

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Prof. Dr. med. M. P. Schön.)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

NF- κ B c-Rel in Fibroblasten und Fibrose

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Franziska Susanne Trautschold-Krause

aus

Hannover
Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. med. M.P. Schön

Ko-Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. M. Bohnsack

Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. med. M.P. Schön

Ko-Referent: Prof. Dr. rer. nat. M. Bohnsack

Promotor-Vertretung: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 13. August 2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "NF- κ B c-Rel in Fibroblasten und Fibrose" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Homöostase der Haut.....	1
1.1.1 Aufbau der Dermis: Dermale Fibroblasten und Extrazelluläre Matrix	1
1.1.2 Fibrose und Myofibroblasten	2
1.2 Systemische Sklerodermie	4
1.2.1 Allgemeines, Epidemiologie und Pathogenese	4
1.2.2 Klassifikation, Symptome und Therapie der Sklerodermie	4
1.3 Das Zytokin <i>transforming growth factor beta</i> (TGF β) und seine Funktion in der Haut.....	5
1.3.1 Smad-abhängiger TGF β -Signalweg.....	5
1.3.2 TGF β in der Haut.....	6
1.4 Nuclear factor <i>kappa light chain enhancer</i> of activated B-cells.....	7
1.4.1 NF- κ B-Proteinuntereinheiten	7
1.4.2 Signalwege.....	7
1.4.3 NF- κ B in der Haut	8
1.4.4 NF- κ B bei Fibrose und systemischer Sklerodermie.....	9
1.5 Ziel des Projekts.....	9
2 Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Laborausrüstung.....	11
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3 Chemikalien	14
2.1.4 Lösungen und Puffer.....	16
2.1.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....	17
2.1.6 Zellkultur-Reagenzien und Medium.....	18
2.1.7 Oligonukleotide.....	18
2.1.8 siRNA.....	19
2.1.9 Antikörper	19
2.1.10 Software	21
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Zellkultur	21
2.2.2 Stimulation mit TGF β	23
2.2.3 siRNA-Transfektion	23
2.2.4 Proteinlysate und Western Blot	24
2.2.5 Genexpressionsanalysen.....	27

2.2.6	Immunfluoreszenz.....	29
2.2.7	Kollagen-Kontraktions-Experimente	30
2.2.8	MTT-Experimente.....	31
2.2.9	Aufnahmen von Phasenkontrastbildern	31
2.2.10	Auswertung qRT-PCR.....	31
2.2.11	Statistische Auswertung.....	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Etablierung eines Fibrose-Modells <i>in vitro</i>	33
3.2	Verstärkte NF- κ B c-Rel-Expression durch fibrotische Induktion	35
3.3	Funktionelle Analyse von c-Rel in Fibroblasten unter homöostatischen und fibrotischen Bedingungen	38
3.3.1	c-Rel Knockdown durch siRNA-Transfektion	38
3.3.2	Zellmorphologie und -viabilität nach c-Rel-Suppression.....	39
3.3.3	Expressionsänderungen fibrotischer Marker nach c-Rel-Suppression	40
3.3.4	Reduzierte Kontraktilität nach c-Rel Knockdown im 3D Modell	43
4	Diskussion	47
4.1	c-Rel-Implikation in dermalen Fibrose.....	47
4.2	Kontraktilität dermalen Fibroblasten unterliegt dem Einfluss von c-Rel	48
4.3	Kollagen I-Expression wird durch c-Rel reduziert	49
4.3.1	Mögliche Effekte von c-Rel auf fibroseassoziierte Proteine.....	51
4.4	Die Viabilität wird durch c-Rel-Suppression nicht beeinflusst.....	51
4.5	Myofibroblasten-Differenzierung erfolgt durch Kombination mechanischer Kräfte und TGF β	52
4.6	Resümee und Ausblick	52
5	Zusammenfassung.....	54
6	Literaturverzeichnis	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Differenzierung dermalen Fibroblasten zu Myofibroblasten	3
Abbildung 2: TGF β -assoziierte Signalwege	6
Abbildung 3: NF- κ B-assoziierte Signalwege	8
Abbildung 4: Morphologische Veränderungen der Fibroblasten nach TGF β -Stimulation	33
Abbildung 5: Fibrose-Induktion durch Stimulation von Fibroblasten mit TGF β <i>in vitro</i>	34
Abbildung 6: Die Induktion von α SMA ist unabhängig von der FCS-Konzentration.....	35
Abbildung 7: Verstärkte c-Rel-Expression im Fibrose-Modell <i>in vitro</i>	37
Abbildung 8: Suppression von c-Rel durch siRNA-Transfektion	39
Abbildung 9: Zellmorphologie und -viabilität nach c-Rel-Suppression	40
Abbildung 10: Genexpressionsanalyse fibrotischer Marker nach c-Rel-Suppression.....	41
Abbildung 11: Expression fibrotischer Marker nach c-Rel-Suppression.....	43
Abbildung 12: Reduzierte Kontraktilität nach c-Rel-Knockdown	45
Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung des Zytoskeletts nach c-Rel-Suppression	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte.....	11
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial.....	13
Tabelle 3: Chemikalien.....	14
Tabelle 4: Reaktionssystem (<i>Kit</i>).....	17
Tabelle 5: Zellkultur-Reagenzien.....	18
Tabelle 6: Primer.....	18
Tabelle 7: siRNA.....	19
Tabelle 8: Primäre Antikörper.....	19
Tabelle 9: Sekundäre Antikörper.....	20
Tabelle 10: Isotypkontrollen.....	20
Tabelle 11: Software.....	21
Tabelle 12: Beispielansatz der siRNA-Transfektion für eine Kammer einer 6-Kammer-Platte.....	23
Tabelle 13: Pipettierschema für ein 10%-Acrylamid-Gel.....	26
Tabelle 14: Mastermix qRT-PCR.....	28
Tabelle 15: Schema qRT-PCR-Reaktion.....	29

Abkürzungsverzeichnis

ADF	Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung
Aqua dest.	<i>aqua destillata</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CRISPR/Cas 9	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISP-associated gene 9</i>
CT Wert	<i>cycle threshold</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EMEM	<i>Eagle's minimum essential medium</i>
ET-1	Endothelin-1
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
GvH	<i>graft versus host</i>
HKG	<i>housekeeping gene</i>
IKK	I κ B-Kinase
I κ B	<i>inhibitor of kappa B</i>
Kollagen 1	Kollagen Typ 1
NF- κ B	<i>nuclear factor "kappa light chain enhancer" of activated B-cells</i>
PAI-1	<i>plasminogen-activator inhibitor-1</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
Rel.	Relatives
RHD	<i>Rel homology domain</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rounds per minute</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfa)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline-Tween®</i>
TGF β	<i>transforming growth factor beta</i>
TIMP-1	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
α SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>

1 Einleitung

1.1 Die Homöostase der Haut

Das größte Organ des Menschen ist die Haut (Held et al. 2016). Sie ist die Schutzbarriere des Körpers vor Krankheitserregern, UV-Strahlung und anderen Umwelteinflüssen (Fritsch 2009). Sie setzt sich aus Epidermis, Dermis und Subkutis zusammen, wobei erstere ein verhorntes Plattenepithel ist und zu ~90% aus Keratinozyten besteht (Fritsch 2009; Held et al. 2016). Die Dermis, die vor allem aus Extrazellulärer Matrix (EZM) und Fibroblasten besteht, wird in die papillare und retikuläre Dermis unterteilt. Die papillare Dermis enthält Kapillaren, welche postkapillar zu Venolen werden und die Epidermis über Diffusion ernähren. Die retikuläre Dermis ist im Gegensatz zur papillaren Dermis deutlich dicker und enthält mehr EZM-Proteine (Sorrell und Caplan 2004).

1.1.1 Aufbau der Dermis: Dermale Fibroblasten und Extrazelluläre Matrix

Die EZM sorgt nicht nur passiv für die Struktur der Dermis, sondern ist auch in der Lage, aktiv Proliferation, Funktionen und Überleben von Zellen zu beeinflussen (Frantz et al. 2010). In gesunder Haut sind Fibroblasten essentiell für die Produktion von EZM-Bestandteilen und damit für die Aufrechterhaltung der Gewebhomöostase zuständig (McAnulty 2007; Sorrell und Caplan 2004). Den Hauptbestandteil der EZM bildet Kollagen, vorwiegend Kollagen Typ I (Kollagen I); sie beinhaltet aber auch andere Kollagentypen wie beispielsweise Kollagen Typ III, IV, VI und XII (Krieg und Aumailley 2011). Die beiden α -Ketten des Kollagen I werden von den Genen *COL1A1* und *COL1A2* codiert und von der Zelle sezerniert. Extrazellulär setzen sich drei α -Ketten als prozessierte Triple-Helices zum fibrillären Kollagen I zusammen (Krieg und Aumailley 2011).

Weitere Bestandteile der EZM sind Fibronectin, Elastin, Proteoglykane und Glykoaminoglykane (Frantz et al. 2010; Tracy et al. 2016). Neu synthetisierte EZM-Proteine werden in die vorhandene EZM eingebettet und verankert (Krieg und Aumailley 2011).

Zur Aufrechterhaltung der gesunden Dermis gehört neben der EZM-Produktion auch deren enzymatischer Abbau, für den Matrix-Metalloproteinasen essentiell sind. Matrix-Metalloproteinasen regulieren das homöostatische Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der EZM (McAnulty 2007; Tracy et al. 2016).

1.1.2 Fibrose und Myofibroblasten

Während eine temporäre Fibrose physiologisch bei der Wundheilung wichtig ist, führen viele chronische Entzündungen im menschlichen Körper zu einer persistierenden pathologischen Fibrose (Wynn und Ramalingam 2012). Die systemische Sklerose (Sklerodermie) ist eine von Fibrose geprägte Erkrankung (Eckes et al. 2014).

Wird die Integrität der Haut gestört, wie bei einer Wunde, so wird sie durch den komplexen Prozess der Wundheilung wiederhergestellt. Nach der Blutstillung und Synthese von Granulationsgewebe werden unter anderem Fibroblasten aus der umgebenden Dermis durch Zyto- und Chemokine, wie *transforming growth factor beta* (TGF β), zur Wunde rekrutiert. Beeinflusst von der mechanischen Spannung der Wunde differenzieren sie über einen Transitionsstatus, die sogenannten Proto-Myofibroblasten, zu Myofibroblasten (Barrientos et al. 2008; Evans et al. 2013; Gerarduzzi und Di Battista 2017) (Abbildung 1). Proto-Myofibroblasten exprimieren vermehrt EZM-Proteine und üben durch ihr kontraktiles Aktin-Zytoskelett mechanische Spannung auf die EZM aus (Hinz 2007; Tomasek et al. 2002).

Die Kombination aus mechanischer Spannung und TGF β -Stimulation führt zu weiterer Ausdifferenzierung zu Myofibroblasten. Diese sind durch die De-novo-Synthese von *alpha smooth muscle actin* (α SMA), die Ausreifung fokaler Adhäsionskontakte sowie TGF β -Expression charakterisiert (Dabiri et al. 2006; Hinz et al. 2003; Tomasek et al. 2002). Das neu synthetisierte α SMA, eine ausschließlich in den Zellen der glatten Muskulatur vorkommende Aktin-Isoform, wird in die intrazellulären Aktin-Fasern integriert (Skalli et al. 1989). Dadurch wird die Kontraktilität der Myofibroblasten erheblich verstärkt.

Myofibroblasten sind aktiv an der Wundkontraktion beteiligt (Hinz et al. 2001b). Die Kombination aus TGF β und Kontraktion bewirkt eine positive Rückkopplung und es kommt zu vermehrter Myofibroblasten-Differenzierung (Dabiri et al. 2006; Gerarduzzi und Di Battista 2017).

Sobald ausreichend EZM-Proteine („Narbengewebe“) synthetisiert wurden, lässt der mechanische Stress auf die Myofibroblasten nach (Hinz 2007). Infolgedessen wird die positive Rückkopplung unterbrochen und die Zahl der Myofibroblasten wird durch Apoptose-Induktion (Carlson et al. 2003; Grinnell et al. 1999; Niland et al. 2001) sowie möglicherweise durch Re-Differenzierung in einen inaktiven Phänotyp reduziert (Driesen et al. 2014; Gerarduzzi und Di Battista 2017). Parallel zur EZM-Synthese erfolgt die Re-Epithelisierung durch eingewanderte Keratinozyten (Takeo et al. 2015). Den Abschluss der Wundheilung bilden die Anordnung und Vernetzung der neu synthetisierten EZM-Proteine in ein organisiertes und möglichst funktionsfähiges Gewebe (Diegelmann und Evans 2004).

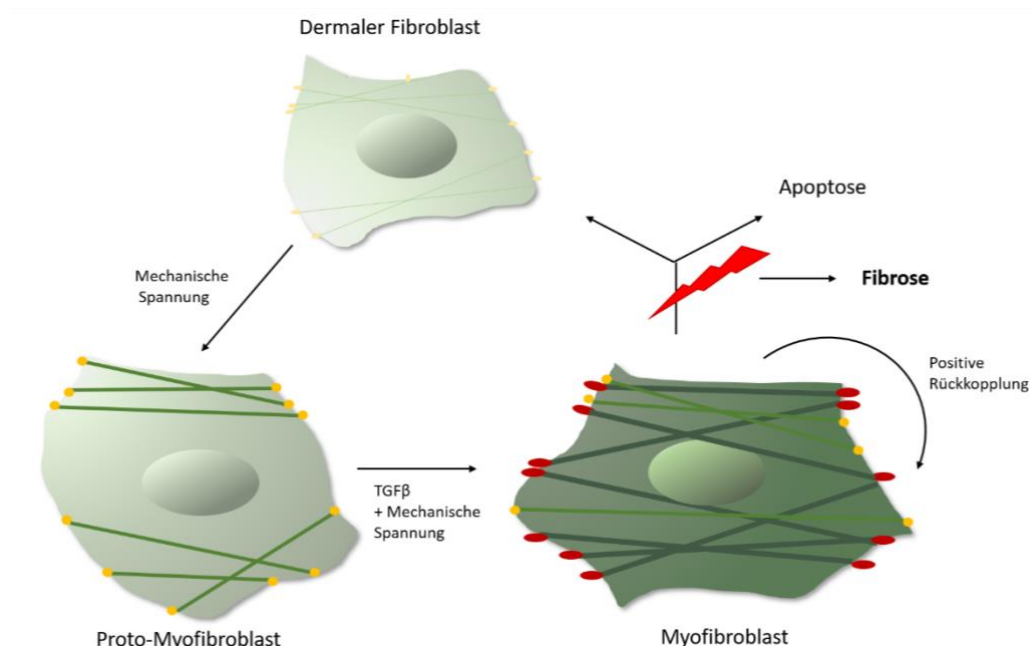


Abbildung 1: Differenzierung dermyofibroblasten zu Myofibroblasten

Durch mechanische Spannung erfolgt die Differenzierung dermyofibroblasten (blassgrün, oben), die über Adhäsionsrezeptoren (gelb) mit den Fasern der EZM verbunden sind, zu Proto-Myofibroblasten (links unten). Diese zeichnen sich durch die Bündelung der Aktinfilamente des Zytoskeletts zu sogenannten Stressfasern (grüne Linien) sowie beginnender fokaler Adhäsionsreifung (orange) aus. Durch weiteren mechanischen Stress und zusätzliche Zytokinstimulation (TGFβ) differenzieren die Proto-Myofibroblasten zu Myofibroblasten (unten rechts). Myofibroblasten sind durch De-novo-Synthese von α SMA (dargestellt durch die dickeren, dunkleren Linien in der Zelle) und die Ausreifung fokaler Adhäsionskontakte (rot) charakterisiert. Die Myofibroblasten erfahren eine positive Rückkopplung durch die von ihnen erzeugte mechanische Spannung sowie ebenfalls von ihnen synthetisiertes TGFβ (runder Pfeil). In der physiologischen Wundheilung reduziert sich das Vorkommen der Myofibroblasten nach Abschluss der Wundheilung durch Apoptose (rechter Pfeil) oder Re-Differenzierung in einen inaktiven Phänotyp (linker Pfeil zu Fibroblasten). Der rote Blitz markiert den Übergang in die pathologische Fibrose, bei der das Vorkommen der Myofibroblasten persistent ist.

Im Gegensatz zur Wundheilung ist bei der „pathologischen Fibrose“ die Differenzierung von Myofibroblasten erhöht und deren Vorkommen permanent. Die übermäßige, persistierende EZM-Produktion bedingt im Fall der dermalen Fibrose eine Zunahme der Dermisdicke (Luzina und Atamas 2008) sowie eine Reduktion der Dermiselastizität (Tomasek et al. 2002). Die physiologische Struktur und Funktionalität der gesamten Haut werden zerstört; dies führt zum klinischen Bild der Fibrose (Gerarduzzi und Di Battista 2017).

Unkontrollierte positive Rückkopplung scheint für die permanente Aktivierung von Myofibroblasten verantwortlich zu sein (Bechtel et al. 2010). Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass aus sklerotischer Haut kultivierte Myofibroblasten ihre Charakteristika ohne zusätzliche Stimuli behalten (LeRoy 1974). Eine dysregulierte Fas-L-induzierte Apoptose wurde ebenfalls in Zusammenhang mit dem permanenten Myofibroblasten-Vorkommen gebracht

(Maheret al. 2010). Dennoch wurde der Ursprung der persistenten Myofibroblasten-Aktivierung bisher nicht abschließend geklärt.

1.2 Systemische Sklerodermie

1.2.1 Allgemeines, Epidemiologie und Pathogenese

Die systemische Sklerodermie ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung. Durch die bereits erwähnte Myofibroblasten-Aktivierung mit übermäßiger EZM-Produktion führt sie zur Fibrosierung der Haut und innerer Organe. Obwohl viele Organe von der systemischen Sklerodermie betroffen sein können, imponiert sie klinisch zuerst in der Haut (Eckes et al. 2014). Ein durch Fibrose bedingter Funktionsverlust des jeweils betroffenen Organs kann lebensbedrohlich sein (Yanaba 2016). Bis heute existiert keine kurative Behandlung für diese Erkrankung (Eckes et al. 2014; Yanaba 2016).

Die systemische Sklerodermie weist eine Prävalenz von ca. 100-200 Erkrankten pro eine Million Einwohner in Deutschland auf (Chiffot et al. 2008; Hunzelmann 2013). Das Krankheitsbild ist variabel und die Fünf-Jahres-Überlebensrate hängt maßgeblich von der Organbeteiligung ab (Hunzelmann und Krieg 2012).

Die Ätiologie der systemischen Sklerodermie ist nicht bekannt. Mit der Entstehung der Erkrankung werden verschiedene Faktoren, wie genetische Prädisposition, bakterielle und virale Infektionen sowie Umwelteinflüsse in Verbindung gebracht (Viswanath et al. 2013).

Das aktuelle Pathogenesemodell favorisiert teilweise überlappende Phasen: Mikrovaskuläre Schäden markieren den Beginn der Erkrankung. Die dadurch induzierten Zyto- und Chemokine tragen zum Umbau der Gefäße bei, was zur Störung der Blutzirkulation in den Kapillaren und zur Nekrose des minderversorgten Gewebes führt (Eckes et al. 2014; Viswanath et al. 2013). Dies wiederum löst eine entzündliche Reaktion aus. Dabei freigesetzte Zytokine, wie TGF β , *connective tissue growth factor* (CTGF) und *platelet derived growth factor* (PDGF) (Barrientos et al. 2008; Cozzani et al. 2013), aktivieren Fibroblasten und induzieren deren Differenzierung zu Myofibroblasten (Eckes et al. 2014).

1.2.2 Klassifikation, Symptome und Therapie der Sklerodermie

Die systemische Sklerodermie wird zumeist in zwei Formen unterteilt: die limitierte *limited cutaneous systemic sclerosis* und die diffuse *diffuse cutaneous systemic sclerosis* (Hunzelmann 2013; Yanaba 2016). Gemeinsam ist beiden die der Fibrose oft jahrelang vorausgehende Raynaud

Symptomatik, eine anfallsartige zeitweise Minderdurchblutung akraler Kapillaren (Hunzelmann 2013; Thompson et al. 2001).

Die limitierte Form verläuft langsam progredient und die Fibrosierung betrifft vor allem die distalen Teile der Gliedmaßen bis zu Ellenbogen und Knien sowie das Gesicht. Die diffuse Form der systemischen Sklerodermie ist rasch progredient. Sie breitet sich auch nach proximal auf den Rumpf des Patienten aus (Hunzelmann 2013).

