

Aus dem Institut für Immunologie und Serologie  
der Medizinischen Fakultät Heidelberg  
(Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Meuer)

# **Modulation der Interaktion zwischen Integrinen und der extrazellulären Matrix in der Fibrose**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des  
Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. Hum.)  
der  
Medizinischen Fakultät Mannheim  
der Ruprecht-Karls-Universität  
zu  
Heidelberg

vorgelegt von  
Stefan Hamelmann

aus  
Bremen  
2022

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd  
Referentin: Prof. Dr. med. Inaam Nakchbandi

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1 Einleitung.....	5
1.1 Fibrose .....	5
1.2 TGF- $\beta$ .....	9
1.3 Integrine .....	17
1.4 Interaktion des TGF- $\beta$ - und Integrin-Signalwegs.....	22
1.5 Leberfibrose .....	25
1.6 Lungenfibrose.....	27
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	30
2 Material und Methoden.....	31
2.1 Materialien und Geräte.....	31
2.2 Tierexperimentelle Methoden .....	49
2.3 Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	54
2.4 Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	60
2.5 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden .....	65
2.6 Statistische Auswertung .....	72
3 Ergebnisse .....	72
3.1 Die Rolle des Integrin- $\beta$ 1 in der Leberfibrose .....	72
3.2 Modulation der Integrin-Matrix-Interaktion .....	99
4 Diskussion.....	131
4.1 Der Knockout von Integrin- $\beta$ 1 in Hepatozyten bewirkt die Bildung einer Leberfibrose .....	132
4.2 Die Modulation der Integrin-Matrix-Interaktion mittels kleiner Peptide.....	138
5 Zusammenfassung.....	147
6 Literaturverzeichnis .....	149
7 Lebenslauf.....	175
8 Danksagung .....	177

## Abkürzungsverzeichnis:

ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Proteinkinase B
ALT	Alanin-Aminotransferase
Alb	Albumin
Alb-Cre	Albumin-Promotor
ANOVA	<i>engl.: analysis of variance</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATI	<i>engl.: alveolar type I</i>
ATII	<i>engl.: alveolar type II</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BMP	<i>engl.: bone morphogenetic protein</i>
BTSM	<i>engl.: bovin tracheal smooth muscle</i>
CCL	CC-Chemokinligand
CCl <sub>3</sub>	Trichlormethyl-Radikale
CCl <sub>4</sub>	Tetrachlorkohlenstoff
CD	<i>engl.: Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>engl.: complementary DNA</i>
CHE	Cholinesterase
cm	Zentimeter
Cdc42	<i>engl.: cell division control protein 42 homolog</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cycGLQGE	zyklisiertes GLQGE
cycGLNGE	zyklisiertes GLNGE
c-Src	<i>engl.: Tyrosinkinase cellular and sarcoma</i>
CXCL 12	CXC-Motiv-Chemokin 12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl.: deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>engl.: dulbecco`s phosphate-buffered saline</i>
DTT	1,4-Dithiothretol
ECL	<i>engl.: enhanced-chemiluminescence</i>
EDTA	<i>engl.: ethylenediaminetetraacetic acid</i>

EGF	<i>engl.: epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
EndoMT	Endothelial-Mesenchymal Transition
engl.	<i>english</i>
ERK	<i>engl.: extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>eng.: fluorescence-activated cell sorting</i>
FAK	<i>engl.: focal adhesion kinase</i>
FAT	<i>engl.: focal-adhesion-targeting domain</i>
FCS	<i>engl.: fetal calf serum</i>
FERM	<i>engl.: band four point one, ezrin-radixin-moesin</i>
FKBPI2	<i>engl.: immunophilin FK506-binding protein</i>
fl	floxed
G	Gauge
g	Beschleunigungsgröße
GDF	<i>engl.: growth and differentiation factors</i>
GLNGE	Glycin-Leucin-Asparagin-Glycin-Glutaminsäure
GLOGE	Glycin-Leucin-Pyrrolysin-Glycin-Glutaminsäure
GLOGER	Glycin-Leucin-Pyrrolysin-Glycin-Glutaminsäure-Arginin
GLQGE	Glycin-Leucin-Glutamin-Glycin-Glutaminsäure
GFOGER	Glycin-Phenylalanin-Pyrrolysin-Glycin-Glutaminsäure-Arginin
Grb2	<i>engl.: growth factor receptor-bound protein 2</i>
HC	<i>engl.: hepatocyte</i>
HSC	<i>engl.: hepatic stellate cells</i>
IBF	Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung
IGF	<i>engl.: Insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
ILK	<i>engl.: integrin linked kinase</i>
IFN	Interferon
IPP	ILK-PINCH-Parvin
i.p.	intraperitoneal
JNK	c-Jun N-terminale Kinase

KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KC	Kupffer-Zellen ( <i>engl.: Kupffer cell</i> )
LAP	<i>engl.: latency associated protein</i>
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LDV	Leucin-Asparaginsäure-Valin
LSEC	<i>engl.: liver sinusoidal endothelial cell</i>
LLC	<i>engl.: large latent complex</i>
LTBP	<i>engl.: latent TGF-<math>\beta</math> binding protein</i>
M	Molar
MAPK	<i>engl.: mitogen-activated protein kinase</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter
Mlec	<i>engl.: mink lung epithelial cells</i>
mM	Millimol
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	<i>engl.: messengerRNA</i>
MSC	<i>engl.: mesenchymal stromal cells</i>
N	Normalität
NaCl	Natriumchlorid
nM	Nanomol
nm	Nanometer
Mx1	<i>engl.: myxovirus resistance 1-promotor</i>
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-I
PCR	<i>engl.: polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>engl.: platelet-derived growth factor</i>
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PINCH	<i>engl.: particularly-interesting-new-cys-his-protein</i>
pIpC	<i>engl.: polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PTEN	<i>engl.: phosphatase and tensin homolog</i>

p38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
P/S	Penicillin/Streptomycin
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
Rap1-RIAM	<i>engl.: Rap1-GTPase/Rap1-GTP-interacting adapter molecule</i>
Ras	<i>engl.: rat sarcoma</i>
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RhoA	<i>engl.: ras homolog gene family member A</i>
RNA	<i>engl.: ribonucleic acid</i>
ROCK-1	<i>engl.: rho associated coiled-coil containing protein kinase 1</i>
SARA	<i>engl.: smad anchor for receptor activation</i>
SDS	<i>engl.: sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	<i>engl.: standard error of the mean</i>
siRNA	<i>engl.: small interfering RNA</i>
SLC	<i>engl.: small latent complex</i>
Smurf	<i>engl.: smad ubiquitination regulatory factor</i>
Sos	<i>engl.: son of sevenless</i>
Src	<i>engl.: sarcoma</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAK1	<i>engl.: TGF-<math>\beta</math>-activated kinase 1</i>
TGF	<i>engl.: transforming growth factor</i>
TGF- $\beta$ R	TGF- $\beta$ Transmembranrezeptor
TIMP	<i>engl.: tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TNF- $\alpha$	<i>engl.: tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
TRAF6	<i>engl.: TNF receptor-associated factor 6</i>
T <sub>Reg</sub>	regulatorische T-Zelle
U	<i>engl.: unit</i>
UV	Ultraviolett
VSMC	<i>engl.: vascular smooth muscle cells</i>
$\alpha$ -SMA	<i>engl.: alpha-smooth muscle actin</i>
$\mu$ l	Mikroliter

# 1 Einleitung

## 1.1 Fibrose

Eine Fibrose resultiert aus einer chronischen Entzündung, wobei das Gewebe beschädigt wird. Bei der Reparatur des Gewebes werden die beschädigten Zellen durch neue Zellen und das Parenchymgewebe durch Bindegewebe ersetzt. Eine Fibrose entsteht, wenn der Reparaturprozess fortschreitet und es zu einer unkontrollierten Ansammlung von extrazellulärer Matrix kommt ((Wynn, 2007); (Tomasek et al., 2002); (Friedman, 2004); (Schuppan et al., 2001)). Dies kann in verschiedenen Organen wie im Herzen, in der Lunge oder in der Leber auftreten, wobei ähnliche Mechanismen vorkommen ((Rockey et al., 2015); (Li et al., 2017)). Werden die Endothel- oder Epithelzellen beschädigt, werden zirkulierende Thrombozyten aktiviert und setzen den Wachstumsfaktor aus Thrombozyten (*engl.: platelet-derived growth factor*; PDGF) und den transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$  (*engl.: transforming growth factor  $\beta$* ; TGF- $\beta$ ) frei. PDGF sorgt für die Sekretion von Chemokinen, während TGF- $\beta$  die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen durch Fibroblasten fördert (Barrientos et al., 2008). Die abgegebenen Chemokine sorgen für eine Infiltration von Immunzellen, insbesondere Monozyten und Neutrophilen, in das beschädigte Areal. Diese Zellen helfen bei der Wundheilung und exprimieren weitere Zytokine und Chemokine, aber auch reaktiven Sauerstoff, welcher für das Gewebe schädlich ist. Werden die pro-inflammatorischen Monozyten und Neutrophilen nicht rechtzeitig eliminiert oder durch anti-inflammatorische Mechanismen inhibiert, können diese das Fortschreiten einer Fibrose fördern. Die Expression des Zytokins TGF- $\beta$  spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung einer Leber-, Lungen-, Nieren-, Haut- oder Herzfibrose. TGF- $\beta$  ist direkt an der Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche die extrazelluläre Matrix in der Fibrose synthetisieren, beteiligt ((Pohlers et al., 2009); (Wang et al., 2011); (Wynn and Ramalingam, 2012)). Des Weiteren haben Makarev et al. gezeigt, dass sich die Signalwege von TGF- $\beta$ , Interleukin-6 (IL-6) und Integrin-gekoppelte-Kinase-Signalwege in der Lungen- und Leberfibrose ähneln (Makarev et al., 2016). Da eine Fibrose ohne Behandlung zu Organversagen und zum Tod führen kann, bieten die übereinstimmenden Mechanismen einen guten Ansatz für die Entwicklung neuer Therapien in der Behandlung der Fibrosen (Wynn, 2008).



### 1.1.1 Fibroblasten

Die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten ist ein entscheidender Mechanismus in der Entwicklung einer Fibrose. Fibroblasten sind Bindegewebszellen, welche in jedem Gewebe vorkommen. Sie sind eine heterogene Zellpopulation mesenchymalen Ursprungs. Die Produktion von Matrixproteinen wie Kollagen, Laminin oder auch Fibronectin, sowie die Proteoglykane des Bindegewebes, gehören zu den Hauptaufgaben der Fibroblasten. Sie spielen daher eine zentrale Rolle bei der Regulation der extrazellulären Matrix (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014). Im gesunden Gewebe sind die Fibroblasten wenig aktiv und halten das Gleichgewicht zwischen dem Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix aufrecht (Li and Wang, 2011). Durch Schädigung oder Veränderung des Gewebes proliferieren und differenzieren die Fibroblasten zu Proto-Myofibroblasten. Diese sind durch die Expression von *stress fibres* (kontraktile Aktinbündel, welche in Nicht-Muskelzellen zu finden sind), die Expression von Fibronectin mit EDA (eine Spleißvariante von Fibronectin) und die Bildung von Transmembrankomplexen (Fibronexus) charakterisiert. Die Freisetzung von verschiedenen Chemokinen und Zytokinen, wie TGF- $\beta$ , IL-6 oder IL-1 $\beta$ , fördern die Differenzierung der Proto-Myofibroblasten zu Myofibroblasten ((Feghali and Wright, 1997); (Scotton and Chambers, 2007); (Wynn, 2008); (Alberts et al., 2002); (Gabbiani, 2003)). Die Myofibroblasten unterscheiden sich von den Fibroblasten und den Proto-Myofibroblasten durch ihre Fähigkeit  $\alpha$ -SMA (*engl.: alpha-smooth muscle actin*) zu exprimieren, sich stärker zusammenzuziehen und größere Mengen extrazellulärer Matrix zu produzieren ((Kendall and Feghali-Bostwick, 2014); (Tomasek et al., 2002)). Die Differenzierung zu Myofibroblasten erfolgt in gesunden Geweben selten, sondern tritt erst nach starker oder dauerhafter Schädigung auf. Dabei spielen die Myofibroblasten eine entscheidende Rolle bei der Wundheilung und bei der Entstehung einer Fibrose (Gabbiani, 2003). Nicht nur Fibroblasten, sondern auch andere Zelltypen können zu Myofibroblasten differenzieren.

### 1.1.2 Myofibroblasten

Verschiedene Zellarten sind in der Lage sich in Myofibroblasten zu differenzieren, wodurch sie einen direkten Einfluss auf die Wundheilung und Fibrogenese haben. Darunter zählen wie oben erwähnt die Fibroblasten, aber auch Epithelzellen,

Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen (*engl.: vascular smooth muscle cells*; VSMC), Perizyten, und Fibrozyten.

Epithelzellen können durch die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) in Zellen mit mesenchyalem Phänotyp übergehen. Dies geschieht unter anderem bei der Embryogenese, Epithelkarzinomen oder aber auch bei Schädigung des Gewebes. Dabei sind die Epithelzellen bei der Wundheilung und auch bei der Bildung von Fibrosen aktiv. Bei der EMT verlieren die Epithelzellen zunächst ihre Polarität und ihre Zellkontakte (*engl.: junctions*), wodurch sie in andere Teile des Gewebes integrieren können. Zusätzlich wird das Zytoskelett moduliert, wobei *stress fibres* gebildet werden. Diese Zellen exprimieren auch den Myofibroblasten Marker  $\alpha$ -SMA, sowie extrazelluläre Matrixproteine ((Hay, 1995); (Kalluri and Weinberg, 2009); (Li et al., 2016)). Es gibt Hinweise, dass die EMT bei Lungenfibrosen über den Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg reguliert werden kann (Chilosi et al., 2003). In Leberfibrosen wird die EMT über TGF- $\beta$  vermittelt, wobei auch der PI3K-Akt-Signalweg (Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B), FAK (*engl.: focal adhesion kinase*) oder ERK (*engl.: extracellular signal-regulated kinase*) involviert sein können ((Bakin et al., 2000); (Cicchini et al., 2008); (Xie et al., 2004); (ZHAO et al., 2016)). Auch in Nierenfibrosen wurde beschrieben, dass Myofibroblasten aus EMT entstehen können und dies durch den Notch Signalweg kontrolliert wird ((Okada et al., 1997); (Ng et al., 1998); (Jinde et al., 2001); (Du et al., 2012)). In Lungenfibrosen, Leberfibrosen und auch Nierenfibrosen scheinen die Epithelzellen jedoch nicht die Hauptquelle der Myofibroblasten zu sein ((Rock et al., 2011); (Hill et al., 2019); (Salton et al., 2019); (Lee et al., 2014); (Taura et al., 2010); (Lin et al., 2008); (Humphreys et al., 2010)).

Genau wie die Epithelzellen können auch die Endothelzellen durch eine Endothelial-Mesenchymal Transition (EndoMT) in Zellen mit einem myofibroblastischen Phänotyp übergehen. Dieser Prozess wurde in verschiedenen Fibrosen beobachtet. Zeisberg et al. haben gezeigt, dass bei der Nierenfibrose 30-50 % der Myofibroblasten sowohl  $\alpha$ -SMA als auch den Endothelmarker CD31 (*engl.: cluster of differentiation 31*) exprimieren (Zeisberg et al., 2008). Zudem konnten Hashimoto et al. an einem Model der Lungenfibrose zeigen, dass etwa 16 % der Lungenfibroblasten aus Endothelzellen differenziert sind und einige dieser Zellen sowohl Kollagen I als auch  $\alpha$ -SMA exprimieren (Hashimoto et al., 2010). Dabei wird die EndoMT in der Nieren-, Lungen- und Herzfibrose durch das Zytokin TGF- $\beta$  gesteuert ((Piera-Velazquez et al., 2011);

(Zeisberg et al., 2007); (Li et al., 2010)).

Es gibt Hinweise, dass VSMCs und Myofibroblasten die gleichen Progenitorzellen haben und daher Ähnlichkeiten aufweisen. VSMCs exprimieren genau wie Myofibroblasten Desmin, Vimentin sowie  $\alpha$ -SMA und können sich ebenfalls zusammenziehen. Für die Expression von  $\alpha$ -SMA verwenden VSMCs jedoch einen anderen Transkriptionsmechanismus im Vergleich zu den Myofibroblasten ((Yoshida and Owens, 2005); (Gan et al., 2007)). In Patienten mit einer systemischen Sklerose wurde eine verminderte VSMC und eine erhöhte Myofibroblasten Differenzierung aus mesenchymalen Stromazellen (*engl.: mesenchymal stromal cells; MSC*) festgestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Verschiebung der Differenzierung TGF- $\beta$ 1 abhängig ist und einen neuen Ursprung von Myofibroblasten darstellt (Hegner et al., 2016).

Perizyten sind Zellen, die den Endothelzellen anliegen und mit diesen direkt über Zellkontakte oder über parakrine Sekretion kommunizieren. Sie regulieren unter anderem die Endothelproliferation, die Endotheldifferenzierung, die Durchlässigkeit der Kapillaren und den Gefäßdurchmesser sowie die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke ((Sims, 1986); (Bergers and Song, 2005); (Armulik et al., 2010)). Perizyten sind mesenchymalen Ursprungs und können sich bei Verletzungen in Myofibroblasten umwandeln. In der Nierenfibrose sind die Perizyten die Hauptquelle der Myofibroblasten, wobei die Perizyten-Myofibroblasten-Umwandlung über den TGF- $\beta$ -Signalweg oder den PDGF-Signalweg induziert wird ((Faulkner et al., 2005); (Lin et al., 2008); (Humphreys et al., 2010); (Chen et al., 2011); (Wu et al., 2013)). Auch in der Leberfibrose nehmen die Leberperizyten, die hepatischen Sternzellen (*engl.: hepatic stellate cells; HSC*), nach der Aktivierung einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp an. Dabei wird  $\alpha$ -SMA sowie große Mengen an extrazellulären Matrixproteinen exprimiert. Die Aktivierung der HSCs kann durch verschiedene Moleküle oder Signalwege geschehen, unter anderem durch oxidativen Stress, Interleukine oder Zytokine ((Lan et al., 2015); (Jiao et al., 2016); (Syn et al., 2011); (Hou and Syn, 2018)). Dabei scheint das Zytokin TGF- $\beta$  einer der Hauptvermittler bei der Aktivierung der HSCs zu sein (Dewidar et al., 2019). Auch der Wachstumsfaktor PDGF fördert die Aktivierung der HSCs, wobei unter anderem der PI3K/AKT-Signalweg aktiviert wird (Borkham-Kamphorst et al., 2008). Die HSCs wurden lange als Hauptquelle der Myofibroblasten in der Leberfibrose beschrieben, wobei es scheint, als wären sie nur eine von mehreren Ursprüngen ((Kisseleva et al., 2012); (Kisseleva, 2017)). Genau

wie in der Leberfibrose scheinen die Perizyten auch in der Lungenfibrose eine von mehreren Vorläuferpopulationen der Myofibroblasten zu sein ((Hung et al., 2013); (Rock et al., 2011); (Rowley and Johnson, 2014)). Dabei kann der Übergang der Perizyten in Myofibroblasten durch Notch1 und dem PDGF/ROCK1-Signalweg (*engl.: rho associated coiled-coil containing protein kinase 1*) reguliert werden (Wang et al., 2019).

Fibrozyten sind zirkulierende Mesenchymzellen aus dem Knochenmark, welche aus Monozyten differenzieren. Sie sind durch die gleichzeitige Expression des hämatopoetischen Stammzellmarkers CD45, den Stammzellmarker CD34, den Monozytenmarkern CD14 und CD11 sowie die Expression von Matrixproteinen wie Kollagen I, Kollagen III und dem Protein Vimentin charakterisiert ((Bucala et al., 1994); (Pilling et al., 2009);(Herzog and Bucala, 2010)). Bei der Schädigung von Geweben werden die Fibrozyten aus dem Knochenmark rekrutiert, wobei sie bei der Wundheilung und auch bei der Fibrogenese beteiligt sind. Die Rekrutierung der Fibrozyten wird durch verschiedene Chemokine, wie CC-Chemokinligand 2 (CCL2), CCL3, CCL12, CCL21 oder CXC-Motiv-Chemokin 12 (CXCL12) reguliert ((Ekert et al., 2011); (Ishida et al., 2007); (Moore et al., 2006); (Sakai et al., 2006); (Phillips et al., 2004)). Unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  oder Endothelin differenzieren die Fibrozyten zu myofibroblasten ähnlichen Zellen, was zu einer vermehrten Expression von  $\alpha$ -SMA sowie Matrixproteinen und einem Verlust von CD34 und CD45 führt (Chong et al., 2019). Zudem konnten isolierte Fibrozyten *in vitro* mit bestimmten Wachstumsmedien auch zu Adipozyten, Chondrozyten oder Osteoblasten differenziert werden ((Gomperts and Strieter, 2007); (Choi et al., 2010)).

## 1.2 TGF- $\beta$

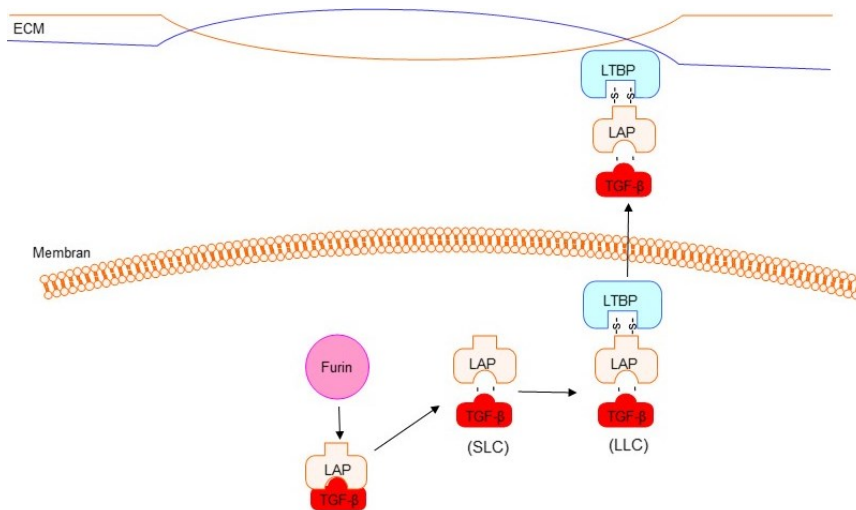
TGF- $\beta$  wird als ein zirka 25 kDa großes Homodimer gebildet und gehört zu der TGF- $\beta$ -Familie. Die TGF- $\beta$ -Familie kann in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Zum einen in die TGF- $\beta$ -ähnliche Gruppe, zu welcher die TGF- $\beta$  Isoformen 1, 2 und 3, Activin, Nodal und einige GDFs (*engl.: growth and differentiation factors*) gehören und zum anderen in die BMP-ähnliche Gruppe (*engl.: bone morphogenetic protein*), zu welcher die BMPs, die meisten GDFs und Anti-Müller-Hormon gehören. Die Mitglieder dieser Gruppen regulieren zahlreiche Zellprozesse wie Proliferation, Differenzierung, Zelltod, Zelladhäsion und Zellmigration ((Weiss and Attisano, 2013); (Hinck et al., 2016)). Das

am besten untersuchte Protein ist das TGF- $\beta$ 1, welches eine wichtige Rolle in der Physiologie und Pathologie der Leber spielt. Wird die Leber durch Alkohol, oxidativen Stress oder durch eine Virushepatitisinfektion geschädigt, werden verschiedene Zytokine (TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ )), freigesetzt. Diese bewirken unter anderem die Aktivierung/Transdifferenzierung der hepatischen Sternzellen zu Myofibroblasten, die Aktivierung der Kupffer-Zellen sowie die Apoptose von Hepatozyten ((Singh and Czaja, 2007); (Czaja, 2002); (Ben-Ari et al., 2004); (Barrett et al., 2003); (Tsukamoto, 1999); (Zhang et al., 2007)). Zeitgleich stimuliert TGF- $\beta$  die Produktion von Matrixproteinen (Kollagen I, Fibronectin) und zudem die eigene Expression in den Myofibroblasten, was zu einer autokrinen Verstärkung der Stimulation durch TGF- $\beta$  führt ((Bachem et al., 1993); (Casini et al., 1993)). Des Weiteren wird TGF- $\beta$  in Granulozyten und den Kupffer-Zellen exprimiert, welches den inflammatorischen Prozess fördert, bei dem Immunzellen in die geschädigte Leber rekrutiert werden ((Nakatsukasa et al., 1990); (Roth et al., 1998); (Markose et al., 2018)). Bei einer akuten Expression wirkt TGF- $\beta$  zunächst als anti-inflammatorisches Zytokin (Wundheilung, Generierung von regulatorischen T-Zellen ( $T_{Reg}$ )), bei dauerhafter Expression pro-inflammatorisch (Dooley and ten Dijke, 2012). Eine ähnliche Wirkung wird auch bei hepatozellulären Karzinomen gezeigt. In Mäusen, wo der TGF- $\beta$  Rezeptor 2 (TGF- $\beta$ R2) verringert exprimiert wurde, konnte eine erhöhte Anfälligkeit für eine hepatozelluläre Karzinogenese festgestellt werden ((Kanzler et al., 2001); (Im et al., 2001)). Dies zeigt eine zunächst tumorsuppressive Wirkung des TGF- $\beta$ -Signalwegs auf die Leber. Bei anhaltender Stimulation mit TGF- $\beta$  wird jedoch vermehrt die Ha-Ras GTPase exprimiert, wodurch der MAPK (*engl.: mitogen-activated protein kinase*) /ERK (*engl.: extracellular-signal regulated kinase*) -Signalweg aktiviert wird. Dieser bewirkt bei den Hepatozyten eine Resistenz gegenüber der apoptotischen Wirkung von TGF- $\beta$  und führt zur Proliferation, wodurch die Tumorentwicklung fortschreitet ((Gotzmann et al., 2002); (Fischer et al., 2005); (Hamilton and Wolfman, 1998))

### 1.2.1 Die Aktivierung von TGF- $\beta$

Zuerst werden die Isoformen des TGF- $\beta$  als pro-TGF- $\beta$  synthetisiert. Dabei sind die Isoformen kovalent an das LAP (*engl.: latency-associated protein*) gebunden. Die LAPs sind in der Lage Disulfidbrückenbindungen zu bilden, wodurch ein Homodimer

entsteht. Ohne diese Dimerisierung kann kein aktives TGF- $\beta$  gebildet werden (Gray and Mason, 1990). Das Homodimer wird durch die Protease Furin intrazellulär gespalten. Das reife TGF- $\beta$  bleibt jedoch nicht-kovalent mit dem LAP als SLC (*engl.: small latent complex*) verbunden (Dubois et al., 1995). Das reife SLC wird nur von wenigen Zellen freigesetzt. Für eine schnelle Faltung und Freisetzung aus der Zelle heraus ist ein weiteres Protein notwendig, das LTBP (*engl.: latent TGF- $\beta$  binding protein*). Das LTBP ist über Disulfidbrücken kovalent mit dem LAP des SLCs verbunden wodurch ein großer latenter Komplex entsteht (*engl.: large latent complex; LLC*). In solch einem großen latenten Komplex wird das TGF- $\beta$  von vielen Zellen im inaktiven Zustand freigesetzt (Abbildung 1). Von den 4 bekannten LTBPs binden lediglich das LTBP-1 und -3 alle drei Isoformen des SLCs (TGF- $\beta$ 1-, TGF- $\beta$ 2- und TGF- $\beta$ 3-LAP), wobei das LTBP-4 ein schwaches Bindevermögen zu TGF- $\beta$ 1-LAP zeigt. Das LTBP-2 bindet an keine der drei Isoformen. Des Weiteren sorgt das LTBP durch die Bindung an extrazelluläre Matrixproteine wie Fibrillin-1, Fibronectin, Vitronectin oder Kollagen IV für die Einlagerung des LLCs in die extrazelluläre Matrix ((Miyazono et al., 1991); (Saharinen and Keski-Oja, 2000); (Dallas et al., 1994); (Robertson et al., 2015); (Fava and McClure, 1987); (Schoppet et al., 2002); (Paralkar et al., 1991)). Dort wird das inaktive TGF- $\beta$  durch die Freisetzung vom LAP mittels proteolytischer Spaltung aktiviert, welches unter anderem durch verschiedene Matrixmetalloproteasen (MMP), Plasminogen-Aktivatoren, BMP-1, Plasmin, Elastase, Kathepsin D oder Thrombin durchgeführt wird ((Ge and Greenspan, 2006); (Clark and Coker, 1998); (Chu and Kawinski, 1998); (Lyons et al., 1990); (Karonen et al., 1997); (Lyons et al., 1988); (Taipale et al., 1992)).

