from SSc patients with interstitial lung disease

Rationale: Lung complications in scleroderma include interstitial lung disease (ILD) and pulmonary arterial hypertension, with these two accounting for over 60% of scleroderma deaths. Despite intense efforts, the currently available therapies for ILD in SSc offer only transient and modest benefits, while carrying a high risk of potentially serious side effects. Given all this, we wanted to evaluate the effects of Ciprofloxacin on lung fibroblasts explanted from SSc patients with established ILD. We hypothesized that similar to dermal fibroblasts, Ciprofoxacin has antifibrotic effects in SSc lung fibroblasts isolated form patients with ILD.

Results: In a first experiement, lung fibroblasts were treated with Ciprofloxacin and then proten levels of Collagen were analysed by Western blot. There was a potent downregulation of collagen type I after antibiotic treatment. Similar to the results obtained in dermal fibroblasts, the levels of the profibrotic marker CCN2 were also downregulated after ciprofloxacin treatment, while MMP1 gene expression was enhanced. Interestingly, the levels of Dnmt1 were also downregulated after Ciprofloxacin treatment, thus suggesting that epigenetic mechanisms may be involved in the antibiotic-induced antifibrotic effects.

Conclusion: Based on these results, we concluded that Ciprofloxacin has dual antifibrotic effects on human lung fibroblasts from SSc patients with ILD, by decreasing the protein and mRNA levels of Collagen type I, and increasing MMP1 gene expression. Furthermore, the antifibrotic effects could be mediated through epigenetic regulation of Fli1 expression, via inhibition of Dnmt1, leading to upregulation of Fli1.

In summary, our study showed that Ciprofloxacin has antifibrotic actions in SSc dermal and lung fibroblasts via downregulation of Dnmt1, upregulation of Fli1 and induction of MMP1 gene expression via an Erk1/2-dependent mechanism. While these results provide evidence to support the use of ciprofloxacin in SSc, larger randomized clinical trials are warranted to confirm whether this may be a new treatment modality for SSc skin and lung fibrosis.



Schematic diagram showing the proposed mechanism of action for the antifibrotic effects of ciprofloxacin.