Da es bis heute es keine kurative Therapie der systemischen Sklerodermie gibt, orientiert sich die Behandlung an den betroffenen Organen unter anderem durch Suppression der Autoimmunreaktion mittels Immunsuppressiva wie Mycophenolat-Mofetil, Methotrexat, Glukokortikosteroide und Cyclophosphamid (Denton et al. 2016; Yanaba 2016). Neuerdings werden außerdem anti-fibrotische Therapieansätze verfolgt, die gezielt die Aktivierung von Fibroblasten supprimieren und die Re-Differenzierung/Apoptose von Myofibroblasten induzieren sollen. Ein aktueller Ansatz ist beispielsweise die Verhinderung der TGF β -vermittelten Myofibroblasten-Differenzierung (Distler et al. 2017; Wynn und Ramalingam 2012).

Da die genannten Strategien noch keine befriedigende Lösung bieten (Distler et al. 2017), ist die Identifizierung weiterer involvierter Signalwege und deren Liganden als therapeutische Angriffspunkte wichtig.

1.3 Das Zytokin *transforming growth factor beta* (TGF β) und seine Funktion in der Haut

TGF β spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen Prozessen. Es sind drei TGF β Isoformen (I, II, III) bekannt, die zunächst inaktiv im extrazellulären Raum als große Pro-Peptidmoleküle vorliegen und durch unterschiedliche physikalische und chemische Faktoren, wie UV-Strahlung, pH-Wert-Veränderungen und mechanischen Stress, aktiviert werden (Robertson und Rifkin 2016; Wipff et al. 2007).

1.3.1 Smad-abhängiger TGF β -Signalweg

Als Ligand bindet TGF β 1 an den TGF β -Rezeptor 2, welcher daraufhin mit dem TGF β -Rezeptor 1 dimerisiert (Ramirez et al. 2014). Dieses Heterodimer phosphoryliert über eine Serin/Threonin-Kinase die inaktiv im Zytoplasma liegenden Smad-Proteine 2 oder 3, bei denen es sich um Transkriptionsfaktoren handelt (Massagué 1998). Das so aktivierte Smad-Protein bildet daraufhin mit Smad 4 ein Heterodimer, das in den Nukleus transloziert. Dort induziert es die Transkription einer Vielzahl fibroseassoziiertes Gene, wie α SMA, *plasminogen-activator*

inhibitor-1 (PAI-1), CTGF und Endothelin 1 (ET-1) (Eckes et al. 2014; Rodríguez-Pascual et al. 2004). Ebenso werden die Smad-Proteine 6 und 7 transkribiert, die als negative Regulatoren des Smad Signalwegs fungieren (Ramirez et al. 2014; Shi und Massagué 2003) (Abbildung 2).

Neben der Aktivierung des Smad-Signalwegs stimuliert TGF β auch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (ERK, p38, JNK) und Rho-ähnliche GTPasen (Abbildung 2), die ebenfalls an der Remodellierung des Zytoskeletts beteiligt sind (Derynck und Zhang 2003; Zhang 2009).

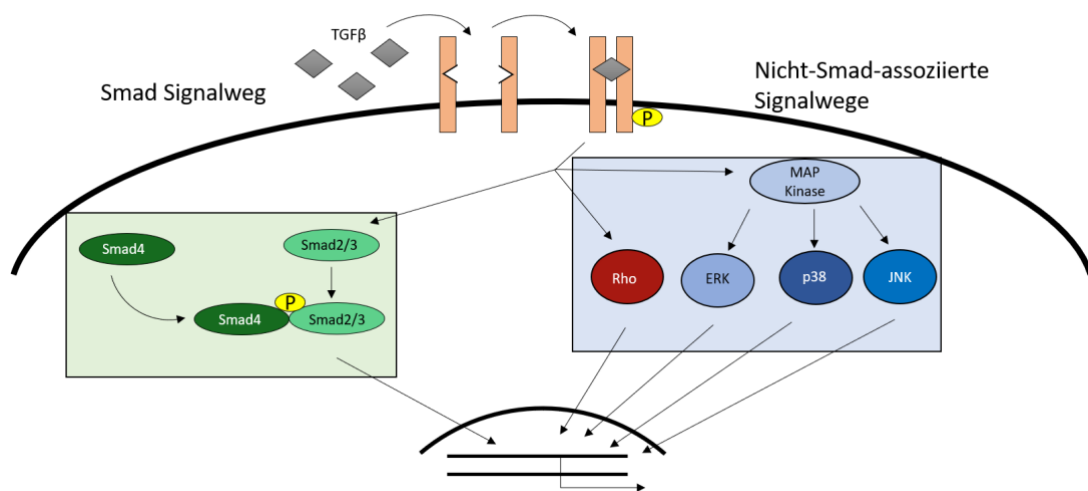


Abbildung 2: TGF β -assoziierte Signalwege

TGF β (graue Rauten) bindet als Ligand an den TGF β -Rezeptor II (orange), der daraufhin mit dem TGF β -Rezeptor I dimerisiert (orange) und phosphoryliert wird (gelb). Dadurch wird der Smad-Signalweg (hellgrüner Kasten) aktiviert. Die inaktiv im Zytoplasma vorliegenden Smad-Proteine 2/3 werden phosphoryliert und bilden mit Smad 4 ein Oligomer, das in den Nukleus transloziert (schwarzer Halbkreis im unteren Bild) und als Transkriptionsfaktor fungiert (schwarze, parallele Linien symbolisieren die DNA). Dadurch wird die Expression wichtiger Gene für die Homöostase, Wundheilung, aber auch Fibrose induziert (rechteckiger Pfeil aus DNA). Andere von TGF β aktivierte Signalwege (hellblauer Kasten) beinhalten die Rho-Kinase (rot) sowie MAP-Kinasen (blau).

1.3.2 TGF β in der Haut

TGF β hat diverse Funktionen in der Haut und beeinflusst beispielsweise die epidermale Differenzierung (Ito et al. 2001). Widersprüchliche Erkenntnisse gibt es bezüglich seines Einflusses auf die epidermale Homöostase; TGF β wirkt regulatorisch auf den Zellzyklus von Keratinozyten und kann deren Proliferation sowohl inhibieren als auch induzieren (Buschke et al. 2011; Fowles et al. 1996; Gordon und Blobel 2008; Massagué et al. 2000). Von den drei bekannten Isoformen ist besonders TGF β 1 für die Wundheilung wichtig. Es wird unmittelbar nach dem Wundereignis induziert, um die initiale Entzündungsreaktion einzuleiten (Ramirez et al. 2014). TGF β ist sowohl bei der Wundheilung als auch bei der Hautfibrose für Entstehung und Aufrechterhaltung der Fibrose essentiell (Desmoulière et al. 1993; Hinz 2007; Roberts et al. 1986).

1.4 Nuclear factor *kappa light chain enhancer of activated B-cells*

Mitte der 1980er Jahre wurde der Transkriptionsfaktor *Nuclear factor "kappa light chain enhancer" of activated B-cells* (NF- κ B) in B-Lymphozyten beschrieben (Sen und Baltimore 1986). NF- κ B reguliert verschiedene zentrale Prozesse angeborener und die adaptiver Immunantworten, die Apoptose, die Zelldifferenzierung und -proliferation. Es wird auch mit der Tumorgenese oder Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht (Karin et al. 2002); letztere werden unter anderem mit einer veränderten NF- κ B-Aktivität verknüpft (Okamoto 2006).

1.4.1 NF- κ B-Proteinuntereinheiten

Von NF- κ B sind fünf Proteinuntereinheiten bekannt: p105/p50 (NF- κ B 1), p100/p52 (NF- κ B 2), p65 (auch als RelA bekannt), RelB und c-Rel. Allen ist eine „*Rel homology domain*“ (RHD) am N-Terminus gemein. Die RHD vermittelt die Dimerbildung und sequenzspezifische DNA-Bindung (Huxford und Ghosh 2009; Oeckinghaus und Ghosh 2009). RelB, p65 und c-Rel tragen zusätzlich eine C-terminale „*transactivation domain*“ (TAD), welche die Transkriptionsaktivität verstärkt. Die NF- κ B Untereinheiten bilden miteinander Homo- oder Heterodimere, die hauptsächlich inaktiv im Zytoplasma vorliegen. Eine Ausnahme bildet RelB, welches ausschließlich in Heterodimeren auftritt (Huxford und Ghosh 2009).

1.4.2 Signalwege

Die hauptsächlichlichen Signalwege sind der kanonische (klassische) sowie der nicht-kanonische (alternative) Signalweg. Zu den beim kanonischen Signalweg aktivierten NF- κ B-Proteinuntereinheiten zählen c-Rel, p65 und p50. Bindet ein Ligand wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) an seinen Rezeptor (Osborn et al. 1989) wird dadurch der trimere „Inhibitor von κ B alpha“ (I κ B)-Kinase (IKK) Komplex (IKK α , IKK β und *NF- κ B essential modulator* (NEMO)) aktiviert. Der IKK Komplex wiederum bewirkt eine Polyubiquitinierung des I κ B, welcher anschließend proteasomal abgebaut wird (Karin und Ben-Neriah 2000). Das freigegebene Dimer transloziert daraufhin in den Nukleus und fungiert dort als Transkriptionsfaktor (Gilmore 2006) (Abbildung 3).

Der alternative Signalweg ist bisher hauptsächlich mit der B- und T- Zell-Entwicklung assoziiert und die Induktion erfolgt über Liganden wie CD40, Lymphotoxin beta und *B-cell activating factor* (BAFF) (Perkins 2006). Besonders das Heterodimer aus RelB und p52 wird vom alternativen Signalweg aktiviert (Sun 2012) (Abbildung 3).

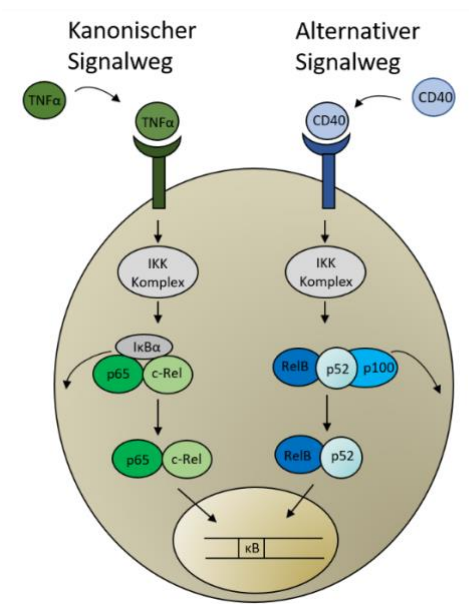


Abbildung 3: NF-κB-assoziierte Signalwege

Vereinfachtes Schema für die beiden hauptsächlichsten NF-κB-Signalwege. Der kanonische Weg (grün) nutzt die NF-κB-Proteinuntereinheiten c-Rel, p65 und p50. Bindet ein Ligand wie TNFα an seinen Rezeptor, so wird das inaktiv im Zytoplasma vorliegende Dimer aktiviert, indem der „Inhibitor von kappa B“ proteasomal abgebaut wird. NF-κB transloziert daraufhin in den Nucleus (beiger Kreis), um dort als Transkriptionsfaktor an die DNA (parallele Linien) zu binden. Der alternative Signalweg (blau) aktiviert unter anderem über CD40 das aus RelB und p52 (p100 als inaktive Vorläuferform) bestehende Dimer.

1.4.3 NF-κB in der Haut

NF-κB ist ein wichtiger Regulator der Homöostase in verschiedenen Organen (Perkins und Gilmore 2006). In der Haut beeinflusst NF-κB die Proliferation und Apoptose sowie die Induktion entzündlicher Prozesse (Hinata et al. 2003).

Vorausgegangene Untersuchungen beschäftigten sich mit Zelltyp-spezifischen Wirkungen von NF-κB in der Haut. In epidermalen Keratinozyten wurde die Proliferation durch Überexpression von p65, p50 (Seitz et al. 1998) sowie c-Rel, RelB und p52 inhibiert (Hinata et al. 2003), wogegen die Überexpression aller fünf NF-κB-Untereinheiten die Proliferation dermalen Fibroblasten nicht beeinträchtigte (Hinata et al. 2003). Ein Proliferationsarrest der Fibroblasten wurde hingegen durch Inhibition von NF-κB und der damit resultierenden, fehlenden Cyclin D1-Induktion erzielt (Guttridge et al. 1999; Hinz et al. 1999).

Die einzelnen NF-κB-Untereinheiten haben vielfältige Funktionen, beispielsweise in der Ontogenese und Homöostase gesunder Haut, wie sich in Studien mit *Knockout*-Mäusen zeigte. Eine starke Dermatitis mit Haarausfall und verdickter Hornschicht (Hyperkeratose) entwickelten beispielsweise *RelB* *-/-*-Mäuse (Barton et al. 2000). Bei *p52* *-/-*-Mäusen wurden dagegen keine offensichtlichen Hautläsionen beschrieben (Franzoso et al. 1998). Die Epidermis

von p50 $-/-$ und *c-Rel* $-/-$ -Mäusen war dünner und exprimierte weniger *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) (Fullard et al. 2013). Ein Effekt von c-Rel auf die Proliferation mit Implikationen für den Zellzyklus zeigte sich auch in humanen Keratinozyten: Die c-Rel-Suppression in Keratinozyten führte zu reduzierter Proliferation und veränderter Zellzyklusphasenverteilung (Lorenz et al. 2014).

1.4.4 NF- κ B bei Fibrose und systemischer Sklerodermie

Einzelne NF- κ B-Untereinheiten konnten bereits mit systemischer Sklerodermie und Fibrose assoziiert werden. So wurde erhöhte p65-Expression in sklerotischen Fibroblasten identifiziert und die Kollagen I-Synthese wurde in diesen Zellen durch p65-Überexpression verstärkt (Beauchef et al. 2012). Auch bei Mäusen mit Bleomycin induzierter Fibrose wurde eine verstärkte p65-Expression beobachtet (Koca et al. 2012). Der Einzelnukleotid-Polymorphismus *rs1598859* im Intron von p50 konnte in einer genomweiten Assoziationsstudie zudem als Risikofaktor für die systemische Sklerodermie identifiziert werden (Martin et al. 2012).

Eine besondere Rolle bei Fibrose und systemischer Sklerodermie kommt allerdings der Untereinheit c-Rel zu:

Bei der fibrosierenden *graft versus host* (GvH)-Reaktion wurde gezeigt, dass *c-Rel* $-/-$ T-Zellen in ihrer Fähigkeit, eine akute GvH-Reaktion auszulösen, eingeschränkt waren. (Yu et al. 2013). *C-Rel* $-/-$ -Mäuse waren zudem vor induzierter hepatischer und kardialer Fibrose geschützt (Gaspar-Pereira et al. 2012; Gieling et al. 2010). Fullard *et al.* zeigten, dass ein c-Rel Verlust bei Mäusen die Bleomycin induzierte Hautfibrose verhindert (Fullard et al. 2013). In *c-Rel* $-/-$ -Mäusen war außerdem die Genexpression von *COL1A2* (Gen für Kollagen 1), *tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (*TIMP-1*) und TGF β 1 erniedrigt (Fullard et al. 2013). Die Rolle von c-Rel bei zellulären Mechanismen der Fibrose ist allerdings noch unbekannt.

1.5 Ziel des Projekts

NF- κ B und seine Untereinheiten wurden im Kontext der Fibrose verschiedener Organe beschrieben. Der genaue Einfluss der einzelnen Untereinheiten und Dimere bei der Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten sowie der Myofibroblasten-Differenzierung ist allerdings unbekannt.

Daher zielt dieses Projekt auf die genauere funktionelle Analyse von NF- κ B mit speziellem Fokus auf c-Rel ab. Dabei werden sowohl unstimulierte dermale Fibroblasten als auch aktivierte Fibroblasten, die Myofibroblasten, in einem *in vitro*-Fibrose-Modell untersucht. Die Analysen

umfassen dabei die Expression myofibroblastenassoziierter Marker sowie zellulärer Eigenschaften wie Viabilität, Kontraktilität und zytoskelettale Veränderungen. Dabei steht die Frage im Vordergrund, ob eine NF- κ B Untereinheiten-spezifische Inhibition Grundlage für die Entwicklung einer innovativen Behandlungsstrategie der dermalen Fibrose sein könnte. Dies könnte wichtig für die bisher nicht kurativ behandelbare systemische Sklerodermie sein.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborausüstung

Tabelle 1: Laborgeräte

Laborgeräte	Bezugsquelle
APPLISKAN Platten-Photometer	Thermo Fisher Scientific
Aqua bidest. Wasseranlage arium(R) 611 VF	Sartorius Stedim Biotech
Autoklav	Sanyo
CO ₂ Inkubator HeraCell 150i	Thermo Fisher Scientific
Elektrophorese Spannungsquelle EPS 1001	Amersham Biosciences
Elektrophoresekammer Sub-cell	Bio-Rad Laboratories
Feinwaage Acculab ALC	Satorius Group
Feinwaage Acculab Vicon	Satorius Group
FlexCycler Thermozykler	Analytik Jena
Genesys 10 Bio (Photometer)	Thermo Fisher Scientific
Heizblock Thermostat Plus	Eppendorf
IKA R MS1 Mini Schüttler	Sigma-Aldrich/ Merck
Kamera Cool Snap	Roper Scientific Photometrics
Kühlschränke 4°C,-20°C,-80°C	Liebherr, Privileg
Bildanalysestystem LAS 4000	Fujifilm
Magnetrührplatte (<i>Stirrer</i>)	VWR
Membran-Vakuumpumpe	vacuubrand
Mikroskop AXIO Imager.M1	Carl Zeiss AG
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss AG
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG
Mikrozentrifuge Galaxy Mini Star	VWR

Laborgeräte	Bezugsquelle
Mikrozentrifuge Sprout	Biozym Scientific
Mini Protean ® Käbme 1mm (10 Well; 15 Well)	Bio-Rad Laboratories
Pipetboy	Integra Biosciences
Pipetten	Eppendorf, Starlab International
Protean ® 3 Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories
Protean ® 3 System zur Gelherstellung:	Bio-Rad Laboratories
Glasplatten, Deckplatten, Klammern, Halter	
Schüttler Polymax 1040	Heidolph
Schüttler See Saw Rocker SSL4	Stuart
Spannungsquelle Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories
Thermozykler Quant Studio 5	Thermo Fisher Scientific
Thermomixer	Eppendorf
Tissuelyser LT	Qiagen
TransBlot Semi Dry Transfer Cell (Blotter)	Bio-Rad Laboratories
Tray Cell (Mikro Messzelle)	Hellma
Vortex Mixer VELP Scientifica	Starlab International
Vortex Mixer L46	Labinco
Wasserbad	Memmert
Zellkulturbank HeraSafe	Kendro Laboratory Products
Zellkulturbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Heraeus Multifuge 1S-12	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Heraeus Multifuge 1S-R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Heraeus PICO 17	Thermo Fisher Scientific

Laborgeräte	Bezugsquelle
Zentrifuge Sprout Mini	Biozym Scientific

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
384-Well PCR-Platte	Starlab International
6-Well, 24-Well, 96-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio One
Einfrierröhrchen (1 ml)	Greiner Bio One
Kultur-Kammern (<i>culture slides</i>)	Falcon/ Corning
Deckgläschen	Menzel-Gläser
Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio One
Filterpapier Whatman™	GE Healthcare Life Sciences
Glaspipetten steril (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Kanüle 20G BD Microlane 3	Becton Dickinson
Kimtech Science Delicate Task Tücher	Kimberly-Clark Professional
Küvetten	Sarstedt
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik Ltd
Nitrozellulose Membran 0,45 µm	Bio-Rad Laboratories
Omnifix 20 ml LuerLock Solo Spritzen	B.Braun
Parafilm®	Bemis
Pasteurpipetten	Carl Roth
PCR SingleCap 8er-Soft Strips 0,2 ml Reaktionsgefäße	Biozym Scientific
Pipettenspitzen	Eppendorf und Starlab International
Reaktionsgefäß (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Eppendorf

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Spritze Injekt-F	B.Braun
StarSeal Advanced Polyolefin Film	Starlab International
Sterile Filteraufsätze Filtropur S plus 0,2	Sarstedt
TechnoCut Skalpell	HMD Healthcare
TipOne Filter Pipetten 10 µl,100 µl,1000 µl	Starlab International
Transferpipetten	Eppendorf und Brand
Vernichtungsbeutel	Sarstedt
Zellkulturflaschen T75	Greiner Bio One
Zellschaber 25 cm	Sarstedt