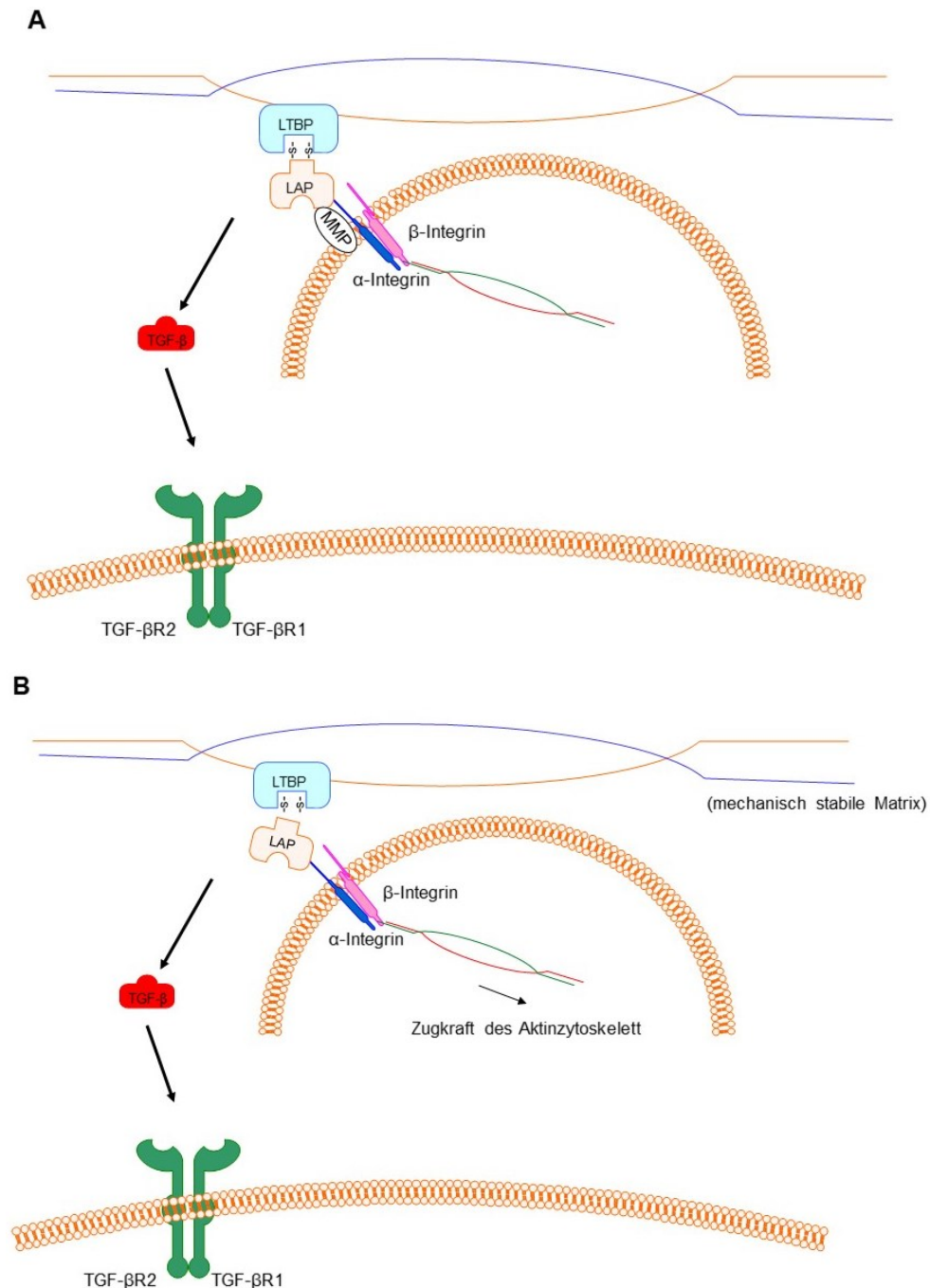


**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Freisetzung von TGF-β**

Das TGF-β ist kovalent an das LAP gebunden. Furin spaltet diese Verbindung, wobei das TGF-β weiterhin nicht-kovalent an das LAP gebunden ist (SLC). Über Disulfidbrücken wird der SLC mit LTBP verbunden (LLC) und aus der Zelle freigesetzt. Die Bindung vom LTBP an Matrixproteine führt zur Einlagerung des LLCs in die extrazellulären Matrix ((Gray and Mason, 1990); (Dubois et al., 1995); (Saharinen and Keski-Oja, 2000); (Robertson et al., 2015)).

Die Aktivierung vom TGF-β1 und -β3 wird auch von Integrinen reguliert. Die Integrine-αβ1, -αβ3, -αβ5, -αβ6, -αβ8, -α5β1, -α8β1 und -α11β3 können an die RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) vom LAP binden und so eine Interaktion mit dem LLC eingehen ((Ludbrook et al., 2003); (Sheppard, 2005)). Jedoch scheinen lediglich die Integrine-αβ3, -αβ5, -αβ6, -αβ8 und -αβ1 Integrin das latente (inaktive) TGF-β auch zu aktivieren ((Wipff et al., 2007); (Henderson et al., 2013)). Dafür sind zwei verschiedene Mechanismen möglich, ein Protease-abhängiger (Abbildung 2 A) und ein Protease-unabhängiger Mechanismus (Abbildung 2 B). Beim Protease-abhängigen Mechanismus bindet die Protease zeitgleich an das Integrin, während dieses mit dem LLC interagiert. Die räumliche Nähe die dadurch entsteht, fördert die proteolytische Spaltung, sodass das TGF-β vom LLC freigesetzt wird. Dieser Mechanismus wurde bis jetzt für das Integrin αβ3 und αβ8 mit einer Matrixmetalloprotease beschrieben ((Rolli et al., 2003); (Brooks et al., 1996); (Mu et al., 2002); (Araya et al., 2006); (Nishimura, 2009)). Beim Protease-unabhängigen Mechanismus überträgt das Integrin, welches intrazellulär mit dem Aktinzytoskelet verbunden ist, die Kontraktion innerhalb der Zelle auf das LAP. Dadurch wird die Konformation des LAP verändert und das TGF-β wird vom LLC freigesetzt und somit aktiviert. Dieser Mechanismus funktioniert jedoch nur, wenn das LLC in einer mechanisch resistenten extrazellulären Matrix eingegliedert vorliegt, da die Kontraktion in einer nachgebenden extrazellulären Matrix nicht übertragen werden

kann. Solch eine Konformationsänderung kann durch die Integrine- $\alpha\beta 3$ , - $\alpha\beta 5$ , - $\alpha\beta 6$  und - $\alpha\beta 1$  ausgelöst werden ((Munger et al., 1999), (Wipff et al., 2007); (Wipff and Hinz, 2008); (Margadant and Sonnenberg, 2010); (Henderson et al., 2013); (Brown and Marshall, 2019)).



### Abbildung 2: Schematische Abbildung der Aktivierung von TGF-β

In Abbildung 2 A ist als Beispiel die Protease-abhängige Aktivierung von TGF-β dargestellt. Dabei interagiert eine MMP mit einem Integrin, welches zeitgleich mit dem LAP verbunden ist. Die räumliche Nähe der MMP zum TGF-β bewirkt die proteolytische Spaltung und die Freisetzung des TGF-β.

In Abbildung 2 B ist die Aktivierung des TGF-β durch Integrine dargestellt. Das Integrin ist sowohl mit dem

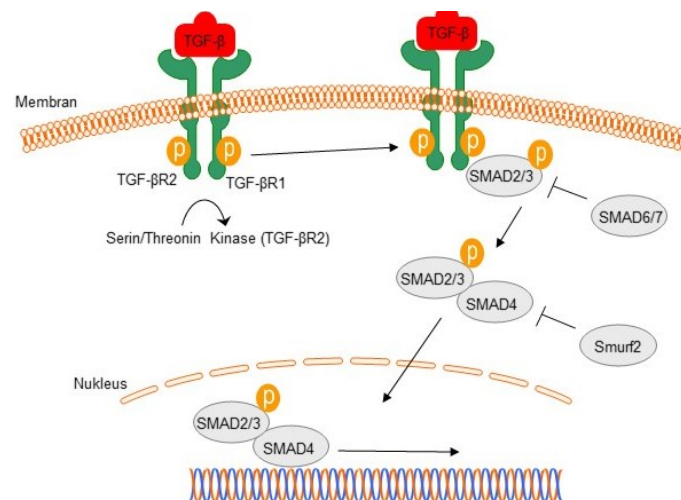


extrazellulären LAP als auch mit dem intrazellulären Aktinzytoskelett verbunden. Durch Kontraktion der Zelle entsteht eine Zugkraft des Aktinzytoskeletts, welches über das Integrin auf das LAP übertragen wird. Dadurch verändert sich die Konformation des LAP und das TGF- $\beta$  wird freigesetzt. Dabei muss der LLC aber in einer mechanisch stabilen Matrix vorliegen, da in einer nachgebenden extrazellulären Matrix die Kontraktion nicht übertragen wird. Abbildung in Anlehnung an ((Wipff et al., 2007); (Wipff and Hinz, 2008)).

### 1.2.2 TGF- $\beta$ Signalwege

Der Effekt des freien TGF- $\beta$  Homodimers wird durch die Bindung an die TGF- $\beta$  Transmembranrezeptoren Typ I und Typ II (TGF- $\beta$ RI, TGF- $\beta$ RII) vermittelt (Abbildung 3). Bei der Bindung von TGF- $\beta$  entsteht ein heterotetramer Komplex aus zwei TGF- $\beta$ RI und zwei TGF- $\beta$ RII Molekülen (Wells et al., 1999). Das TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3 besitzen eine höhere Bindungsaffinität zum TGF- $\beta$ RII und binden zuerst an diesen, woraufhin TGF- $\beta$ RI rekrutiert wird (Groppe et al., 2008). Die BMPs haben im Gegensatz zum TGF- $\beta$ 1/- $\beta$ 3 eine höhere Bindungsaffinität zum Rezeptor Typ I ((Sebald et al., 2004); (Hinck, 2012)). Der intrazelluläre Signalweg beginnt mit der Phosphorylierung des TGF- $\beta$ RI durch die Serin/Threonin Kinase des TGF- $\beta$ RII (Wrana et al., 1994). Die Aktivität des TGF- $\beta$ RII wird durch Autophosphorylierung reguliert, wobei eine Phosphorylierung am Ser416 die TGF- $\beta$ RII Kinase inhibiert, eine Phosphorylierung am Ser409 die Kinase jedoch aktiviert (Luo and Lodish, 1997). Die Phosphorylierung des TGF- $\beta$ RI bewirkt eine Konformationsänderung des TGF- $\beta$ RI, was zur Freisetzung des zirka 12 kDa FKBPI2 (*engl.: immunophilin FK506-binding protein*) führt, welches sonst die TGF- $\beta$ RI Kinase Aktivität inhibiert (Wang et al., 1996). Nach der Aktivierung vom TGF- $\beta$ RI werden verschiedene SMAD Proteine phosphoryliert. Die Rezeptoren für Nodal, Aktivin und TGF- $\beta$  phosphorylieren SMAD2 und SMAD3, wobei die Rezeptoren für BMPs und Anti-Müller-Hormon SMAD1, SMAD5 und SMAD8 phosphorylieren (Macias et al., 2015). SMAD2/3 werden über das Protein SARA (*engl.: smad anchor for receptor activation*) an den TGF- $\beta$ RI rekrutiert und dann phosphoryliert (Tsukazaki et al., 1998). Die phosphorylierten SMAD Proteine bilden zusammen mit dem SMAD4 einen heteromeren Komplex. Dieser Komplex transloziert in den Nukleus wo er als Transkriptionsfaktor agiert ((Massagué et al., 2005); (Fabregat et al., 2016)). Die Phosphorylierung von SMAD Proteinen kann durch die Proteine SMAD6/7 inhibiert werden, indem diese an den aktivierten TGF- $\beta$ RI binden und dadurch die Interaktion zwischen TGF- $\beta$ RI und den SMAD2/3 Proteinen blockieren ((Imamura et al., 1997); (Hayashi et al., 1997); (Lo et al., 2014)). Des Weiteren kann SMAD6, durch die Bindung an SMAD1, die Interaktion zwischen SMAD1 und SMAD4 verhindern und so den Signalweg inhibieren (Hata et al., 1998).

Neben SMAD6/7 werden SMAD1 und SMAD5 durch die E3 Ubiquitinligase Smurf1 (engl.: *smad ubiquitination regulatory factor 1*) reguliert. Smurf1 ubiquitiniert SMAD1/5 wodurch die Degradation durch Proteasomen eingeleitet wird (Zhu et al., 1999). SMAD1 und SMAD2 können auch durch Smurf2 ubiquitiniert werden, welches in der Degradation endet ((Lin et al., 2000); (Zhang et al., 2001)).

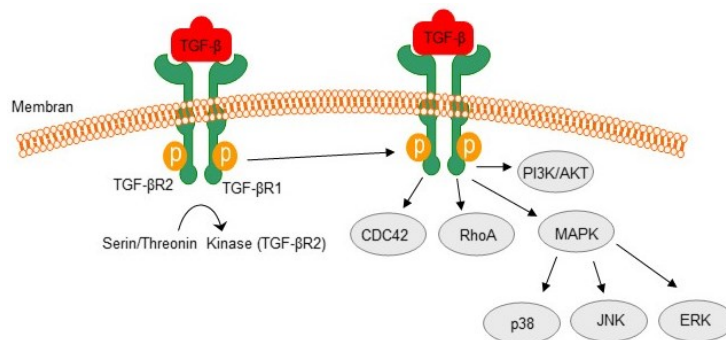


**Abbildung 3: Schematische Darstellung des kanonischen TGF- $\beta$ -Signalwegs**

Die Bindung von TGF- $\beta$  an die Rezeptoren führt zu einer Phosphorylierung der intrazellulären Domäne. Durch die Bindung der SMAD-Proteine SMAD2/3 an diese Domänen werden diese phosphoryliert, gehen einen Komplex mit SMAD4 ein und fungieren im Nucleus als Transkriptionsfaktor. Die Aktivierung von SMAD2/3 kann durch SMAD6/7 inhibiert werden. Smurf2 kann die Degradation von SMAD1 und SMAD2 einleiten, wodurch keine Interaktion mit SMAD4 entsteht und der Transfer in den Nucleus verhindert wird. Abbildung in Anlehnung an ((Chaudhury and Howe, 2009); (Zhang et al., 2001)).

Neben den SMAD-Signalwegen werden auch nicht-SMAD-Signalwege durch aktivierte TGF- $\beta$  Rezeptoren ausgelöst (Abbildung 4). So wird zum Beispiel das Protein TRAF6 (engl.: *TNF receptor-associated factor 6*) mittels Ubiquitinierung aktiviert, welches die Interaktion zwischen TRAF6 und TAK1 (engl.: *TGF- $\beta$ -activated kinase 1*) fördert. TAK1 aktiviert den MAP Kinase Signalweg, wodurch letztendlich die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und p38 MAPK (p38-mitogenaktivierte Proteinkinase) aktiviert werden (Yamashita et al., 2008). Die Aktivierung vom TGF- $\beta$ RI kann zu einer direkten Phosphorylierung des ShcA Proteins führen, welches dann eine Interaktion mit Grb2 (engl.: *growth factor receptor-bound protein 2*) und Sos (engl.: *son of sevenless*) eingehen kann. Dieser Komplex aktiviert Ras (engl.: *rat sarcoma*), was wiederum zur Aktivierung von ERK führt (Lee et al., 2007). Darüber hinaus kann die Bindung von TGF- $\beta$  an seine Rezeptoren zur Aktivierung von Cdc42 (engl.: *cell division*

*control protein 42 homolog*) und RhoA (*engl.: ras homolog gene family member A*) führen, wodurch das Zytoskelett reguliert wird (Edlund et al., 2002). Außerdem führt die Stimulation durch TGF- $\beta$  zur Transdifferenzierung von Epithelzellen zu mesenchymalen Zellen wobei, der PI3K/Akt-Signalweg aktiviert wird ((Yi et al., 2005); (Kattla et al., 2008)).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des nicht-kanonischen TGF- $\beta$ -Signalwegs**

Die Bindung von TGF- $\beta$  an die Rezeptoren führt im nicht-kanonischen Signalweg zu einer Aktivierung von CDC42 und RhoA, des PI3K/AKT-Signalwegs und der MAP Kinasen p38, JNK und ERK. Abbildung in Anlehnung an (Zhang, 2009).

### 1.2.3 Die Internalisierung von TGF- $\beta$

Der TGF- $\beta$ -Signalweg wird auch durch die Rezeptor-Internalisierung sowohl positiv als auch negativ reguliert. Dabei werden die TGF- $\beta$  Rezeptoren für gewöhnlich durch eine Clathrin-vermittelte Endozytose oder durch Caveolae internalisiert.

Bei der Clathrin-vermittelten Endozytose liegen die Rezeptoren in einer mit Clathrin angereicherten Grube und interagieren mit dem Adapterkomplex AP2. Dabei kann AP2 sowohl an TGF- $\beta$ RI als auch an TGF- $\beta$ RII binden. Durch die Bindung an den TGF- $\beta$  Rezeptor und an die Clathrine in der Membran wird die Endozytose initiiert (Yao et al., 2002). Bei der Endozytose kann der TGF- $\beta$  Rezeptor in frühen Endosomen noch mit SARA und Endofin interagieren und so SMAD2/3 beziehungsweise SMAD1 phosphorylieren ((Hayes et al., 2002); (Shi et al., 2007)). Die TGF- $\beta$  Rezeptoren werden nach der Endozytose entweder in Lysosomen degradiert oder aber durch einen Rab11 abhängigen Prozess an die Membranoberfläche zurück transportiert (Mitchell et al., 2004).

Caveolae sind eine zirka 50 bis 100 nm große Grube in der Membran, welche besonders Cholesterol-, Glycosphingolipid- und Caveolin-1-reich sind und zu den Lipid Rafts gehören. Caveolin-1 kann direkt mit TGF- $\beta$ RI interagieren und dadurch die

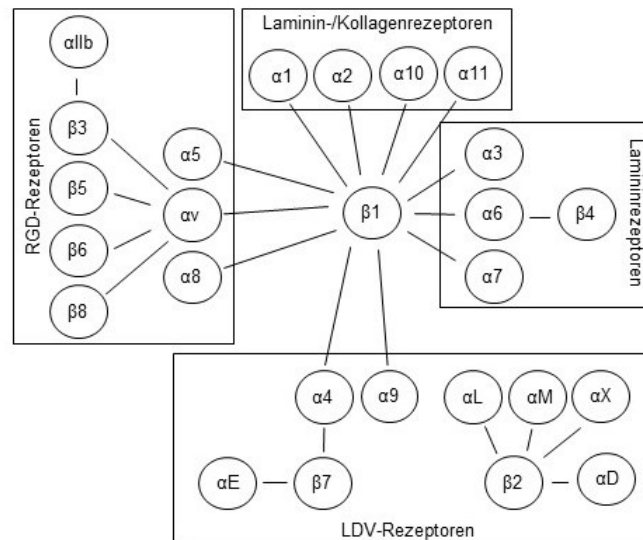
Phosphorylierung von SMAD2 inhibieren (Razani et al., 2001). Des Weiteren fördert Caveolin-1 mit dem TGF- $\beta$  ko-Rezeptor CD109 die Degradation der TGF- $\beta$  Rezeptoren. CD109 begünstigt die Lokalisation der TGF- $\beta$  Rezeptoren in den Caveolae. Bei der Degradation der Rezeptoren reguliert das Protein CD109 zudem die Lokalisation von SMAD7 und der Ubiquitinase Smurf2 an den TGF- $\beta$ RI. Smurf2 interagiert mit SMAD7, welches zeitgleich an den TGF- $\beta$ RI binden kann. SMAD7 wird dabei durch Smurf2 ubiquitiniert, wodurch der TGF- $\beta$ RI-SMAD7-Smurf2-Komplex in Lysosomen degradiert wird ((Bizet et al., 2011); (Bizet et al., 2012); (Di Guglielmo et al., 2003)). Die Lage in den Caveolae bewirkt nicht nur die Degradation der TGF- $\beta$ -Rezeptoren, sondern kann auch verschiedene MAP Kinasen aktivieren und so den SMAD-unabhängigen Signalweg fördern (Zuo and Chen, 2009).

### 1.3 Integrine

Integrine sind Transmembranproteine, die in der Zellmembran in allen tierischen Zellen, mit Ausnahme von Erythrozyten, vorkommen. Sie bilden eine Brücke zwischen dem Zytoskelett und dem Extrazellularraum und interagieren als Adhäsionsrezeptoren mit anderen Zellen sowie mit der umliegenden Matrix. Dabei aktivieren sie so die intrazellulären Signalwege. Diese Interaktionen sind essentiell für die Proliferation, Migration, Differenzierung, Adhäsion, Entwicklung und Überleben der Zelle (Hynes, 2002). In Vertebraten gibt es 24 verschiedene Integrine, die aus 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten gebildet werden können (van der Flier and Sonnenberg, 2001). Dabei ist immer eine  $\alpha$ -Untereinheit mit einer  $\beta$ -Untereinheit nicht-kovalent verbunden und bilden so ein Heterodimer. Die Integrine bestehen aus einer großen Ektodomäne, an welcher die Liganden binden, einer Transmembran Domäne und einer kurzen Zytoplasma-Domäne, wobei Integrin- $\beta$ 4 mit einer langen Zytoplasma-Domäne eine Ausnahme bildet (Danen, 2013).

Die verschiedenen Integrine können in vier Hauptliganden spezifische Gruppen unterteilt werden (Abbildung 5). Die größte ist die RGD-bindende Gruppe, wozu die Integrine- $\alpha$ v $\beta$ 1, - $\alpha$ v $\beta$ 3, - $\alpha$ v $\beta$ 5, - $\alpha$ v $\beta$ 6, - $\alpha$ v $\beta$ 8, - $\alpha$ 5 $\beta$ 1, - $\alpha$ 8 $\beta$ 1 und - $\alpha$ 11 $\beta$ 3 gehören. Diese Integrine binden an das RGD Tripeptid, welches in vielen Proteinen der extrazellulären Matrix wie zum Beispiel Fibronectin, Vitronectin oder Fibrinogen, vorhanden ist, aber auch andere Liganden mit einem solchen Tripeptid. Die Bindungsaffinität ist jedoch nicht bei allen gleich und hängt von der Genauigkeit der RGD-Konformation zu der

spezifischen  $\alpha$ - $\beta$ -Bindungstasche ab. Die Integrine- $\alpha 4\beta 1$ , - $\alpha 4\beta 7$ , - $\alpha E\beta 7$ , - $\alpha 9\beta 1$ , - $\alpha D\beta 2$ , - $\alpha X\beta 2$ , - $\alpha L\beta 2$  und - $\alpha M\beta 2$  erkennen und binden die Liganden mit einer LDV-Sequenz (Leucin-Asparaginsäure-Valin), welche funktionell der RGD-Sequenz ähnelt. Die Bindung der LDV-Sequenz an Integrine findet wahrscheinlich, wie bei RGD auch, über eine  $\alpha$ - $\beta$ -Bindung statt, wobei die Bindung an die Integrine mit einer  $\beta 2$ -Untereinheit hauptsächlich über die  $\alpha$ -Untereinheit läuft (Shimaoka et al., 2003). Zwar sind die Bindungsstellen der  $\beta 2$ -Untereinheit strukturell homolog zu den LDV-Bindungsstellen, jedoch unterscheiden sich die  $\beta 1/\beta 7$ -Bindedomänen durch die Aminosäure Aspartat von der  $\beta 2$ -Bindedomäne, welche die Aminosäure Glutamat beinhaltet. Die Matrixproteine Kollagen und Laminin werden von den Integrinen- $\alpha 1\beta 1$ , - $\alpha 2\beta 1$ , - $\alpha 10\beta 1$  und - $\alpha 11\beta 1$  erkannt. Diese beinhalten in der  $\alpha$ -Untereinheit die  $\alpha$ -I-Domäne, welche gleich zur von Willebrand-Faktor-Typ A-Domäne ist. Die  $\alpha$ -I-Domäne ist eine 200 Aminosäuren lange Insertion, welche zumindest im Integrin- $\alpha 1\beta 1$ , - $\alpha 2\beta 1$  und - $\alpha 11\beta 1$  die tripelhelikale Sequenz GFOGER (Glycin-Phenylalanin-Pyrrolysin-Glycin-Glutaminsäure-Arginin) im Kollagen erkennt. Auch die Bindung des Peptids GLOGER an diese drei Integrine konnte gezeigt werden ((Zhang et al., 2003); (Siljander et al., 2004); (Kim et al., 2005)). Die Bindung dieser vier Intergringe (- $\alpha 1\beta 1$ ; - $\alpha 2\beta 1$ ; - $\alpha 10\beta 1$  und - $\alpha 11\beta 1$ ) an Laminin ist bis her unbekannt. Als hoch spezifische Bindungspartner für Laminin sind die Integrine- $\alpha 3\beta 1$ , - $\alpha 6\beta 1$ , - $\alpha 7\beta 1$  und - $\alpha 6\beta 4$  bekannt, welche keine  $\alpha$ -I-Domäne besitzen. Analysen haben gezeigt, dass diese Integrine an anderen Regionen im Laminin binden als die Integrine mit einer  $\alpha$ -I-Domäne. Zusätzlich sind noch weitere Integrin-Liganden, wie Tenascin oder Thrombospondin, bekannt (Humphries et al., 2006).