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie/ Reagenz	Bezugsquelle
30%-Acrylamid/Bis-Acrylamid	Bio-Rad Laboratories
Aceton	Carl Roth
Ammonium Persulfat (APS)	Thermo Fisher Scientific
Bovine Gamma Globulin Component 1-7	Thermo Fisher Scientific
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich/ Merck
Bromphenolblau	LKB Bromma
Complete Tablets 7x Mini (Proteaseinhibitor)	Roche
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich/ Merck
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Fluoreszierendes Mounting Medium	Dako
Glycin	Serva
Isopropanol	Nalgene

Chemikalie/ Reagenz	Bezugsquelle
Kollagen I aus Rattenschwänzen	Thermo Fisher Scientific
Luminol	Sigma-Aldrich/ Merck
Magermilchpulver („Blockmilch“ Pulver)	Bio-Rad Laboratories
Methanol	Merck
NaCl	Carl Roth
Natriumdesoxycholat	Merck
Natronlauge	Carl Roth
Nonidet® P-40	USB
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich/ Merck
PageRuler™ Prestained Protein Leiter	Thermo Fisher Scientific
Ponceau S	Sigma-Aldrich/ Merck
Protein Assay Farbstoffreagenzkonzentrat (Bradford Reagenz)	Bio-Rad Laboratories
Restore™ WesternBlot Stripping Puffer	Thermo Fisher Scientific
RNase Away (Oberflächendekontamination)	Molecular Bio Products
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS, Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth
Spectra™ Multicolor High Range Protein Leiter	Fermentas
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich/ Merck
Tris-Salzsäure (Tris-HCL)	Carl Roth
Tris Puffer	Carl Roth
Triton X 100	Merck
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich/ Merck
Tween® 20	Carl Roth
Ultra Pure 0,5 M EDTA, pH 8,0	Thermo Fisher Scientific
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth
Zitronensäure	Carl Roth

2.1.4 Lösungen und Puffer

RIPA-Lysispuffer

50 mM Tris-HCL, pH 7,4
1% Nonidet® P-40
0,5% Natriumdesoxycholat
0,1% SDS
150mM NaCl
2mM EDTA

ECL Lösungen

Lösung 1

1 mM Tris-HCL, pH 8,5
0,4 mM p-Cumarsäure
2,5 nM Luminol

Lösung 2

100 mM Tris-HCL, pH 8,5
0,018% Wasserstoffperoxid

Transferpuffer

48 mM Tris
39 mM Glycin
200 ml Methanol
0,0375% SDS

Ponceau S Lösung

0,1% Ponceau S
5% Essigsäure

Laufpuffer, 10fach

1,92 M Glycin

250 mM Tris

5% SDS

SDS-Probenpuffer, 5fach

200 mM TRIS, pH 6,8

4% SDS

40% Glycerol

0,07% Bromphenolblau

TBS-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 7,0

1 mM EDTA pH 8,0

150 nM NaCl

0,05% Tween® 20

2.1.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Tabelle 4: Reaktionssystem (*Kit*)

Reaktionssystem (<i>Kit</i>)	Bezugsquelle
CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT)	Promega
innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena
Nuclear Extraction Kit (Subzelluläre Lysate)	Panomics
SuperScript™ IV cDNA Synthese	Thermo Fisher Scientific

2.1.6 Zellkultur-Reagenzien und Medium

Tabelle 5: Zellkultur-Reagenzien

Produkt	Bezugsquelle
DPBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Lonza
Einfriermedium CryoSFM	PromoCell
EMEM	Lonza
FCS (Fetales Kälber Serum)	Biochrome
L-Glutamin	Lonza
TGFβ1 (Rekombinantes humanes Protein)	Thermo Fisher Scientific
Trypsin	Lonza

2.1.7 Oligonukleotide

2.1.7.1 Primer

Tabelle 6: Primer

Gen/Name	<i>Forward Primer</i>	Größe	Bezugsquelle
	<i>Reverse Primer</i>		
Anchored Oligo(dT)₂₀	PM-305	-	Jena Bioscience
αSMA	<u>5'-CGTGGGTGACGAAGCACAG-3'</u>	151 bp	Sigma-Aldrich/ Merck
	5'-GGTGGGATGCTCTTCAGGG-3'		
c-Rel	QuantiTec-QT00052472	117 bp	Qiagen
COL1A1	<u>5'-GCTCCTGCTCCTCTTAGCG-3'</u>	108 bp	Sigma-Aldrich/ Merck
	5'-CCGTTCTGTACGCAGGTGAT-3'		
CTGF	<u>5'-CTCGCGGCTTACCGACTG -3'</u>	72 bp	Sigma-Aldrich/ Merck
	5'-GGCTCTGCTTCTCTAGCCTG -3'		
ET-1	<u>5'-GCTCCAGAAACAGTCTTAGGC -3'</u>	169 bp	Sigma-Aldrich/ Merck
	5'-ACTGGGAGTGGGTTTCTCCC -3'		
GAPDH	QuantiTec - QT00079247	95 bp	Qiagen
p50 (NF-κB1)	<u>5'-CACTTAGCAATCATCCACCTT-3'</u>	171 bp	Eurofins MWG Operon
	5'-AGCCCTCAGCAAATCCT-3'		
p52 (NF-κB2)	<u>5'-GGGGCATCAAACCTGAAGATTTCT-3'</u>	202 bp	Eurofins MWG Operon
	5'-TCCGGAACACAATGGCATACTGT-3'		

Gen/Name	<i>Forward Primer</i>	Größe	Bezugsquelle
	<i>Reverse Primer</i>		
p65 (RelA)	QuantiTec-QT02324308	136 bp	Qiagen
PAI-1	$\frac{5' - CTCCTCTCTGCCCTCACCAAC - 3'}{5' - GTGGAGAGGGCTCTTGGTCTG - 3'}$	212 bp	Eurofins MWG Operon
RelB	QuantiTec-QT00038640	113 bp	Qiagen
RNA-Polymerase	$\frac{5' - GGAGATTGAGTCCAAGTTCA - 3'}{5' - GCAGACACACCAGCATAGT - 3'}$	115 bp	Sigma-Aldrich/ Merck

2.1.8 siRNA

Alle in Tabelle 7 enthaltenen Produkte stammen von der Bezugsquelle Qiagen

Tabelle 7: siRNA

Name	Produktname	Zielsequenz
Control siRNA	AllStars neg. Control siRNA	Nicht angegeben
c-Rel-siRNA I	Hs_Rel_1	5'-CCGGTGCGTATAACCCGTATA-3'
c-Rel-siRNA II	Hs_Rel_6	5'-CAGGCGCCAATTCCAATACTA-3'

2.1.9 Antikörper

2.1.9.1 Primäre Antikörper

Tabelle 8: Primäre Antikörper

Primärer Antikörper	Bezugsquelle
α SMA	Abcam
c-Rel	CellSignaling Technology
GAPDH	CellSignaling Technology
Kollagen1	Santa Cruz Biotechnology
N-Cadherin	Takara Bio
P50 (NF- κ B1)	Abcam
P52 (NF- κ B2)	CellSignaling Technology

Primärer Antikörper	Bezugsquelle
P65 (RelA)	CellSignaling Technology
PAI-1	Santa Cruz Biotechnology
pSmad 3	Abcam
RelB	CellSignaling Technology
SM22 α	Abcam
Smad 3	CellSignaling Technology
Vinculin	Sigma-Aldrich/ Merck

2.1.9.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper

Sekundärer Antikörper	Bezugsquelle
Alexa Fluor 488 Konjugat	Cell Signaling Technology
Alexa Fluor® 555 Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific
Anti-Maus IgG (H+L), HRP Konjugat	Promega
Anti-Kaninchen IgG (H+L), HRP Konjugat	Promega

2.1.9.3 Isotypkontrollen

Tabelle 10: Isotypkontrollen

Isotypkontrolle	Bezugsquelle
Kaninchen IgG Isotypkontrolle	Thermo Fisher Scientific
Maus IgG1 Isotypkontrolle	Thermo Fisher Scientific

2.1.10 Software

Tabelle 11: Software

Software	Bezugsquelle
AxioVision Rel 4.7.1	Carl Zeiss AG
ImageJ 1.51	National Institutes of Health
LAS 4000 Imaging System	Fujifilm
MAC OS High Sierra	Apple Inc.
Metamorph 6.3r2	Molecular Devices
Microsoft Office 2016	Microsoft
REST Software	Pfaffl, Qiagen
QuantStudio™ Design & Analysis Software	Thermo Fisher Scientific

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zellkultivierung

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen handelt es sich um die Fibroblasten-Zelllinie BJ (ATCC® CRL-2522™). Diese wurde aus der Vorhaut eines Neugeborenen etabliert. Die BJ-Fibroblasten wurden maximal bis Passage 14 verwendet.

BJ-Zellen wurden in „*Eagle's minimum essential medium*“ (EMEM) inklusive 10% Fetales Kälber Serum (FCS) und 1% L-Glutamin (=EMEM-Wachstumsmedium) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Mykoplasmenkontaminationen wurden durch regelmäßige Untersuchungen mittels PCR ausgeschlossen.

2.2.1.2 Zellpassagen

Bei einer Konfluenz von etwa 95% wurden die Zellen passagiert. Dazu erfolgte eine Waschung mit 5 ml PBS und eine anschließende Zugabe von 2 ml Trypsin mit vierminütiger Inkubation bei 37°C. Bei einer Ablösung von etwa 90% der Zellen wurde die Reaktion mit 5 ml EMEM-Wachstumsmedium gestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsröhrchen überführt. Bei 1200 rpm (*rounds per minute*) wurde die Suspension für 3 min zentrifugiert und danach der Überstand abgesaugt. Das verbliebene Zellsediment wurde in 10 ml EMEM-

Wachstumsmedium re-suspendiert und weiter kultiviert oder mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt und für weitere Versuche genutzt.

2.2.1.3 Zellen einfrieren

Zum Einfrieren kultivierter Zellen erfolgte eine Waschung mit 5 ml PBS und eine anschließende Zugabe von 2 ml Trypsin-Lösung mit vierminütiger Inkubation bei 37°C. Die Reaktion wurde mit 5 ml EMEM-Wachstumsmedium gestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Je 20 µl der Zell-Medium Suspension wurden mit 40 µl Trypanblau gemischt und in einer Neubauer Zählkammer die Anzahl der vitalen Zellen bestimmt. Bei 1200 rpm wurde die verbliebene Suspension für 3 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Zellsediment wurde in EMEM/ 6% Einfriermedium re-suspendiert, wobei in 1 ml Suspension 1 Mio. Zellen enthalten waren. Je 1 ml wurde in ein Einfriereröhrchen überführt und stufenweise auf -80°C heruntergekühlt, bevor sie zur Lagerung in flüssigen Stickstoff gegeben wurden.

2.2.1.4 Zellen auftauen

Die Zellen in den Einfriereröhrchen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend in 37°C warmes EMEM-Wachstumsmedium überführt und in einer T75 Zellkulturflasche im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Das alte Medium wurde dazu abgesaugt und anschließend frisches, 37°C warmes Medium hinzugegeben.

2.2.1.5 Zellaussaat

Für Western Blots, *quantitative real time polymerase chain reactions* (qRT-PCRs) und Kollagen-Kontraktions-Experimente wurden jeweils 50 x 10³ Zellen in insgesamt 2 ml EMEM-Wachstumsmedium je Kammer einer Kulturplatte mit 6 Kammern (*6-well plate*) ausgesät.

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden 3 x 10³ Zellen in insgesamt 500 µl Volumen pro Kammer in einem Zellkultur-Objektträger mit 8 Kulturkammern (*8-well culture slide*) ausgesät.

Für MTT-Experimente wurden 5 x 10² Zellen pro Kammer einer 96-Kammer Kulturplatte (*96-well plate*) ausgesät und mit EMEM-Wachstumsmedium auf insgesamt 100 µl Volumen aufgefüllt.

Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel sowie weitere Behandlungen der Zellen.

2.2.1.6 Zellen abschaben

Für Western Blots und qRT-PCRs wurden die Zellen mit kaltem PBS (1 ml, 4°C) gewaschen und umgehend mit 500 µl PBS bedeckt, um sie vor Austrocknung zu schützen. Es erfolgte die

Ablösung der Zellen mit einem Zellschaber. Anschließend wurde die Zell-PBS-Mischung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Um möglichst viele Zellen zu gewinnen, wurde die Kulturkammer erneut mit 500 µl kaltem PBS gespült. Das Reaktionsgefäß wurde direkt auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden die Zellen durch achtminütige Zentrifugation bei 800 x g bei 4°C pelletiert, der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Zellsedimente bei -20°C gelagert.

2.2.2 Stimulation mit TGFβ

Adhärente Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch einmalige Zugabe von *Transforming growth factor beta 1* (TGFβ, 10 ng/ml) ins Medium stimuliert.

Die Stimulationszeitpunkte erfolgten nach Aussaat und einmaligem Mediumwechsel (24 h nach der Aussaat). Die Zellen wurden 72 h, 48 h, 24 h, 10 h, 6 h oder 2 h vor Ablösung stimuliert. In jedem Versuchsaufbau gab es zusätzlich eine unstimulierte Probe (0 h).

2.2.3 siRNA-Transfektion

Je nach Ansatzgröße wurde *small interfering RNA* (siRNA) (20 µM, finale Konzentration 40 nM) und anschließend die entsprechende Menge Promofectin als Transfektionsreagenz in raumwarmes EMEM gegeben und unmittelbar für 10 s geschüttelt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 12: Beispielansatz der siRNA-Transfektion für eine Kammer einer 6-Kammer-Platte

Probe Reagenz	Unbehandelt (1x)	Promofectin (1x)	CTRL- siRNA (1x)	c-Rel- siRNA 1 (1x)	c-Rel- siRNA (1x)	II
EMEM	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	
Promofectin	-	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	
siRNA	-	-	4 µl	4 µl	4 µl	

Im nächsten Schritt wurde die siRNA-Transfektionslösung mit je 2 ml Medium auf die Zellen gegeben und die Zellen bei 37°C für 24 h inkubiert.

Anschließend wurde das Medium abgesaugt und frisches EMEM-Wachstumsmedium hinzugegeben; teilweise erfolgte eine anschließende Stimulation mit TGFβ für weitere 48 h (siehe 2.2.2). Die Analysen fanden 72 h nach der Transfektion statt und beinhalteten die drei

Kontrollansätze „Unbehandelt“, „Promofectin“, „CTRL-siRNA“ sowie die Proben „c-Rel-siRNA I“ und „c-Rel-siRNA II“, die entweder unstimuliert oder für 48 h mit TGF β stimuliert worden waren.

2.2.4 Proteinlysate und Western Blot

2.2.4.1 Proteinlysat mit RIPA-Lysispuffer

Für die Proteinisolation wurden die sedimentierten Zellen zunächst in RIPA-Proteaseinhibitorlösung re-suspendiert, für 30 min auf Eis gestellt und dabei alle 10 min geschüttelt. Im Anschluss wurde das Homogenat für 15 min bei 14000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt oder bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt.

2.2.4.2 Zytoplasma- und Kern-Proteinlysate

Aus den sedimentierten Zellpellets wurde nach Anleitung des *Nuclear Extraction Kits* (Panomics) Zytoplasma- und Kernproteinlysate gewonnen. Dazu wurden die Zellen in einer ihrer Sedimentgröße entsprechenden Menge Puffer A resuspendiert.

Puffer A

1 ml Puffer A

10 μ l DTT

10 μ l Proteinaseinhibitor

10 μ l Phosphataseinhibitor I

10 μ l Phosphataseinhibitor II

Anschließend wurde die Zell-Puffer-Suspension für 10 min auf Eis auf dem Schwenker sanft durchmischt. Es folgte eine Zentrifugation bei 14.000 x g für 3 min bei 4°C. Der dabei entstandene Überstand war das Zytoplasma-Proteinlysate. Zur Extraktion des Kern-Proteinlysats wurden je nach Pelletgröße 25-50 μ l Puffer B hinzugegeben.

Dieser wurde unmittelbar vor Gebrauch folgendermaßen zubereitet:

Puffer B

- 1 ml Puffer B
- 10 µl DTT
- 10 µl Proteinaseinhibitor
- 10 µl Phosphataseinhibitor I
- 10 µl Phosphataseinhibitor II

Die mit Puffer B bedeckten sedimentierten Zellen wurden umgehend für 10 s geschüttelt. Die Zellen wurden dabei vollständig vom Boden des Reaktionsgefäßes gelöst und suspendiert. Die Proben wurde für 1 h auf Eis gestellt und alle 20 min vier- bis fünfmal mit der Hand invertiert. Zum Schluss wurde die Puffer-Suspension für 5 min mit 14.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand war das Kern-Proteinlysate. Dieses und das Zytoplasma-Proteinlysate wurden bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

2.2.4.3 Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe der Bradford-Reaktion. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden Standard-Proteinkonzentrationen von 0,125 µg/ml bis 20 µg/ml in 800 µl Aqua Bidest und 1 µl RIPA-Puffer hergestellt. Den Lysaten wurde 1 µl Puffer (bei Zytoplasmalysat Puffer A, bei Kernlysate Puffer B) hinzugegeben und anschließend 10 min mit 200 µl Bradford-Reagenz bei Raumtemperatur inkubiert. Von den zu bestimmenden Proteinlysate-Proben wurde je 1 µl in 800 µl Aqua Bidest hinzugegeben und diese ebenfalls für 10 min mit 200 µl Bradford-Reagenz bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde anhand des Genesys Spektrometers (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

2.2.4.4 SDS-PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese) und Western Blotting

Zwischen 20 µg und 40 µg Protein wurden auf ein einheitliches Volumen mit Aqua Bidest und mit $\frac{1}{5}$ des Gesamtvolumens 5 x SDS Probenpuffer aufgefüllt. Nach fünf minütiger Inkubation bei 95°C wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese separiert.

Für die SDS-PAGE wurden je nach Größe der zu untersuchenden Proteine Acrylamid-Gele zwischen 8% und 15% verwendet. Die Gele setzten sich aus einem oberen Sammelgel und einem unteren Trenngel zusammen.

Tabelle 13: Pipettierschema für ein 10%-Acrylamid-Gel

Sammelgel	Trenngel 10%
1,6 ml Aqua Bidest	2 ml Aqua Bidest
415 µl 30% Acrylamid	1,6 ml Acrylamid 30%
315 µl 1,0 M Tris-HCL, pH 6,8	1,3 ml 1,5 M Tris-HCL, pH 8,8
25 µl SDS 10%	50 µl 10% SDS
25 µl APS (Ammonium Persulfat) 10%	50 µl 10% APS
2,5 µl TEMED	5 µl TEMED

Die Gele wurden in die Laufkammer eingesetzt, welche im Anschluss mit Laufpuffer befüllt wurde. Dann wurden die Proben aufgetragen.

Es wurde eine Spannung von 150-200 V angelegt, bis die Lauffront die untere Gelkante erreichte. Nach Herauslösen der Gele aus der Gelkammer wurden die Proteine durch *Semi-dry-Blotting* bei 150 mA für 50 min auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Zur Überprüfung eines gleichmäßigen Proteintransfers wurden die Membranen mit Ponceau S angefärbt und anschließend mit Aqua dest. (Aqua destillata) wieder entfärbt. Abhängig vom später aufzutragenden Antikörper wurden die Membranen für 60 min in 5% „Blockmilch“/TBS-T (*tris buffered saline-Tween®*) oder 5% BSA (Bovines Serumalbumin)/TBS-T inkubiert und anschließend in 1% „Blockmilch“/TBS-T oder 1% BSA/TBS-T und dem primären Antikörper des zu untersuchenden Proteins bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei Waschungen der Membran mit TBS-T für je 10 min und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, entweder „Anti-Kaninchen“ oder „Anti-Maus“, in 1% „Blockmilch“/TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach drei erneuten Waschungen mit TBS-T für je 10 min wurde die Membran gleichmäßig mit ECL-Lösung für drei Minuten bedeckt und danach das Chemilumineszenz-Signal im LAS 4000 (Fujifilm) mit gleichnamiger Software dokumentiert.

2.2.4.5 Membranen „stripfen“

Zur Detektion weiterer Proteine wurden die Membranen nach der Detektion und dreimaligen Waschen mit TBS-T für jeweils 5 min mit „Stripping“-Puffer für 12 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder drei Mal für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit „Blockmilch“ sowie die Antikörperzugabe (2.4.4.4).

2.2.5 Genexpressionsanalysen

Zur Untersuchung der Transkriptionsrate verschiedener Gene wurde isolierte RNA in sogenannte *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben. Durch Amplifikation spezifischer Sequenzen wurden die jeweils transkribierten Gene quantitativ in Echtzeit durch ein Fluoreszenzsignal bestimmt. Genutzt wurde dazu der Zeitpunkt *Cycle threshold* (CT-Wert), an dem das Fluoreszenzsignal einen bestimmten, genspezifischen Wert überschreitet. Dies geschieht umso früher, je stärker die Genexpression ist. Mit Hilfe einer Standardkurve lassen sich diese CT-Werte zu quantitativen Aussagen auswerten (Obermaier 2006).

2.2.5.1 RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung

Aus den sedimentierten Zellen (2.2.1.6) wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers (InnuPrep RNA mini Kit; Analytik Jena) RNA isoliert. Dazu wurden die sedimentierten Zellen in 400 µl RL-Puffer suspendiert und mittels einer 20G Kanüle homogenisiert. Nach Zentrifugation durch einen Spinfilter wurden dem durch die Zentrifugation gewonnenem Eluat 400 µl 70% Ethanol hinzugegeben. Es folgten zwei Waschungen mit HS und LS Puffer und eine Trockenzentrifugation. Daraufhin wurden 33 µl RNA-freies Wasser auf den Spinfilter gegeben und die RNA aus dem Filter herauszentrifugiert. Der Eluat wurde erneut auf den Filter gegeben und zentrifugiert.

RNA-Konzentration und -Reinheit wurden durch Absorption bei 260 und 280 nm mit dem Genesys Spektrometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Der Nullwert wurde durch RNase-freies Wasser gesetzt.

2.2.5.2 cDNA Synthese

Jeweils 1 µg RNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf 11 µl aufgefüllt, dazu wurden 1 µl Primermix sowie 1 µl dNTPs hinzugegeben.

Primermix für 1 µg RNA

3 µl Random Hexamer Primer

1 µl Anchored Oligo(dT)₂₀ Primer

Der Ansatz wurde für 5 min bei 65°C inkubiert und danach für 1 min auf Eis gestellt. Es wurden 7 µl „Mastermix“ hinzugegeben.

 Mastermix cDNA für 1 µg RNA

- 6 µl 5-fach SSIV Puffer
- 1 µl 100 nM DTT
- 1 µl RNase Inhibitor
- 1 µl Reverse Transkriptase

Es erfolgte eine Inkubation für je 10 min bei Raumtemperatur, 55°C und 80°C. Die Lagerung der cDNA fand bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C statt.

2.2.5.3 qRT-PCR

Auf einer Platte mit 384 Reaktionskammern (*384-well plate*) wurden zunächst für jedes zu untersuchende Gen 3 µl „Mastermix“ vorgelegt. Letzterer bestand zu zwei Teilen aus dem DNA-bindenden EVA *Green Dye* und einem Teil genspezifischen Primer ($\frac{1}{2}$ *Forward* und $\frac{1}{2}$ *Reverse Primer*).

Tabelle 14: Mastermix qRT-PCR

	1 Well	50 Wells
EVA <i>Green Dye</i>	2 µl	100 µl
<i>Forward Primer</i>	0,5 µl	25 µl
<i>Reverse Primer</i>	0,5 µl	25 µl

„EVA *Green Dye*“ fluoresziert nach Bindung an doppelsträngige DNA und aus der Intensität des fluoreszierenden Signals lässt sich die Menge der doppelsträngigen DNA bestimmen.

Für die Generierung einer Standardkurve für jedes Gen wurden vorgegebene Standardkonzentrationen von 500 aM mehrfach im Verhältnis 1:10 mit Ampuwa Wasser verdünnt, sodass die Standard-Konzentrationen zwischen 50 aM und 0,0005 aM betragen.

1 µl cDNA Template wurde mit 6 µl Ampuwa (1:7) verdünnt. Dem Mastermix wurden je 7 µl der Standards/Proben hinzugefügt und die Reaktionsplatte mit einer Folie luftdicht verschlossen. Standards wurden jeweils als Duplikate, Proben jeweils als Triplikate aufgetragen. Im Thermozykler Quant Studio 5 (Thermo Fisher Scientific) erfolgte die PCR-Reaktion nach folgendem Schema (Tabelle 15).

Tabelle 15: Schema qRT-PCR-Reaktion

Schritt	Zeit	Temperatur
Denaturierung	15 min	95°C
40 PCR Zyklen		
Denaturierung	15 s	95°C
Annealing	20 s	60°C
Elongation	20 s	72°C
Schmelzkurve	15 s	95°C
	15 s	60°C
Dissoziation	15 s	95°C

Die Analyse der qPCR erfolgte mit der QuantStudio™ Design & Analysis Software von Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific.

2.2.6 Immunfluoreszenz

Zu Beginn wurde das Medium aus den Zellkultur-Kammern entfernt und die Zellen vorsichtig zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung durch Inkubation bei Raumtemperatur mit 4% PFA für 10 min. Nach erneuter, zweimaliger Waschung mit PBS folgte eine einstündige Blockung mit 0,25% Triton-X/ 5% FCS/ PBS bei Raumtemperatur. Nach Entfernung der Blocklösung wurde der erste Antikörper in die Antikörper-Grundlösung (2,5% FCS/ PBS) dazugegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger dreimal mit PBS für je 10 min gewaschen und mit dem sekundären Antikörper in der Antikörper-Grundlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgten drei Waschungen à 5 min und 2 Waschungen à 1 min. Zum Einbetten der Zellen sowie einer besseren Photostabilität der Fluorophore wurde fluoreszierendes Mounting-Medium dazugegeben. Im fluoreszierenden Mounting-Medium war 0,5 µg/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) enthalten. Ohne Einschluss von Luftblasen wurde auf dem Objektträger ein Deckglas aufgelegt und anschließend durch Klarlack luftdicht verschlossen.

Erfolgte die Immunfluoreszenz-Färbung mit zwei unterschiedlichen Primärantikörpern, so wurde nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper über Nacht am darauffolgenden Tag der

Objektträger dreimal für je 10 min mit PBS gewaschen und zusammen mit dem zweiten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit PBS für je 10 min gewaschen und mit den sekundären Antikörpern in der Antikörper-Grundlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgten drei Waschungen à 5 min und 2 Waschungen à 1 min. Zum Einbetten der Zellen sowie einer besseren Photostabilität der Fluorophore wurde fluoreszierendes Mounting-Medium dazugegeben. Im fluoreszierenden Mounting-Medium war 0,5 µg/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) enthalten. Ohne Einschluss von Luftblasen wurde auf dem Objektträger ein Deckglas aufgelegt und anschließend durch Klarlack luftdicht verschlossen.

Die digitalen Aufnahmen wurden mit dem Axio Imager M1 Mikroskop (Carl Zeiss AG) und der AxioVision Rel. 4.7.1 Software (Carl Zeiss AG) gemacht.

2.2.7 Kollagen-Kontraktions-Experimente

Die Zellen wurden transfiziert, 24 h später wurde das Medium gewechselt und zum Teil mit TGFβ stimuliert. Für die Kontraktions-Experimente erfolgte die Ablösung der Zellen mit Trypsin. Für die Ablösung wurden in jede Kammer einer 6-Kammer-Platte 700 µl Trypsin gegeben und nach vierminütiger Inkubation bei 37°C und Ablösung von 90% der adhären Zellen die enzymatische Reaktion mittels Zugabe von 1.400 µl EMEM-Wachstumsmedium gestoppt. Die Zell-EMEM Mischung wurde daraufhin in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1.200 rpm für 3 min pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit EMEM-Wachstumsmedium re-suspendiert.

Je $1 \cdot 10^5$ Zellen wurden in insgesamt 1 ml Medium EMEM-Wachstumsmedium gegeben. Anschließend wurden 400 µl dieser Zell-Suspension mit 200 µl Kollagen Typ I gemischt und mit 5 µl NaOH versetzt. Es erfolgte umgehend die Überführung des Kollagen-Zell-Gemisches in die Kammer einer 24-Kammer-Platte. Für das in dieser Arbeit verwendete Floating-Modell (Bell et al. 1979) wurde nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur das polymerisierte Zell-Kollagengel mit 600 µl EMEM-Wachstumsmedium bedeckt und vorsichtig vom Rand der Kammer gelöst. Die Aufnahmen erfolgten 24 h nach Aussaat der Zellen in das Kollagengel mit dem LAS 4000 (Fujifilm).

Die Kontraktions-Experimente wurden anhand der Bestimmung der Oberfläche der Kollagen-Zell-Gele mittels ImageJ Version 1.51 (National Institutes of Health) ausgewertet.

2.2.8 MTT-Experimente

Bei einem MTT-Experiment wird die Viabilität der Zellen durch Stoffwechselaktivitäten der Zellen bestimmt. Der gelbliche, wasserlösliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird zu den Zellen pipettiert. Dieser Farbstoff wird von den Zellen durch die Reduktion von NADP zu NADPH sowie NAD zu NADH in das violett-farbene, wasserunlösliche Formazan umgewandelt, dessen Absorption anschließend photometrisch gemessen werden kann.

Die Durchführung der MTT-Experimente (*CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*, Promega) begann 72 h nach Transfektion der auf einer 96-Kammer-Platte ausgesäten Zellen und 0 h oder 48 h nach Stimulation mit TGFβ. Es wurden 15 µl Farbstoff-Lösung in jede Kammer gegeben. Nach 4 h Inkubation im Brutschrank wurde die Reaktion durch Zugabe von je 100 µl Stopp-Lösung beendet. Die 96-Kammer-Platte wurde über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert, bevor am drauffolgenden Tag die Absorption bei 570 nm und 630 nm im Appliskan (Thermo Fisher Scientific) gemessen wurde.

2.2.9 Aufnahmen von Phasenkontrastbildern

Die Phasenkontrastbilder der Zellen wurden mit dem Axiovert 200 Mikroskop (Carl Zeiss AG) und dem Programm Metamorph 6.3r2 (Molecular Devices) bei 50- und 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

2.2.10 Auswertung qRT-PCR

Die Auswertung der quantitativen *real time* PCR Ergebnisse erfolgte mit der Pfaffl-Methode (Pfaffl 2001).

Pfaffl-Methode

$$\text{Effizienz } E = 10^{\left(-\frac{1}{\text{Steigung}}\right)}$$

$$\text{Ratio} = \frac{E(\text{Zielgen})^{\Delta\text{CT}(\text{CTRL si-Probe})}}{E(\text{HKG})^{\Delta\text{CT}(\text{CTRL si-Probe})}}$$

In einem idealen Experiment würde die Effizienz E bei 100% liegen. Dies würde eine Verdopplung der jeweiligen DNA Sequenz pro Zyklus bedeuten. Bei E=100% beträgt die Steigung der Schmelzkurve -3,32. Die Steigung ergibt sich aus einer Schmelzkurve mit Standardkonzentrationen.

Die Effizienz des jeweiligen Gens wird in der Pfaffl-Methode als Basis einer Exponentialfunktion mit dem ΔCT-Wert als Exponent verwendet. Der ΔCT-Wert entspricht

der Differenz des CT-Wertes der zu analysierenden Probe und des CT-Wertes des Referenzwertes (0 h TGF β oder CTRL-siRNA 0 h TGF β) des jeweiligen zu untersuchenden Gens.

Das Verhältnis ist demzufolge der Quotient der Exponentialfunktionen zu den Basen des Ziel- und des Referenzgens (*housekeeping gene*, HKG). In dieser Arbeit war das in die Berechnung einbezogene HKG „RNA-Polymerase“.

2.2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse erfolgte mit der REST[®] Software (*Relative Expression Software Tool*) (Pfaffl et al. 2002, Qiagen). Die dabei verwendeten Referenzgene waren GAPDH und RNA-Polymerase. Die statistische Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse unterschiedlicher Stimulationszeiträume beinhaltete die Vergleiche aller Stimulationszeiträume untereinander (Abbildung 5a, Abbildung 7a & c). Die statistische Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse nach siRNA-Transfektion (Abbildung 8b, Abbildung 10) erfolgte jeweils zur CTRL-siRNA-Probe gleicher Bedingung (mit bzw. ohne TGF β -Stimulation).

Die statistische Auswertung der MTT- und Kontraktions-Experimente erfolgte mit dem zweiseitigen, gepaarten T-Test. Dazu wurden die jeweiligen Werte aller fünf Proben der gleichen Bedingung miteinander verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Fibrose-Modells *in vitro*

Ein der Fibrose zugrundeliegender Mechanismus ist die übermäßige Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Dem Zytokin TGF β 1 kommt dabei eine Schlüsselrolle zu. *In vitro* kultivierte Fibroblasten können durch Stimulation mit TGF β 1 zur Differenzierung zu myofibroblastenartigen Zellen angeregt werden (Roberts et al. 1986). Der wichtigste Differenzierungs- beziehungsweise Myofibroblastenmarker ist α SMA, zusätzlich finden beispielsweise auch Kollagen 1, PAI-1 und SM22 α als Fibrosemarker Anwendung.

Für die Etablierung des *In-vitro*-Fibrose-Modells wurden BJ Zellen mit 10 ng/ml TGF β 1 (TGF β) für 24 h, 48 h oder 72 h stimuliert. Durch TGF β -stimulierte Fibroblasten wurden im Hinblick auf ihren Phänotyp sowie die Induktion fibrotischer Marker jeweils im Vergleich zu unstimulierten Zellen untersucht.

Mit TGF β -stimulierte BJ-Zellen zeigten generell eine veränderte Zellmorphologie. Die Zellen erschienen nach der Stimulation kompakter im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Dieser Effekt trat tendenziell schon nach 24 h und sehr deutlich nach 48 h und 72 h auf (Abbildung 4a). Um typische myofibroblastenassoziierte Veränderungen des Zytoskeletts, wie die Zunahme filamentöser Aktin-Stressfasern, zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen des F-Aktin-bindenden Fibrosemarkers SM22 α durchgeführt. Die Zellen zeigten nach Stimulation durch TGF β eine deutliche Zunahme des filamentösen Aktins, insbesondere nach 48 h und 72 h (Abbildung 4b, vergrößerte Ausschnitte).

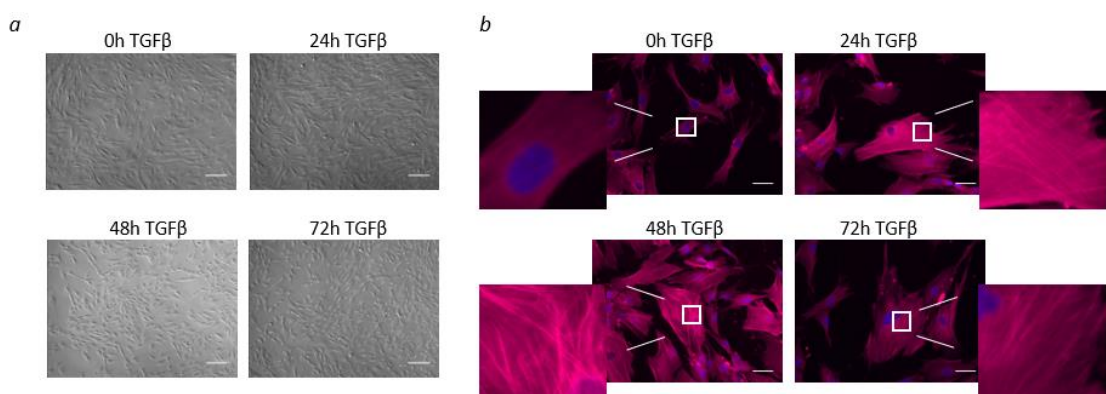


Abbildung 4: Morphologische Veränderungen der Fibroblasten nach TGF β -Stimulation
a) Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen von BJ-Fibroblasten nach unterschiedlichen TGF β -Stimulationszeiträumen (0 h, 24 h, 48 h und 72 h). Die Größenbalken entsprechen 200 μ m. **b)** Immunfluoreszenzfärbung des F-Aktin-bindenden Proteins SM22 α nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h TGF β -Stimulation. Die Nuclei sind mit DAPI angefärbt. Gezeigt ist eines von drei repräsentativen Experimenten; die Größenbalken entsprechen 50 μ m.

Mittels qRT-PCR wurde die Expression der fibrotischen Marker α SMA, PAI-1 und Kollagen 1 (*COL1A1*) untersucht, die nach TGF β -Stimulation verglichen mit der jeweiligen unbehandelten Probe (0 h) deutlich anstieg (Abbildung 5a). Nach 24-stündiger Stimulation ergab sich für PAI-1 eine Expressionsinduktion um das 3,87fache ($p=0,02$), für Kollagen 1 um das 3,49fache ($p=0,015$) und für α SMA um das 2,75fache ($p=0,85$). Nach einer Stimulationsdauer von 48 h zeigte sich für PAI-1 ein Expressionsanstieg um etwa das 3,22fache ($p=0,20$) und für Kollagen 1 um das 2,64fache ($p=0,033$). Das Expressionsniveau von α SMA war nach 48 h Stimulation ähnlich dem der unstimulierten Probe (Abbildung 5a). Nach 72 h Stimulation mit TGF β war die Genexpression von PAI-1 um das 2,9fache ($p=0,12$) und Kollagen 1 um das 2,8fache ($p=0,023$) gesteigert, die Expression von α SMA um das 2,4fache ($p=0,78$) (Abbildung 5a). Auf Translationsebene war die Expression von PAI-1 zu allen drei gemessenen Zeitpunkten (Abbildung 5b) und die von α SMA nach 48 h und 72 h TGF β -Stimulation gesteigert (Abbildung 5b).

Ein weiteres untersuchtes Protein war Smad 3, dessen Expression nach allen drei Stimulationszeiträumen reduziert war. Zusätzlich wurde phosphoryliertes Smad 3 (pSmad 3) als Positivkontrolle für die Aktivierung des TGF β -assoziierten Smad-Signalwegs untersucht. Die pSmad 3-Expression war nach 48 h und 72 h Stimulation induziert (Abbildung 5b).

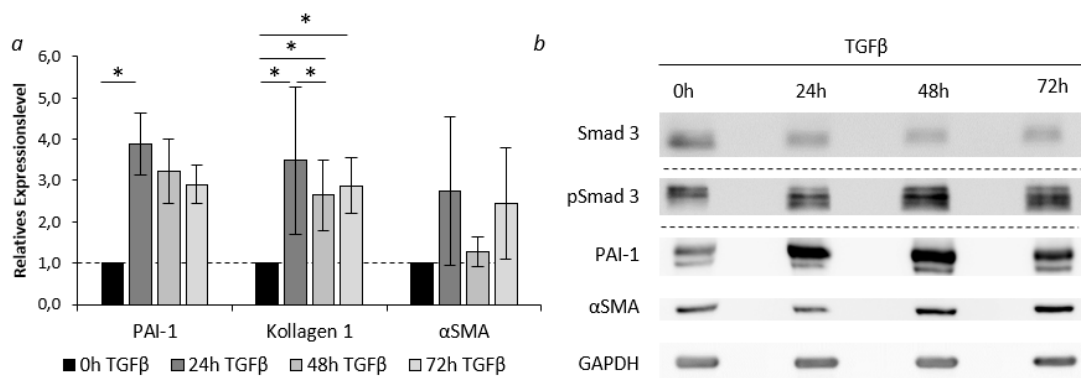


Abbildung 5: Fibrose-Induktion durch Stimulation von Fibroblasten mit TGF β *in vitro*
a) Durch qRT-PCR wurde die Genexpression der Fibrosemarker PAI-1, Kollagen 1 (*COL1A1*) und α SMA nach 24 h, 48 h und 72 h TGF β -Stimulation im Vergleich zu unstimulierten Zellen (0 h TGF β) untersucht. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus vier Versuchen. Fehlerbalken = Standardfehler, * $p<0,05$. **b)** Die Proteinexpression der Fibrosemarker PAI-1, Kollagen 1 und α SMA sowie Smad 3 und pSmad 3 nach 24 h, 48 h und 72 h TGF β -Stimulation ist dargestellt. Abgebildet ist einer von insgesamt drei bis fünf Western Blots. GAPDH dient als Ladekontrolle.