**Abbildung 5: Die Integrinheterodimere und deren Liganden**

Schematische Darstellung der 24 möglichen Integrinheterodimere in Vertebraten. Die Integrine wurden in die Liganden spezifischen Gruppen eingeteilt: RGD-Rezeptoren; Laminin-/Kollagenrezeptoren; Lamininrezeptoren; LDV-Rezeptoren. Abbildung in Anlehnung an ((Humphries et al., 2006); (Hynes, 2002)).

### 1.3.1 Aktivierung von Integrinen

Die Affinität zu den Liganden wird durch Konformationsänderungen der extrazellulären Domänen der Integrine reguliert. Dabei sind drei mögliche Konformationen bekannt, *bent-closed*, *extended-closed* und *extended-open*. Sind die Integrine in der *bent-closed* oder *extended-closed* Konformation, liegen die unteren Segmente der Ektodomäne sowie die Transmembrandomänen der α- und β-Untereinheiten eng beieinander und die Bindungsstelle für die Liganden ist verdeckt. Der Unterschied zwischen der *bent-closed* und *extended-closed* Konformation besteht darin, dass bei der *bent-closed* Konformation die Bindungsstelle für Liganden nahe der Membran liegt und bei der *extended-closed* Konformation von der Membran weg zeigt. Bei dem Wechsel in die *extended-open* Konformation werden die Transmembrandomänen sowie die unteren Segmente der Ektodomänen voneinander getrennt, wodurch die Konformation der Ektodomäne verändert und die Bindungsstelle für die Liganden frei wird ((Springer and Dustin, 2012); (Li and Springer, 2017)). Diese Konformationsänderungen werden durch verschiedene intrazelluläre Proteine gesteuert. Dabei existieren zwei Modelle, wie Integrine aktiviert werden können. Zum einen durch inside-out Aktivierung und zum anderen durch outside-in Aktivierung. Bei der inside-out Aktivierung binden Zytosolmoleküle, wie zum Beispiel Talin, an die β-Untereinheit, wodurch die Transmembrandomänen getrennt werden und es zu einer

Umorientierung der Ektodomänen kommt. Dabei werden die Bindungsstellen für die Liganden frei. Damit Talin die Integrine aktivieren kann, muss es selbst vorab durch Signale, wie zum Beispiel von Chemokinen, ADP (Adenosindiphosphat) oder Thrombin ausgehen, aktiviert werden. In Leukozyten wird Talin via Rap1-RIAM (*engl.: Rap1-GTPase/Rap1-GTP-interacting adapter molecule*) aktiviert und bindet dann an die Integrine. Bei der Bindung von Talin an die Integrine können zudem Verbindungen mit dem Aktin-Zytoskelett entstehen ((Lagarrigue et al., 2016); (Sun et al., 2016)). Durch die Aktivierung der Integrine steigt die Affinität zu den Liganden (Tadokoro et al., 2003). Kindlin ist ein weiteres Molekül, welches die Integrine aktivieren kann, indem es, wie Talin, an die  $\beta$ -Untereinheit im Zytoplasma bindet. Dabei existieren verschiedene Kindlin-Proteine, welche an unterschiedliche Integrine binden und dabei die Aktivierung begünstigen, aber möglicherweise auch inhibieren können. So bindet Kindlin-1 an die Integrine- $\beta$ 1, - $\beta$ 3 und - $\beta$ 6 und Kindlin-2 und -3 an die Integrine  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 ((Harburger et al., 2009); (Bandyopadhyay et al., 2012); (Rognoni et al., 2014); (Böttcher et al., 2012); (Bledzka et al., 2012); (Montanez et al., 2008); (Moser et al., 2008); (Moser et al., 2009); (Schmidt et al., 2011)). Im Gegensatz zu Talin haben die Kindlin-Proteine keine Bindungsstelle für Aktin, so dass für die Interaktion zum Zytoskelett der Proteinkomplex IPP (ILK-PINCH-Parvin) (*engl.: integrin linked kinase; ILK*) (*engl.: particularly-interesting-new-cys-his-rich-protein; PINCH*) und Migfilin rekrutiert werden ((Mackinnon et al., 2002); (Tu et al., 2003)). Neben Integrinen kann Kindlin auch an andere Rezeptoren im Zytoplasma binden und dadurch verschiedene Signalwege wie den TGF- $\beta$ - und den Wnt-Signalweg regulieren. Kindlin-2 bindet unter anderem an die Rezeptoren TGF- $\beta$ RI und TGF- $\beta$ RII, wodurch die Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 begünstigt wird. Zudem reguliert Kindlin-2 auch den TGF- $\beta$ -Signalweg, indem es die Aktivierung der Integrine beeinflusst, welche für die Freisetzung des TGF- $\beta$ -Moleküls aus der extrazellulären Matrix verantwortlich sind. Somit spielt Kindlin-2 auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer Fibrose ((Rognoni et al., 2014); (Yu et al., 2018); (Yu et al., 2018)).

Weitere Integrin-aktivierende Moleküle sind  $\beta$ 3-endonexin und Cytohesin, wobei diese beiden Integrin- $\beta$ -abhängig sind. So bindet  $\beta$ 3-endonexin nur an die Integrin- $\beta$ 3-Domäne, aber nicht an die  $\beta$ 1- oder  $\beta$ 2-Domäne und Cytohesin nur an die  $\beta$ 2-Domäne. Die Aktivierung der Integrine durch  $\beta$ 3-endonexin ist jedoch in Abwesenheit von Talin nur sehr schwach ((Kashiwagi et al., 1997); (Tadokoro et al., 2003); (Kolanus et al., 1996)).

Integrine liegen vorwiegend in der *bent-closed* Konformation vor, können aber auch zwischen der *extended-closed* und der *extended-open* Konformation in einem thermodynamischen Gleichgewicht variieren, ohne dabei eine Bindung mit Kindlin oder Talin einzugehen. Diese Aktivierung wird als outside-in Aktivierung bezeichnet. Dabei dient unter anderem extrazelluläres  $Mn^{2+}$  als Aktivator,  $Ca^{2+}$  als Deaktivator ((Lange et al., 1994); (Xiong et al., 2002)). Erst nach der Konformationsänderung binden Kindlin und Talin an die Integrine und stabilisieren die *extended-open* Konformation, sodass gleichzeitig extrazelluläre Liganden binden können ((Theodosiou et al., 2016); (Sun et al., 2019)).

### 1.3.2 Integrinsignalwege

Durch die Bindung von Liganden werden verschiedene zelluläre Proteine zu fokalen Adhäsionen zusammengelagert. Da Integrine keine enzymatischen Aktivitäten besitzen, erfolgt die Signalübertragung über Kinasen dieser Multiproteinkomplexe, wie zum Beispiel durch die Tyrosinkinase Src (*engl.: sarcoma*), PI3K, ILK oder FAK (Patsenker and Stickel, 2011). Durch ILK und FAK werden auch weitere Signalkaskaden aktiviert, wie der AKT-Signalweg oder der MAPK-Signalweg, wodurch ERK aktiviert wird ((Howe et al., 2002); (Stupack and Cheresch, 2002); (Wang et al., 2014)). Des Weiteren scheint FAK auch eine wichtige Rolle in der Regulierung der Leberfibrose zu spielen. Die Aktivierung von FAK korreliert in hepatischen Sternzellen mit der Expression von  $\alpha$ -SMA und Kollagen. Durch die Inhibierung von FAK wurde gezeigt, dass die hepatischen Sternzellen weniger aktiv sind und dadurch die Matrixproduktion in der Leberfibrose abnimmt (Zhao et al., 2017). Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch für Lungenfibroblasten gezeigt, wo die Expression von  $\alpha$ -SMA mit der Phosphorylierung von FAK korreliert ((Thannickal et al., 2003); (Mimura et al., 2005)). FAK beinhaltet eine N-terminale FERM-Domäne (*engl.: band four point one, ezrin-radixin-moesin*), eine Kinase-Domäne in der Mitte und eine nicht katalytische C-terminale-Domäne. Über die FERM-Domäne bindet FAK an die  $\beta$ -Untereinheit des Integrins. Die C-terminalen-Domäne hat mehrere Proteininteraktionsstellen, unter anderem auch die FAT-Domäne (*engl.: focal-adhesion-targeting domain*). Mit der FAT-Domäne kann FAK verschiedene Protein-Protein-Interaktionen mit anderen fokalen Adhäsionsproteinen, wie Talin oder Paxillin eingehen ((Parsons, 2003); (Tachibana et al., 1995); (Liu et al., 1999); (Chen et al.,



1995)). Die Aktivierung von FAK führt zur Phosphorylierung an vier verschiedenen Tyrosin-Aminosäuren (Y397, Y407, Y576 und Y577), wobei Tyrosin 397 (Y397) der Hauptort für die Autophosphorylierung ist (Calalb et al., 1995). Durch die Rekrutierung von diversen Signalmolekülen in den fokalen Adhäsionen, kann der Integrin-Signalweg mit verschiedenen Signalwegen interagieren. Der TGF- $\beta$ -Signalweg, ein bekanntlich profibrotisches Zytokin der Leberfibrose, ist einer davon.

#### 1.4 Interaktion des TGF- $\beta$ - und Integrin-Signalwegs

Der TGF- $\beta$ - und der Integrin-Signalweg interagieren auf mehreren Ebenen. Dabei reguliert TGF- $\beta$  zum einen den Integrin-Signalweg und zum anderen regulieren die Integrine den TGF- $\beta$ -Signalweg.

##### 1.4.1 Regulation des Integrin-Signalwegs über TGF- $\beta$

Die Expression von verschiedenen Integrinen ( $-\alpha 1\beta 1$ ,  $-\alpha 2\beta 1$ ,  $-\alpha 3\beta 1$ ,  $-\alpha 5\beta 1$ ,  $-\alpha 6\beta 1$ ,  $-\alpha 8\beta 1$ ,  $-\alpha 6\beta 4$ ,  $-\alpha v\beta 3$ ,  $-\alpha v\beta 5$ ,  $-\alpha v\beta 6$ ,  $-\alpha L\beta 2$  und  $-\alpha E\beta 7$ ) kann durch TGF- $\beta$  in mehreren Zelltypen reguliert werden. Viele dieser Integrine werden durch TGF- $\beta$  hoch reguliert, wobei einige aber auch runter reguliert werden können (Margadant and Sonnenberg, 2010). TGF- $\beta$  reguliert nicht nur die Expression der Integrine, sondern auch die Expression von Integrin-Liganden. Die Expression der Matrixproteine Fibronectin, Vitronectin und Kollagen werden beispielsweise durch TGF- $\beta$  gesteuert (Roberts et al., 1992). Dabei reguliert TGF- $\beta$  auch das Spleißen von Fibronectin (White et al., 2010). In Fibroblasten inhibiert TGF- $\beta$  die Phosphatase PTEN (*engl.: phosphatase and tensin homolog*), wodurch der PI3K/AKT-Signalweg stärker aktiviert und vermehrt Fibronectin mit EDA exprimiert wird. Darüber hinaus reguliert TGF- $\beta$  auch die Expression von Integrin-bindenden Zytoplasmamolekülen wie ILK, Paxillin oder PINCH ((Janji et al., 1999) (Walsh and Young, 2011) (Jung et al., 2007)), wodurch die Integrin-Aktivität ebenfalls gesteuert werden kann.

##### 1.4.2 Integrine regulieren die TGF- $\beta$ -Aktivierung

Wie bereits unter 1.2.1 detailliert beschrieben, kann TGF- $\beta$  durch verschiedene Integrine aktiviert werden (Wipff et al., 2007). Die Integrine  $-\alpha v\beta 1$ ,  $-\alpha v\beta 3$ ,  $-\alpha v\beta 5$ ,  $-\alpha v\beta 6$ ,  $-\alpha v\beta 8$ ,  $-\alpha 5\beta 1$ ,  $-\alpha 8\beta 1$  und  $-\alpha 11\beta 3$  können an die RGD Sequenz vom LAP binden und

interagieren so mit dem LLC. Durch diese Verbindung übertragen die Integrine die Kontraktion der Zelle auf das LLC, wodurch eine Konformationsänderung entsteht und das TGF- $\beta$  freigesetzt wird. Zudem kann das TGF- $\beta$  auch durch proteolytische Spaltung aktiviert werden, wobei die Integrine mit MMPs interagieren.

Die Regulierung der Freisetzung von TGF- $\beta$  mittels Integrinen ist für die Entwicklung einer Fibrose sehr wichtig. So zeigen Mäuse mit einer Mutation in der RGD Sequenz des LAP die gleichen Defekte wie Mäuse die kein TGF- $\beta$ 1 exprimieren (Yang et al., 2007). Zudem verursacht eine Deletion des Integrin- $\beta$ 6 sowie - $\beta$ 8 oder - $\alpha$ v auf verschiedenen Immunzellen, welche bei der Aktivierung des TGF- $\beta$  eine Rolle spielen, in Mäusen eine hochgradige Entzündung infolge einer gestörten TGF- $\beta$  Signalübertragung (Margadant and Sonnenberg, 2010). So führt die Deletion des Integrin- $\alpha$ v $\beta$ 8 in dendritischen Zellen zu einer verminderten Aktivierung von TGF- $\beta$ , wodurch weniger regulatorische T-Zellen induziert werden und Darmentzündungen entstehen (Travis et al., 2007). Eine ähnliche Auswirkung wurde auch für die Deletion von Integrin- $\alpha$ v auf myeloiden Zellen beschrieben, welches ebenfalls in Darmentzündungen resultiert (Lacy-Hulbert et al., 2007).

#### 1.4.3 Integrine regulieren den TGF- $\beta$ -Signalweg

Neben der direkten Regulierung durch die Aktivierung von TGF- $\beta$ , können Integrine auch den TGF- $\beta$ -Signalweg auf mehreren Ebenen kontrollieren. So ist in Mesangialzellen die Expression von Kollagen, induziert durch TGF- $\beta$  und p42/p44 MAPK, abhängig von der Integrin vermittelten Aktivierung von FAK (Hayashida et al., 2007). Des Weiteren wird die TGF- $\beta$ -abhängige p38 MAPK-Aktivität während der EMT in Brustepithelzellen über  $\beta$ 1-Integrine induziert (Bhowmick et al., 2001). In Keratinozyten wird die MMP9-Expression, stimuliert durch TGF- $\beta$ , durch das Integrin- $\alpha$ 3 $\beta$ 1 verstärkt (Lamar et al., 2008). Die Ausschaltung der  $\beta$ 3-Untereinheit führt in Fibroblasten zu einer erhöhten Expression der beiden TGF- $\beta$ -Rezeptoren TGF- $\beta$ RI und TGF- $\beta$ RII, wodurch die Signalübertragung von TGF- $\beta$  verstärkt wird (Reynolds et al., 2005). Im Gegensatz dazu führt die Ausschaltung der  $\alpha$ 3-Untereinheit in Keratinozyten zu einer erhöhten Expression von SMAD7, wodurch der TGF- $\beta$ -Signalweg inhibiert wird (Reynolds et al., 2008).

Integrine können aber auch durch die Interaktion mit den TGF- $\beta$  Rezeptoren den TGF- $\beta$ -Signalweg beeinflussen. Die TGF- $\beta$  Stimulation bewirkt in Brustkrebszellen und in

Lungenfibroblasten die Interaktion zwischen Integrin- $\alpha\beta 3$  und TGF- $\beta$ RII, wodurch eine kooperative Signalübertragung an c-Src (*engl.: Tyrosine kinase cellular and sarcoma*) und MAPKs entsteht ((Scaffidi et al., 2004); (Gallagher and Schiemann, 2006); (Margadant and Sonnenberg, 2010)). Asano et al. haben gezeigt, dass bei der Differenzierung der Hautfibroblasten zu Myofibroblasten sowohl freies TGF- $\beta$ , als auch das Integrin- $\alpha\beta 5$  vorhanden sein muss und dabei der Integrin/FAK-Signalweg aktiv ist. Zudem wurde beschrieben, dass das Integrin- $\alpha\beta 5$  bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten eine wesentliche Rolle spielt. Mittels einer Immunpräzipitation konnte zudem eine Interaktion zwischen dem Integrin- $\alpha\beta 5$  und den beiden TGF- $\beta$ -Rezeptoren nachgewiesen werden (Asano et al., 2006).

Dies zeigt, dass die Integrine den TGF- $\beta$ -Signalweg auf mehreren Ebenen und auf verschiedene Weise beeinflussen können, wobei die Regulierung auch vom Zelltyp abhängig ist.

#### 1.4.4 Der Integrin- und TGF- $\beta$ -Signalweg interagieren in der Fibrose

In der Entstehung einer Fibrose spielt TGF- $\beta$  eine zentrale Rolle. Wie bereits beschrieben, ist die TGF- $\beta$  Aktivität auch von Integrinen abhängig und damit auch die Bildung der Fibrose. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, in denen das Integrin- $\beta 6$  ausgeschaltet ist, für verschiedenen Fibrosen weniger anfällig sind. In Wildtyp-Mäusen konnte die Fibrose durch eine Behandlung mit Antagonisten für die TGF- $\beta$ -Signalübertragung oder durch die Gabe eines blockierenden Antikörpers gegen das Integrin- $\alpha\beta 6$  vermindert werden ((Munger et al., 1999); (Ma et al., 2003); (Hahm et al., 2007); (Wang et al., 2007); (Patsenker et al., 2008); (Puthawala et al., 2008); (Horan et al., 2008)). Zudem zeigen mit Bleomycin behandelte Mäuse, denen das Integrin- $\alpha 3$  fehlt, eine normale akute Reaktion, aber eine verminderte Akkumulation von Myofibroblasten und Kollagen I in der Lunge. In diesen Mäusen wurde keine Bleomycin-vermittelte Fibrosebildung in der Lunge festgestellt (Kim et al., 2009). Auch in humanen Lungenfibroblasten konnte gezeigt werden, dass durch das Blockieren des Integrin- $\alpha\beta 5$  die Expression von  $\alpha$ -SMA, sowie die Phosphorylierung von SMAD2, vermindert ist (Scotton et al., 2009).

Dies zeigt, dass sowohl der Integrin- als auch der TGF- $\beta$ -Signalweg von großer Bedeutung für die Fibrose ist. Die Modulation der Signalwege kann dazu führen, dass die Fibrose abgeschwächt oder gänzlich verhindert werden kann. Jedoch sind noch

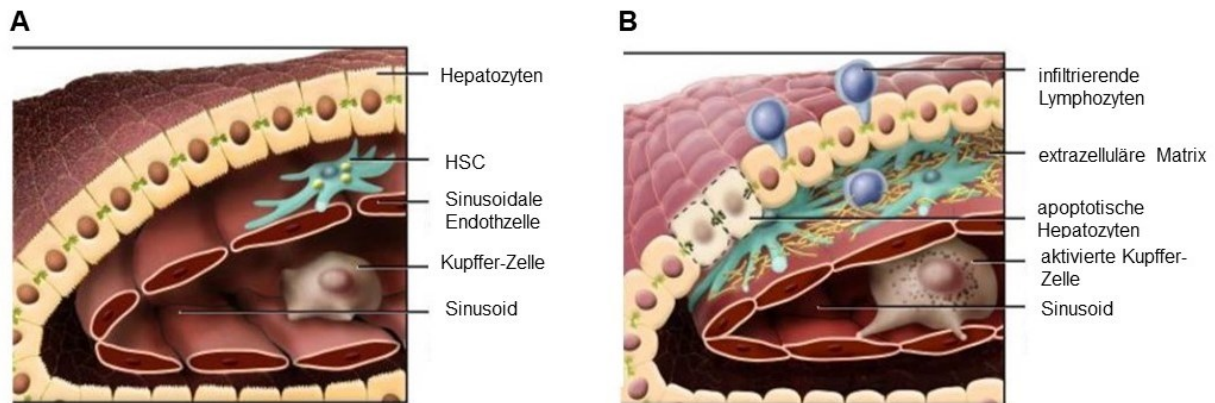
nicht alle Mechanismen bekannt, so dass beide Signalwege und deren Interaktion noch weiter untersucht werden müssen.

## 1.5 Leberfibrose

Die Leber besteht hauptsächlich aus den Hepatozyten, welche radial angeordnet sind und die Leberläppchen bilden. Zwischen den Hepatozyten befinden sich Kapillarräume, die Sinusoide, die durch eine diskontinuierliche Endothelzellschicht ausgekleidet sind. Zwischen den Hepatozyten und den Endothelzellen befindet sich der Disse-Raum. In diesem erfolgt der Stoffaustausch zwischen dem Blut und den Hepatozyten. Im Sinusoid und dem Disse-Raum befinden sich die nicht-parenchymalen Zellen, die Kupffer-Zellen, die sinusoidalen Endothelzellen und die hepatischen Sternzellen (HSCs) (Vekemans and Braet, 2005) (Abbildung 6 A).

Eine Leberfibrose entsteht durch eine chronische Schädigung der Leber, welche am häufigsten durch eine Hepatitis-Viren Infektion, chronischer Alkoholkonsum oder Fettleibigkeit verursacht wird ((Mueller et al., 2009); (Baumeister et al., 2008)). Dabei sterben die Hepatozyten ab und inflammatorische Zytokine, wie TNF- $\alpha$  (*engl.: tumor necrosis factor- $\alpha$* ), IL-6 oder TGF- $\beta$  aber auch andere molekulare Mediatorstoffe wie IGF (*engl.: insulin-like growth factor*), EGF (*engl.: epidermal growth factor*) oder PDGF, werden freigesetzt. Dadurch kommt es zur Aktivierung der leberresidenten Kupffer-Zellen (Leber-Makrophagen) und zu einer weiteren Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen. Die inaktiven HSCs werden aktiviert und es kommt zu einer Infiltration von Immunzellen (Abbildung 6 B). Die aktivierten HSCs nehmen einen myofibroblastischen Phänotyp an und exprimieren vermehrt pro-inflammatorische Zytokine sowie extrazelluläre Matrixproteine, wie Kollagen I, Kollagen III und Fibronectin. Zudem werden weitere matrixproduzierende Zellen durch die EMT oder EndoMT gebildet, sowie Fibrozyten aus dem Knochenmark rekrutiert und aktiviert. Der steigende Anteil der Matrixproteine in der Leber wird durch eine erhöhte Synthese der TIMPs (*engl.: tissue inhibitors of metalloproteinases*), welche die Matrix degradierenden Matrixmetalloproteinase inhibieren, verstärkt. Die Regeneration der Leberfibrose geht mit der Apoptose der HSCs und der Erneuerung der Hepatozyten einher. Des Weiteren werden wieder weniger TIMPs exprimiert, so dass die Aktivität der Matrixmetalloproteinase wieder erhöht ist und die überschüssigen Matrixproteine abgebaut werden können ((Yoshiji et al., 2002); (Canbay et al., 2004); (Bataller and

Brenner, 2005); (Tacke and Weiskirchen, 2010); (Hernandez-Gea and Friedman, 2011); (Xu et al., 2012)).



**Abbildung 6: Schematische Abbildung der Entwicklung einer Leberfibrose**

(A) Schematischer Querschnitt einer gesunden Leber mit intakten Hepatozyten und wenig aktiven HSCs und Kupfer-Zellen. (B) Schematischer Querschnitt einer fibrrotischen Leber. Durch die Schädigung der Leber kommt es zur Apoptose von Hepatozyten und damit einhergehend zur Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen. Kupfer-Zellen werden aktiviert und es kommt zur Infiltration von Immunzellen. HSCs werden aktiviert und exprimieren vermehrt extrazelluläre Matrixproteine (Bataller and Brenner, 2005).