Da das dem Medium zugegebene FCS ebenfalls TGF β enthalten kann (Oida und Weiner 2010), wurde zusätzlich überprüft, ob eine reduzierte FCS Konzentration (5%) die Induzierbarkeit des klassischen Myofibroblastenmarkers α SMA beeinflusst (Abbildung 6).

Unterschiede waren weder morphologisch (Abbildung 6a) noch im Hinblick auf die Expression von α SMA (Abbildung 6b) nachweisbar. Daher wurde gefolgert, dass möglicherweise im FCS enthaltenes TGF β die Induzierbarkeit der Fibroblasten nicht beeinflusste. Somit wurden die folgenden Experimente mit der für eine hohe Zellviabilität empfohlenen FCS-Konzentration von 10% durchgeführt (ATCC, 2018).

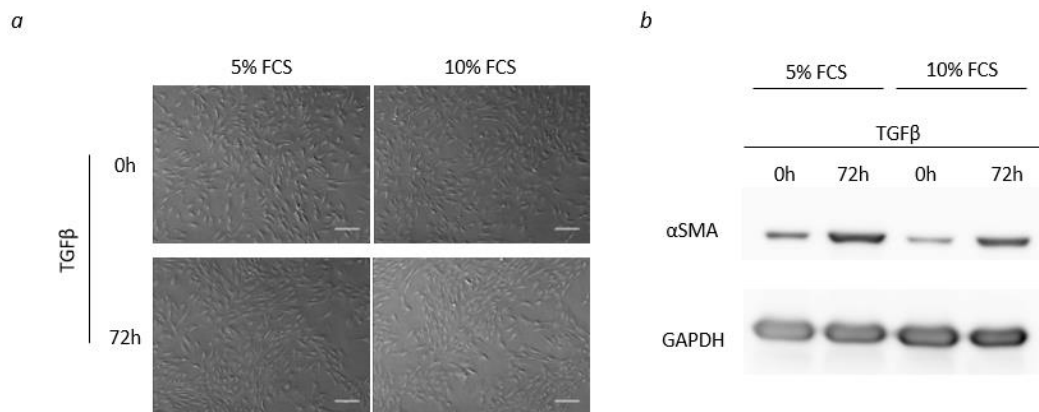


Abbildung 6: Die Induktion von α SMA ist unabhängig von der FCS-Konzentration.

a) Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen von BJ-Zellen in EMEM-Wachstumsmedium mit 5% FCS und 10% FCS sowie ohne und mit TGF β -Stimulation für 72 h. Einer von zwei repräsentativen Versuchen ist gezeigt. Die Längsbalken entsprechen 200 μ m. **b)** Die Expression von α SMA nach 0 h und 72 h TGF β -Stimulation mit jeweils 5% beziehungsweise 10% FCS im Medium wurde durch Western Blotting bestimmt. Abgebildet ist das Ergebnis eines von insgesamt zwei Versuchen. GAPDH dient als Ladekontrolle für eine gleichmäßige Proteinkonzentration.

Insgesamt wurde nach Stimulation mit TGF β auf verschiedenen Ebenen eine Aktivierung der Fibroblasten hin zu myofibroblastenartigen Zellen nachgewiesen, sodass alle weiteren Untersuchungen auf diesem Modell aufbauen konnten.

3.2 Verstärkte NF- κ B c-Rel-Expression durch fibrotische Induktion

NF- κ B ist in die Aufrechterhaltung der Zell-Homöostase und in Immunreaktionen involviert, wobei Letzteres seine Funktion bei Autoimmunerkrankungen zumindest teilweise erklärt. Die Regulation einzelner NF- κ B-Proteine kann Anhaltspunkte für ihre Funktion bei der Fibrose bieten. Aus diesem Grund erfolgten Gen- und Proteinexpressionsanalysen der einzelnen NF- κ B Proteinuntereinheiten im zuvor etablierten *In-vitro*-Fibrose-Modell.

Auf Transkriptionsebene zeigte sich eine tendenziell gesteigerte Expression von c-Rel nach 24 h um 48%, nach 48 h um 45% und nach 72 h um 63% ($p=0,35-0,59$) (Abbildung 7a). Die Transkriptionsniveaus der vier anderen NF- κ B-Untereinheiten zeigten geringere Veränderungen: Für p65 und RelB ergaben sich kaum Veränderungen (Abbildung 7a). Eine

reduzierte Expression zeigte sich bei p50 (-24%, $p=0,20$) sowie etwas deutlicher bei p52 (-34%, $p=0,036$) jeweils nach 48 h TGF β -Stimulation (Abbildung 7a).

Um auch die Proteinexpression der NF- κ B-Untereinheiten unter fibrotischen Bedingungen zu untersuchen, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt (Abbildung 7b). Hier wurde c-Rel nach 48 h Stimulation verstärkt exprimiert (Abbildung 7b). RelB, p65 und p50 wurden nach TGF β -Stimulation ähnlich exprimiert wie in unstimulierten Zellen. Die Untereinheit p52 wurde nach 72 h Stimulation leicht reduziert exprimiert (Abbildung 7b).

Aufgrund der Transkriptionsinduktion von c-Rel nach TGF β -Stimulation sollte zusätzlich untersucht werden, ob diese Induktion bereits nach kürzerer Stimulation ihr Maximum erreicht. Parallel dazu wurde als Kontrolle das stark induzierbare PAI-1 untersucht. C-Rel wurde nach zweistündiger Stimulation nicht vermehrt exprimiert; allerdings ließ sich nach 6 h eine Induktion um 44% und nach 10 h Stimulation um 39% nachweisen (Abbildung 7c). PAI-1 war nach 2 h Stimulation um das 2,88fache induziert ($p<0,001$), nach 6h um das 4,43fache ($p<0,001$) und nach 10 h um das 4,62fache ($p<0,001$) (Abbildung 7c). C-Rel wurde also, verglichen mit der Induktion fibroseassoziiertes Marker, etwas verzögert induziert. Zwischen 6 h und 72 h nach TGF β -Stimulation war es relativ konstant exprimiert.

Da neben der Expression auch die Aktivität der Transkriptionsfaktoren wichtig ist, wurde diese für die NF- κ B Proteine des klassischen Signalwegs, c-Rel, p65 und p50, mittels Fraktionierung der subzellulären Kompartimente bestimmt (Abbildung 7d). Dadurch wurde das Proteinvorkommen in Zytoplasma und Kern differenziell bestimmt. Als Kontrolle für die zytoplasmatischen Proteine diente GAPDH, und die Reinheit der Kernlysate wurde durch das ausschließlich im Zellkern vorkommende Intermediärfilament Lamin A/C bestätigt.

C-Rel, p65 und p50 waren nach Stimulation mit TGF β im Zytoplasma reduziert bei gleichbleibender nukleärer Signalintensität (Abbildung 7d). Dies könnte auf Translokation in den Nukleus und somit auf eine erhöhte Aktivität als Transkriptionsfaktor hindeuten, erfordert allerdings wegen der nicht immer eindeutigen Trennung zwischen Zytoplasma- und Kernfraktion weitergehende Analysen.

Insgesamt wurde die Expression von c-Rel als einzige NF- κ B Proteinuntereinheit sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene nach Stimulation mit TGF β induziert, was auf eine Funktion bei der Fibrose beziehungsweise Myofibroblasten-Differenzierung hindeutet.

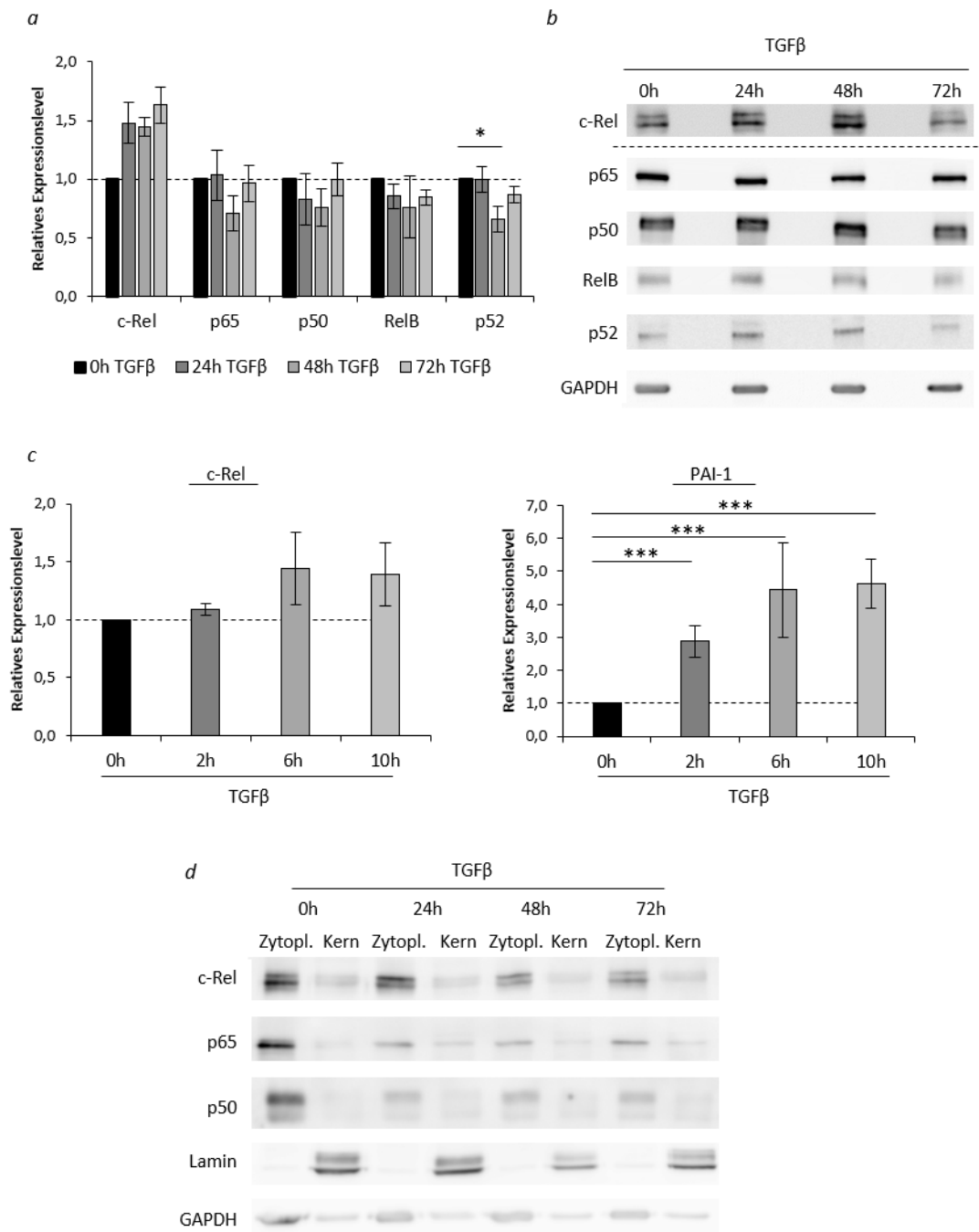


Abbildung 7: Verstärkte c-Rel-Expression im Fibrose-Modell *in vitro*.

a) Die Genexpression der fünf NF- κ B-Proteine c-Rel, p65, p50, RelB und p52 wurde nach TGF β -Stimulation (24 h, 48 h und 72 h) mittels qRT-PCR bestimmt und zu den unstimulierten Zellen ins Verhältnis gesetzt. Im Diagramm sind die Mittelwerte aus vier Versuchen abgebildet. Fehlerbalken = Standardfehler, * $p < 0,05$. **b)** Die Proteinexpression der fünf NF- κ B-Untereinheiten wurde nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h TGF β -Stimulation nachgewiesen. Abgebildet ist einer von insgesamt vier bis fünf Western Blots. GAPDH dient als Ladekontrolle. **c)** Die Genexpression von c-Rel (links) und PAI-1 (rechts) wurde nach kurzer TGF β -Stimulationsdauer (2 h, 6 h und 10 h) mittels qRT-PCR bestimmt. Abgebildet sind die zu den unstimulierten Zellen ins Verhältnis gesetzten Mittelwerte aus drei durchgeführten Versuchen. Fehlerbalken = Standardfehler, *** $p < 0,001$. **d)** Das subzelluläre Verteilungsmuster der Proteine c-Rel, p65 und p50 nach TGF β -Stimulation (0 h, 24 h 48 h und 72 h) wurde durch Western Blotting bestimmt. Abgebildet ist das Ergebnis eines von insgesamt zwei durchgeführten Versuchen. Lamin dient als Kontrolle für die Kernlysate und GAPDH als Kontrolle für die Zytoplasmalysate.

3.3 Funktionelle Analyse von c-Rel in Fibroblasten unter homöostatischen und fibrotischen Bedingungen

3.3.1 c-Rel Knockdown durch siRNA-Transfektion

Die unter fibrotischen Bedingungen gesteigerte c-Rel-Expression legt einen Einfluss von c-Rel in der Fibrose nahe und wurde im Folgenden durch siRNA-Transfektion analysiert.

Die Experimente erfolgten unter zwei Bedingungen: Zum einen wurde die c-Rel-Suppression in unstimulierten BJ-Fibroblasten analysiert. Zum anderen wurden siRNA-transfizierte BJ-Zellen für 48 h mit TGF β stimuliert, wodurch eine Myofibroblasten-Differenzierung induziert (Abbildung 5) und gleichzeitig der Zeitpunkt der stärksten c-Rel-Expression (Abbildung 7b) gewählt wurde.

Für beide Bedingungen wurden zwei verschiedene c-Rel-spezifische siRNA-Konstrukte verwendet, um mögliche konstruktsspezifische Eigenschaften aufzudecken. Zusätzlich wurden drei Kontrollbedingungen mitgeführt: Unbehandelte, nur mit Transfektionsreagenz (Promofectin) behandelte sowie mit Kontroll-siRNA (CTRL-siRNA)-transfizierte Zellen. Die Kontroll-siRNA soll nach Herstellerangaben keinen Effekt auf die Expression eines Gens haben (Qiagen, 2018). Durch die drei Kontrollbedingungen konnten stärkere Schwankungen der c-Rel-Gen- und Proteinexpression aufgrund der Transfektionsprozedur ausgeschlossen werden (Abbildung 7a und b). Zunächst wurde die Suppression von c-Rel auf Gen- und Proteinebene überprüft.

Die c-Rel-Proteinexpression war nach beiden siRNA-Konstrukten sowohl unter homöostatischen als auch fibrotischen Bedingungen deutlich reduziert (Abbildung 8a). Auf Transkriptionsebene zeigte sich unter homöostatischen Bedingungen bei beiden via siRNA c-Rel-supprimierten Zellen eine verminderte c-Rel-Expression. Die Reduktion von c-Rel war bei den c-Rel-siRNA II-Konstrukt-transfizierten Zellen mit -66% ($p < 0,001$) verglichen mit dem Referenzwert CTRL-siRNA 0 h TGF β stärker ausgeprägt als bei den c-Rel-siRNA I-Konstrukt-transfizierten Zellen (-21%, $p = 0,15$) (Abbildung 8b, links). Unter fibrotischen Bedingungen wurde, wie bereits in Abbildung 7a gezeigt, eine Induktion der c-Rel-Expression bei den Kontrollbedingungen nachgewiesen und auch hier war die Suppression auf Genebene im Vergleich zur mit TGF β stimulierten CTRL-siRNA-transfizierten Probe deutlich herunterreguliert (c-Rel-siRNA I -47% $p < 0,005$, c-Rel-siRNA II -72%, $p < 0,005$) (Abbildung 8b, rechts). Die Schwankungen innerhalb der Kontrollbedingungen lagen bei $< 25\%$.

Die erfolgreiche c-Rel-Suppression durch siRNA erlaubte die Durchführung der folgenden, funktionellen Analysen mit diesem Modell.

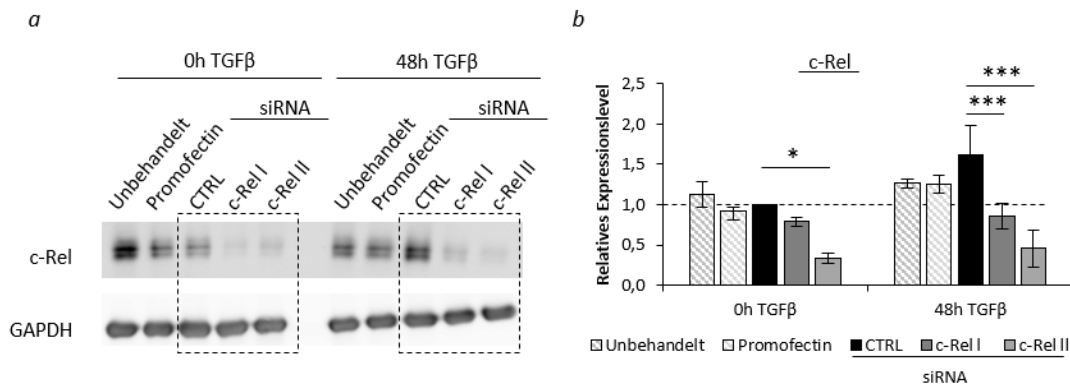


Abbildung 8: Suppression von c-Rel durch siRNA-Transfektion

a) Die c-Rel-Proteinexpression genannter Bedingungen ohne (links) und mit (rechts) TGFβ-Stimulation wurde mittels Western Blot nachgewiesen. GAPDH dient als Kontrolle. Gezeigt ist das Ergebnis eines von insgesamt vier Western Blots. **b)** Die Genexpression von c-Rel ohne (links) und mit (rechts) TGFβ-Stimulation wurde mittels qRT-PCR bestimmt. In dem Diagramm sind die Mittelwerte aus drei Versuchen abgebildet. Die mit CTRL-siRNA-transfizierten, unstimulierten Zellen dienen den genannten Bedingungen als Referenzwert. Fehlerbalken = Standardfehler, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

3.3.2 Zellmorphologie und -viabilität nach c-Rel-Suppression

Zunächst wurde untersucht, ob die c-Rel-Suppression Einfluss auf die Zellviabilität und -morphologie hat.

Die Viabilitätsanalyse (MTT-Experimente) zeigte eine geringfügig reduzierte Zellviabilität nach c-Rel-Suppression verglichen mit der Zellviabilität nach CTRL-siRNA-Transfektion unter homöostatischen Bedingungen (Abbildung 9a, links). Unter fibrotischen Bedingungen war die Viabilität der unbehandelten und der c-Rel supprimierten Zellen im Vergleich zur Viabilität der mit CTRL-siRNA-transfizierten Zellen ebenfalls leicht reduziert (Abbildung 9).

Zusammenfassend beeinflusst die Suppression von c-Rel die Viabilität der Zellen sowohl unter homöostatischen als auch fibrotischen Bedingungen nur geringfügig.

Die c-Rel-supprimierten BJ-Zellen neigten vor allem nach Transfektion mit c-Rel-siRNA I unter homöostatischen sowie noch deutlicher unter fibrotischen Bedingungen zu abgerundeten Formen (siehe Pfeile, Abbildung 9b). Dieser morphologische Effekt war bei den c-Rel-siRNA II-transfizierten Zellen weniger stark ausgeprägt.