### 1.5.1 Experimentelle Leberfibrose mittels $\text{CCl}_4$

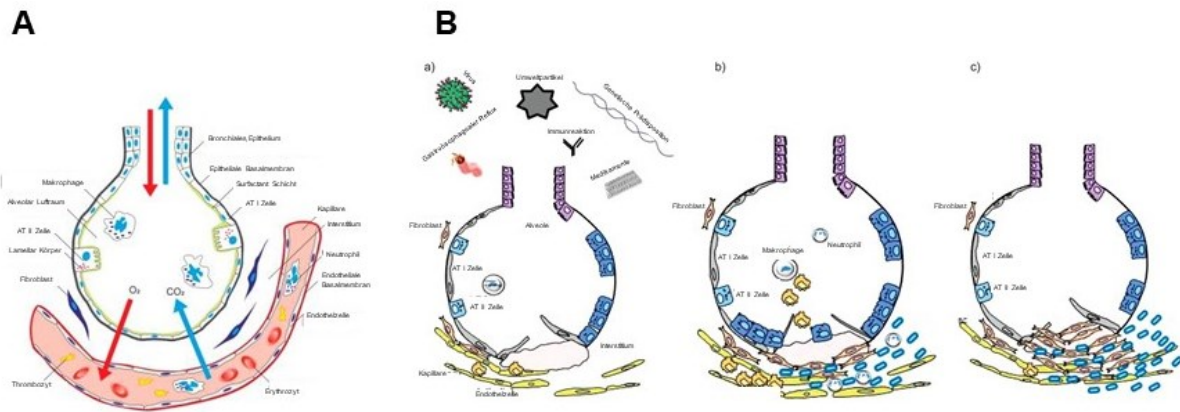
Für die Untersuchungen der Leberfibrose werden oftmals Versuche *in vivo* durchgeführt. Bei *in vitro*-Versuchen können zwar die Mechanismen in den einzelnen Zelltypen untersucht werden, jedoch können dabei nicht die komplexen Mechanismen, die bei einer Fibrose auftreten, wie zum Beispiel die Interaktion der verschiedenen Zellen, nachvollzogen werden. Zur Induktion einer experimentellen Leberfibrose können Mäuse mit Tetrachlorkohlenstoff ( $\text{CCl}_4$ ) behandelt werden. Dies stellt eines der am häufigsten verwendeten Modelle für die Induktion einer Fibrose dar. Dabei kann die Chemikalie sowohl oral, subkutan, durch Inhalation oder durch intraperitoneale Injektion verabreicht werden (Yanguas et al., 2016). Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die induzierte Fibrose, wie auch beim Menschen, reversibel sein kann. Durch wiederholte intraperitoneale Injektionen entsteht nach vier bis sechs Wochen eine hepatische Fibrose. Weitere Injektionen bewirken nach acht Wochen eine reversible Zirrhose und nach zwölf Wochen eine irreversible Zirrhose (Constandinou et al., 2005). Die Schädigung des Gewebes ist der Anfang der Erkrankung.  $\text{CCl}_4$  wird in der Leber durch die Oxidase Cytochrom P450 zu Trichloromethyl-Radikalen ( $\text{CCl}_3$ ) metabolisiert (McCay et al., 1984).  $\text{CCl}_3$  führt zur Peroxidation von Lipiden und zur Schädigung der

Membran der Hepatozyten. Dabei entstehen Nekrosen und es kommt zur Apoptose der Hepatozyten. Wie auch beim Krankheitsverlauf beim Menschen, werden die Kupffer-Zellen aktiviert und exprimieren Zytokine und Chemokine. Es folgt die Infiltration von Immunzellen, die Aktivierung der HSCs und die erhöhte Expression von extrazellulären Matrixkomponenten ((Yanguas et al., 2016); (Heindryckx et al., 2009)). Zur Bestätigung, ob eine Schädigung der Leber vorliegt, können einige Blutwerte analysiert werden. Darunter zählen die Leberenzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST). Der größte Anteil an ALT befindet sich im Zytosol von Leberzellen. Wird die Aktivität von ALT im Blut nachgewiesen, so deutet dies auf eine Schädigung der Leber hin, da diese häufig mit dem Tod von Zellen, vor allem Hepatozyten, einhergeht ((Sherman, 1991); (Sookoian and Pirola, 2015)). AST findet man neben dem Zytosol auch in den Mitochondrien. Eine erhöhte AST-Aktivität im Blut deutet auf eine stärkere Schädigung des Gewebes hin, da hierbei schon die Mitochondrien beschädigt wurden. Ein weiteres Enzym, welches im Blut gemessen werden kann, ist die Cholinesterase (CHE), die im Parenchymgewebe der Leber synthetisiert wird. Verminderte CHE-Werte im Blut deuten auf einen erheblichen Leberschaden mit einer starken Verringerung der Parenchymzellen hin. Albumin ist ein weiteres Produkt welches in der Leber synthetisiert wird. Ein verringerter Albuminspiegel im Blut weist, genau wie beim CHE, auf eine verminderte Syntheseleistung der Leber hin (2000).

## 1.6 Lungenfibrose

Der Gasaustausch in der Lunge findet in den Alveolen statt, welche das blinde Ende der Bronchien darstellen. Die Membran der Alveolen besteht aus verschiedenen Schichten. Von innen ist die Membran mit einer Schicht aus Surfactant, einem lungenspezifischen Tensid, ausgekleidet, wodurch die Oberflächenspannung verringert wird. Unter ihr befindet sich ein Monolayer aus Epithelzellen mit zwei Zelltypen, den flachen Alveolarepithelzellen (*engl.: alveolar type I; ATI*) und den kubischen Alveolarepithelzellen (*engl.: alveolar type II; ATII*). Die ATI-Zellen bilden eine dünne Blut-Luft-Schranke, so dass ein schneller Gasaustausch zwischen den Alveolen und den angrenzenden Kapillaren vonstattengehen kann. Die ATII-Zellen produzieren und sezernieren das Surfactant. Zudem können sie proliferieren und sich in ATI-Zellen differenzieren und so beschädigte Zellen in der Epithelzellschicht

ersetzen. Die Epithelzellen sind mit einer Basalmembran vom Interstitium getrennt. Im Interstitium befinden sich die Fibroblasten, das Bindegewebe und die Alveolen umgebenden Blutkapillaren. Diese sind, wie auch die Alveolen, mit einer Basalmembran vom Interstitium getrennt. Unter der Basalmembran befindet sich ein Monolayer aus Endothelzellen. Die enge räumliche Nähe zwischen den Kapillaren und den Alveolen sowie die sehr dünnen Membranen bewirken einen schnellen und einfachen Gasaustausch. Zudem befinden sich in den Alveolen Alveolarmakrophagen, welche verschiedene Fremdpartikel, Bakterien oder Blutzellen bei Verletzungen phagozytieren ((Nova et al., 2019); (Guillot et al., 2013); (Knudsen and Ochs, 2018)) (Abbildung 7 A). Eine Lungenfibrose entsteht durch wiederholte Schädigung der Lunge, wie zum Beispiel durch das Einatmen von Schadstoffen, wie Asbeststaub oder Quarzstaub, durch Strahlung, Medikamente oder durch andere Erkrankungen, die die Lungenfibrose begünstigen ((Zhang et al., 1993); (Piguet et al., 1990); (Piguet and Vesin, 1994); (Mehta, 2005); (Egan et al., 1995)). Die andauernde Schädigung der Lunge führt zur Apoptose der Alveolarepithelzellen. Dabei werden verschiedene Zytokine und Chemokine, wie TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , CCL2, CCL3, CCL17 oder CCL18, freigesetzt ((Zhang et al., 1997); (Zhang et al., 1994); (Agostini and Gurrieri, 2006); (Prasse et al., 2006)). Immunzellen, vor allem Neutrophile und Makrophagen, infiltrieren in das geschädigte Gebiet und beschädigte Zellen oder fremde Organismen werden phagozytiert. Dabei exprimieren sie auch Zytokine und Chemokine ((Sibille and Reynolds, 1990); (Wynn, 2011)). Dies führt zur Aktivierung der Fibroblasten, Transdifferenzierung der Epithelzellen zu Myofibroblasten durch EMT und zur Rekrutierung, sowie Aktivierung, von Fibrozyten ((Khalil et al., 2005); (Willis and Borok, 2007)) (Abbildung 7 B). Durch die Freisetzung des TGF- $\beta$  werden auch die Expressionen von verschiedenen MMPs, welche die extrazelluläre Matrix abbauen, sowie von TIMPs, welche die MMPs inhibieren, verändert ((Hall et al., 2003); (Ruiz et al., 2003)). Die vermehrte Matrixproduktion durch die Myofibroblasten und die gleichzeitige Unterdrückung der Aktivität der Matrixmetalloproteinasen wird die Lungenarchitektur zunehmend verändert und führt schließlich zum Funktionsverlust ((Strieter, 2008); (Wuyts et al., 2013)).



**Abbildung 7: Schematische Abbildung der Entwicklung einer Lungenfibrose**

(A) Schematische Darstellung einer Alveole in einer gesunden Lunge mit angrenzender Kapillare (Nova et al., 2019). (B) Schematische Entwicklung einer Lungenfibrose. Durch die Schädigung der Lunge durch verschiedene Komponenten kommt es zur Schädigung der Membranen und zur Apoptose der Alveolarepithelzellen (ATI) (B a). Die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen bewirkt die Aktivierung der Fibroblasten und damit die Expression von extrazellulären Matrixproteinen. Zudem kommt es zur Infiltration von Immunzellen (B b). Bei anhaltender Schädigung wird durch die anhaltende Expression von Matrixproteinen die Architektur der Lunge zunehmend verändert und führt schließlich zum Funktionsverlust (B c) (Wuyts et al., 2013).

Eine schwerwiegende Form der Lungenfibrose ist die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF), für die es jedoch noch keine bekannten Ursachen gibt, wobei vermutet wird, dass eine erbliche Veranlagung diese Krankheit begünstigt. Dabei scheinen Menschen mit einer Mutation in den Surfactant-Proteinen oder den Telomerase-Genen ein erhöhtes Risiko für eine IPF zu haben ((Thomas et al., 2002); (Tsakiri et al., 2007)). Auch ist die Wahrscheinlichkeit bei ehemaligen und aktiven Rauchern an einer IPF zu erkranken wesentlich höher (Chambers and Mercer, 2015).

### 1.6.1 Experimentelle Lungenfibrose mittels Bleomycin

Wie auch bei der Leberfibrose werden für die Untersuchungen der Lungenfibrose oftmals *in vivo*-Versuche durchgeführt. Zur Induktion einer experimentellen Lungenfibrose können Mäuse mit Bleomycin behandelt werden, eines der am häufigsten verwendeten Modelle. Dabei kann die Chemikalie intratracheal oder intraperitoneal verabreicht werden ((Fleischman et al., 1971); (Adamson and Bowden, 1974); (Headley et al., 2018)). Bleomycin wird vom Bakterium *Streptomyces verticillus* gebildet und ist zum einen ein Antibiotikum und zum anderen ein Zytostatikum, wobei es in Krebstherapien verwendet wird ((Umezawa et al., 1967); (Blum et al., 1973)). Bleomycin unterbricht den Zellzyklus von Zellen, indem es DNA-Strangbrüche verursacht. Durch die Komplexierung von Metallionen und die Reaktion mit reaktivem Sauerstoff, werden DNA-spaltende Superoxid- und Hydroxylradikale gebildet



(Claussen and Long, 1999). In verschiedenen Geweben wird Bleomycin durch die Bleomycin-Hydrolase inaktiviert, sodass nur ein geringer Schaden entsteht. Das Lungengewebe besitzt jedoch nur eine geringe Menge der Bleomycin-Hydrolase, wodurch eine Lungenfibrose eine häufige Nebenwirkung in der Therapie mit Bleomycin ist (Sebti et al., 1989). Beim Menschen führt die wiederholte Schädigung der Lunge zu einer zunehmenden Verschlechterung der Lungenaktivität, welche jedoch reversibel sein kann (Siemon et al., 2008). Im Gegensatz dazu reicht eine einmalige intratracheale Injektion von Bleomycin bei Mäusen aus, um Nekrosen und die Apoptose von ATI-Zellen zu bewirken. Da Bleomycin den Zellzyklus inhibiert, können die ATII-Zellen nicht proliferieren/differenzieren und ein Reparaturmechanismus bleibt aus ((Adamson, 1976); (Adamson, 1984); (Safaeian et al., 2013)). Wie auch beim Menschen werden durch die Apoptose verschiedene Chemokine und Zytokine freigesetzt. Dies führt zur Infiltration von Immunzellen sowie zur Rekrutierung und Aktivierung von Zellen, die Matrixproteine produzieren. Im Bleomycin-Modell hat die inflammatorische Phase ihren Höhepunkt zirka am vierzehnten Tag. Der Wechsel zwischen der inflammatorischen und der fibrotischen Phase erfolgt ab Tag neun, wobei die fibrotische Phase ihren Höhepunkt zirka am Tag einundzwanzig hat. Die Lunge hat sich im Bleomycin induzierten Lungenfibrose-Modell bei Mäusen nach zirka acht Wochen wieder regeneriert ((Chaudhary et al., 2006); (Bakowska and Adamson, 1998); (Hecker et al., 2014); (Schiller et al., 2015)).

### 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Eine Fibrose entsteht durch die häufige Schädigung des Gewebes eines Organs, wobei diverse Zytokine und Chemokine freigesetzt werden. Die Zytokine leiten zunächst den Reparaturprozess ein und die Chemokine fördern die Infiltration von Immunzellen sowie extrazelluläre Matrix produzierende Zellen. Die Myofibroblasten, welche die Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix während einer Fibrose sind, werden durch die freigesetzten Zytokine aktiviert, wobei verschiedene Integrin-Signalwege mitwirken. Schreitet der Reparaturprozess unkontrolliert fort, führt dies zu einer vermehrten Ansammlung von Matrixproteinen, wobei die Funktionalität des Organs mit der Zeit abnimmt und es schließlich zu einem Organversagen kommt.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Integrin-Matrix-Interaktion auf die

Entstehung einer Fibrose zu analysieren. Das Integrin- $\beta$ 1 ist ein Integrinmonomer, welches mit diversen  $\alpha$ -Untereinheiten Integrindimere bildet und dadurch eine Interaktion mit der extrazellulären Matrix eingehen kann. Diese Interaktionen steuern verschiedene zelluläre Mechanismen, wie Proliferation oder Differenzierung. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob eine Veränderung des Integrin- $\beta$ 1-Signalweges einen Einfluss auf die Entwicklung einer Leberfibrose hat. Dafür wurden Mäuse mit einem konditionellen Knockout des Integrin- $\beta$ 1 in Hepatozyten verwendet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte eine Modulation der Integrin-Matrix-Interaktion während einer Fibrose untersucht werden. Integrine erkennen bestimmte Peptidsequenzen an denen sie binden, wie die RGD oder GFOGER Sequenz. In dieser Arbeit wurden die GFOGER-ähnlichen Peptidsequenzen GLQGE, GLNGE und GLOGE verwendet, um eine Modulation im Integrin-Signalweg zu bewirken und dadurch die Entwicklung einer Fibrose zu beeinflussen. Außerdem wurden die Peptide in der Leber- und Lungenfibrose als mögliche pharmakologische Behandlung getestet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien und Geräte

#### 2.1.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav	Tuttnauer Systec 5075 EL	Systec
Brutschrank/CO <sub>2</sub> -Inkubator	Stemi 200C	Carl Zeiss GmbH
Durchflusszytometer	LSRII	BD Bioscience
Entwicklungsgerät	Typ CP1000	Agfa
Einfrierbox	Nalgene™ Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific
Elektroblotter	PerfectBlue Semi-Dry	Peqlab
Feinwaage	ABJ 120-4M	Kern
Gelsystem DNA	DNA Perfect Blue 40-1410	Peqlab
Gelsystem Protein	XCell Sure Lock Mini-Cell EI0002; MINI PROTEAN II TM	Invitrogen Biorad
Geldokumentation	UVP UVsolo touch	Analytik Jena

Hämatologie-System	CELL-DYN Emerald	Abbott
Heizblock	Thermomixer Compact	Eppendorf
Laborshake Großschüttler	LABOSHAKE LS500, linear 230 V	Gerhardt
Laborwaage	PRS 4200-2	Kern
Light Cycler	Light Cycler 2.0 Instrument	Roche
Magnetrührer	Yellow line MSH basic	Carl Roth
Mikroskop	Mikroskope DM IL, inverses Routinemikroskop; Keyen ECLIPSE Ti-E	Leica  Nikon
Mikrowellengerät	MS-1715TU Multiwave	LG Electronics
Mikrotiterplatten Reader	Typ 16039400, Sunrise Basic	Tecan Wallac 1420 Victor2™
pH-Meter	Typ 761 Calimatic	Knick
Photometer	Pharmacia Ultrospec 2000; BioPhotometer Plus	GE Healthcare Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetboy comfort classic	IBS Integra
Pumpe	Pharmacia LKB Pump P1	GE Healthcare Econo, BioRad
Scanner	CanoScan LiDE 60	Canon
Sterilbank	Holten LaminAir 1.2	Thermo Fisher Scientific
Stickstofftank	Chronos Biosafe	Messer
Stromversorger	Standard Power Pack P25	Biometra
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9700	PE Applied
Thermocycler	Biosystems T Personal Thermocycler	Biometra
Trockenschrank	Sterilisator	Memmert
Ultragefrierschrank	Innova U725	New Brunswick Scientific
Vortex	Vortex Genie 2	Bender & Hobein

Wasserbad	Typ 1004	Gesellschaft für Labortechnik
Zellzählapparatur	Typ TT CASY®	Innovatis, Roche
Zentrifugen	Typ 1-14 Biofuge 15 Heraeus Multifuge 1 S-R Light Cycler 2.0 Sample Carousel (20µl) Sorvall RC-5B PLUS Superspeed Zentrifuge	Sigma Laborzentrifuge Heraeus Thermo Fisher Scientific Roche  Thermo Fisher Scientific

### 2.1.2 Herstellerverzeichnis

<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
Abbott GmbH & Co.	KG Wiesbaden
Abcam plc	Cambridge, UK
Acris Antibodies GmbH	Hiddenhausen
Agfa Healthcare GmbH	Köln
A. Hartenstein GmbH	Würzburg
Alcan Packaging Neenah	Wisconsin, USA
Amersham	Freiburg
AppliChem GmbH	Darmstadt
ASYS Hitech GmbH	Eugendorf, Schweiz
Axxora Deutschland GmbH	Lörrach
Bachem AG	Bubendorf, Schweiz
Bayer AG	Leverkusen
BD Biosciences	Heidelberg
Bender & Hobein AG	Zürich, Schweiz
BioCat	Heidelberg
BioLegend Europe BV	Uithoorn, Niederlande
Biometra GmbH	Göttinge
Biomers	Ulm
Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Bio-Techne (R&D, Tocris)	Wiesbaden-Nordenstadt

Biozym Scientific GmbH	Oldendorf
Braun	Tuttlingen
Caliper Life Sciences	Rüsselsheim
Canon Inc.	Tokyo, Japan
Carl Roth GmbH & Co.KG	Karlsruhe
Carl Zeiss GmbH	Göttingen
Charles River Laboratories	Sulzfeld
CST Cell Signaling	Frankfurt am Main
Dako Deutschland GmbH	Hamburg
Dianova GmbH	Hamburg
Dunn Labortechnik GmbH	Asbach
Eppendorf AG	Hamburg
Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Field Emissipon Corporation	McMinnville Oregon, USA
GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg
Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel
C. Gerhardt GmbH & Co.KG	Königswinter
Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Heraeus Kulzer GmbH & Co.KG	Wehrheim
Heraeus Sepatech GmbH	Osterode am Harz
Hiss Diagnostics	Freiburg
Johnsson & Johnsson GmbH	Neuss
Kern & Sohn GmbH	Balingen
Kinesis GmbH	Langenfeld
Knick GmbH & Co.KG	Berlin
Labinstruments Deutschland GmbH	Crailsheim
Lab & Vet Service GmbH	Wien, Österreich
Leica Microsystems	Wetzlar
LG Electronics	Seoul, Südkorea
Marienzfeld GmbH & Co.KG	Lauda-Königshofen
Memmert GmbH & Co.KG	Schwabach
Merck KGaA	Darmstadt
Messer Group GmbH	Sulzbach

Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach
Minerva Biolabs	Berlin
MorphoSys AbD GmbH	Düsseldorf
New Brunswick Scientific	Edison NJ, USA
New England BioLabs GmbH	Frankfurt am Main
Nikon GmbH	Düsseldorf
Olympus America Inc.	Center Valley PA, USA
Pall Life Sciences	Dreieich
Pan Biotech GmbH	Aidenbach
PE Applied Biosystems	Waltham MA, USA
PeproTech Germany	Hamburg
Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Perbio Science	Bonn
Polysciences Europe GmbH	Eppenheim
Progen Biotechnik	Heidelberg
Promega GmbH	Hamburg
Qiagen GmbH	Hilden
Restek GmbH	Bad Homburg
Roche Diagnostics	Mannheim
Sanofi-Aventis Deutschland GmbH	Frankfurt am Main
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Heidelberg
Sarstedt	Nürnberg
Serva	Heidelberg
Semperit AG	Wien, Österreich
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Sigma Laborzentrifugen GmbH	Osterode am Harz
Sony Corporation	Tokyo, Japan
Stratec Biomedical AG	Birkenfeld
Synchem OHG	Felsberg/Altenburg
System GmbH	Wettenberg
Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim
Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham MA, USA
Trevigen Inc.	Gaithburg, USA

Vitaris AG	Baar
VWR International GmbH	Darmstadt
Whatman International Ltd	Maldstone, UK
Zentrallager Theoretikum	Heidelberg

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Produktnummer, Hersteller</b>
Abdeckfolie	#30001358, Tecan
Aluminiumfolie	#2596.1, Carl Roth
Augen- & Nasensalbe	#2182442, Bepanthen, Bayer
Chamber Slides	#177445, Lab-Tek Chamber Slides, Nunc
Deckgläser 24x60, Ø 10mm	#0102242, Marienfeld #0111500, Marienfeld
Einmalinjektionskanülen	#304000 Microlance, 30G, BD Biosciences #302200 Microlance, 27G, BD Biosciences
Einmalröhrchen	#55.1578, Polypropylen, 12/75 mm, Sarstedt
Frischhaltefolie	#59206, Zentrallager Theoretikum (Universität Heidelberg)
Glaskapillaren qPCR	#04929292001, Roche
Gewebe-Handhomogenisator	#9-0950, neoLab
Handschuhe Nitril	#3780872, Sempercare, Semperit AG
Kryoröhrchen	#123263, Greiner Bio-One
Lumitrac™ weiße Microplatten	#655075, Greiner Bio-One
Macrosep-Säulen	#MAP100C36, 100kD, Pall #MAP001C36, 1kD, Pall
Mikrotiterplatten	#439454 Maxi Sorp, Nunc #655061 Microlon, Greiner Bio-One
Microvette	#20.1288, 200 K3E (Blutplasma), Sarstedt #20.1291, 200 Z-Gel (Blutserum), Sarstedt
Nitrozellulosemembran	#10600016, Amersham Protran, GE Healthcare
Objektträger	#4951PLUS, Thermo Fisher Scientific

Parafilm	#P-996, Alcan Packaging
Pasteurpipetten	#197734230, NeoLab
PCR-Reaktionsgefäße	#711080, Biozym
Petrischalen	#633171, Greiner Bio-One #664160 Cellstar, Greiner Bio-One
Perfusionsschlauch	Infusionsgerät R87, #10355, Ohmeda, GE Healthcare
Pipettenspitzen	#739296, #740290, Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße	#72.706 1,5ml, Sarstedt #72.695 2 ml, Sarstedt
Röntgenfilme (Western Blot)	#RF12 Fuji Medical Super RX, A. Hartenstein
Serologische Pipetten	(2,5,10 & 25 ml), Greiner Bio-One
Spritzen	#300013 Plastikpak, BD Biosciences
Sterilfilter	#ESF-PV-30-022, KX Syringe Filter PVDF, Kinesis #1564020 Nalgene, Thermo Fisher Scientific
Teflonreaktionsgefäß	#RE23997 Q-sep Teflon Tube 50 ml, Restek GmbH
Vacutainer®	#REF3672823, BD
Whatman Papier	#3030917 3MM CHR, Whatman International Ltd.
Zellkulturflaschen	#169900 25 cm <sup>2</sup> , Nunc #156800 75 cm <sup>2</sup> , Nunc #159926 175 cm <sup>2</sup> , Nunc
Zellkulturplatten	#150239 6-Lochplatte, Nunc #144530 24-Lochplatte, Nunc #150787 48-Lochplatte, Nunc #269620 96-Lochplatte, Nunc
Zellsiebe	#542040 40 µm, Greiner Bio-One #542070 70 µm, Greiner Bio-One #542000 100 µm, Greiner Bio-One



Zentrifugenröhrchen

#188271 15 ml, Greiner Bio-One

#227261 50 ml, Greiner Bio-One

#### 2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

<b>Name</b>	<b>Produktnummer, Hersteller</b>
Aceton	#40143 Zentrallager Theoretikum
Agarose	#15510-027, Invitrogen
Albumin Fraktion V (BSA)	#8076.2, Carl Roth
Aluminiumsulfat	#192430050, Acros Organics
$\alpha$ -MEM mit Ascorbinsäure	#22561021, Gibco, Thermo Fisher Scientific
$\alpha$ -MEM ohne Ascorbinsäure	#A1049001, Gibco, Thermo Fisher Scientific
Ammoniumchlorid	#32205, Riedel-de Haën, Zentrallager
Aqua pro Iniectione	#23114.04, Braun
$\beta$ -Alanin	#146064-500G, Sigma-Aldrich
Biotin-11-dUTP Solution (1 mM)	#R0081, Thermo Fisher Scientific
Bleomycin Sulfat	#B5507-15UN, Sigma-Aldrich
Borsäure	#A3581, 1000, Applichem
Chloramin-T-Hydrat	#857319-100G, Sigma-Aldrich
Coomasie Brilliant Blue R-250 Dye	#20278, Thermo Fisher Scientific
DAPI	#6335.1 Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	#D9779, Sigma-Aldrich
Detektionsreagenz ECL	#32106, ECL Western-Blotting-Substrat, Pierce
4-Dimethylaminobenzaldehyd	#39070, Fulka, Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	#D2650, Sigma-Aldrich
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	#A3567. 0500, Applichem
DMEM	#41966052, Gibco, Thermo Fisher Scientific
DNA-Marker 100 bp	#T835., Carl Roth
RNase-Free DNase Set	#79254, Qiagen
dNTP Mix	#BIO-39044, Boline

DPBS	#14190, Gibco, Thermo Fisher Scientific
Dynabeads® Schaf anti-Ratte IgG	#11035, Thermo Fisher Scientific
Dynabeads™ Protein G	#10004D, Thermo Fisher Scientific
EDTA	#E5134, Sigma-Aldrich
Enhancer	#01-1030, Peqlab
Essigsäure	#10296, Grüssing
Ethanol	#32205, Riedel-de Haën, Zentrallager
Fetal Calf Serum (FCS)	#P30-3302, Pan Biotech
Formaldehyd	#31245, Riedel-de Haën, Zentrallager
G418 – Disulfat- Lösung, steril	#A6798,0050, Applichem
Gelatine Sapharose 4B	#17-0956-01, Amersham, GE Healthcare
Harnstoff	#U5128, Sigma-Aldrich
HBSS 10x	#14185045, Gibco, Thermo Fisher Scientific
HEPES	#15630056, Gibco, Thermo Fisher Scientific
Imidazol	#104716, Merck
Iodessigsäure	#35603, ThermoScientific
Kaliumchlorid	#A3582,1000, Applichem
Kaliumhydrogencarbonat	#P748, Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	#1.04873.1000, Merck
Kaliumhydroxid	#Z12038, Zentrallager Theroretikum
Ketanest®	#Pfizer, Klinikapotheke Universität Heidelberg
Kochsalzlösung (0,9 % NaCl)	#190/12606084, B.Braun
Kollagen	#C777-5mg, Sigma-Aldrich
Kollagenase NB4	#17454, Serva
Kompensationskugeln	#A10513; Thermo Fisher Scientific
L-Hydroxyprolin	#25834, Serva
Lipofectamin2000	#11668019, Thermo Fisher Scientific
β-Mercaptoethanol	#444203-250ML, Merck
Methanol	#32213-2.5L, Sigma-Aldrich