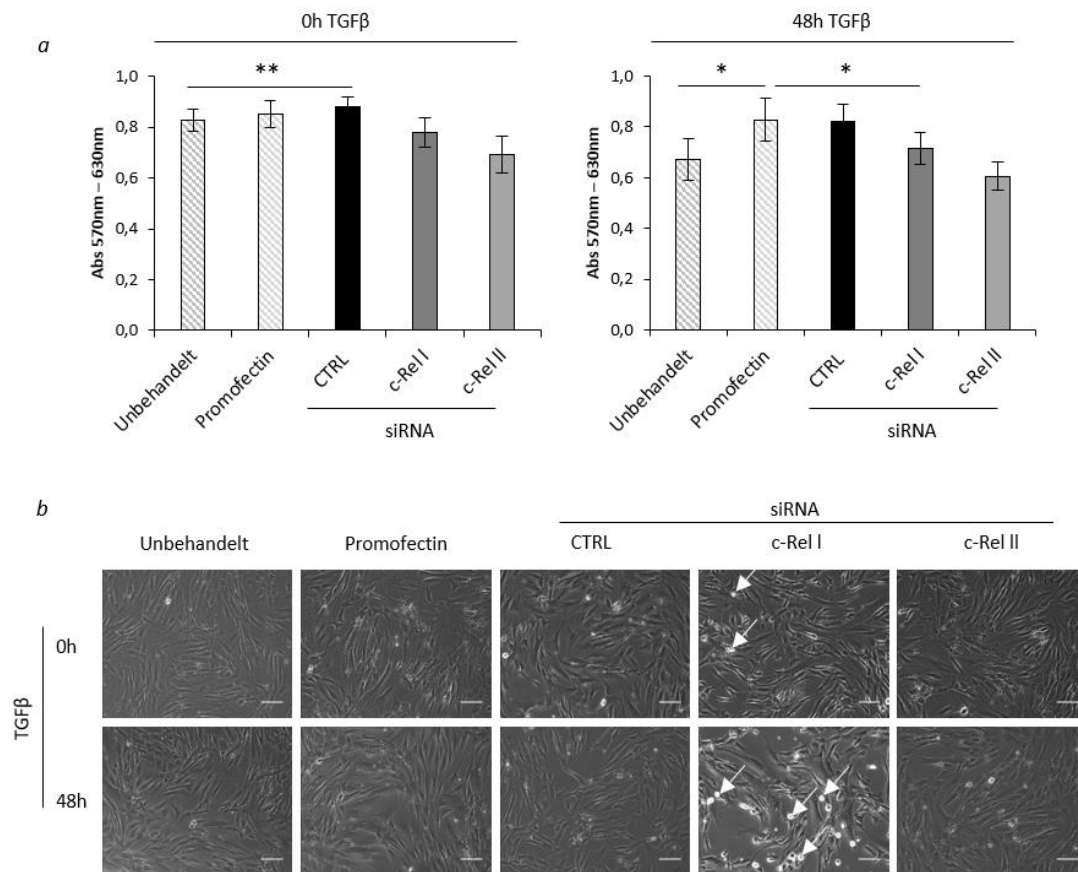


Abbildung 9: Zellmorphologie und -viabilität nach c-Rel-Suppression

a) Die Zellviabilität ohne (links) bzw. mit (rechts) TGFβ-Stimulation ist mittels MTT-Viabilitäts-Assay dargestellt. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte aus drei Versuchen, Fehlerbalken = Standardfehler. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. **b)** Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen ohne (oben) und mit (unten) TGFβ-Stimulation sind abgebildet. Die Pfeile zeigen auf abgerundete Zellen. Die Größenbalken entsprechen 100 μm .

3.3.3 Expressionsänderungen fibrotischer Marker nach c-Rel-Suppression

Der Einfluss von c-Rel auf EZM-Proteine sowie ausgewählte fibroseassoziierte Marker wurde im Folgenden untersucht. Neben den drei im Fibrose-Modell (Abbildung 5) betrachteten Proteinen, αSMA , PAI-1 und Kollagen 1, wurden auf Transkriptionsebene zusätzlich das mit systemischer Sklerodermie-assoziierte Endothelin-1 (ET-1) und der fibroseassoziierte Bindegewebs-Wachstumsfaktor (*connective tissue growth factor*, CTGF) untersucht (Barrientos et al. 2008; Cozzani et al. 2013).

PAI-1 war nach c-Rel-Suppression unter homöostatischen Bedingungen kaum verändert (Abbildung 10), unter fibrotischen Bedingungen aber erwartungsgemäß deutlich induziert.

Ähnlich verhielt sich CTGF: Nach erwartungsgemäßer Induktion durch TGFβ waren nach cRel-Suppression keine eindeutigen Tendenzen sichtbar (Abbildung 10).

Kollagen 1 (*COL1A1*) wurde unter homöostatischen Bedingungen ebenfalls einheitlich exprimiert (Abbildung 10). Unter fibrotischen Bedingungen wurde die Expression in Kontroll-

Zellen induziert. Die Kollagen I-Expression nach TGF β -Zugabe war auch in c-Rel-supprimierten Zellen gesteigert, allerdings fiel der Anstieg insgesamt geringer aus als bei den Kontroll-Zellen. Die Expressionsinduktion der mit c-Rel-siRNA I-transfizierten Zellen war geringer (+54%, $p=0,40$) als die der mit c-Rel-siRNA II-transfizierten Zellen (+143%, $p=0,051$), jeweils verglichen mit der Referenzprobe CTRL-siRNA 0 h TGF β (Abbildung 10).

α SMA wurde unter homöostatischen Bedingungen einheitlich exprimiert, lediglich die Expression in mit c-Rel-siRNA I-transfizierten Zellen war leicht induziert (65%, $p=0,12$) (Abbildung 10). α SMA wurde durch TGF β -Stimulation nicht induziert, zudem war nach c-Rel-Suppression keine einheitliche Tendenz erkennbar (Abbildung 10).

Die ET-1-Expression unterlag bei den fünf Bedingungen deutlichen Schwankungen. Durch TGF β war keine Induktion nachweisbar (Abbildung 10).

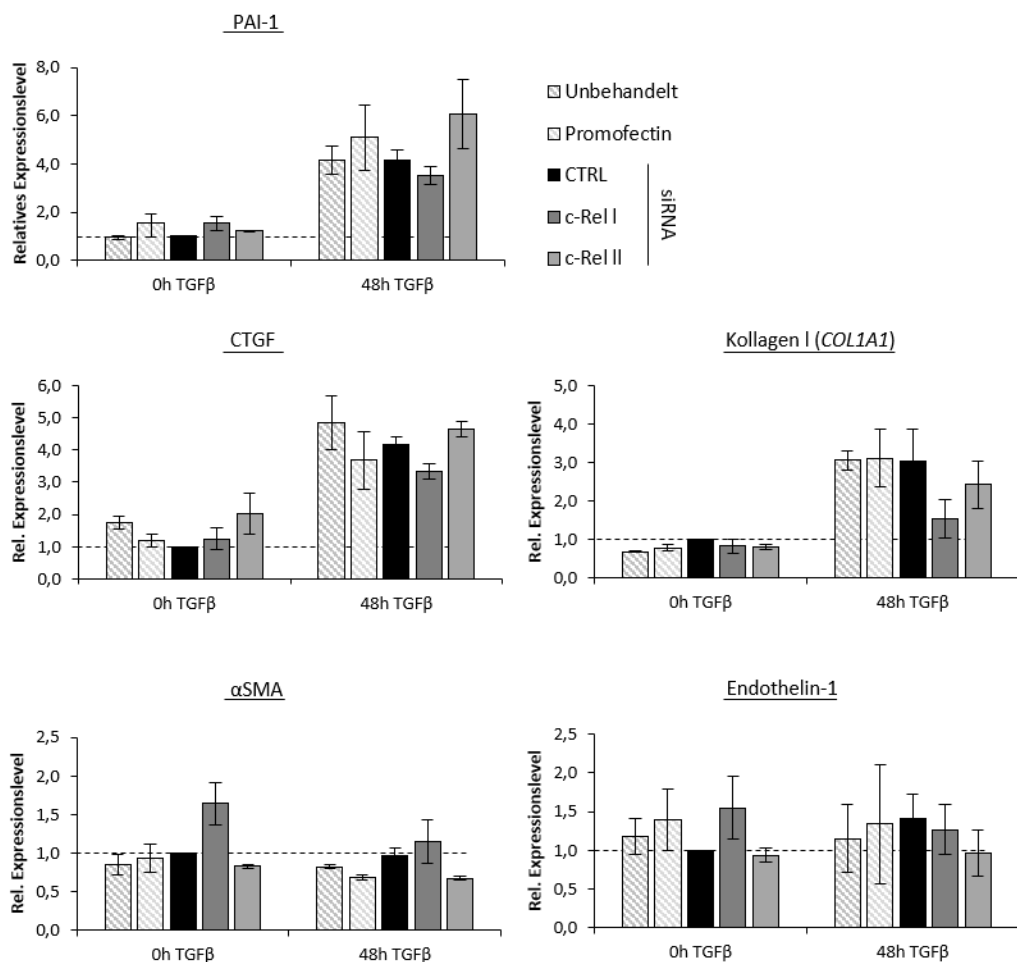


Abbildung 10: Genexpressionsanalyse fibrotischer Marker nach c-Rel-Suppression

Die Genexpression von PAI-1, Kollagen I, α SMA, CTGF und ET-1 ohne (links) und mit (rechts) TGF β -Stimulation ist dargestellt. Relative Mittelwerte aus drei qRT-PCR-Versuchen sind abgebildet zu CTRL-siRNA 0 h TGF β . Die Fehlerbalken = Standardfehler.

Fibrosemarker wurden nach c-Rel-Suppression auch auf Proteinebene untersucht (Abbildung 11): PAI-1 wurde unter homöostatischen Bedingungen von Kontroll- und c-Rel-supprimierten Zellen einheitlich exprimiert. TGF β -Stimulation steigerte die Expression deutlich (Abbildung 11). Die Expression in c-Rel-supprimierten Zellen unterschied sich nicht von den Kontrollzellen.

Kollagen I wurde besonders von c-Rel-siRNA I-transfizierten BJ-Zellen unter nicht-fibrotischen Bedingungen vermindert exprimiert (Abbildung 11, links), was unter fibrotischen Bedingungen noch deutlicher ausgeprägt war (Abbildung 11, rechts). Die Expression in mit c-Rel-siRNA II-transfizierten Zellen war sowohl unter nicht-fibrotischen als auch unter fibrotischen Bedingungen ähnlich wie unter Kontrollbedingungen (Abbildung 11, rechts), bei denen TGF β die Expression deutlich steigerte.

Für das transmembrane Zell-Zell-Adhäsionsprotein N-Cadherin war unter nicht-fibrotischen Bedingungen nach Transfektion mit dem c-Rel-siRNA I-Konstrukt die Expression reduziert; die Expression in den drei Kontrollen und nach Transfektion mit dem c-Rel-siRNA II-Konstrukt lagen auf einem einheitlichen Niveau (Abbildung 11, links). Unter fibrotischen Bedingungen war eine verstärkte N-Cadherin-Expression der drei Kontrollen (Unbehandelt, Promofectin und CTRL-siRNA) sowie der mit c-Rel-siRNA II-transfizierten BJ-Zellen erkennbar (Abbildung 11, rechts). Im Vergleich dazu fiel die Induktion der c-Rel-siRNA I-supprimierten Probe geringer aus (Abbildung 11, rechts).

CTRL- und c-Rel-siRNA-transfizierte BJ-Zellen unterschieden sich hinsichtlich der α SMA-Expression unter homöostatischen Bedingungen nicht. Es zeigte sich eine in der Intensität uneinheitliche Expressionsinduktion der drei Kontrollen. Unter fibrotischen Bedingungen war bei den drei Kontroll- sowie c-Rel-siRNA II-supprimierten Proben eine leichte Induktion der Proteinexpression erkennbar. Keine Expressionsinduktion zeigte sich bei der mit c-Rel-siRNA I-transfizierten Probe.

Eine verstärkte Phosphorylierung von Smad 3 (pSmad 3) markierte die Aktivierung des Smad-Signalwegs durch TGF β . Unter nicht-fibrotischen Bedingungen zeigte sich für pSmad 3 eine gleichmäßige Expression sowohl unter den verschiedenen Kontrollbedingungen als auch bei c-Rel-supprimierten Proben (Abbildung 11, links). Nach TGF β -Stimulation war die pSmad 3-Proteinexpression in den drei Kontrollen induziert. Im Vergleich zu den Kontrollen war die Expressionsinduktion der c-Rel herunterregulierten Proben nach TGF β -Stimulation tendenziell geringer (Abbildung 11).

Insgesamt zeigten die ausgewählten fibrotischen Marker sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene bei den untersuchten Bedingungen keine eindeutigen

Expressionsveränderungen nach c-Rel-Suppression. Auf Transkriptionsebene war Kollagen I (*COL1A1*) unter fibrotischen Bedingungen nach c-Rel-Suppression vermindert exprimiert. Auf Proteinebene zeigte sich eine tendenziell verminderte Expression von Kollagen I und N-Cadherin unter nicht-fibrotischen Bedingungen. Unter fibrotischen Bedingungen war die pSmad 3-Proteinexpression tendenziell bei beiden c-Rel-supprimierten Proben reduziert. Für das c-Rel-siRNA I-Konstrukt war unter fibrotischen Bedingungen ebenfalls die Proteinexpression von α SMA, Kollagen I und N-Cadherin reduziert.

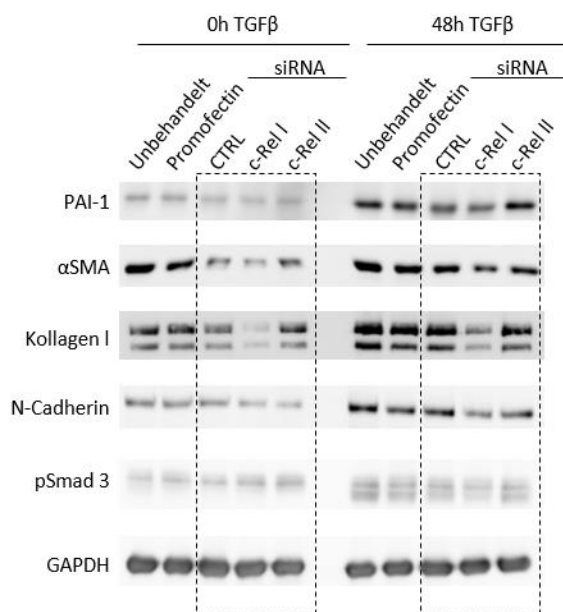


Abbildung 11: Expression fibrotischer Marker nach c-Rel-Suppression.

Die Proteinexpression von PAI-1, α SMA, Kollagen I, N-Cadherin und pSmad 3 ohne (links) und mit (rechts) TGF β -Stimulation sind im Western Blot dargestellt. GAPDH dient als Kontrolle. Gezeigt wird einer von insgesamt drei bis vier durchgeführten Versuchen.

3.3.4 Reduzierte Kontraktilität nach c-Rel Knockdown im 3D Modell

Die Kontraktilität der Myofibroblasten ist bei Fibrose verändert. Daher wurden Kontraktions-Experimente nach Suppression von c-Rel durchgeführt. Das in dieser Arbeit verwendete Modell wird als *Floating*-Modell bezeichnet, da die Kollagen-Zell-Gele unmittelbar nach der Polymerisation vom Rand des Kulturgefäßes gelöst werden und im Medium schwimmen (Bell et al. 1979). Die Kontraktionsfähigkeit der transfizierten BJ-Zellen wurde unter unstimulierten sowie unter fibrotischen (TGF β -stimulierten) Bedingungen bestimmt.

Im homöostatischen Modell zeigte sich nach c-Rel-Suppression eine geringere Gel-Kontraktion im Vergleich zu der mit CTRL-siRNA-transfizierten Zellen. Für das c-Rel-siRNA I-Konstrukt ergab sich eine um 59% ($p=0,005$), für c-Rel-siRNA II-Konstrukt eine um 47% ($p=0,03$) größere TGF β -Stimulation. Unter fibrotischen Bedingungen bestand ein ähnlicher, allerdings weniger stark ausgeprägter Effekt. Die Gele mit den c-Rel-siRNA I-transfizierten BJ-Zellen waren 48 h

nach TGF β -Stimulation um 27% ($p=0,02$) größer als die mit CTRL-siRNA-transfizierten; die des c-Rel-siRNA II-TGF β -Konstrukts um 40% ($p=0,02$) (Abbildung 12b).

Unter homöostatischen und fibrotischen Bedingungen war die Zell-Kontraktilität nach c-Rel-Suppression beeinträchtigt, was eine Funktion von c-Rel bei der Kontraktilität nahelegt. Die Geloberflächen der mit TGF β -stimulierten BJ-Zellen waren insgesamt nicht kleiner als die der unstimulierten Zellen.

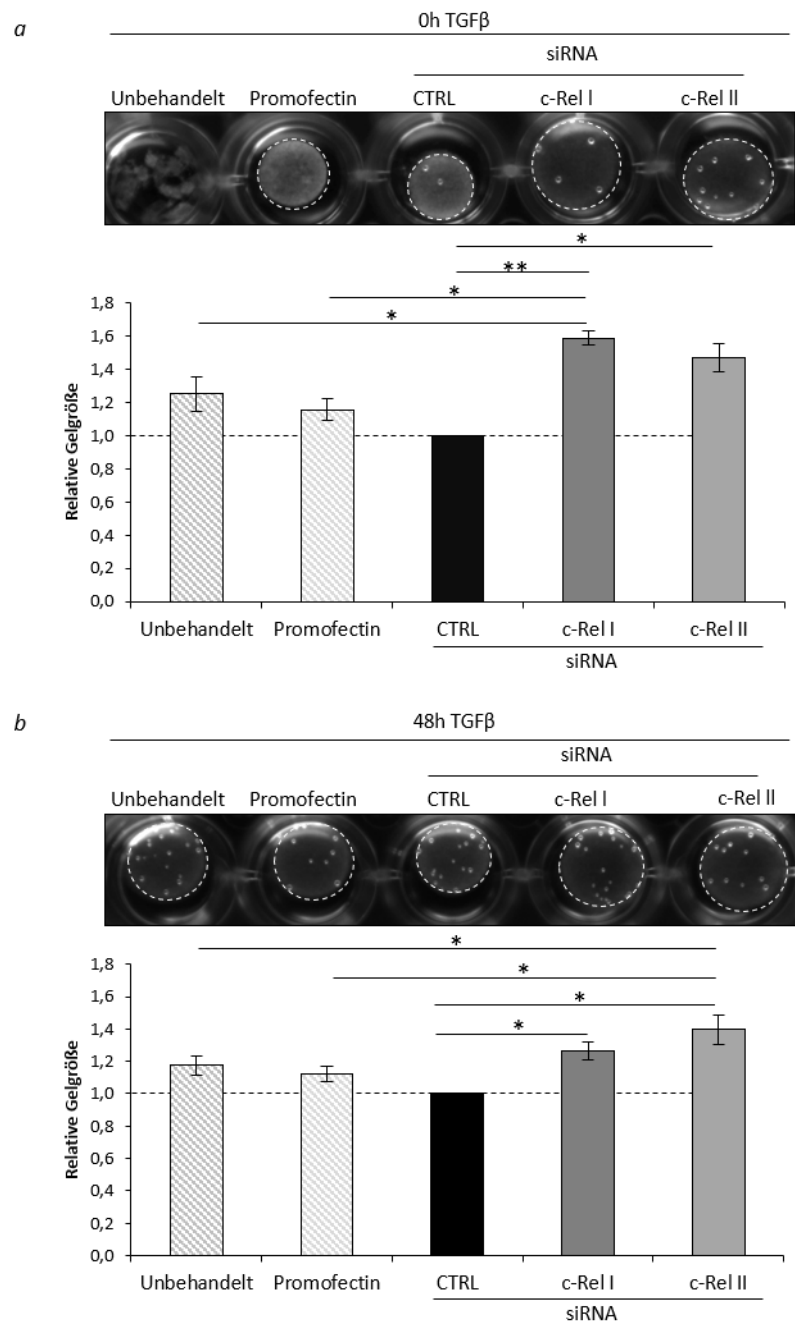


Abbildung 12: Reduzierte Kontraktilität nach c-Rel-Knockdown

a) Oben: Eine repräsentative Aufnahme von insgesamt drei Kontraktions-Experimenten nach siRNA-Transfektion unter homöostatischen Bedingungen. Unten: Im Diagramm sind die im Mittel gemessenen Geloberflächen der Proben relativiert zu CTRL-siRNA 0h TGF β dargestellt. Fehlerbalken = Standardfehler, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. **b)** Oben: Eine repräsentative Aufnahme von insgesamt vier Kontraktions-Experimenten nach siRNA-Transfektion sowie zusätzlicher TGF β -Stimulation. Unten: Im Diagramm sind die im Mittel gemessenen Geloberflächen relativiert zu CTRL-siRNA 48h TGF β dargestellt. Fehlerbalken = Standardfehler, * $p < 0,05$.

Die c-Rel-Suppression geht mit reduzierter Kontraktilität einher (Abbildung 12). Die Kontraktilität einer Zelle wird durch deren Zytoskelett vermittelt, zu dem Aktinfilamente und Adhäsionsrezeptoren gehören. Um einen möglichen Einfluss von c-Rel auf das Zytoskelett und das damit assoziierte fokale Adhäsionsprotein Vinculin zu identifizieren, wurden filamentöses

Aktin (SM22 α Färbung, rotes Fluoreszenzsignal) und Vinculin (grünes Signal) durch Immunfluoreszenz angefärbt. Die Immunfluoreszenz erfolgte mit transfizierten Zellen unter homöostatischen und fibrotischen Bedingungen (Abbildung 4). Die Signalintensität war sehr variabel (Abbildung 13). Eine eindeutige Aussage war daher nicht möglich.

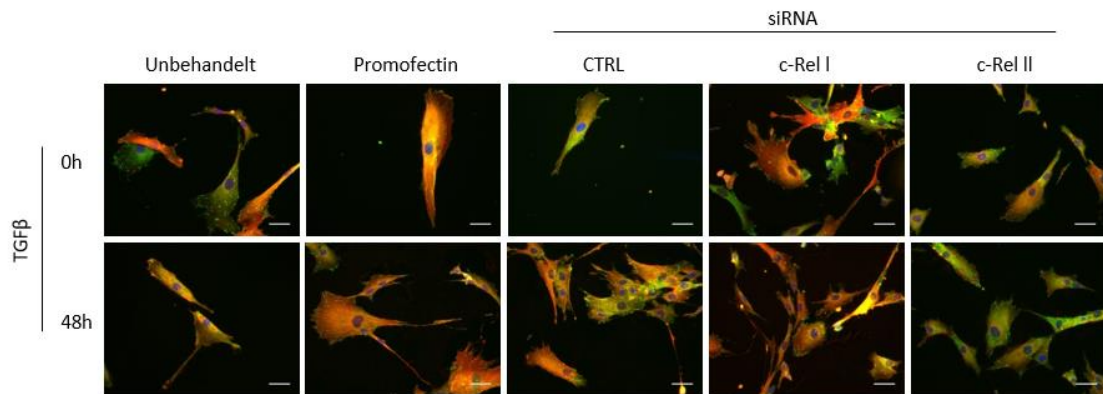


Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung des Zytoskeletts nach c-Rel-Suppression

Gezeigt werden Immunfluoreszenzfärbungen des F-Aktin-bindenden Proteins SM22 α (rot) und der Fokalen Adhäsionskontakte (Vinculin; grün) ohne (obere Reihe) oder mit (untere Reihe) TGF β -Stimulation für 48 h. Die Nuklei sind mit DAPI angefärbt. Gezeigt wird eine repräsentative Aufnahme von drei durchgeführten Analysen. Die Größenbalken entsprechen 50 μ m.

4 Diskussion

Die systemische Sklerodermie ist durch Fibrose, also die übermäßige Produktion und Akkumulation von EZM, geprägt (Eckes et al. 2014). Eine kurative Therapie existiert nicht. Der mit der Fibrose assoziierte Zelltyp ist der Myofibroblast, dem in der physiologischen Wundheilung eine wichtige Rolle zukommt (Gabbiani 2003). Myofibroblasten kommen in der physiologischen Wundheilung temporär vor und werden durch Apoptose oder eine mögliche Reversion zu inaktiven (Myo)Fibroblasten umgewandelt (Carlson et al. 2003; Driesen et al. 2014; Gerarduzzi und Di Battista 2017; Grinnell et al. 1999; Niland et al. 2001). Im Gegensatz dazu ist das Vorkommen von Myofibroblasten in fibrotischer Haut permanent.

Die Reduktion der Myofibroblasten am Ende der Wundheilung ist Gegenstand aktueller Untersuchungen zur Therapie der Fibrose (Distler et al. 2017). Bisherige Ergebnisse deuten darauf hin, dass NF- κ B in die Pathogenese der Fibrose und systemischen Sklerodermie involviert ist (Beauchef et al. 2012; Martin et al. 2012)

Die in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Analysen von c-Rel zielten speziell auf die Frage ab, ob eine c-Rel-Inhibition als Ansatzpunkt zur Entwicklung anti-fibrotischer Therapien dienen kann.

4.1 c-Rel-Implikation in dermalen Fibrose

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine erhöhte c-Rel-Expression in Assoziation mit dem Erlangen von myofibroblastenartigen Charakteristika auf Proteinebene und als Tendenz auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden. Dies suggeriert eine zuvor noch nicht beschriebene Funktion von c-Rel bei der Differenzierung von dermalen Fibroblasten zu myofibroblastenartigen Zellen, die Gegenstand weiterer funktioneller Untersuchungen wurde.

Zuvor wurde c-Rel bereits als Regulator bei der Fibrose beschrieben. So sind *c-Rel*^{-/-}-T-Zellen in ihrer Fähigkeit beschränkt eine akute GvH-Reaktion auszulösen (Yu et al. 2013). *C-Rel*^{-/-}-Mäuse sind vor induzierter hepatischer und kardialer Fibrose (Gieling et al. 2010; Gaspar-Pereira et al. 2012) und vor einer durch Bleomycin induzierten Hautfibrose geschützt (Fullard et al. 2013). Die letztere Arbeit zeigte zudem, dass in *c-Rel*^{-/-}-Mäusen die Genexpression von *COL1A2*, *TIMP-1* und *TGF β 1* erniedrigt ist (Fullard et al. 2013).

Im Gegensatz zu früheren Arbeiten basiert diese Arbeit auf einem *In-vitro*-Modell mit humanen dermalen Fibroblasten. Dies ermöglichte es, explizit auf die Fragestellung der dermalen Fibrose einzugehen. Die dermalen fibroseassoziierten Zellen, Myofibroblasten, konnten zelltypspezifisch analysiert werden.

4.2 Kontraktilität dermalen Fibroblasten unterliegt dem Einfluss von c-Rel

Kontraktilität ist essentiell für die Fähigkeit von (Myo)Fibroblasten eine Wundheilungsreaktion zu initiieren. Die Fibrose ist mit einer übermäßigen und unkontrollierten Myofibroblasten-Differenzierung assoziiert. Letztlich resultiert eine makroskopische Gewebestifeheit (Luzina und Atamas 2008; Tomasek et al. 2002).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Suppression von c-Rel die Kontraktilität homöostatischer und (in geringerem Ausmaß) TGF β -stimulierter dermalen Fibroblasten reduziert. Dies legt einen unabhängig von der Myofibroblasten-Differenzierung auftretenden Einfluss von c-Rel auf die Kontraktilität nahe.

Über verschiedene Adhäsionsrezeptoren, wie beispielsweise Integrine, interagieren Zellen mit der EZM (McAnulty 2007; Tracy et al. 2016) und übertragen mechanische Kräfte (Lopez et al. 2008). Dadurch werden Signalkaskaden in der Zelle, die unter anderem die Kontraktion des Zytoskeletts bewirken, ausgelöst (Agarwal 2014). Die Kontraktion mesenchymaler Zellen wird über den Rho-A-Kinase-Signalweg, der von TGF β aktiviert wird, und Myosin-Phosphatase vermittelt (Tomasek et al. 2002; Van De Water et al. 2013). Da die c-Rel-Suppression die Kontraktilität reduzierte, ist vorstellbar, dass c-Rel als Mediator in diesem Signalweg fungiert. Die experimentelle Bestätigung dieser Hypothese steht allerdings noch aus.

Da TGF β direkt durch c-Rel reguliert wird (Slota et al. 2017), könnte die in dieser Arbeit beobachtete reduzierte Kontraktilität nach c-Rel-Suppression demnach auf eine reduzierte TGF β Transkription zurückzuführen sein. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass auch bei c-Rel^{-/-}-Mäusen die TGF β -Expression erniedrigt war (Fullard et al. 2013).

Gleichzeitig würde ein Einfluss von TGF β auf die Kontraktions-Induktion erklären, warum der Kontraktionsverlust der TGF β -stimulierten Kollagen-Zell-Gele geringer ausfiel als der der unstimulierten: Der durch die c-Rel-Suppression erzielte Effekt auf die TGF β -Transkription würde dann durch entsprechende TGF β -Supplementierung aufgehoben. Zukünftige Arbeiten könnten daher den Zusammenhang zwischen c-Rel und TGF β eingehender beleuchten, da TGF β Myofibroblasten und somit die Fibrose erheblich beeinflusst (Dabiri et al. 2006).

Eine weitere mögliche Erklärung für die reduzierte Kontraktilität von Fibroblasten und Myofibroblastenähnlichen Zellen nach c-Rel-Suppression ist die eingeschränkte Interaktion der Zellen untereinander, möglicherweise infolge der leicht reduzierten N-Cadherin-Expression. C-Rel könnte beispielsweise Einfluss auf die Verankerung von N-Cadherin mit dem Zytoskelett

nehmen (Derycke und Bracke 2004), die über β -Catenin miteinander interagieren. Eine Interaktion von NF- κ B mit β -Catenin wurde beschrieben (Ma und Hottiger 2016).

Invasive Tumore wie Mammakarzinome exprimieren verstärkt N-Cadherin, was möglicherweise die Motilität der Tumorzellen erhöht (Hazan et al. 2000). N-Cadherin ist demnach in pathologische Prozesse mit unkontrollierter Proliferation, Differenzierung und Proteinexpression involviert. Ähnliche Prozesse sind Bestandteil der Fibrose, bei der es durch unkontrollierte Myofibroblasten-Differenzierung zur übermäßigen EZM-Expression kommt. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse legen nahe, dass N-Cadherin bei der dermalen Fibrose eine Rolle spielt. Komplementär dazu wurde gezeigt, dass N-Cadherin in fibrotischem Lungengewebe verstärkt exprimiert wird und somit eine Rolle in der Fibrose unterschiedlicher Gewebe spielt (Li et al. 2012). Die NF- κ B-Untereinheit p65 wurde bereits mit verstärkter N-Cadherin-Expression in Verbindung gebracht (Li et al. 2012); c-Rel wurde diesbezüglich noch nicht untersucht. Die vorliegende Arbeit könnte nun Anlass geben, die Rolle von c-Rel in der N-Cadherin-Expression genauer zu untersuchen.

Unter Verwendung des sogenannten *Floating*-Modells wurde hier der Einfluss von c-Rel auf die Fibroblasten-Kontraktilität gezeigt. Um die Funktion der Myofibroblasten in der Wundheilung besser zu verstehen, wäre es interessant herauszufinden, ob sich in den Gelen fibroseassoziierte zelluläre Parameter verändern. Dazu müssten zukünftig die Zellen aus den Gelen isoliert und entsprechend analysiert werden.

Das organotypische *Floating*-Modell weist einige Eigenschaften der homöostatischen Dermis auf (Grinnell 1994). Dazu gehören beispielsweise die vergleichbare Gewebe-Steifigkeit sowie die Möglichkeit der Zellen, im Gegensatz zu Zellen in an der Kulturgefäßwand fixierten Kollagengelen, Kräfte in alle Richtungen aufbauen zu können (Kanta 2015). Da sich allerdings durch das frühzeitige Ablösen des Gels vom Gefäßrand weniger Zugkräfte aufbauen können, könnte künftig auch das sogenannte *Stressed*-Modell etabliert werden, in dem die Zellen erst 24 h nach Polymerisation von der Gefäßwand gelöst werden. Dadurch haben sie die Möglichkeit, länger zu adhären und stärkere Zugkräfte aufzubauen. Dieses Modell wiese eine höhere Gewebesteifigkeit auf. Es könnte gemeinsam mit dem *Floating*-Modell verschiedene Bedingungen in fibrotischen Geweben abbilden.

4.3 Kollagen 1-Expression wird durch c-Rel reduziert

In fibrotischem Gewebe akkumuliert die von Myofibroblasten produzierte EZM. Der Hauptbestandteil der dermalen EZM, Kollagen 1, wird in physiologischem Gewebe von

Fibroblasten und nach einem Wundereignis verstärkt von Myofibroblasten synthetisiert. Die EZM-Expression wird unter anderem durch TGF β induziert (Roberts et al. 1986). In dieser Arbeit zeigte sich unter fibrotischen Bedingungen eine reduzierte Kollagen 1 (*COL1A1*)-Transkription und -Translation nach c-Rel-Suppression, besonders bei einer von zwei mit c-Rel-siRNA-transfizierten Proben. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass c-Rel die Kollagen 1-Transkription beeinflusst. Übereinstimmend mit dieser Hypothese wurde *COL1A2* in *c-Rel*^{-/-}-Mäusen vermindert exprimiert (Fullard et al. 2013). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Transkription von *COL1A2* durch Bindung aktivierter Smad-Proteine mit der *COL1A2*-Promotorregion induziert wird (Jinnin 2010). Somit könnte die reduzierte Kollagensynthese eine Folge der in dieser Arbeit gezeigten, tendenziell reduzierten pSmad 3-Expression sein, die wiederum Folge der durch c-Rel reduzierten TGF β Expression sein könnte.

Es wurde gezeigt, dass p65 und p50 Kollagen 1 (*COL1A1*)-Transinhibitoren sind (Bigot et al. 2012). Demzufolge wäre es möglich, dass unter homöostatischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen c-Rel als *COL1A1*-Transaktivator und p65 und p50 als Transinhibitoren besteht. Unter fibrotischen Bedingungen waren in dieser Arbeit die p65- und p50-Expressionsniveaus tendenziell leicht reduziert und die Expression von c-Rel induziert. Demnach überwoge der induzierende Einfluss von c-Rel und folglich die Kollagen 1-Synthese in der Fibrose. Obwohl in dieser Arbeit keine Aussage zur spezifischen Aktivität von c-Rel getroffen werden konnte, deutet die Expressionsinduktion darauf hin, dass c-Rel bei Fibrose verstärkt als Transkriptionsfaktor aktiv ist. Analog konnte beispielsweise in humanen Kardiomyozyten gezeigt werden, dass c-Rel vermehrt im Endstadium der kardialen Fibrose nukleär lokalisiert war (Gaspar-Pereira et al. 2012). Obwohl Zusammenhänge mit der systemischen Sklerodermie bekannt sind, zeigten sich keine Expressionsunterschiede von p50 und p65 nach TGF β -Stimulation in den dermalen Fibroblasten (Beauchef et al. 2012; Bigot et al. 2012; Martin et al. 2012). Da c-Rel mit p50 und p65 im Rahmen des klassischen NF- κ B-Signalweg Heterodimere bildet und aktiviert werden kann (Smale 2012), sollte zukünftig die Dimerzusammensetzung untersucht werden. Die Lokalisations- und Aktivitätsanalyse von c-Rel, p50 und p65 in der Haut von Sklerodermie-Patienten, beispielsweise mittels *Proximity Ligation Assay* (PLA), wäre zukünftig von großem Interesse.

Des Weiteren wäre es möglich, dass die reduzierte Kollagensynthese eine Reduktion von Kollagenrezeptoren wie des Integrins α 2 β 1 bedingt. Durch weniger Zell-EZM-Kontakte wäre die Mechanotransduktion eingeschränkt, was womöglich die Kontraktilität vermindern könnte. In Übereinstimmung dazu wurde gezeigt, dass das Integrin α 2 NF- κ B-abhängig die Kontraktilität von Fibroblasten beeinflusst (Xu et al. 1998). Analysen der Zell-Matrix-Kontakte,

beispielsweise anhand von Integrinen und fokalen Adhäsionskontakten, wären ein weiterer interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Untersuchungen.

Ein weiterer beachtenswerter Aspekt ist die (indirekte) Interaktion von Cadherinen und Integrinen (Agarwal 2014). Eine mögliche Reduktion der Integrine durch reduzierte Kollagensynthese könnte zu einer Reduktion der Cadherine führen oder andersherum könnte die reduzierte N-Cadherin-Expression eine reduzierte Integrin-Expression bedingen. Beide Folgen würden Mechanosensibilität und Zell-Zell-Interaktionen reduzieren. Sie könnten mechanischen Stress als wichtigen Faktor der Fibrose reduzieren. An dieser Stelle offenbaren sich deutlich die engen Verknüpfungen vieler Aspekte und Signalwege der Fibrose, deren weitere Aufdeckung Motivation und Ziel zukünftiger Untersuchungen sein sollte.

4.3.1 Mögliche Effekte von c-Rel auf fibroseassoziierte Proteine

Unter den mit systemischer Sklerodermie und fibrosessoziierten Genprodukten zeigten sich bei PAI-1 und CTGF in c-Rel-supprimierten Fibroblasten nach TGF β -Stimulation keine Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Eine Erklärung wäre, dass PAI-1 und CTGF indirekt von c-Rel über TGF β beeinflusst werden. In Übereinstimmung dazu wurde gezeigt, dass die Expression sowohl von CTGF und PAI-1 durch TGF β induziert wird (Igarashi et al. 1993; Lund et al. 1987). Um die Expression myofibroblastenassoziiierter Marker unabhängig von experimenteller TGF β -Zugabe bestimmen zu können, wären kultivierte Myofibroblasten von Sklerodermie-Patienten geeignet. Da gezeigt wurde, dass Myofibroblasten *in vitro* ihren Phänotyp behalten (LeRoy 1974), könnten die Effekte einer c-Rel-Suppression künftig auch unabhängig von TGF β -Zugabe untersucht werden.

4.4 Die Viabilität wird durch c-Rel-Suppression nicht beeinflusst

Bei der Entwicklung anti-fibrotischer Therapien steht der Nutzen für die Patienten im Fokus. Es ist also wichtig, dass ein Verlust von c-Rel keinen Überlebensnachteil mit sich bringt. Tatsächlich schützt ein c-Rel-Verlust Mäuse vor Fibrose, ohne gleichzeitig deren Mortalität zu erhöhen (Fullard et al. 2013). Die in dieser Arbeit untersuchte Viabilität war in den c-Rel-supprimierten Fibroblasten und Myofibroblasten nur leicht reduziert. C-Rel scheint also keinen starken Einfluss auf Zell-Viabilität zu haben.

Das Ziel einer c-Rel-basierten anti-fibrotischen Behandlung könnte durch eine langfristig *in vivo* anwendbare Strategie zur c-Rel-Suppression erreichbar sein. Dazu käme die CRISPR/Cas 9 Methode (Hsu et al. 2014) für einen gezielten c-Rel-Knockout *in vitro* in Betracht.

4.5 Myofibroblasten-Differenzierung erfolgt durch Kombination mechanischer Kräfte und TGF β

Das in dieser Arbeit verwendete *In-vitro*-Fibrose-Modell, welches bereits seit mehr als drei Jahrzehnten etabliert ist (Roberts et al. 1986), zeigte eine Induktion Fibrose-typischer Veränderungen nach TGF β -Stimulation (Hinz 2007).

In vitro wirken auf die adhärennten Fibroblasten mechanische Kräfte, die größer sind als die in physiologischer Haut (Grinnell und Petroll 2010). Demzufolge kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den vermeintlich homöostatischen dermalen Fibroblasten bereits um Proto-Myofibroblasten handelt.

Nach der experimentellen Zugabe von TGF β zeigte sich allerdings eine deutliche Zunahme fibroseassoziiierter Genprodukte. In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (Arora et al. 1999; Hinz et al. 2001a) war der auf die Fibroblasten wirkende mechanische Stress allein nicht ausreichend, um die Differenzierung zu Myofibroblasten zu induzieren. Erst durch zusätzliche Stimulation mit TGF β erfolgte die Differenzierung zu myofibroblastenähnlichen Zellen. Dieser Aspekt könnte im Zusammenhang mit dem Einfluss von c-Rel auf mechanische Eigenschaften der Zellen eine Bedeutung für die Fibrose haben, da die Myofibroblasten-Differenzierung erst durch die Kombination aus TGF β und mechanischem Stress induziert wird.

4.6 Resümee und Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine Funktion von c-Rel in der Fibrose durch seine verstärkte Expression unter fibrotischen Bedingungen identifiziert. Es wurde gezeigt, dass c-Rel mit Fibroblasten-Kontraktilität assoziiert ist und wohl auch auf die Kollagen I-Synthese wirkt. C-Rel scheint Einfluss auf wichtige Parameter zu nehmen, daher könnten die vorliegenden Ergebnisse Motivation für zukünftige Untersuchungen der Rolle von c-Rel in der Fibrose sein.

Die experimentellen Ergebnisse und ihre Interpretation im Lichte der relevanten Literatur geben einen Einblick in die engen Verknüpfungen der an der Fibrose beteiligten Proteine, Mechanismen und Signalwege. Es eröffnen sich einige Ansatzpunkte für weitere Analysen, beispielsweise hinsichtlich der Aktivität und Dimerbildung von c-Rel oder zytoskeletaler Veränderungen *in vitro* und *in vivo*. Zusätzlich sollten die NF- κ B-Proteinuntereinheiten in sklerotischem Gewebe sowie die Folgen der c-Rel-Suppression bei der Fibrose weiter analysiert werden.