2-Methoxyethanol	#156205, Methyl Cellosolve, Sigma-Aldrich
2-Methylbutan	#A1263,1000, Applichem
MgCl <sub>2</sub>	#01-1030, Peqlab
Micro BCA™ Protein Assay	#23235, Thermo Scientific
Milchpulver	#T145.1, Carl Roth
Mowiol 4-88 Reagent	#475904, Calbiochem, Merck
Natriumcarbonat	#A4332.1000, Applichem
Natriumchlorid	#64026, Riedel-de Haën, Zentrallager
Natriumcitrat	#S464, Sigma-Aldrich
Natriumfluorid	#201154-5G-D, Sigma-Aldrich
Natriumhydrogenphosphat	#106346, Merck
Natriumhydrogencarbonat	#106323, Merck
Natriumhydroxid	#30620, Sigma-Aldrich
Natriumnitrat	#237213, Sigma-Aldrich
Natriumorthovanadate	#S6508-50G, Sigma-Aldrich
Natriumthiosulfat	#S7026, Sigma-Aldrich
NP40	#ab142227, Abcam
Nycodenz, 60 %	#31000.01, Serva
ONE Glo™ Luciferase Assay System	#E6120 ONE Glo™, Promega
Opti-MEM®	#31985-062, Gibco, Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	#15140-122, Gibco, Invitrogen
Peptide ((cyc)GLQGE, (cyc)GLNGE, (cyc)GLOGE)	BioCat
Peptide ((cyc)GLQGE, (cyc)GLNGE, (cyc)GLOGE)	MPI für Biochemie Martinsried
Percoll	#P1644, Sigma-Aldrich
Phenolphthalein	#34607, Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	#A0999,0005, AppliChem
Pikrinsäure	#80456, Fluka, Sigma-Aldrich
Polyinosinic-polycytidylic acid (plpC)	#IAX-200-021-3005, Adipogen
Poly-L-Lysin 0,01 % Cultrex	#3438-100-01, VWR
2-Propanol	#69595, Riedel-de Haën, Zentrallager

Proteinase K	#3115852001, Roche
Propidiumiodid	#421301, Biolegend
Puromycin	#540411, Merck
RedSafe	#21141, Hiss Diagnostics
RevertAid Reverse Transcriptase zusammen mit 5x Reaktionspuffer	#EP0442, Fermentas
RiboLock RNase Inhibitor	#EO0381, Fermentas
Salzsäure	#Z-23-88, Zentrallager Theoretikum
Schwefelsäure	#13073, Grüssing
SensiMix™ Capillary Kit	#QT405-01, Bioline
TACS-Nuklease und Puffer	#4800-30-N, Trevigen
Taq DNA-Polymerase	#01-1030, Peqlab
Taq DNA-Polymerase	MPI für Biochemie Martinsried
Tetrachlorkohlenstoff	#289116, Sigma-Aldrich
TGF-β (rekombinant human)	#100-21C, PeproTech
TMB	#613544, Merck
Toluol	#244511, Sigma-Aldrich
Tricin	#T5816-25G, Sigma-Aldrich
Tris	#4855.2, Carl Roth
Tris-HCL	#9090.3, Carl Roth
Triton X-100	#108603, Merck
Trypanblau (0,4 %)	#15250061, Gibco, Thermo Fisher Scientific
Trypsin-EDTA	#25300054, Gibco, Thermo Fisher Scientific
Tween 20	#9127.1, Carl Roth
Xylazin	#Klinikapotheke Universität Heidelberg
Xylol	#296325, Sigma-Aldrich
Zelldissoziationspuffer	#13151014, Gibco, Thermo Fisher Scientific

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

ACK-Lysepuffer	4,15 g Ammoniumchlorid
----------------	------------------------

	0,5 g Kaliumhydrogencarbonat 100 µl 0,5 M EDTA (pH 7,5) in 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Agarosegel	1,5 % - 3 % Agarose einwiegen, mit 1X TAE-Puffer auffüllen, in der Mikrowelle unter Kochen lösen, mit 5 µl Red Safe versetzen und in ein Gelschlitten gießen
Annexin-Bindepuffer	10 mM HEPES pH 7,4 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> in 50 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
β-Alaninlösung (10%ig)	5 g β-Alanin in 50 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> pH-8,7 (mit KOH)
Blockierlösung	5 % BSA in PBS-T
Chloramin-T-Lösung	2,82 g Chloramin-T-Hydrat in 50 ml 2-Methoxyethanol
Coomassie-Entfärbelösung	200 ml 2-Propanol 70 ml Essigsäure in 1 Liter H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Coomassie-Färbelösung	400 ml 2-Propanol 75 ml Essigsäure 2 g Brilliant Blau R250 in 1 Liter H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
DNA-Lysepuffer	100 mM Tris (pH 8,5) 200 mM NaCl 5 mM EDTA (pH 8,0) 0,2 % SDS in 10 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> , sterilfiltrieren
EDTA-Lösung 0,5 M	186,1 g EDTA in 1 Liter H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> pH-8,0 (NaOH)
EGTA-Lösung	3,8 g EGTA in 10 M NaOH lösen pH-Wert auf 7,4 einstellen (HCL) mit dH <sub>2</sub> O auf 10 ml auffüllen

EGTA-Lösung (Perfusion)	<p>1 % Penicillin / Streptomycin</p> <p>1 % HEPES</p> <p>0,25 % EGTA-Lösung</p>
Ehrlich's Reagenz	<p>Lösung 1: 13,7 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / 100 ml Ethanol auf Eis rühren.</p> <p>Lösung 2: 60 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd / 100 ml Ethanol auf Eis rühren.</p> <p>Lösung 1 unter Rühren auf Eis in Lösung 2 geben.</p> <p>Zum vollständigen Lösen leicht erwärmen, Lagerung bei 4 °C.</p>
FACS-Puffer	2,5 % FCS in DPBS
KCL-Borat-Puffer	<p>15,45 g Borsäure</p> <p>56,25 g KCl</p> <p>in 250 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub></p> <p>pH-8,7 (KOH)</p>
Kollagenase-Lösung 1	<p>0,015 % Kollagenase NB4</p> <p>1 % Penicillin / Streptomycin</p> <p>1% HEPES</p> <p>1% CaCl<sub>2</sub> (von Stock 0,1 M)</p> <p>In 1x HBSS</p>
Kollagenase-Lösung 2	<p>0,001 % DNase I</p> <p>0,005 % Kollagenase NB4</p> <p>1 % Penicillin / Streptomycin</p> <p>1% HEPES</p> <p>1% CaCl<sub>2</sub> (von Stock 0,1 M)</p> <p>In 1x HBSS</p>
10x Laufpuffer (SDS-PAGE)	<p>30,25 g Tris</p> <p>144 g Glycin</p> <p>10 g SDS</p> <p>In 1 Liter H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub></p>
Mowiol (Elvanol)	<p>5 g Mowiol 4-88 Reagent</p> <p>20 ml 1X PBS (pH 8,0)</p>

	<p>10 ml Glycerin</p> <p>ü.N. bei RT unter Rühren lösen, 30min bei 50°C im Wasserbad schütteln, 30min bei 5000g zentrifugieren, bei -20° lagern</p>
Natrium-Thiosulfat-Lösung	<p>56,92 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub></p> <p>in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub></p>
Nycodenz-Lösung	<p>Nycodenz 60 % mit Tricin-Puffer mischen (1 zu 1)</p>
Nycodenz-Lösung 18 %	<p>Für 10 ml: 4 ml 1x HBSS + 6 ml Nycodenz-Lösung</p>
Nycodenz-Lösung 9 %	<p>Für 10 ml: 7 ml 1x HBSS + 3 ml Nycodenz-Lösung</p>
Paraformaldehyd-Lösung (4 %)	<p>22,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub></p> <p>5 µl 10 M NaOH und auf 60°C erhitzen</p> <p>1g Paraformaldehyd</p> <p>2,5 ml 10X PBS dazu geben und auf Eis abkühlen lassen</p> <p>pH-7,4</p>
PBS (10x)	<p>400g NaCl</p> <p>58 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></p> <p>10 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></p> <p>10 g KCl</p> <p>in 5 Liter H<sub>2</sub>O<sub>d</sub></p> <p>pH-7,0</p>
PBS-T	<p>1x PBS</p> <p>0,5 % Tween</p>
Probenpuffer 4x (DNA)	<p>50 % Glycerin</p> <p>In 4x TBE</p> <p>Spatelspitze Bromphenol</p>
Probenpuffer 4x (Protein)	<p>0,15 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub></p> <p>1,25 ml 0,5 M Tris (pH 6,8)</p> <p>1 ml Glycerol</p> <p>2 ml 10 % SDS</p>

	<p>0,1 ml 1% Bromphenolblau  0,5 ml <math>\beta</math>-Mercaptoethanol (nur bei reduzierenden Bedingungen)</p>
Proteinase-K-Lösung	20 mg/ml Proteinase K in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Protein-Lysepuffer	<p>20 mM Tris-HCL  150 mM NaCl  10 % Glycerin  0,5 % Triton X-100  2 mM EDTA  10 mM NaF  1 mM PMSF  1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></p>
Protein-Lysepuffer (nativ)	<p>20 mM Tris-HCL  137 mM NaCl  1 % Nonidet P-40  pH-8,0</p>
Stripping-Puffer	<p>200 mM Glycin in H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>  pH-2,9</p>
TAE-Puffer (50x)	<p>242 g Tris  57,1 ml reine Essigsäure  100 ml 0,5 M EDTA  in 1 Liter H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>  pH-8,3</p>
Transferpuffer (10x)	<p>29,2 g Glycin  58 g Tris  37,6 ml 10 % SDS Lösung  in 1 Liter H<sub>2</sub>O<sub>d</sub></p>
Tricin-Puffer	<p>1,8 g Tricin  50 ml PBS  pH-7,4 (NaOH)</p>
Verdaumedium	<p>1 ml DMEM  1 mg Kollagenase NB4  1 <math>\mu</math>l DNase I</p>



## 2.1.6 Antikörper

### 2.1.6.1 Primär Antikörper

Antikörper	Herkunft	Verwendung	Hersteller
AKT	Kaninchen	WB	9272, Cell Signaling
Phospho AKT (S473)	Kaninchen	WB	9271, Cell Signaling
$\alpha$ -SMA	Maus	WB	A2547, Sigma
Caveolin-1	Maus	WB	610406, BD
Collagen I	Ziege	WB	1310-01, Southern Biotech
Collagen III	Ziege	WB	1330-01, Southern Biotech
ERK 1/2	Kaninchen	WB	9102, Cell Signaling
Phospho ERK 1/2 (T202/Y204)	Kaninchen	WB	4376, Cell Signaling
FAK	Kaninchen	WB	06-543, Millipore
Phospho FAK (Y397)	Kaninchen	WB	8556, Cell Signaling
Fibronectin	Kaninchen	WB	AB2033, Millipore
GAPDH	Kaninchen	WB	G9545, Sigma
Integrin- $\alpha$ 10	Ziege	IF	PA5-23897, Thermo Scientific
Integrin- $\alpha$ 11	Kaninchen	IF, WB	sc-161742, Santa Cruz
Integrin- $\beta$ 1	Ratte	WB	MAB1997, Millipore
Integrin- $\beta$ 1	Ratte	IF	553715, BD
Integrin- $\beta$ 3	Kaninchen	WB	AB1932, Millipore
Smad2	Kaninchen	WB	5339, Cell Signaling
Phospho Smad2	Kaninchen	WB	3108, Cell Signaling
Smad3	Kaninchen	WB	9513, Cell Signaling
Phospho Smad3	Kaninchen	WB	9520, Cell Signaling
Smad4	Kaninchen	WB	ab40759, Abcam

Phospho Smad4	Kaninchen	WB	AP3251a, Abgent
---------------	-----------	----	-----------------

### 2.1.6.2 Sekundär Antikörper

Antikörper	Label	Hersteller
Esel anti-Ziege	HRP	705-635-147, Dianova
Esel anti-Ziege	PE	Sc-3743, Santa Cruz
Ziege anti-Kaninchen	HRP	111-035-045, Dianova
Ziege anti-Kaninchen	Alexa 647	Ab150079, abcam
Ziege anti-Maus	HRP	170-6515, BioRad
Ziege anti-Ratte	HRP	112-036-071, Dianova

### 2.1.6.3 Antikörper und Marker für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Label	Klon/Bestellnr.	Isotyp	Hersteller
Annexin V	Alexa 647	640912		Biologend
CD3ε	PE	145-2C11	Armenian Hamster IgG	Biologend
CD11b	PerCP- Cy5.5	M1/70	Rat IgG2b, κ	Biologend
CD11c	BB515	N418	Armenian Hamster IgG	Biologend
CD19	FITC	eBio1D3	Rat IgG2a, κ	eBioscience
CD29	PE	HMb1-1	Armenian Hamster IgG	Biologend
CD45	APC-Cy7	30-F11	Rat IgG2b, κ	Biologend
CD45R (B220)	FITC	RA3-6B2	Rat IgG2a, κ	Biologend
CD49a	PE	HMa1	Hamster IgG2, λ0	Biologend
CD49b	Alexa647	DX5	Rat IgM, κ	Biologend
CD49d	PE	9C10	Rat IgG2a, κ	Biologend
CD49e	Alexa647	5H10-27	Rat IgG2a, κ	Biologend
CD51	PE	RMV-7	Rat IgG1, κ	Biologend
CD61	APC	HMa3.1	Armenian Hamster IgG	Biologend

CD61	PE	HMβ3.1	Armenian Hamster IgG	Bio-Rad
F4/80	PE	BM8	Rat IgG2a, κ	Biolegend
Fixable Viability Stain 450	BV450			BD
PI		421301		Biolegend

## 2.1.7 Oligonukleotide

### 2.1.7.1 Oligonukleotide für die Genotypisierung

Primer	Sequenz
5'-Alb	TAGTGTGGTTAATGATCTACAG
3'-beta1	GTGAAGTAGGTGAAAGGTAAC
5'-beta1	AGGTGCCCTTCCCTCTAGA
5'-Col	CAGCTCTCCATCAAGATGGT
3'-Cre	ATGTTTAGCTGGCCCAAATG
3'-FN	ACCCCTGAGCATCTTGAGTG
5'-FN	TGTCCCATATAAGCCTCTGCT
5'-Mx	GCAAGCTCAGGCTTTTTTCAC

### 2.1.7.2 Oligonukleotide und Sonden für die qPCR

Gen	5' Primer	3' Primer	Probe #
αSMA	ggagaagccccagtc	agcatcatcagcgaag	21
Caveolin1	aacgacgacgtggtcaaga	cacagtgaagtggtgaagc	97
EEA1	ggttaaaaatgctgtttcacaaaa	tttctctgctgcaagctcct	27
Fibronectin	tttgctcctgcacgtgttt	ctgtgtatactggtgtaggtgtgg	66
HPRT	tctcctcagaccgctttt	cctggttcatcatcgctaadc	95
Integrin-β1	tggcaacaatgaagctatcg	atgtcgggaccagtaggaca	109
Kollagen1	catgttcagcttgtggacct	gcagctgactcagggatg	15
Kollagen3	tggacccaaggtcttcc	catctgatccagggttcca	64
Kollagen4	agggtccccctggtctta	ccactgagcctgtcacacc	109

TGF- $\beta$	ctgggcaccatccatgac	cagttcttctctgtggagctga	15
TGF- $\beta$ R1	cagctcctcatcggtgg	cagagggtggcagaaacactg	32
TGF- $\beta$ R2	ggctctggtactctgggaaa	aatgggggctcgtaatcct	7

### 2.1.8 siRNAs

siRNA	5' siRNA	3' siRNA	Hersteller
Integrin- $\alpha$ 1	CCUACUUUGGUAGCGUC UU-dTdT	AAGACGCUACCAAAGUAG G-dTdT	Sigma
Integrin- $\alpha$ 2	CAGAGUACUUCAUCAAU GU-dTdT	ACAUUGAUGAAGUACUC UG-dTdT	Sigma
Integrin- $\alpha$ 4	GCAUGAAGACCAUAAUG CU-dTdT	AGCAUUAUGGUCUUCAU GC-dTdT	Sigma
Integrin- $\alpha$ 5	GAGAUGAAGAUCUACCU CA-dTdT	UGAGGUAGAUCUUCAUC UC-dTdT	Sigma
Integrin- $\alpha$ 10	GGUAUGAGGUUCACCCU UA-dTdT	UAAGGGUGAACCUCAUA CC-dTdT	Sigma
Integrin- $\alpha$ 11	GUGUAUGUCUACAACCU GA-dTdT	UCAGGUUGUAGACAUAC AC-dTdT	Sigma
Integrin- $\alpha$ v	CUUCUACUGGAU AACUC A-dTdT	UGAGUUUAUCCAGUAGA AG-dTdT	Sigma
Integrin- $\beta$ 1	GUGAAGACAUGGACGCU UA-dTdT	UAAGCGUCCAUGUCUUC AC-dTdT	Sigma
Integrin- $\beta$ 3	CCUGUAUCGCCGUACA GU-dTdT	ACAUGUACGGCGAUACA GG-dTdT	Sigma
Kontrolle	Mission siRNA Universal Negative Control #1 (SIC001-10NMOL)		Sigma

## 2.2 Tierexperimentelle Methoden

### 2.2.1 Versuchstierhaltung

Für die Anfertigung dieser Arbeit wurden Tiere der Gattung *mus musculus* verwendet. Die Tiere wurden in der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten und gezüchtet. In regelmäßigen Abständen wurde der Pathogenstatus überprüft. Maximal drei Tiere wurden in einem Polykarbonatkäfig mit einer Fläche von 360 cm<sup>2</sup> gehalten. Auf dem Käfigboden war ein staubfreies Weichholzgranulat (#LTE E-001; ABEDD Vertriebs GmbH) verteilt sowie für den Nestbau Zellstoffe. Die Räume hatten eine Temperatur von 22°C +/- 2°C, eine Luftfeuchtigkeit von 50-60% und ein Hell-Dunkel-Zyklus von 12-12 Stunden. Die Versorgung mit Wasser (Leitungswasser) und Futter (#Rod 16 oder Rod 18, Altromin) geschah ad libitum. Die Versuche mit den Tieren wurden nach Genehmigung des Tierversuchsvorhabens durch die Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Karlsruhe durchgeführt.

Tierversuchsnummer	Titel
G-256/14	Die Rolle von Integrin-β1 in der Fibrosebildung
G-60/17	Die Rolle kleiner Peptide in der Leberfibrose
G-230/17	Integrin-β1 moduliert TGF-β
G-53/19	Rolle cyclisierter Peptide in der Leberfibrose
G-166/19	Rolle kleiner Peptide in der Lungenfibrose
G-235/19	Auswirkung vom Integrin-β1 bei der Fibrosebildung
G-102/20	Auswirkung vom Integrin-β3 bei der Fibrosebildung

### 2.2.2 Mausstämme

Der C57BL/6J Mausstamm wurde 1921 von C.C. Little erschaffen. Dieser Stamm ist nicht sehr anfällig für natürliche Tumore, erlaubt aber eine große Variation von Mutationen. Daher ist er einer der am häufigsten verwendeten Inzuchtmausstämme und wird für viele humane Krankheiten als Tiermodell verwendet (Goldstein and Wagers, 2018). In dieser Arbeit wurde der C57BL/6J Mausstamm für die Experimente der Leber- und Lungenfibrose verwendet. Die Mäuse wurden ab einem Alter von 6 Wochen über die IBF direkt von Janvier Labs bestellt und im klinisch-experimentellen Bereich der IBF gehalten.

Als Kontrolle für die Integrin-β1 Knockout Mäuse wurde ein Mausstamm verwendet, bei dem das Integrin-β3 in allen Zellen ausgeschaltet ist (B6.129S2-

Itgb3tm1Hyn/JSemJ). Die Homozygoten Knockout Mäuse sind wegen inneren Blutungen und chronischen Blutungen im Gastrointestinaltrakt sowie eines skelettalen Defekts kaum überlebensfähig ((Hodivala-Dilke et al., 1999); (McHugh et al., 2000)). Aus diesen Gründen wurde diese Mauslinie als belastet eingestuft.

### 2.2.3 Konditionelle Knockout-Mäuse

Um den Einfluss des Integrin- $\beta$ 1 auf die Leberfibrose zu untersuchen, wurden zwei konditionelle Knockout-Mausstämme verwendet. Der konditionelle Knockout erfolgte mit Hilfe des Cre/loxP-Systems (Sternberg et al., 1981). Dieses System erlaubt die gezielte Ausschaltung des gewünschten Gens in spezifischen Gewebe- oder Zellarten, aber auch zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten. Das Zielgen ist dabei mit sogenannten loxP-Stellen flankiert (gefloxt, fl/fl). Diese dienen als Erkennungssequenz für das Enzym Cre-Rekombinase, welches den DNA-Bereich zwischen den beiden loxP-Stellen herausschneidet und die DNA-Enden wieder verbindet. Die Deletion des gewünschten Gens kann dabei gewebe- oder entwicklungspezifisch sein, wenn die Expression der Cre-Rekombinase an spezifische Promotoren gekoppelt ist.

Es wurden zwei Mausstämme verwendet bei der die Expression der Cre-Rekombinase zum einen unter der Kontrolle des Albumin-Promotors (Alb-Cre) und zum anderen unter der Kontrolle des Mx1-Promotors (*engl.: myxovirus resistance 1-promotor*) stand. Unter der Kontrolle des Albumin-Promotors wird die Cre-Rekombinase lediglich in den Hepatozyten exprimiert, was zur Folge hat, dass nur in den Hepatozyten das Zielgen (Integrin- $\beta$ 1) deletiert ist (Weisend et al., 2009). Für die Ausschaltung des Integrin- $\beta$ 1 in allen Leberzellen wurden Mäuse verwendet, in der die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Mx1-Promotors steht. Der Mx1-Promotor wird durch Interferone oder durch die Chemikalie plpC (*engl.: polyinosinic-polycytidylic acid*), eine synthetische Doppelstrang RNA, die die Ausschüttung von Interferonen bewirkt, induziert (Kuhn et al., 1995). Hier wurde durch die fünfmalige intraperitoneale (i.p.) plpC-Injektion, mit je einem Abstand von 2-3 Tagen (2 mg/ml in 0,9 % NaCl; 10  $\mu$ l/g), der Mx1-Promotor aktiviert und das Integrin- $\beta$ 1 in der gesamten Leber und in der Zirkulation reduziert. Die beiden Mausstämme wurden uns von Herrn Prof. R. Fässler (MPI für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.4 Induktion einer Leberfibrose mit Tetrachlorkohlenstoff (CCl<sub>4</sub>)

Für die Induktion einer Leberfibrose wurde den Mäusen die Chemikalie Tetrachlorkohlenstoff (CCl<sub>4</sub>) injiziert. CCl<sub>4</sub> wird in der Leber durch Monooxygenasen in Trichlormethylradikale (CCl<sub>3</sub>) metabolisiert. Dieses reagiert mit Nukleinsäuren, Lipiden oder mit den Sulfhydrylgruppen von Proteinen und bewirkt die Permeabilisierung von Membranen. Die Behandlung führt schließlich zu Nekrosen, Apoptose von Hepatozyten, Aktivierung von hepatischen Sternzellen und Inflammation ((Yanguas et al., 2016); (Iredale, 2007); (Scholten et al., 2015)). In dieser Arbeit wurde den Mäusen 5 µl pro Gramm Körpergewicht eines 1:5 verdünnten CCl<sub>4</sub>-Öl-Gemisches, oder den Kontrolltieren nur Öl, drei Mal wöchentlich über einen Zeitraum von sechs Wochen mit einer 30 G Kanüle i.p. injiziert. Das Gewicht der Tiere wurde einmal pro Woche kontrolliert.

#### 2.2.5 Induktion einer Lungenfibrose mit Bleomycin

Für die Induktion einer Lungenfibrose wurde den Mäusen die Chemikalie Bleomycin injiziert. Bleomycin wird von dem Bakterium *Streptomyces verticillus* gebildet und wurde 1962 von Hamao Umezawa entdeckt. Im Wesentlichen wird es in der Krebstherapie verwendet, wobei als Nebenwirkung häufig eine Lungenfibrose auftritt. Die Wirkung von Bleomycin besteht in dem Schneiden von DNA. Dabei bindet Bleomycin an die DNA und gleichzeitig an ein Metallion (*in vivo* oft ein Eisenion). Durch die Anwesenheit von reaktivem Sauerstoff oxidiert das Metallion und die DNA (*engl.: deoxyribonucleic acid*) wird geschnitten. Weiterhin induziert Bleomycin die Lipidperoxidation, was ebenfalls zu Zellschäden führt ((Hay et al., 1991) (Della Latta et al., 2015)). In dieser Arbeit wurde den Mäusen einmalig 0,05 U (*engl.: unit*) pro Kilogramm Körpergewicht Bleomycin in 50 µl 0,9 % NaCl intratracheal mit einer 22 G Venenverweilkanüle injiziert. Vorab wurden die Mäuse mit einem Narkosemittel, bestehend aus 10 % Ketamin und 2 % Xylazin in sterilem DPBS (*engl.: dulbecco's phosphate-buffered saline*), narkotisiert. Den Mäusen wurden 10 µl pro Gramm Körpergewicht dieser Narkoselösung mit einer 30 G Kanüle i.p. injiziert.

### 2.2.6 Behandlung der Mäuse mit Peptiden

Als Behandlung für die Leber- und Lungenfibrose wurde den Mäusen die Peptide GLQGE (Glycin-Leucin-Glutamin-Glycin-Glutaminsäure), GLNGE (Glycin-Leucin-Asparagin-Glycin-Glutaminsäure) und GLOGE (Glycin-Leucin-Pyrrolysin-Glycin-Glutaminsäure) injiziert. Die Aminosäuresequenz GLNGE (Glycin-Leucin-Asparagin-Glycin-Glutaminsäure) kommt in dem Peptid R1R2 vor. R1R2 ist ein Fibronektin bindendes Peptid aus dem Bakterium *Streptococcus equi*. Durch die Bindung von R1R2 an Fibronektin wird die Bindestelle für Kollagen blockiert und dadurch die Einlagerung von Kollagen in der extrazellulären Matrix inhibiert ((Lindmark and Guss, 1999); (Sottile et al., 2007)). Zu dem ähneln die drei Peptide sehr der Integrin Bindedomäne GFOGER, welche für die Bindung an Kollagen eine Rolle spielt ((Zhang et al., 2003); (Kim et al., 2005)). Die drei Peptide wurden zum einen in zyklisierter und in nicht zyklisierter Form von der Firma Biocat synthetisch hergestellt und bezogen. Zum anderen wurden die Peptide von Stefan Pettera (MPI für Biochemie, Martinsried) hergestellt. Alle Peptide wurden in 0,9 % NaCl gelöst. Bei der Behandlung der Leberfibrose wurde den Tieren in den letzten zehn Tagen täglich pro Maus 0,5 mg cycGLQGE oder ein Kontrollpeptid mit einer 30 G Kanüle i.p. injiziert. Kontrolltieren für die Leberfibrose wurden mit 0,9 % NaCl behandelt.

Für die Behandlung der Lungenfibrose wurde den Tieren in den letzten zehn Tagen täglich pro Maus 1 mg cycGLQGE oder Kontrollpeptid mit einer 30 G Kanüle subkutan injiziert. Kontrolltieren für die Lungenfibrose wurden mit 0,9 % NaCl behandelt.

### 2.2.7 Die Tötung der Versuchstiere und die Entnahme von Proben

Die Euthanasierung der Versuchsmäuse erfolgte durch die Injektion einer Narkoselösung, bestehend aus 10 % Ketamin und 2 % Xylazin in sterilem DPBS, wovon 10 µl pro Gramm Körpergewicht mit einer 30 G Kanüle i.p. verabreicht wurde. Nach Einsetzen der Narkose wurden die Mäuse fixiert und den Tieren Blut, Leber oder Lunge entnommen. Zur Bestimmung der Erythrozytenzahl und des Hämoglobinwertes wurde ein Teil des entnommenen Blutes 1:2 mit DPBS + 5 mM EDTA verdünnt und mit dem Hämatologie-System CELL-DYN Emerald analysiert. Für die Analyse der Blutwerte im Blutplasma wurde das Blut in einer Microvette mit Tri-Kalium-EDTA für 5 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert. Das Plasma wurde anschließend 1:8 mit 0,9 % NaCl verdünnt und zur Analyse ins Analysezentrum des Universitätsklinikum Heidelberg



gebracht. Für die Analyse der Knochenmarkszellen wurde den Tieren die Extremitäten entfernt und für *in vitro* Versuche verwendet. Die einzelnen Leberlappen oder Lungenflügel wurden zügig nach Eintreten der Narkose entnommen und auf ein Whatman-Papier gelegt. Ein kleiner Leberlappen oder Lungenflügel wurde für durchflusszytometrische Analysen in Verdaumedium zerkleinert und für mindestens 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Das weitere Vorgehen wird unter Punkt 2.3.12 genauer beschrieben. Die anderen Leberlappen bzw. Lungenflügel wurden zum schonenden Fixieren kurz in gekühltes 2-Methylbutan (Isopenthan) und anschließend zum schnellen Gefrieren für 1-2 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 2.3 Zellbiologische Arbeitsmethoden

Sämtliche Arbeiten mit Zellen wurden mit sterilisierten Geräten, steril verpackten Zellkulturflaschen und Pipetten sowie steril filtrierten oder steril gekauften Substanzen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhärenente Zellen, welche durch die Zugabe der Hydrolase Trypsin von der Oberfläche gelöst werden konnten.

#### 2.3.1 Auftauen und Kultivierung der Zellen

Ein Aliquot der gewünschten Zelllinie wurde aus dem flüssigen Stickstoff zügig in einem Wasserbad bei 37 °C unter einer achtförmigen Bewegung aufgetaut. Unmittelbar nach dem Auftauen wurden die Zellen in eine vorgewärmte mit 10 ml Medium gefüllte 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit Filtertop überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 5 ml DPBS (*engl.: dulbecco's phosphate-buffered saline*) gewaschen und mit frischem Medium versorgt. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen passagiert. Dabei wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml DPBS gewaschen. Zum Lösen der Zellen von der Oberfläche, wurden diese mit 3 ml Trypsin/EDTA (*engl.: ethylenediaminetetraacetic acid*) versetzt und für 3 bis 5 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach dem Ablösen wurden die Zellen in 7 ml Medium resuspendiert, nach gewünschter Konfluenz 1:5, 1:10 oder 1:20 geteilt und auf 13 ml mit Medium aufgefüllt. Die restlichen Zellen wurden in einem Falcon für *in vitro* Experimente oder zum Einfrieren gesammelt. Die Kultivierung

erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> (Kohlenstoffdioxid) Begasung und etwa 98 % Luftfeuchtigkeit.

### 2.3.2 Kryokonservierung der Zellen

Bei der Kryokonservierung wurden in etwa  $1 \times 10^6$  Zellen in einem Kryokonservierungsgefäß eingefroren. Dafür wurden die Zellen nach dem Passagieren in einem Falcon gesammelt und für 4 Minuten bei 500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Medium mit 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Die Zellen wurden in einem Volumen von 1 ml in die Kryokonservierungsgefäße aliquotiert und in eine mit Isopropanol gefüllte Kühlbox gelegt. Diese wurde bei -80 °C über Nacht langsam und schonend eingefroren (-1 °C pro Minute). Beim langsamen Einfrieren diffundiert das DMSO in die Zellen, wodurch das Wasser verdrängt und die Bildung von Eiskristallen minimiert wird. Am nächsten Tag wurden die Kryokonservierungsgefäße zur langfristigen Aufbewahrung in einen Stickstofftank überführt.

### 2.3.3 Mlec-Zellen (engl.: mink lung epithelial cells)

Zur Bestimmung von TGF- $\beta$  auf Proteinebene wurde eine Zelllinie von Lungenepithelzellen (Mlec-Zellen) aus amerikanischen Nerzen (Mink) verwendet. Die Zellen der verwendeten Zelllinie sind stabil transfiziert und enthalten das Gen Luciferase aus dem Leuchtkäfer. Das Luciferase-Gen steht unter der Kontrolle des PAI-1 Promotors (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-I), welcher durch TGF- $\beta$  aktiviert wird (Abe et al., 1994). Zum Erhalt des Luciferase-Konstruktes wurde diese Zelllinie unter Selektionsdruck in einem Medium (DMEM, #41966052, Gibco, Invitrogen) mit 10 % FCS (engl.: fetal calf serum), 1 % P/S (Penicillin/Streptomycin) und 1 % G418 kultiviert. Diese Zelllinie wurde uns von Herrn Prof. R. Fässler (MPI für Biochemie in Martinsried) zur Verfügung gestellt.

### 2.3.4 Fibroblasten 3T3-Zelllinie

Für die *in vitro* Fibroblasten-Experimente wurden Zellen der 3T3-Zelllinie verwendet. Unter bestimmten Bedingungen können diese Zellen auch zu Adipozyten differenzieren (Green and Meuth, 1974). Die Zellen wurden in einem Medium (DMEM,

#41966052, Gibco, Invitrogen) mit 10 % FCS und 1 % P/S im Brutschrank kultiviert. Diese Zelllinie wurde uns von Prof. R. Wallich (Institut für Immunologie, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

### 2.3.5 MC3T3-E1 Klon 4

Für den Nachweis der Bindung von Peptiden an Integrine, wurden Zellen der Zelllinie MC3T3-E1 Klon 4 (Ursprung: ATCC CRL-2593, ATCC) verwendet. Diese Zelllinie wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Carla Sens mit lentiviralen Partikeln und shRNA bearbeitet, sodass die verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Integrin Knockouts haben. In dieser Arbeit wurden Zelllinien verwendet, die einen Integrin- $\beta$ 1 oder keinen Knockout hatten. Die Zelllinien wurden in  $\alpha$ MEM Medium ohne Ascorbinsäure (#A10490-01, Gibco, Invitrogen) mit 10 % FCS, 50 IU/ml Penicillin, 50  $\mu$ g/ml Streptomycin und 2,5  $\mu$ g/ml Puromycin im Brutschrank kultiviert.

### 2.3.6 Hepatomzelllinie Huh-7

Die humane Hepatomzelllinie Huh-7 wurde 1982 von H. Nakabayashi und J. Sato etabliert, wobei sie Hepatozyten aus einem Lebertumor eines 57 Jahre alten Japaners isolierten (Nakabayashi et al., 1982). Erworben wurde die Zelllinie von der JCRB Cell Bank (JCRB0403) und diente als Kontrolle zu den primären Hepatozyten Zellkulturversuchen. Die Zelllinie wurde in einem Medium (DMEM, #41966052, Gibco, Invitrogen) mit 10 % FCS im Brutschrank kultiviert.

### 2.3.7 Isolation der primären Hepatozyten (HC), Kupffer-Zellen (KC), Endothelzellen (LSEC) und hepatischen Sternzellen (HSC) aus murinen Lebern

Für die Isolation der verschiedenen Leberzellen muss die Leber vorab *in vivo* perfundiert werden (Liu et al., 2011). Dafür wurden den Mäusen zuerst mit einer 30 G Kanüle 10  $\mu$ l pro Gramm Körpergewicht einer Narkoselösung, bestehend aus 10 % Ketamin und 2 % Xylazin in sterilem DPBS, i.p. verabreicht. Nach dem die Wirkung der Narkose mittels eines Reflextests überprüft wurde, wurden den Mäusen der Bauchraum geöffnet und die *Vena Cava* sowie die *Vena portae* freigelegt. Unterhalb der Leber wurden mit Hilfe einer 25 G Flügelkanüle 50 ml einer EGTA-haltigen (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) Lösung in die *Vena*

cava gepumpt. Zeitgleich wurde die *Vena portae* durchtrennt, um ein Auslaufen der in die Leber hinein gepumpte Flüssigkeit zu ermöglichen. Bei dem Durchspülen der Leber mit der ersten Flüssigkeit wird das Blut aus der Leber entfernt, wobei die Leber eine hellbraune Farbe annimmt und das Versuchstier entblutet. Zum Verdau des Bindegewebes wird im Anschluss die Leber mit 50 ml einer Kollagenase-Lösung 1 durchspült. Nach der Perfusion der Leber, wurde diese entnommen und in einer Kollagenase-Lösung 2 mit zwei Pinzetten zerkleinert. Die Zellsuspension wurde mit einem 100 µm Zellsieb filtriert und anschließend bei 50 g ohne Bremse für zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand, welcher die nichtparenchymalen Zellen (KC, LSEC, HSC) enthält, wurde abgenommen und in einem neuen Falcon gesammelt. Die abzentrifugierten Hepatozyten im Pellet wurden in 6 ml DPBS resuspendiert, mit 4 ml Percoll versetzt und sieben Minuten bei 150 g ohne Bremse zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und die Hepatozyten in der gewünschten Menge Medium aufgenommen. Die nicht parenchymalen Zellen wurden bei 800 g für fünf Minuten ohne Bremse abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10 ml einer 18 % Nycodenz-Lösung resuspendiert. Diese Lösung wurde zuerst mit 10 ml einer 9 % Nycodenz-Lösung und anschließend mit 4 ml 1 x HBSS überschichtet. Der Dichtegradient wurde für 20 Minuten bei 1400 g ohne Bremse zentrifugiert. Die HSCs, welche als weiße Zellbande direkt unterhalb der HBSS-Schicht zu erkennen sind, wurden abgenommen und in einem neuen Falcon gesammelt. Die KCs und LSECs lagen zwischen der 9 % Nycodenz- und der 18 % Nycodenz-Schicht und wurden ebenfalls in einem neuen Falcon gesammelt. Die beiden gesammelten Zellsuspensionen wurden mit DPBS auf 50 ml aufgefüllt und für fünf Minuten bei 800 g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden dann in der gewünschten Menge Medium resuspendiert. Zum Trennen der KCs von den LSECs wurden die Zellen in der gewünschten Menge ausgesät. Nach 20-25 Minuten wurde der Überstand, wo nur noch die LSECs vorkamen, abgenommen und neu ausgesät. Die übrig gebliebenen KCs wurden in neuem Medium aufgenommen.

### 2.3.8 Isolation der murinen Knochenmarkszellen

Zur Isolierung der Knochenmarkszellen wurden die Tibia und Femur nach der Euthanasie von der Maus frei präpariert und das Haut- und Muskelgewebe entfernt. Im Anschluss wurden die Enden der Knochen mit einer scharfen Schere abgeschnitten

und das Knochenmark mit einer Spritze, gefüllt mit sterilem DPBS, und einer 25 G Kanüle ausgespült. Das Knochenmark wurde in einem Falcon auf Eis gesammelt und anschließend bei 500 g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 3 ml ACK-Lysepuffer resuspendiert, wodurch die Erythrozyten entfernt wurden. Bei 500 g für 3 Minuten wurden die Knochenmarkszellen abzentrifugiert, der Überstand wieder abgesaugt und die Zellen in der gewünschten Lösung für weitere Experimente aufgenommen.

### 2.3.9 Isolation von Zellen aus dem Blut

Zur Überprüfung der Ausschaltung von Genen mittels plpC oder zur Genotypisierung von Mäusen aus der  $\beta 3$  Linie, wurden den Mäusen ein bis zwei Tropfen Blut entnommen. Das Blut wurde in einem Reaktionsgefäß mit 100  $\mu$ l DPBS mit 5 mM EDTA gesammelt, für 4 Minuten bei 500 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Lysieren der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 1 ml ACK-Lysepuffer resuspendiert, für 4 Minuten bei 500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Lyse der Erythrozyten wurde zwei bis drei Mal wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet in der gewünschten Menge FACS-Puffer aufgenommen. Die Färbung für die Durchflusszytometrie sowie die Analyse wurde wie im Abschnitt 2.3.12 beschrieben durchgeführt.

### 2.3.10 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl wurde zum einen mit dem CASY®-Zellzähler von der Firma Innovatis nach Protokoll des Herstellers und zum anderen mit der Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zählkammer besitzt vier Großquadrate mit einer Fläche von 1 mm<sup>2</sup>. Ein Deckglas wurde vorsichtig aufgelegt, bis Newtonsche Ringe entstanden, wodurch ein Raum von 0,1 mm Tiefe und somit ein Volumen von 0,1 mm<sup>3</sup> pro Quadrat gebildet wurde. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:2 mit einer 0,4 % Trypanblau-Lösung versetzt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der die Zellmembran von lebenden Zellen nicht durchdringen kann und somit nur die toten Zellen blau färbt. Die Zellsuspension wurde seitlich aufgetragen und durch die Kapillarkraft unter das Deckglas gesogen. Die lebenden Zellen aller Großquadrate wurden gezählt und der

Mittelwert mit dem Kammerfaktor und dem Verdünnungsfaktor multipliziert, wodurch die Lebendzellzahl pro Milliliter Zellsuspension bestimmt wurde.

#### 2.3.11 Transiente Transfektion der Hepatozyten mit siRNAs

Mit Hilfe der transienten Transfektion ist es möglich zeitweilig Fremd-DNA oder -RNA, wie zum Beispiel Plasmide oder siRNAs (*engl.: small interfering RNA*), in Zellen einzubringen. Für die transiente Transfektion der Hepatozyten mit siRNAs wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 nach Protokoll des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden 16-24 Stunden vor der Transfektion bis zu einer Konfluenz von 70-80 % in eine 48-Lochplatte in 200 µl Medium pro Loch ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Begasung inkubiert. Pro Loch wurde zunächst ein Reaktionsansatz mit 12,5 µl Opti-MEM® und 2 µl Lipofectamin 2000 und dann ein zweiter Reaktionsansatz mit 12,5 µl Opti-MEM® und 30 nM siRNA hergestellt. Zur Bildung von lipophilen Komplexen, die das Eindringen der siRNA in die Zellen erleichtert, wurden die beiden Ansätze zusammen pipettiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Begasung im Brutschrank inkubiert.

#### 2.3.12 Durchflusszytometrische Analysen

Bei der Durchflusszytometrie (*eng.: flow cytometry; fluorescence-activated cell sorting; FACS*) werden Zellen zuerst anhand ihrer Größe und Granularität analysiert. Durch spezifische Antikörper, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, gegen extra- oder intrazelluläre Proteine können die Zellen dann weiter charakterisiert und unterschiedliche Zellpopulationen ermittelt werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch verschiedene Laser angeregt, die Emission mit den entsprechenden Filtern detektiert und mit Hilfe einer speziellen Software kann jede fluoreszenzmarkierte Zelle im Dotplot oder Histogramm betrachtet werden. In dieser Arbeit wurden entweder Zellen aus Geweben, Zelllinien oder isolierte Primärzellen verwendet. Nach dem Verdau des Gewebes (2.2.7) wurde das Lysat mit einem 70 µm Zellsieb filtriert. Alle Zellen wurden bei 500 x g für 4 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 µl FACS-Puffer mit den

gewünschten Antikörpern in der entsprechenden Verdünnung aufgenommen und für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen und nach der Zentrifugation bei 500 g für 4 Minuten bei 4 °C in der benötigten Menge FACS-Puffer aufgenommen. Ungefärbte Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet. Zur Kompensation der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe wurden Kompensationskugeln nach Protokoll des Herstellers verwendet. Die Kompensationskugeln wurden mit den verwendeten Antikörpern einzeln gefärbt und vor der Messung der Proben gemessen. Die Messung wurde am LSRII von BD Bioscience durchgeführt und die Auswertung erfolgte mit der DIVA-Software von BD Bioscience.

### 2.3.13 Bestimmung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie

Die Apoptoserate von Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dafür wurden die Zellen bei 500 g bei 4 °C für 4 Minuten abzentrifugiert und das Zellpellet mit kaltem DPBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 50 µl Annexin-Bindepuffer resuspendiert und 1 µl Annexin V, ein Marker für die frühe Apoptose, zugegeben. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 100 µl Annexin-Bindepuffer abgestoppt. Unmittelbar vor der Messung am Durchflusszytometer wurde dem Ansatz 1 µl PI-Lösung (1 mg/ml PI = 1:10 verdünnt) hinzugefügt und dann gemessen. Die Analyse fand mit der DIVA-Software von BD Bioscience am LSRII von BD Bioscience statt.

## 2.4 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

### 2.4.1 DNA-Isolation aus Mausbiopsien

Für die Genotypisierung der Mäuse wurde die DNA aus Gewebestücken isoliert. Dafür wurde den Mäusen in einem Alter von zwei bis drei Wochen ein kleines Stück des Schwanzendes oder ein Stück vom Ohr entnommen. Die Gewebestücke wurden in einer Verdauungslösung bestehend aus 92 µl DNA-Lysepuffer und 8 µl Proteinase K (20 mg/ml) über Nacht bei 55 °C lysiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend bei 12000 x g für 10 Minuten

zentrifugiert. Der Überstand wurde dann für die Bestimmung des Genotyps mittels Polymerasekettenreaktion verwendet.

#### 2.4.2 RNA-Isolation aus Zellen und Geweben

Sämtliche Arbeiten mit RNA wurden mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O durchgeführt. Zur Analyse der mRNA-Expression in Zellen oder Geweben wurde die gesamte RNA isoliert. Dafür wurden die Zellen oder ein kleines Stück Gewebe im entsprechenden Volumen RNAzol®RT aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Für Zellen in einer Zellplatte mit 48 Vertiefungen wurde ein Volumen von 100 µl pro Vertiefung und für ein 1 mg Gewebe 1000 µl RNAzol®RT gewählt. Die Lyse der Zellen erfolgte bei einer kurzen Inkubation bei Raumtemperatur. Das Gewebe wurde mit einem Gewebe-Handhomogenisator in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zerkleinert. Zur Präzipitation der DNA und der Proteine wurden die Proben mit dem 0,4-fachen Volumen H<sub>2</sub>O versetzt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe des 0,4-fachen Volumens 75 %igem Ethanol und einer Inkubation bei Raumtemperatur für 8 Minuten wurde die RNA gefällt. Die gefällte RNA wurde bei 12000 g für 8 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit dem 0,4-fachen Volumen 75 %igem Ethanol versetzt und bei 12000 g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und die RNA in dem gewünschten Volumen H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 2.4.3 Reverse Transkription

Eine reverse Transkriptase transkribiert RNA in einzelsträngige cDNA (*engl.: complementary DNA*), welche dann für quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktionen (qRT-PCR) verwendet werden können. Die Analysen zeigen die mRNA-Expression zum Zeitpunkt der RNA-Isolation. In dieser Arbeit wurden für die Herstellung der cDNA 10 µl der isolierten RNA mit 1 µl Oligo dT Primer (10mM, Biomers) gemischt, für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und für kurze Zeit bei 4 °C gekühlt. Zu den Proben wurden 9 µl Mastermix (Tabelle 1) pipettiert und anschließend im Thermocycler für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert. Die cDNA wurde zum Schluss bei -20 °C gelagert oder direkt für qRT-PCR-Analysen verwendet.



**Tabelle 1: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zur reversen Transkription**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen pro Ansatz (in µl)</b>
5x Reaktionspuffer	4
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5
dNTPs (10 mM)	2,0
RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/µl)	0,1
Nuklease freies H <sub>2</sub> O	2,4

#### 2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (*engl: polymerase chain reaction; PCR*)

Die PCR wird verwendet, um einen bestimmten Bereich der DNA *in vitro* exponentiell zu amplifizieren ((Saiki et al., 1988); (Bej et al., 1991)). Dabei werden zunächst die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA-Doppelhelix bei 95 °C aufgebrochen (Denaturierung), sodass DNA-Einzelstränge entstehen. Im Anschluss erfolgt zwischen 55 °C und 65 °C die Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge (Hybridisierung), wobei diese komplementär zur DNA sind. Die Wahl der Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Oligonukleotide. Der Komplementärstrang wird ausgehend von den Primern in 5' – 3' Richtung durch die DNA-Polymerase synthetisiert (Elongation). Die Temperatur und die Zeit der Elongations-Phase sind abhängig von dem eingesetzten Enzym und der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Diese drei Zyklen können beliebig oft wiederholt werden. Für die Genotypisierung der Mäuse mittels PCR wurde ein „touch down“ PCR-Programm verwendet. In der Tabelle 2 und 3 sind der Ansatz und der Ablauf der PCR für die Genotypisierung dargestellt.

**Tabelle 2: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes für die Genotypisierung**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen pro Ansatz (in µl)</b>
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	15,25
10 x PCR Puffer	2,5
Enhancer	2
MgCl <sub>2</sub>	1,5
dNTPs (10mM)	1
5'Primer (25 µM)	1
3'Primer (25 µM)	1

Taq Polymerase (5 U/μl)	0,25
DNA-Lysat	0,5

**Tabelle 3: Ablauf eines PCR-Programms für die Genotypisierung**

Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
3 min	95 °C	1 x
30 sec	95 °C	10 x
30 sec	63 °C (-1 °C/Zyklus)	
30 sec	72 °C	
30 sec	95 °C	35 x
30 sec	53 °C	
30 sec	72 °C	
3 min	72 °C	1 x
∞	4 °C	

Im Anschluss der PCR wurden die DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese aufgetrennt.

#### 2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird verwendet, um verschieden große DNA-Fragmente aufzutrennen. Dabei wandern die DNA-Fragmente bei angelegter Spannung, aufgrund ihrer negativen Ladung, durch ein Netz aus Agarose-Doppelhelices zur Anode. Die Fragmentgröße gibt dabei die Laufgeschwindigkeit vor, so dass kleinere Fragmente schneller durch das Agarosegel wandern.

Für die Genotypisierung der Mäuse wurde ein 1-2 %iges Agarosegel verwendet. Hierfür wurde die Agarose durch Erhitzen in 1 % TAE-Puffer gelöst und in eine Gelkammer gegossen. Zuvor wurde der flüssigen Agarose 5 μl RotiSafe zugegeben. Dieser bindet an die DNA und emittiert unter UV-Licht eine grüne Fluoreszenz, sodass die DNA-Fragmente im Gel sichtbar werden. Den Proben wurden 10 μl DNA-Probenpuffer zugegeben und auf das Agarosegel aufgetragen. Zur Bestimmung der Größe der Fragmente wurde ein DNA-Marker (100 bp-DNA-Leiter extended; Carl Roth) mit aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 1 x TAE-Puffer

bei einer Spannung von 110 Volt. Das Agarosegel wurde anschließend unter UV-Licht (GelDoc, Jenanalytic) ausgewertet.

#### 2.4.6 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR wird für Genexpressionsanalysen verwendet. Sie beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR-Methode, welche aber zeitgleich die Quantifizierung der amplifizierten DNA beinhaltet (Higuchi et al., 1992). Die Quantifizierung erfolgt durch die Messung freigesetzter Fluoreszenz einer bestimmten Zielsequenz, welche in ein Verhältnis zu einer Referenzsequenz (*housekeeping*-Gen) gesetzt wird. In dieser Arbeit wurden sequenzspezifische fluoreszenzmarkierte TaqMan-Sonden verwendet, welche während der Hybridisierung, genau wie die spezifischen Primer, an die cDNA binden. Die TaqMan-Sonden sind am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher markiert. Da das Emissionsspektrum des Fluorophors dem Absorptionsspektrum des Quenchers entspricht, wird die Emission des Fluorophors auf Grund der räumlichen Nähe absorbiert. Während der Elongations-Phase trifft die Taq-Polymerase auf die sequenzspezifisch gebundene TaqMan-Sonde und spaltet diese hydrolytisch aufgrund ihrer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität. Dadurch wird das Reporter-Fluorophor vom Quencher getrennt und ein Fluoreszenzsignal ist messbar. Das Signal ist proportional zur amplifizierten DNA-Menge. Die in dieser Arbeit verwendeten Sonden (*Probes*) und Primer wurden über die *Universal ProbeLibrary Assay Design Software* von der Firma Roche erstellt. In den Tabellen 4 und 5 sind der Ansatz und das verwendete qRT-PCR-Programm dargestellt.