Die zukünftige Untersuchung weiterer Zusammenhänge könnte die Therapie der Fibrose verbessern. Die Inhibition von c-Rel oder einzelner NF- κ B-Signalwege hat sich in dieser Arbeit

als ein verfolgenswerter Ansatz erwiesen, zumal die c-Rel-Suppression die Zellviabilität kaum beeinträchtigte. Die reduzierte Kontraktilität nach c-Rel-Suppression könnte genutzt werden, um beispielsweise durch topische Applikation eines niedermolekularen c-Rel-Inhibitors eine lokale Remission der Fibrose zu erreichen. Ein weiteres Anwendungsgebiet läge möglicherweise auch in der Prophylaxe überschießender Narbenbildung. Durch eine c-Rel-Suppression und dadurch reduzierte Kontraktion könnte diese vermieden werden und die Gewebesteifigkeit früher an die gesunde Dermis angeglichen werden.

5 Zusammenfassung

Die nicht heilbare systemische Sklerose resultiert aus permanenter Myofibroblasten-Aktivität und der damit verbundenen übermäßigen Produktion von EZM-Proteinen. Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, ob eine Hemmung einzelner NF- κ B-Untereinheiten als Angriffspunkt einer Therapie gegen die unkontrollierte Myofibroblasten-Differenzierung dienen könnte. Die Analysen dieser Arbeit erfolgten auf Basis eines *In-vitro*-Modells, dessen Funktionalität anhand der Induktion fibroseassoziiierter Parameter bestätigt wurde.

Die NF- κ B-Untereinheit c-Rel war sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene induziert, was einen Einfluss von c-Rel auf fibroseassoziierte Charakteristika nahelegte. Die darauf aufbauende funktionelle siRNA-Suppression von c-Rel erfolgte sowohl unter homöostatischen Bedingungen zur Untersuchung der Funktion von c-Rel in normalen Fibroblasten als auch unter fibrotischen Bedingungen, um fibroseassoziierte Funktionen identifizieren zu können. Die Zell-Viabilität war bei beiden Konditionen lediglich geringfügig verschieden. Tendenzielle Unterschiede bestanden hinsichtlich der Expression zentraler fibroseassoziiierter Proteine wie Kollagen I. In organotypischen (dermisäquivalenten) Kollagen-Matrizen konnte eine deutlich und signifikant reduzierte Kontraktilität von c-Rel-supprimierten Fibroblasten gezeigt werden. Dieser Effekt war unter homöostatischen Bedingungen stärker ausgeprägt als unter fibrotischen.

Insgesamt wurde die Expression von c-Rel unter fibrotischen Bedingungen induziert und Einflüsse von c-Rel auf die EZM-Produktion und die Zell-Kontraktilität wurden gezeigt. Deshalb könnte die c-Rel-Suppression als Ansatzpunkt zur therapeutischen Fibrosereduktion dienen.

6 Literaturverzeichnis

- Agarwal SK (2014): Integrins and cadherins as therapeutic targets in fibrosis. *Front Pharmacol* **5**, 131
- Arora PD, Narani N, McCulloch CA (1999): The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts. *Am J Pathol* **154**, 871-882
- Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M (2008): Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* **16**, 585-601
- Barton D, HogenEsch H, Weih F (2000): Mice lacking the transcription factor RelB develop T cell-dependent skin lesions similar to human atopic dermatitis. *Eur J Immunol* **30**, 2323-2332
- Beauchef G, Bigot N, Kypriotou M, Renard E, Porée B, Widom R, DompMartin-Blanchere A, Oddos T, Maquart FX, Demoor M (2012): The p65 subunit of NF- κ B inhibits COL1A1 gene transcription in human dermal and scleroderma fibroblasts through its recruitment on promoter by protein interaction with transcriptional activators (c-Krox, Sp1, and Sp3). *J Biol Chem* **287**, 3462-3478
- Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Müller GA, Kalbacher H, Salant DJ, Müller CA, Kalluri R, Zeisberg M (2010): Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med* **16**, 544-550
- Bell E, Ivarsson B, Merrill C (1979): Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1274-1278
- Bigot N, Beauchef G, Hervieu M, Oddos T, Demoor M, Boumediene K, Galera P (2012): NF-kappaB accumulation associated with COL1A1 transactivators defects during chronological aging represses type I collagen expression through a -112/-61-bp region of the COL1A1 promoter in human skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* **132**, 2360-2367
- Buschke S, Stark HJ, Cerezo A, Prätzel-Wunder S, Boehnke K, Kollar J, Langbein L, Heldin CH, Boukamp P (2011): A decisive function of transforming growth factor-beta/Smad signaling in tissue morphogenesis and differentiation of human HaCaT keratinocytes. *Mol Biol Cell* **22**, 782-794

- Carlson MA, Longaker MT, Thompson JS (2003): Wound splinting regulates granulation tissue survival. *J Surg Res* **110**, 304-309
- Chiffot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J (2008): Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum* **37**, 223-235
- Cozzani E, Javor S, Laborai E, Drosera M, Parodi A (2013): Endothelin-1 levels in scleroderma patients: a pilot study. *ISRN Dermatol* **2013**, 125632
- Dabiri G, Campaner A, Morgan JR, Van De Water L (2006): A TGF-beta1-dependent autocrine loop regulates the structure of focal adhesions in hypertrophic scar fibroblasts. *J Invest Dermatol* **126**, 963-970
- Denton CP, Hughes M, Gak N, Vila J, Buch MH, Chakravarty K, Fligelstone K, Gompels LL, Griffiths B, Herrick AL (2016): BSR and BHPR guideline for the treatment of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* **55**, 1906-1910
- Derycke LD, Bracke ME (2004): N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol* **48**, 463-476
- Derynck R, Zhang YE (2003): Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577-584
- Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G (1993): Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* **122**, 103-111
- Diegelmann RF, Evans MC (2004): Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* **9**, 283-289
- Distler JH, Feghali-Bostwick C, Soare A, Asano Y, Distler O, Abraham DJ (2017): Review: Frontiers of Antifibrotic Therapy in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* **69**, 257-267
- Driesen RB, Nagaraju CK, Abi-Char J, Coenen T, Lijnen PJ, Fagard RH, Sipido KR, Petrov VV (2014): Reversible and irreversible differentiation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* **101**, 411-422

- Eckes B, Moinzadeh P, Sengle G, Hunzelmann N, Krieg T (2014): Molecular and cellular basis of scleroderma. *J Mol Med (Berl)* **92**, 913-924
- Evans ND, Oreffo RO, Healy E, Thurner PJ, Man YH (2013): Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche. *J Mech Behav Biomed Mater* **28**, 397-409
- Fowles DJ, Cui W, Johnson SA, Balmain A, Akhurst RJ (1996): Altered epidermal cell growth control in vivo by inducible expression of transforming growth factor beta 1 in the skin of transgenic mice. *Cell Growth Differ* **7**, 679-687
- Frantz C, Stewart KM, Weaver VM (2010): The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* **123**, 4195-4200
- Franzoso G, Carlson L, Poljak L, Shores EW, Epstein S, Leonardi A, Grinberg A, Tran T, Schariton-Kersten T, Anver M (1998): Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *J Exp Med* **187**, 147-159
- Fritsch P: *Dermatologie und Venerologie für das Studium*. Springer-Verlag, Heidelberg 2009
- Fullard N, Moles A, O'Reilly S, van Laar JM, Faini D, Diboll J, Reynolds NJ, Mann DA, Reichelt J, Oakley F (2013): The c-Rel subunit of NF-kappaB regulates epidermal homeostasis and promotes skin fibrosis in mice. *Am J Pathol* **182**, 2109-2120
- Gabbiani G (2003): The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* **200**, 500-503
- Gaspar-Pereira S, Fullard N, Townsend PA, Banks PS, Ellis EL, Fox C, Maxwell AG, Murphy LB, Kirk A, Bauer R (2012): The NF-kappaB subunit c-Rel stimulates cardiac hypertrophy and fibrosis. *Am J Pathol* **180**, 929-939
- Gerarduzzi C, Di Battista JA (2017): Myofibroblast repair mechanisms post-inflammatory response: a fibrotic perspective. *Inflamm Res* **66**, 451-465
- Gieling RG, Elsharkawy AM, Caamano JH, Cowie DE, Wright MC, Ebrahimkhani MR, Burt AD, Mann J, Raychaudhuri P, Liou HC (2010): The c-Rel subunit of nuclear factor-kappaB regulates murine liver inflammation, wound-healing, and hepatocyte proliferation. *Hepatology* **51**, 922-931

- Gilmore TD (2006): Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680-6684
- Gordon KJ, Blobel GC (2008): Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta* **1782**, 197-228
- Grinnell F (1994): Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* **124**, 401-404
- Grinnell F, Petroll WM (2010): Cell motility and mechanics in three-dimensional collagen matrices. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**, 335-361
- Grinnell F, Zhu M, Carlson MA, Abrams JM (1999): Release of mechanical tension triggers apoptosis of human fibroblasts in a model of regressing granulation tissue. *Exp Cell Res* **248**, 608-619
- Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS, Jr. (1999): NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* **19**, 5785-5799
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA (2000): Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* **148**, 779-790
- Held L, Metzler G, Schaller M: Histologische Strukturen der normalen Haut. In: Cerroni L, Garbe C, Metzger D, Kutzner H, Kerl H (Hrsg): *Histopathologie der Haut*; Springer-Verlag, Heidelberg 2016, 61-76
- Hinata K, Gervin AM, Jennifer Zhang Y, Khavari PA (2003): Divergent gene regulation and growth effects by NF-kappa B in epithelial and mesenchymal cells of human skin. *Oncogene* **22**, 1955-1964
- Hinz B (2007): Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* **127**, 526-537
- Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C (2001a): Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* **12**, 2730-2741

- Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C (2003): Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol Cell* **14**, 2508-2519
- Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M (1999): NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* **19**, 2690-2698
- Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G (2001b): Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* **159**, 1009-1020
- Hsu PD, Lander ES, Zhang F (2014): Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* **157**, 1262-1278
- Hunzelmann N (2013): Systemische Sklerodermie. *Hautarzt* **64**, 299-312
- Hunzelmann N, Krieg T (2012): Das Deutsche Netzwerk für Systemische Sklerodermie (DNSS): Aktuelle Daten zu Diagnostik und Therapie. *Hautarzt* **63**.Suppl1, 71-75
- Huxford T, Ghosh G (2009): A structural guide to proteins of the NF-kappaB signaling module. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a000075
- Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR (1993): Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* **4**, 637-645
- Ito Y, Sarkar P, Mi Q, Wu N, Bringas P, Jr., Liu Y, Reddy S, Maxson R, Deng C, Chai Y (2001): Overexpression of Smad2 reveals its concerted action with Smad4 in regulating TGF-beta-mediated epidermal homeostasis. *Dev Biol* **236**, 181-194
- Jinnin M (2010): Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis. *J Dermatol* **37**, 11-25
- Kanta J (2015): Collagen matrix as a tool in studying fibroblastic cell behavior. *Cell Adh Migr* **9**, 308-316

- Karin M, Ben-Neriah Y (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* **18**, 621-663
- Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW (2002): NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* **2**, 301-310
- Koca SS, Ozgen M, Dagli F, Tuzcu M, Ozercan IH, Sahin K, Isik A (2012): Proteasome inhibition prevents development of experimental dermal fibrosis. *Inflammation* **35**, 810-817
- Krieg T, Aumailley M (2011): The extracellular matrix of the dermis: flexible structures with dynamic functions. *Exp Dermatol* **20**, 689-695
- LeRoy EC (1974): Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J Clin Invest* **54**, 880-889
- Li CW, Xia W, Huo L, Lim SO, Wu Y, Hsu JL, Chao CH, Yamaguchi H, Yang NK, Ding Q (2012): Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF- α requires NF- κ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Res* **72**, 1290-1300
- Lopez JI, Mouw JK, Weaver VM (2008): Biomechanical regulation of cell orientation and fate. *Oncogene* **27**, 6981-6993
- Lorenz VN, Schön MP, Seitz CS (2014): c-Rel downregulation affects cell cycle progression of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **134**, 415-422
- Lund LR, Riccio A, Andreasen PA, Nielsen LS, Kristensen P, Laiho M, Saksela O, Blasi F, Dano K (1987): Transforming growth factor- β is a strong and fast acting positive regulator of the level of type-1 plasminogen activator inhibitor mRNA in WI-38 human lung fibroblasts. *EMBO J* **6**, 1281-1286
- Luzina IG, Atamas SP: Fibrotic Skin Diseases. In: Gaspari AA, Tying SK (Hrsg): *Clinical and Basic Immunodermatology*; Springer-Verlag GmbH, Heidelberg 2008, 721-737
- Ma B, Hottiger MO (2016): Crosstalk between Wnt/ β -Catenin and NF- κ B Signaling Pathway during Inflammation. *Front Immunol* **7**, 378

- Maher TM, Evans IC, Bottoms SE, Mercer PF, Thorley AJ, Nicholson AG, Laurent GJ, Tetley TD, Chambers RC, McAnulty RJ (2010): Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **182**, 73-82
- Martin JE, Broen JC, Carmona FD, Teruel M, Simeon CP, Vonk MC, van 't Slot R, Rodriguez-Rodriguez L, Vicente E, Fonollosa V (2012): Identification of CSK as a systemic sclerosis genetic risk factor through Genome Wide Association Study follow-up. *Hum Mol Genet* **21**, 2825-2835
- Massagué J (1998): TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**, 753-791
- Massagué J, Blain SW, Lo RS (2000): TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103**, 295-309
- McAnulty RJ (2007): Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 666-671
- Niland S, Cremer A, Fluck J, Eble JA, Krieg T, Sollberg S (2001): Contraction-dependent apoptosis of normal dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* **116**, 686-692
- Obermaier M: Optimierung und quantitative Auswertung eines hochsensitiven Reverse Transkriptase Aktivitäts Assay. *Med. Diss. München* 2006
- Oeckinghaus A, Ghosh S (2009): The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a000034
- Oida T, Weiner HL (2010): Depletion of TGF-beta from fetal bovine serum. *J Immunol Methods* **362**, 195-198
- Okamoto T (2006): NF-kappaB and rheumatic diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **6**, 359-372
- Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ (1989): Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2336-2340

- Perkins ND (2006): Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* **25**, 6717-6730
- Perkins ND, Gilmore TD (2006): Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ* **13**, 759-772
- Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**, e36
- Qiagen (2018): Allstars Negative Control siRNA. <https://www.qiagen.com/us/shop/rnai/allstars-negative-control-sirna/#orderinginformation>; Abgerufen am 8.12.2018
- Ramirez H, Patel SB, Pastar I (2014): The Role of TGFbeta Signaling in Wound Epithelialization. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **3**, 482-491
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH (1986): Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4167-4171
- Robertson IB, Rifkin DB (2016): Regulation of the Bioavailability of TGF-beta and TGF-beta-Related Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a021907
- Rodríguez-Pascual F, Reimunde FM, Redondo-Horcajo M, Lamas S (2004): Transforming growth factor-beta induces endothelin-1 expression through activation of the Smad signaling pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* **44 Suppl 1**, 39-42
- Seitz CS, Lin Q, Deng H, Khavari PA (1998): Alterations in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2307-2312
- Sen R, Baltimore D (1986): Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**, 705-716

- Shi Y, Massagué J (2003): Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700
- Skalli O, Pelte MF, Pecllet MC, Gabbiani G, Gugliotta P, Bussolati G, Ravazzola M, Orci L (1989): Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem* **37**, 315-321
- Slotta C, Schlüter T, Ruiz-Perera LM, Kadhim HM, Tertel T, Henkel E, Hübner W, Greiner JFW, Huser T, Kaltschmidt B (2017): CRISPR/Cas9-mediated knockout of c-REL in HeLa cells results in profound defects of the cell cycle. *PLoS One* **12**, e0182373
- Smale ST (2012): Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF-kappaB family of transcription factors. *Immunol Rev* **246**, 193-204
- Sorrell JM, Caplan AI (2004): Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci* **117**, 667-675
- Sun SC (2012): The noncanonical NF-κB pathway. *Immunol Rev* **246**, 125-140
- Takeo M, Lee W, Ito M (2015): Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5**, a023267
- Thompson AE, Shea B, Welch V, Fenlon D, Pope JE (2001): Calcium-channel blockers for Raynaud's phenomenon in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **44**, 1841-1847
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA (2002): Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 349-363
- Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ (2016): Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **5**, 119-136
- Van De Water L, Varney S, Tomasek JJ (2013): Mechanoregulation of the Myofibroblast in Wound Contraction, Scarring, and Fibrosis: Opportunities for New Therapeutic Intervention. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2**, 122-141
- Viswanath V, Phiske MM, Gopalani VV (2013): Systemic sclerosis: current concepts in pathogenesis and therapeutic aspects of dermatological manifestations. *Indian J Dermatol* **58**, 255-268

- Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B (2007): Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol* **179**, 1311-1323
- Wynn TA, Ramalingam TR (2012): Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* **18**, 1028-1040
- Xu J, Zutter MM, Santoro SA, Clark RA (1998): A three-dimensional collagen lattice activates NF-kappaB in human fibroblasts: role in integrin alpha2 gene expression and tissue remodeling. *J Cell Biol* **140**, 709-719
- Yanaba K (2016): Strategy for treatment of fibrosis in systemic sclerosis: Present and future. *J Dermatol* **43**, 46-55
- Yu Y, Wang D, Kaosaard K, Liu C, Fu J, Haarberg K, Anasetti C, Beg AA, Yu XZ (2013): c-Rel is an essential transcription factor for the development of acute graft-versus-host disease in mice. *Eur J Immunol* **43**, 2327-2337
- Zhang YE (2009): Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* **19**, 128-139

Publikation

Vortrag und Posterpräsentation im Rahmen der 45. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF) in Zürich, 07.03.2018- 10.03.2018

Trautshold-Krause FS, Unkelbach U, Schön MP, Seitz CS, Lorenz VN (2018): TGF- β 1 signaling affects transcription factor NF- κ B expression in an *in vitro* skin fibrosis model. *Exp Dermatol* 27, e5

Posterpräsentation im Rahmen der 46. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF) in München, 13.03.2019- 16.03.2019

Micus LC, **Trautshold-Krause FS**, Schön MS, Seitz CS, Lorenz VN (2019): NF-kappaB c-Rel suppressed dermal fibroblasts display impaired fibrosis-associated cellular mechanisms. *Exp Dermatol* 28, e17

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. M. P. Schön für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe an meiner Dissertation zu arbeiten, danken. Seine fachliche Kompetenz und sein Interesse an der Forschung haben maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen. Vielen herzlichen Dank!

Des Weiteren möchte ich mich für die sehr gute Betreuung sowie die wertvollen Ideen und Vorschläge bei Prof. Dr. M. Bohnsack bedanken.

Ein großer Dank gebührt Dr. V. N. Lorenz für ihre großartige Betreuung und dafür, dass Sie mir jederzeit mit Tat und Rat zur Seite stand. Sie hat mich stets motiviert und von ihr habe ich sehr viel über diese Arbeit Hinausgehendes gelernt. Ohne sie wäre diese Arbeit vermutlich noch lange nicht fertig.

Auch bei Prof. Dr. C. S. Seitz möchte ich mich für Ihre Ideen und Ratschläge hinsichtlich des gesamten Projekts bedanken.

Danke auch der Arbeitsgruppe Schön für die freundliche Aufnahme und die schöne Zeit. Mein besonderer Dank gilt dabei U. Unkelbach, die mich in die Methoden eingearbeitet hat und immer eine Lösung für so manches Problem hatte. Ebenso sehr möchte ich S. Köchy für ihre Unterstützung und unermüdlichen Einsatz danken. Für die Hilfsbereitschaft bei offenen Fragen möchte ich ebenfalls A. Bennemann, C. Breysach und J. Busse, J. Schulz und K. Zachmann sowie allen weiteren Mitarbeiterinnen danken.

Vielen Dank auch an meine Mit-DoktorandInnen für die fachliche und methodische, aber auch für die moralische Unterstützung und die zahlreichen erheiternden Momente. Dabei möchte ich mich im Speziellen bei E. Neubert für ihre zahlreichen Hilfen bedanken und natürlich bei M. Lüders für die ausführlichen projektbezogenen Gespräche.

Ein weiterer großer Dank gilt F. Kohler für die Bereitstellung seines Graphpads sowie die vielseitige Hilfe. Auch Prof. Dr. H. Köster und M.-L. Wahle möchte ich für ihre Unterstützung danken.