Tabelle 4: Zusammensetzung eines qRT-PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen pro Ansatz (in µl)
cDNA	3
Nuklease freies H <sub>2</sub> O	2,4
5'Primer (10 µM)	0,6
5'Primer (10 µM)	0,6
TaqMan-Sonde (Hydrolyse Probe)	0,15
SensiFast Enzyme Mix	7,5

20 x BSSA (1 mg/ml)

0,75

Tabelle 5: Ablauf eines qRT-PCR-Programms

Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
10 mn	95 °C	1 x
10 sec	95 °C	48 x
30 sec	55 °c	
1 sec	72 °c	
30 sec	40 °C	1 x

Die Quantifizierung der relativen Genexpression erfolgte durch die  $\Delta\Delta C_q$ -Berechnungs-Methode (Pfaffl and Riedmaier, 2011). Die Expression des zu untersuchenden Gens wurde auf die Expression eines unter gleichen Versuchsbedingungen exprimierten Referenzgens (HPRT) der jeweiligen Probe normiert.

## 2.5 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

### 2.5.1 Isolation von Proteinextrakten aus Zellen

Zur Isolation von Proteinen aus Zellen wurden diese in 48-Lochplatten bis zu einer Konfluenz von 70-80 % ausgesät und je nach Fragestellung stimuliert oder inhibiert. Am Ende des Experiments wurde das Medium abgesaugt, die Zellen in 50-100  $\mu$ l Protein-Lysepuffer aufgenommen und für kurze Zeit bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 12000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert oder direkt für Western Blot-Analysen verwendet.

### 2.5.2 Isolation von Proteinextrakten aus Geweben

Für die Gewinnung von Proteinextrakten aus Geweben wurde ein kleines Stück der eingefrorenen Organe in Protein-Lysepuffer aufgenommen und mit einem Gewebe-Handhomogenisator zerkleinert. Das Gemisch wurde für 10 Minuten bei 12000 g

zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert oder direkt für Western Blot-Analysen verwendet.

### 2.5.3 Gewinnung von Proteinlysaten für die Analyse von TGF- $\beta$

Damit die TGF- $\beta$  Konzentration in Geweben analysiert werden konnte, wurde ein kleines Stück Gewebe in 500  $\mu$ l Selektionsmedium für Mlec Zellen mit einem Gewebe-Handhomogenisator zerkleinert und dann bei 12000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Analyse des aktiven TGF- $\beta$  verwendet. Das Pellet wurde in 500  $\mu$ l frischem Selektionsmedium resuspendiert, 10 Minuten bei 80 °C inkubiert sowie für 10 Minuten auf Eis gelagert und anschließend bei 12000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Analyse des Matrix TGF- $\beta$  verwendet.

Für die Analyse der TGF- $\beta$  Konzentration in kultivierten Zellen, wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 70-80 % in einer 48-Lochplatte ausgesät und je nach Experiment stimuliert oder inhibiert. Das Medium der kultivierten Zellen wurde für die Analysen des aktiven TGF- $\beta$  verwendet. Die Zellen wurden mit 200  $\mu$ l frischem Selektionsmedium für Mlec Zellen versetzt, 10 Minuten bei 80 °C inkubiert und anschließend für 10 Minuten auf Eis gelagert. Die Zellen wurden von der Lochplatte in ein Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Analyse des Matrix TGF- $\beta$  verwendet.

### 2.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in Proteinextrakten wurde das Micro BCA™ Protein Assay Kit von Pierce (#23235, Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Proteinlysate aus Geweben wurden vor der Bestimmung 1:1000 und Proteinlysate aus Zellen 1:500 mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> verdünnt. Die Messung erfolgte in einer 96-Lochplatte nach den Empfehlungen des Herstellers mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 562 nm. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration mittels einer Standardkurve bestimmt.

### 2.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zum Auftrennen von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld, wurde die eindimensionale SDS (*engl.: sodium dodecyl sulfate*)-Polyacrylamid-

Gelelektrophorese nach Lämmli verwendet (Laemmli, 1970). Die Proteine wurden mit 5 x Lämmli-Puffer, welcher zum einen DTT (1,4-Dithiothretol) und zum anderen das Detergens SDS enthält, 1:5 versetzt. Das DTT spaltet die Disulfidbrücken der Tertiär- und Quartärstrukturen und sorgt dadurch für eine Linearisierung der Proteine. Zusätzlich wurden die Proben für 3 Minuten bei 95 °C erhitzt, was die Denaturierung der Proteine unterstützt. Das negativ geladene SDS bindet an die hydrophoben Seitenketten der denaturierten Proteine und überdeckt deren Eigenladung. Dadurch und durch die Linearisierung können die Proteine nach der Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden.

Für die Auftrennung der Proteine wurde ein Polyacrylamid-Gel bestehend aus einem kurzen Sammelgel und einem Trenngel gegossen. Die Konzentration des Trenngels hing von der Größe der zu analysierenden Proteine ab. Zur Herstellung der Gele wurden zwei Glasplatten mit einem Abstandshalter (1,5 mm) zusammengesetzt und unten verschlossen. Als erstes wurde das Trenngel gegossen und mit 70 % Isopropanol überschichtet, wodurch eine glatte Oberfläche entstand. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Isopropanol abgenommen, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und mit einem Kamm zum Formen der Taschen versehen. Aus dem auspolymerisierten Gel wurde der Kamm entfernt, das Gel in eine Elektrophorese-Kammer gestellt und mit 1 x Laufpuffer bedeckt. Die denaturierten Protein-Proben wurden in die Taschen des Gels pipettiert und zur Bestimmung der Größe der Proteine ein Molekulargewicht-Standard mit aufgetragen. Zunächst wurde eine Spannung von 90 Volt angelegt. Hat die Lauffront das Trenngel erreicht wurde die Spannung auf 130 Volt erhöht, sodass die Auftrennung der Proteine im Trenngel nach dem Molekulargewicht erfolgte.

**Tabelle 6: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für SDS-Page**

Komponente	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
30 % Acrylamid-Lösung	3,33 ml	0,5 ml
Deionisiertes H <sub>2</sub> O	4,17 ml	1,75 ml
1,5 M Tris/HCL pH 8,8	2,5 ml	
0,5 M Tris/HCL pH 6,8		0,75 ml
Temed	0,007 ml	0,003 ml
10 % APS	0,1 ml	0,03 ml

### 2.5.5.1 Immundetektion mittels Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse ist eine Methode mit der ausgewählte Proteine in einem Protein-Gemisch nachgewiesen werden können. Zunächst werden die Proteine in der SDS-Page aufgetrennt und im Schluss durch das Anlegen eines elektrischen Feldes vertikal zum Gel auf eine Trägermembran übertragen. Die Proteine bleiben aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen an der Membran haften. Das Muster der Auftrennung und die Quantität bleiben dabei erhalten. Einzelne Proteine (Antigene) können im Anschluss mittels spezifischer Antikörper detektiert werden ((Towbin et al., 1979); (Burnette, 1981)).

In dieser Arbeit wurden die Proteine mittels des semi-dry-Blot-Systems auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman) übertragen. Hierfür wurden 6 Whatman-Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und zum Äquilibrieren in Transferpuffer gelegt. Das Gel wurde direkt nach dem Auftrennen der Proteine mittel SDS-Page in Sammelgel und Trenngel geteilt. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte indem drei Whatman-Filterpapiere auf die Anoden-Platte gelegt wurden. Auf die Filterpapiere wurde die Membran, das Gel und wieder drei Filterpapiere gelegt. Abschließend wurde der Stapel durch die Kathoden-Platte abgedeckt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 12 Volt für 45 Minuten. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für mindestens 60 Minuten mit einer 5 %igen Milchpulver oder 5 %igen BSA-Lösung (Bovines-Serumalbumin) geblockt, wodurch unspezifische Bindungsstellen gesättigt und so eine spezifische Antikörperbindung ermöglicht wurde. Im Anschluss wurde der Blockierpuffer abgenommen, der primäre Antikörper in neuem Blockierpuffer nach Angaben des Herstellers verdünnt und mit der Membran über Nacht bei 4 °C auf einem Rundschtüttler geschüttelt. Am nächsten Tag wurde der primäre Antikörper abgenommen und die Membran 3 x für 10 Minuten mit 1 x PBS-T gewaschen. Der Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper wurde im gleichen Puffer 1:10000 verdünnt und für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Membran auf einem Rundschtüttler geschüttelt. Der sekundäre Antikörper wurde wieder abgenommen und die Membran 3 x für 10 Minuten mit 1 x PBS-T gewaschen. Für die Detektion der Proteine wurde ein ECL-System (*engl.: enhanced-chemiluminescence-system*) verwendet. Dafür wurde das Detektionsreagenz 1 und das Detektionsreagenz 2 im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde für ein bis drei Minuten mit der ECL-Lösung inkubiert und anschließend in eine

Filmkassette zwischen Klarsichtfolien gelegt. Die Peroxidase des Sekundärantikörpers katalysiert die Oxydation des Luminols, welches im Detektions-Reagenz enthalten ist, wodurch ein messbares Licht emittiert wird. Im Dunkeln wurde das entstehende Licht durch Auflegen eines lichtsensitiven Autoradiographie-Films detektiert, wobei die Belichtungszeit je nach Protein und Stärke des Signals variierte. Die gemessene Emission korreliert dabei mit der Lage und der Menge des Proteins auf der Membran. Der Film wurde mit der AGFA Typ CP1000 Tischentwicklungsmaschine entwickelt. Die quantitative Auswertung erfolgte mit Image J.

#### 2.5.6 Nachweis der Bindung von Peptiden an Integrine

Der Nachweis der Bindung von Peptiden an Integrine erfolgte mit der Methode von Lagenaur und Lemmon (Lagenaur and Lemmon, 1987), wobei die hohe Affinität von Nitrozellulose für Proteine genutzt wird. Dafür wurden 5 cm<sup>2</sup> einer Nitrozellulose-Membran in 6 ml Methanol gelöst. Eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte wurde mit der Nitrozellulose-Methanol-Lösung bedeckt und der Deckel abgenommen, sodass das Methanol verdampfen konnte. Hat sich das Methanol verflüchtigt, wurden 0,5 mg Peptid in DPBS in die Vertiefung einer 6-Loch-Platte gegeben und für vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurde eine Vertiefung nur mit DPBS ohne Peptide inkubiert. Isolierte MSCs oder MC3T3-E1-Zellen wurden in nativem Protein-Lysepuffer aufgenommen, wobei die Integrin-Dimere intakt bleiben, sodass diese Lysate für Bindungsstudien verwendet werden können. Nach der Inkubation wurden die Vertiefungen 2 x mit PBS gewaschen. Zum Sättigen der Bindungsstellen der Nitrozellulose wurden die Vertiefungen mit 20 % BSA ohne Fibronectin für fünf Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dann 2 x mit PBS gewaschen. Die Zelllysate wurden für 3 Minuten bei 12000 g zentrifugiert, der Überstand in die Vertiefungen gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Proteinlysate abgenommen und die Vertiefungen 2 x mit DPBS gewaschen. Die Proteininteraktionen wurden mit 0,5 % Paraformaldehyd für 30 Minuten bei 4 °C fixiert und dann wieder zwei Mal mit DPBS gewaschen. Die Proteine wurden mit normalem Protein-Lysepuffer von der Nitrozellulose abgelöst. Zur Analyse der Proteininteraktionen mit den Peptiden wurde das Proteinlysate an das Max-Planck-Institut für Biochemie nach Martinsried geschickt.



### 2.5.7 Luciferase-Assay (Mlec-Assay)

Luciferasen sind Oxigenasen, welche in Anwesenheit von Sauerstoff die Oxidation von Luciferin katalysieren. Hierbei entsteht eine Biolumineszenz, die im Luciferase-Assay quantifiziert wird (Inouye and Shimomura, 1997).

In dieser Arbeit wurde der Luciferase-Assay verwendet, um den Proteingehalt von TGF- $\beta$  in Zell- oder Gewebelysaten zu ermitteln. Dafür wurden Mlec-Zellen verwendet, die das Gen Luciferase unter der Kontrolle eines verkürzten PAI-1-Promotor, welcher durch TGF- $\beta$  aktiviert wird, stabil transfiziert haben. Der gemessene Wert im Luciferase-Assay korreliert mit der Menge an exprimierter Luciferase und daher auch mit der Menge an TGF- $\beta$ . Dafür wurden am Tag vor dem Assay  $4 \times 10^5$  Mlec-Zellen pro Vertiefung in eine 96-Lochplatte ausgesät. Am Tag des Assays sollten die Zellen 100 % konfluent sein. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 100  $\mu$ l DPBS gewaschen. 100  $\mu$ l der entsprechend verdünnten Zell- oder Leberlysate wurde auf die Zellen gegeben und für 5 Stunden bei 37 °C im Inkubator kultiviert. Zur Bestimmung der TGF- $\beta$  Konzentration wurde eine Standardkurve mit 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125, 0,015612 und 0 ng/ml TGF- $\beta$  (#100-21C, rekombinantes humanes TGF- $\beta$ , PeproTech) in Mlec-Medium mit aufgetragen. Nach der Inkubation wurden 50  $\mu$ l aus jeder Vertiefung entfernt und 80  $\mu$ l Luciferase-Substrat (#E6120, ONE Glo™, Promega) hinzugegeben. Für eine vollständige Lyse der Zellen wurde die Zellkulturplatte in Aluminiumfolie eingewickelt und für 15 Minuten bei -80°C eingefroren. Zum Auftauen wurde die Aluminiumfolie abgenommen und die Platte bei 37 °C im Inkubator gestellt. Für die Messung wurden 100  $\mu$ l pro Vertiefung in eine weiße blickdichte Lumitrac TM 96-Loch-Platte (#655075, Grainer Bio-One) überführt. Die Messung erfolgte mit einem Luminometer (Wallace Victor2 1420 Multi label counter, Perkin Elmer) über einen Zeitraum von 2 Sekunden, wobei die Emission der freien Photonen pro Sekunde gemessen wurde. Anhand einer Standardkurve wurde das Gehalt von TGF- $\beta$  in den Proben ermittelt.

### 2.5.8 Ermittlung der Kollagenmenge

Ein wichtiges Merkmal einer Fibrose ist die Einlagerung von extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen. Die Bestimmung der Kollagenmenge kann daher ein Hinweis auf den Grad der Fibrose geben. Kollagen besitzt statt der üblichen Aminosäure Prolin eine hydrolysierte Variante, das Hydroxyprolin. Da Hydroxyprolin

etwa 10 % aller Aminosäuren im Kollagen ausmacht kann anhand der Menge des Hydroxyprolins, welches mittels biochemischer Methoden nachgewiesen werden kann, eine Aussage über die Menge an Kollagen im analysierten Gewebe getroffen werden ((Stegemann, 1958), (Berg, 1982)).

Für die Bestimmung des Hydroxyprolins wurde zuerst das Gewicht des Gewebestücks mit einer Feinwaage bestimmt. Anschließend wurde das Gewebe in ein Teflonreaktionsgefäß mit 2 ml 8 N Salzsäure gegeben und zur Hydrolyse über Nacht bei 116 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> hinzugegeben. Die Teflonreaktionsgefäß wurden gewaschen und getrocknet. Zur Bestimmung der Menge von Hydroxyprolin wurde eine Standardkurve mit 30, 20, 15, 10, 8, 6, 2 und 0 µg L-Hydroxyprolin in 4 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> angefertigt und in die sauberen Teflonreaktionsgefäß gegeben. 800 µl des Gewebehydrolysats wurden mit 3,2 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> in einem Teflonreaktionsgefäß gemischt. Zu allen Proben (Standardreihe und Gewebeproben) wurde ein Tropfen Phenolphthalein zugegeben. Anschließend wurde der pH-Wert mit 10 M (für die Gewebeproben) oder 1 M (für die Standardreihe) Kaliumhydroxid auf etwa 8,7 eingestellt, welches durch einen Farbumschlag der Lösung von durchsichtig zu rosa erkennbar ist. Danach wurden den Proben 2-3 g Kaliumchlorid (KCl), 1 ml KCl-Borat-Puffer und 0,5 ml 10%iger β-Alaninlösung zugegeben und gemischt. Während einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben wiederholt gemischt, wobei die Proben immer mit KCl gesättigt waren und bei Bedarf KCl nachgefüllt wurde. Im Anschluss wurde 1 ml einer 0,2 M Chloramin-T-Lösung zugegeben und gemischt. Bei der anschließenden 25-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur oxidiert das Hydroxyprolin zu Pyrrol-2-Karboxylsäure. Durch die Zugabe von 3 ml 3 M Natriumthiosulfat und anschließendem Mischen wurde die Reaktion abgestoppt. In jedes Teflonreaktionsgefäß wurden 5 ml Toluol gegeben und dann für 4 Minuten horizontal stark geschüttelt (Stufe 10, Laboshake, Gerhardt). Im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße für 4 Minuten bei 470 g zentrifugiert, wobei die Trennung der Phasen erfolgte. Die obere Toluolphase wurde verworfen und die Proben in einem Wasserbad nach aufsteigen von Luftblasen am Reaktionsgefäß für 30 Minuten gekocht. Hierbei wurde die Pyrrol-2-Karboxylsäure in Pyrrol umgewandelt. Nach dem Abkühlen der Proben wurde das Pyrrol durch die Zugabe von 5 ml Toluol und 4-minütigem horizontalen Schütteln gefällt. Durch erneutes Zentrifugieren bei 470 g für 4 Minuten wurden die Phasen getrennt. 2,5 ml der oberen Toluolphase wurden mit 1ml Ehrlichs

Reagenz vermischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der OD-Wert bei 560 nm mit einem Photometer gemessen. Für die Messung wurde eine Glasküvette verwendet, bei der mögliche Rückstände mit Azeton entfernt wurden. Anhand der Standardkurve wurde die Menge an Hydroxyprolin bestimmt. Der Wert wurde zum eingesetzten Gewebegewicht korrigiert und zum Erhalt der Kollagenmenge mit 10 multipliziert.

## 2.6 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen der Experimente wurden mit den Programmen GraphPad Prism (V5, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) und Microsoft Excel 2010 durchgeführt. Mittels eines zweiseitigen t-Tests für unabhängige Stichproben wurden statistische Unterschiede zwischen zwei Gruppen evaluiert. Bei mehr als zwei Gruppen wurde zunächst ein ANOVA-Test (*engl.: analysis of variance*) gefolgt von einem zweiseitigen t-Test für die Analyse zweier Gruppen verwendet. Bei großer Variabilität zwischen den Experimenten, wurde jedes Experiment in einem Mittelwert zusammengefasst und in einem verpaarten t-Test analysiert. Signifikante Unterschiede im p-Wert werden mit Sternen und ein Trend mit einer Raute markiert (\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,1$ ). Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler (SEM; *engl.: standard error of the mean*) des Mittelwertes in den Graphen an.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Rolle des Integrin- $\beta$ 1 in der Leberfibrose

In Vorarbeit und zur Erlernung der Methoden wurden einige Experimente, welche in dem Labor bereits verifiziert waren, zu dem Integrin- $\beta$ 1-Thema wiederholt und erweitert. Daraus folgend wurden weitere Experimente ergänzt, um das Thema noch weiter zu vertiefen.

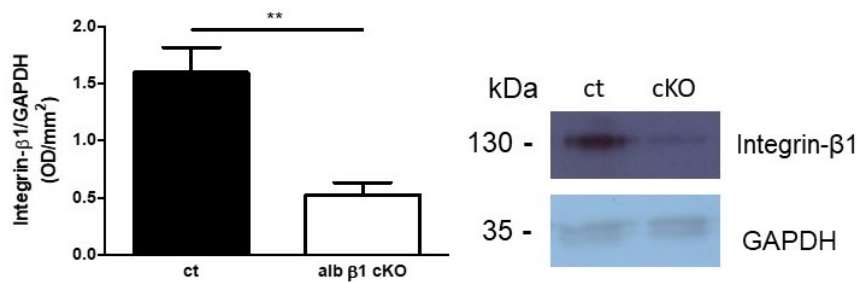
Integrine sind für die Zellen essentiell, da sie unter anderem bei der Proliferation, Migration, Differenzierung, Adhäsion, Entwicklung und beim Überleben der Zellen eine wichtige Rolle spielen (1.3). Das Integrin- $\beta$ 1 ist eine Hauptintegrinuntereinheit, welche mit verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten mehrere Interaktionen mit der extrazellulären Matrix eingehen kann. Mit den  $\alpha$ -Untereinheiten  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 10 oder  $\alpha$ 11 bindet es an

Kollagen, mit  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$  oder  $\alpha 8$  an die RGD-Sequenz von Fibronectin und mit  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  oder  $\alpha 7$  an Laminin. In der Fibrose werden die Matrixproteine Kollagen und Fibronectin übermäßig exprimiert. Mit Hilfe eines Integrin- $\beta 1$  Knockouts in Hepatozyten sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Veränderung der Zell-Matrix-Interaktion einen Einfluss auf das Verhalten der Hepatozyten hat. Dafür wurden konditionelle Integrin- $\beta 1$ -Knockout-Mäuse (Integrin- $\beta 1$ -KO-Mäuse) (alb  $\beta 1$  cKO) und Kontrollmäuse (ct) gezüchtet (2.2.3).

### 3.1.1 Expression des Integrin- $\beta 1$ in Lebern und Hepatozyten von konditionellen Integrin- $\beta 1$ -Knockout-Mäusen

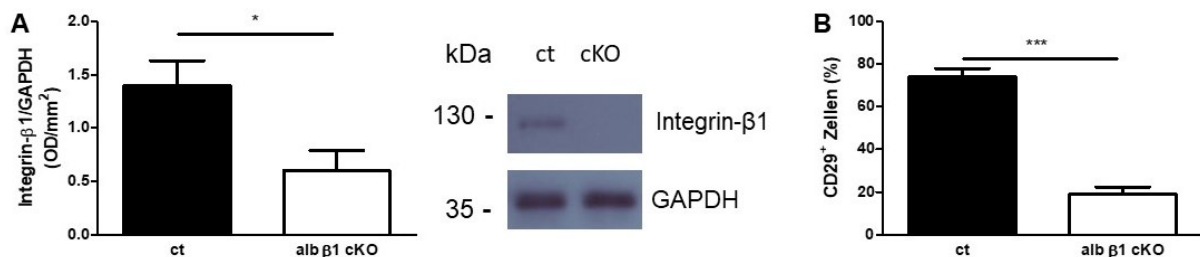
Zur Kontrolle, ob das Integrin- $\beta 1$  in den Hepatozyten ausgeschaltet war, wurden sowohl Lebern als auch Hepatozyten aus konditionellen Integrin- $\beta 1$ -KO-Mäusen und Kontrollmäusen untersucht. Dafür wurden die Lebern aus den Mäusen entfernt (2.2.7), sowie die Hepatozyten aus den Lebern der Mäuse isoliert (2.3.7). Sowohl aus den Lebern als auch aus den Hepatozyten wurden die Proteine extrahiert (2.5.1; 2.5.2), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und das Integrin- $\beta 1$  in einer Western Blot-Analyse (2.5.5.1) mittels spezifischer Antikörper detektiert (2.1.6.1). Die Ausschaltung des Integrin- $\beta 1$  in den isolierten Hepatozyten wurde zusätzlich mittels Durchflusszytometrie analysiert (2.3.12).

In Western Blot-Analysen konnte auf Proteinebene gezeigt werden, dass das Integrin- $\beta 1$  im Verhältnis zu GAPDH in den Lebern von Integrin- $\beta 1$ -KO-Mäusen im Vergleich zu den Lebern von Kontroll-Mäusen verringert war (Abbildung 8). Eine Verringerung des Integrin- $\beta 1$  im Verhältnis zu GAPDH konnte ebenfalls durch Western Blot-Analysen in den Integrin- $\beta 1$ -cKO-Hepatozyten im Vergleich zu Kontroll-Hepatozyten nachgewiesen werden (Abbildung 9 A). Auch die durchflusszytometrische Analyse zeigte eine signifikante Verminderung von Integrin- $\beta 1$  auf der Zelloberfläche von Integrin- $\beta 1$ -KO-Hepatozyten im Vergleich zu Kontroll-Hepatozyten (Abbildung 9 B).



**Abbildung 8: Western Blot-Analyse der Ausschaltung des Integrin-β1 in Lebern von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen**

Ein kleines Stück der isolierten Lebern aus Kontroll- (ct) und Integrin-β1-KO-Mäusen (alb β1 cKO) wurde in Proteinlysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für Integrin-β1 (Verdünnung 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (ct:  $1.600 \pm 0.2188$ ; alb β1 cKO:  $0.5274 \pm 0.1073$ ) (n=4). (\*\*p<0,01)



**Abbildung 9: Ausschaltung des Integrins-β1 in Hepatozyten aus Kontroll- und Integrinβ1-KO-Mäusen**

**A:** Die isolierten Kontroll- und Integrin-β1-KO-Hepatozyten wurden in Proteinlysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für Integrin-β1 (Verdünnung 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (ct:  $1.400 \pm 0.2337$ ; alb β1 cKO:  $0.5987 \pm 0.1898$ ) (n=12/10). (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001)

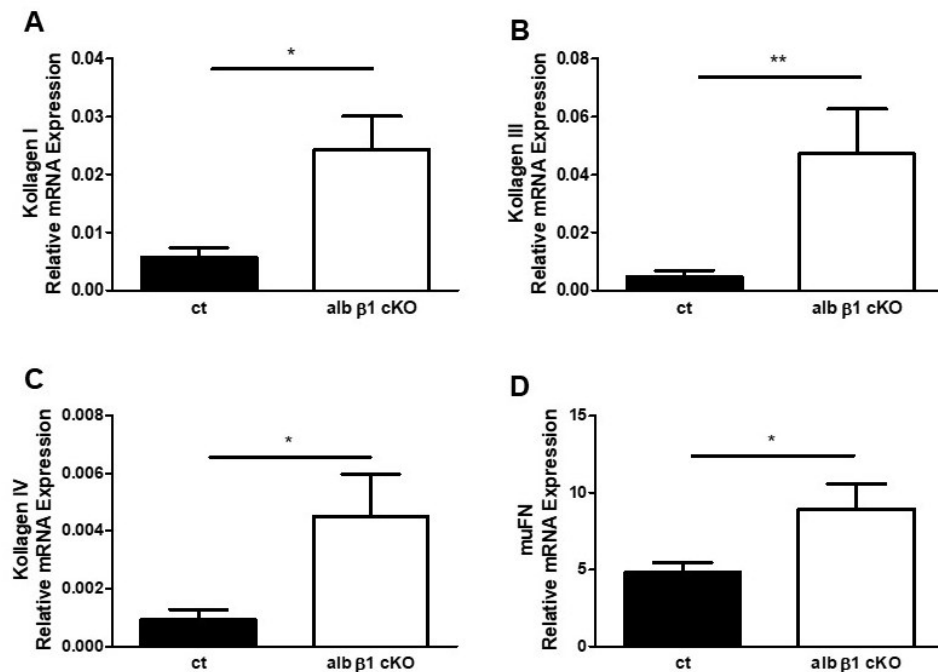
**B:** Die isolierten Kontroll- (ct) und Integrin-β1-KO-Hepatozyten (alb β1 cKO) wurden abzentrifugiert, gefärbt und mittels Durchflusszytometrie mit spezifischen Antikörpern für Integrin-β1 (CD29) (Verdünnung 1:100) analysiert (ct:  $73.98 \pm 3.937$ ; alb β1 cKO:  $19.00 \pm 3.290$ ) (n=6).

Somit konnten die Integrin-β1-KO-Mäuse für die Frage, ob eine Veränderung in der Zell-Matrix-Interaktion einen Einfluss auf die Zellen hat, verwendet werden.

### 3.1.2 Veränderte extrazelluläre Matrix durch Integrin-β1-Knockout

Das Integrin-β1 bindet mit verschiedenen α-Untereinheiten an diverse Matrixproteine. Der Knockout von verschiedenen Integrinen führt zu diversen Reaktionen in unterschiedlichen Organen (1.4.4) (Bouvard Daniel et al., 2001). Daher sollte hier die Rolle des Integrin-β1 auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in der Leber mittels qRT-PCR analysiert werden. Dafür wurde ein kleines Stück der isolierten Leber von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen in RNazol lysiert, RNA isoliert (2.4.2), in cDNA umgeschrieben (2.4.3) und die Expression verschiedener Matrixproteine mit

spezifischen Primern (Oligonukleotiden) gemessen (2.4.6; 2.1.7.2). Die Ausschaltung des Integrins- $\beta$ 1 in den Hepatozyten führte zu einer Erhöhung der Expression der Matrixproteine Kollagen I, Kollagen III, Kollagen IV und Fibronektin in den Lebern der Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen im Vergleich zu den Lebern der Kontroll-Mäuse (Abbildung 10).

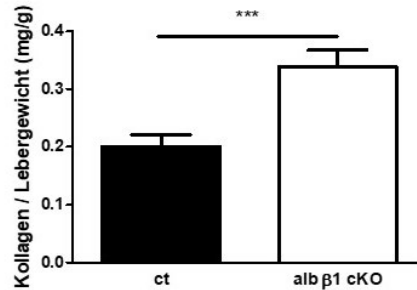


**Abbildung 10: Relative mRNA-Expression von Matrixproteinen in Lebern von Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen**

Die RNA wurde aus einem kleinen Stück Leber aus Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen isoliert und in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR-Analysen wurde mit spezifischen Oligonukleotiden die Expression von verschiedenen Matrixproteinen analysiert. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen von Kollagen I (A) (ct:  $0.005675 \pm 0.001678$ ; alb  $\beta$ 1 cKO:  $0.02424 \pm 0.005825$ ) (n=4), Kollagen III (B) (ct:  $0.00471 \pm 0.002174$ ; alb  $\beta$ 1 cKO:  $0.04709 \pm 0.01552$ ) (n=10), Kollagen IV (C) (ct:  $0.00092 \pm 0.0003626$ ; alb  $\beta$ 1 cKO:  $0.00451 \pm 0.001465$ ) (n=10) und Fibronektin (muFN) (D) (ct:  $4.803 \pm 0.6442$ ; alb  $\beta$ 1 cKO:  $8.927 \pm 1.645$ ) (n=8/9) im Verhältnis zu HPRT. (\*p<0,05; (\*\*p<0,01)

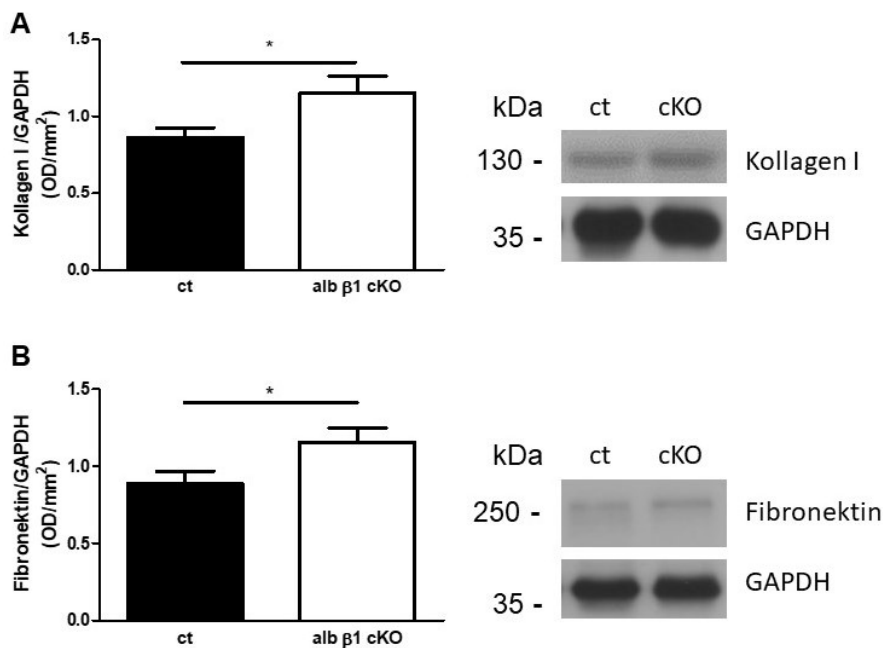
Um zu überprüfen, ob auch die Proteinmenge betroffen ist, wurde eine biochemische Analyse sowie Western Blot-Analysen von den Lebern der Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen durchgeführt. Die biochemische Analyse wurde wie unter 2.5.8 beschrieben durchgeführt. Für die Western Blot-Analysen wurden die Proteine aus einem kleinen Stück Leber extrahiert (2.5.2), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (2.5.5.1). Das Fibronektin und Kollagen wurden mittels spezifischer Antikörper detektiert (2.1.6.1). Die biochemische Analyse sowie die Western Blot-Analysen gehen mit den qRT-PCR-Analysen einher und zeigten auf Proteinebene einen Anstieg von Kollagen (Abbildung 11) sowie für die Matrixproteine Kollagen I (Abbildung 12 A) und Fibronektin (Abbildung

12 B) in den Lebern der Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen im Vergleich zu den Lebern der Kontroll-Mäuse.



**Abbildung 11: Biochemische Analyse des Kollagengehalts in Lebern von Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen**

Die Kollagenmenge der Lebern der Kontroll- (ct) und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen (alb  $\beta$ 1 cKO) wurde in einer biochemischen Analyse und im Verhältnis zum Lebergewicht bestimmt (ct:  $0.2008 \pm 0.01987$ ; alb  $\beta$ 1 cKO:  $0.3391 \pm 0.02886$ ) (n=18/21). (\*\*\*)p<0,001)



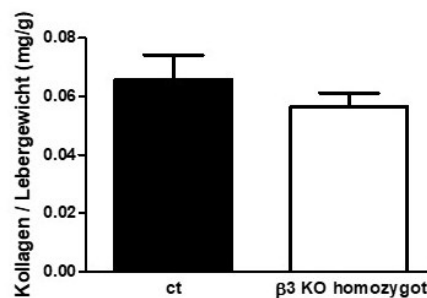
**Abbildung 12: Western Blot-Analyse von Kollagen I und Fibronectin in Lebern von Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen**

Ein kleines Stück der isolierten Lebern aus Kontroll- (ct) und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen (alb  $\beta$ 1 cKO) wurde in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für Kollagen I (Verdünnung 1:4000) (A) (ct:  $0.8627 \pm 0.06305$ ; alb  $\beta$ 1 cKO:  $1.153 \pm 0.1087$ ) (n=8/10), Fibronectin (Verdünnung 1:5000) (B) (ct:  $0.8853 \pm 0.08110$ ; alb  $\beta$ 1 cKO:  $1.157 \pm 0.09034$ ) (n=13/15) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt sind jeweils ein repräsentativer Western Blot. (\*p<0,05)

Die Überprüfung ergibt, dass der Knockout des Integrin- $\beta$ 1 einen Einfluss auf die Produktion von Matrixproteinen hat.

### 3.1.3 Biochemische Analyse des Kollagengehalts in Integrin- $\beta$ 3-Knockout-Mäusen

Der Integrin- $\beta$ 1-KO in Hepatozyten bewirkt eine vermehrte Produktion von Matrixproteinen. Es stellt sich die Frage, ob auch andere Integrine, wie das Integrin- $\beta$ 3, die Synthese der Matrixproteine regulieren kann. Deswegen wurden die Lebern von Integrin- $\beta$ 3-KO-Mäusen in einer biochemischen Analyse überprüft (2.5.8). In Abbildung 13 ist die biochemische Analyse der Lebern der Kontroll- und Integrin- $\beta$ 3-KO-Mäusen zu sehen. Die Ausschaltung von Integrin- $\beta$ 3 führte, im Gegensatz zu Integrin- $\beta$ 1, zu keiner vermehrten Produktion von Kollagen.



**Abbildung 13: Biochemische Analyse des Kollagengehalts in Lebern von Kontroll- und Integrin- $\beta$ 3-KO-Mäusen**

Die Kollagenmenge der Lebern der Kontroll- (ct) und Integrin- $\beta$ 3-KO-Mäusen ( $\beta$ 3 KO homozygot) wurde in einer biochemischen Analyse und im Verhältnis zum Lebergewicht bestimmt (ct:  $0.06568 \pm 0.008470$ ;  $\beta$ 3 KO homozygot:  $0.05634 \pm 0.004751$ ) (n=7/6).

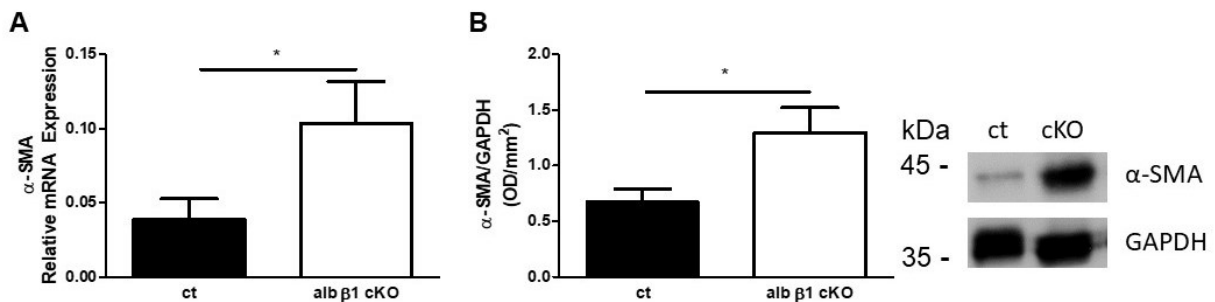
Dies deutet darauf hin, dass das Integrin- $\beta$ 1, jedoch nicht das Integrin- $\beta$ 3, bei der Regulierung der Matrixproduktion in der Leber eine wichtige Rolle spielen könnte.

### 3.1.4 Aktivierung der Myofibroblasten durch den Integrin- $\beta$ 1-Knockout

Die erhöhte Produktion der Matrixproteine kann auf eine verstärkte Aktivierung von Myofibroblasten hindeuten. Myofibroblasten können aus verschiedenen Zelltypen hervorgehen, wobei in der Leber speziell die HSCs lange als Hauptquelle der Myofibroblasten genannt wurden (1.1.2). Zur Untersuchung, ob die vermehrte Matrixakkumulation auf eine verstärkte Differenzierung der Myofibroblasten zurückzuführen ist, wurde der Myofibroblastenmarker  $\alpha$ -SMA in der Leber analysiert. Dies erfolgte zum einen auf mRNA-Ebene und zum anderen auf Proteinebene. Für die qRT-PCR-Analysen wurde ein kleines Stück der Lebern der Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen in RNazol lysiert, RNA isoliert (2.4.2), in cDNA mit Oligonukleotiden umgeschrieben (2.4.3) und die Expression von  $\alpha$ -SMA mit spezifischen Primern



gemessen (2.4.6; 2.1.7.2). Für die Analysen auf Proteinebene wurden die Proteine aus einem kleinen Stück Leber der Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen extrahiert (2.5.2), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und  $\alpha$ -SMA in einer Western Blot-Analyse (2.5.5.1) mittels spezifischem Antikörper detektiert (2.1.6.1). Die Analysen zeigten eine Erhöhung des Myofibroblastenmarkers  $\alpha$ -SMA sowohl bei der mRNA-Expression (Abbildung 14 A) als auch auf Proteinebene (Abbildung 14 B) in den Lebern der Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen.

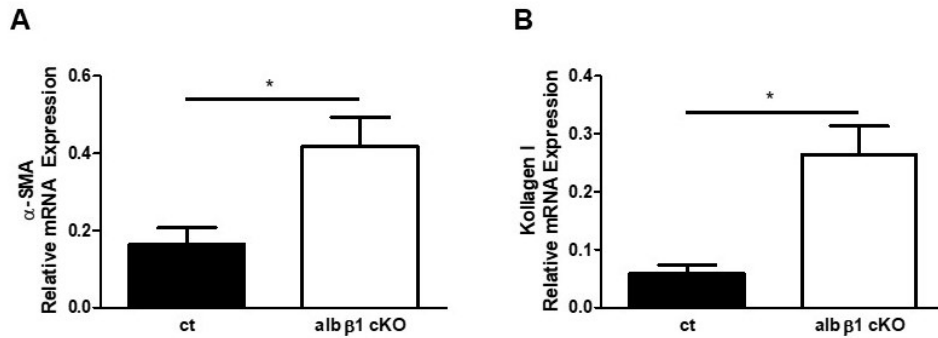


**Abbildung 14: qRT-PCR- und Western Blot-Analysen von  $\alpha$ -SMA in den Lebern der Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen**

(A) Die RNA wurde aus einem kleinen Stück Leber aus Kontroll- (ct) und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen (alb  $\beta$ 1 cKO) isoliert und in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR-Analysen wurde mit spezifischen Oligonukleotiden die Expression von  $\alpha$ -SMA analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionen von  $\alpha$ -SMA im Verhältnis zu HPRT (ct:  $0.03870 \pm 0.01413$ ; alb  $\beta$ 1 cKO:  $0.1035 \pm 0.02838$ ) (n=20/19). (\*p<0,05)

(B) Ein kleines Stück der isolierten Lebern aus Kontroll- (ct) und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen (alb  $\beta$ 1 cKO) wurde in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für  $\alpha$ -SMA (Verdünnung 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (ct:  $0.6732 \pm 0.1148$ ; alb  $\beta$ 1 cKO:  $1.296 \pm 0.2269$ ) (n=14). (\*p<0,05)

Zur Bestätigung, dass die Veränderung der Expression von  $\alpha$ -SMA in den Lebern von den HSCs herrührt, wurden diese aus Lebern von Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen isoliert (2.3.7) und in RNazol lysiert. Die RNA wurde isoliert (2.4.2), in cDNA mit Oligonukleotiden umgeschrieben (2.4.3) und die Expression des Myofibroblastenmarkers  $\alpha$ -SMA sowie von Kollagen I mit spezifischen Primern gemessen (2.4.6; 2.1.7.2). Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Erhöhung des Myofibroblastenmarkers  $\alpha$ -SMA in den isolierten HSCs aus den Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen im Vergleich zu den HSC aus den Kontroll-Mäusen (Abbildung 15 A). Die Erhöhung der Kollagen I-Expression (Abbildung 15 B) sprach ebenfalls für eine vermehrte Aktivierung der HSC in den Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen.



**Abbildung 15: Relative mRNA-Expression von α-SMA und Kollagen I in HSCs von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen**

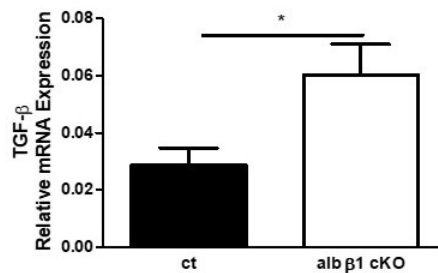
Die RNA wurde aus den HSCs der Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen isoliert und in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR-Analysen wurden mit spezifischen Oligonukleotiden die Expressionen von α-SMA und Kollagen I analysiert. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen von α-SMA (A) (ct:  $0.1630 \pm 0.04367$ ; alb β1 cKO:  $0.4166 \pm 0.07638$ ) (n=10/12) und Kollagen I (B) (ct:  $0.05818 \pm 0.01521$ ; alb β1 cKO:  $0.2641 \pm 0.04921$ ) (n=4/8) im Verhältnis zu HPRT. (\* p<0,05)

Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die erhöhte Matrixproduktion in den Lebern der Integrin-β1-KO-Mäuse auf eine verstärkte Differenzierung der HSCs zu Myofibroblasten zurückzuführen ist.

### 3.1.5 Der Einfluss des Integrin-β1-Knockouts auf das Zytokin TGF-β

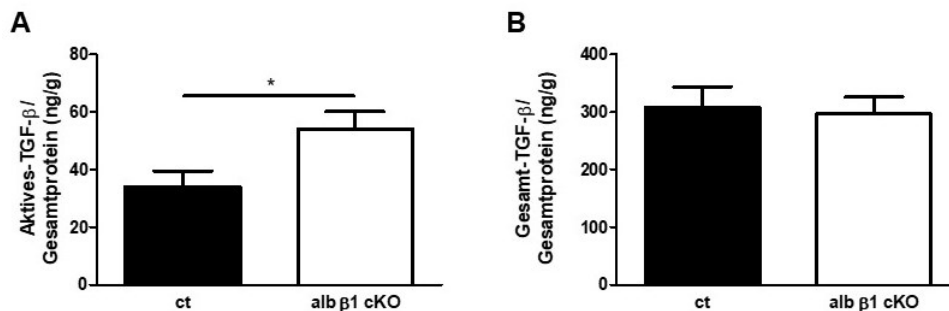
Die Ausschaltung des Integrins-β1 führt zu einem Anstieg der Myofibroblasten und zu einer zunehmenden Produktion von Kollagen und Fibronectin. Diese Prozesse können in der Leber unter anderem von dem profibrotischen Zytokin TGF-β reguliert werden. Einige Integrine sind an der Aktivierung von TGF-β beteiligt (wie das Integrin-αβ3, -αβ5, -αβ6, -αβ8 und -αβ1) oder aber interagieren mit dem TGF-β Signalweg, wodurch sie die Differenzierung der Myofibroblasten modulieren können (1.2.1; 1.4). Daher sollte hier analysiert werden, ob der Integrin-β1-Knockout einen Einfluss auf TGF-β hat. Dafür wurden Experimente durchgeführt, welche die Menge sowie die Signaltransduktion von TGF-β untersuchten.

Zunächst wurde kontrolliert, ob die Ausschaltung des Integrins-β1 in den Hepatozyten einen Einfluss auf die Expression von TGF-β in der Leber hat. Dafür wurde ein kleines Stück der Lebern der Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäuse in RNAzol lysiert, die RNA isoliert (2.4.2), in cDNA mit Oligonukleotiden umgeschrieben (2.4.3) und die Expression von TGF-β mit spezifischen Primern gemessen (2.4.6; 2.1.7.2). Die Ausschaltung des Integrins-β1 in den Hepatozyten führte zu einer Erhöhung der relativen mRNA-Expression von TGF-β in den Lebern der Integrin-β1-KO-Mäuse im Vergleich zu den Lebern der Kontroll-Mäuse (Abbildung 16).



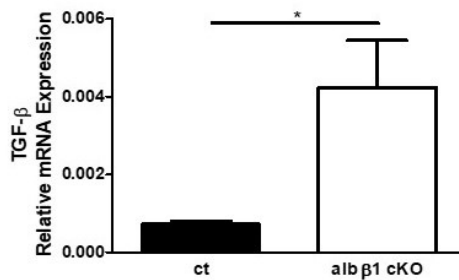
**Abbildung 16: Relative mRNA-Expression von TGF-β in Lebern von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen**  
 Die RNA wurde aus einem kleinen Stück Leber aus Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen isoliert und in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR-Analysen wurden mit spezifischen Oligonukleotiden die Expression von TGF-β analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von TGF-β im Verhältnis zu HPRT (ct: 0.02869 ± 0.005874; alb β1 cKO: 0.06033 ± 0.01061) (n=22/25). (\*p<0,05)

Weiterhin wurde die Menge des TGF-β in einem Luciferase-Assay analysiert (2.5.7). Dafür wurden die Lebern der Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäuse wie unter 2.5.3 beschrieben vorbereitet. In den Lebern der Integrin-β1-KO-Mäuse war das aktive TGF-β erhöht im Vergleich zu den Lebern der Kontroll-Mäuse (Abbildung 17 A), wohingegen die gesamte TGF-β-Proteinmenge unverändert blieb (Abbildung 17 B).



**Abbildung 17: Analyse des aktiven und gesamten TGF-β-Gehaltes in Lebern von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen**  
 Mittels eines Luciferase-Assays wurde das biologisch aktive TGF-β (A) (ct: 34.04 ± 5.383; alb β1 cKO: 54.02 ± 6.055) (n=20/19) sowie die gesamte TGF-β-Proteinmenge (B) (ct: 307.2 ± 36.19; alb β1 cKO: 296.6 ± 29.66) (n=20/21) im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge in den Lebern von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen gemessen. (\*p<0,05)

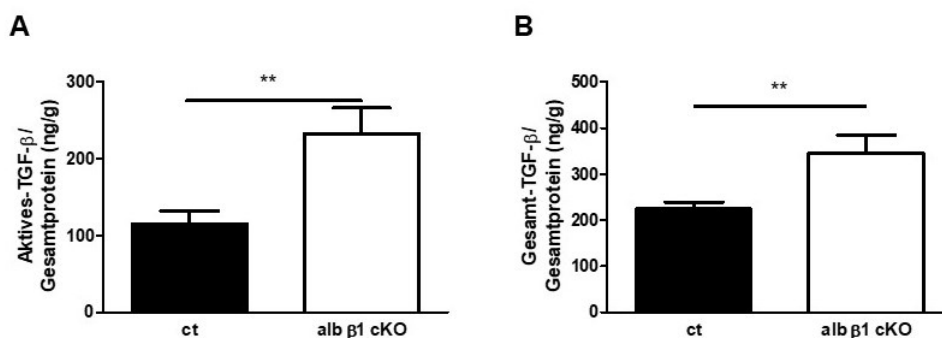
Zur Klärung, welche Zellen für die Erhöhung des aktiven TGF-β verantwortlich sind, wurden zunächst die Hepatozyten untersucht, da diese den größten Teil der in der Leber vorkommenden Zellen bilden. Dafür wurden Hepatozyten aus Lebern von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen isoliert (2.3.7) und in RNazol lysiert. Die RNA wurde isoliert (2.4.2), in cDNA mit Oligonukelotiden umgeschrieben (2.4.3) und die Expression von TGF-β mit spezifischen Primern gemessen (2.4.6; 2.1.7.2). Die Ausschaltung des Integrin-β1 in den Hepatozyten führte zu einer Erhöhung der relativen mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontroll-Hepatozyten (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Relative mRNA-Expression von TGF-β in Hepatozyten von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen**

Die RNA wurde aus Hepatozyten aus Kontroll- (ct) und Integrin-β1-KO-Mäusen (alb β1 cKO) isoliert und in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR-Analysen wurde mit spezifischen Oligonukleotiden die Expression von TGF-β analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionen von TGF-β im Verhältnis zu HPRT (ct: 0.0007167 ± 0.00009098; alb β1 cKO: 0.004233 ± 0.001212) (n=6). (\*p<0,05)

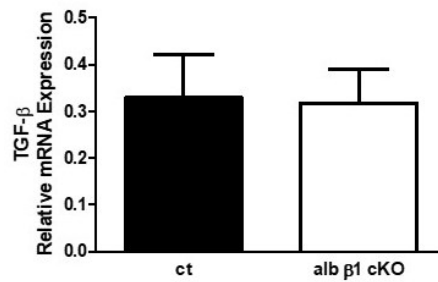
Neben der Expression wurde auch die Proteinmenge sowie das aktive TGF-β in einem Luciferase-Assay analysiert (2.5.7). Dafür wurden die Hepatozyten wie unter 2.5.3 beschrieben vorbereitet. Das aktive TGF-β sowie die gesamte TGF-β-Proteinmenge waren in den Integrin-β1-KO-Hepatozyten im Vergleich zu den Kontroll-Hepatozyten erhöht (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Analyse des aktiven und gesamten TGF-β-Gehaltes in Hepatozyten von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen**

Mittels eines Luciferase-Assays wurde das biologisch aktive TGF-β (A) (ct: 115.4 ± 16.63; alb β1 cKO: 232.5 ± 33.60) (n=45/35) sowie die gesamte TGF-β-Proteinmenge (B) (ct: 223.9 ± 15.33; alb β1 cKO: 344.7 ± 40.07) (16/15) im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge in den Hepatozyten von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen gemessen. (\*\*p<0,01)

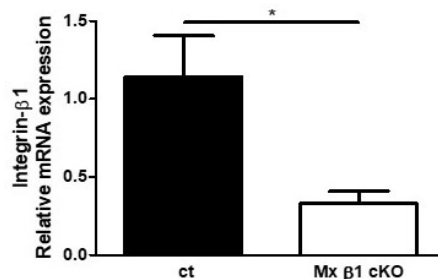
Zur Bestätigung, dass die Hepatozyten für die erhöhte Menge von aktivem TGF-β verantwortlich sind und nicht doch auch andere Zellen, wurden HSCs aus den Lebern von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen isoliert (2.3.7) und in RNazol lysiert. Die RNA wurde isoliert (2.4.2), in cDNA mit Oligonukleotiden umgeschrieben (2.4.3) und die Expression von TGF-β mit spezifischen Primern gemessen (2.4.6; 2.1.7.2). Die qRT-PCR-Analysen zeigten keinen Unterschied in der Expression von TGF-β in den HSCs von Kontroll-Mäusen im Vergleich zu den HSCs von Integrin-β1-KO-Mäusen (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Relative mRNA-Expression von TGF-β in HSCs von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen**

Die RNA wurde aus HSCs aus Kontroll- (ct) und Integrin-β1-KO-Mäusen (alb β1 cKO) isoliert und in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR-Analysen wurde mit spezifischen Oligonukleotiden die Expression von TGF-β analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionen von TGF-β im Verhältnis zu HPRT (ct:  $0.3288 \pm 0.09284$ ; alb β1 cKO:  $0.3167 \pm 0.07408$ ) (n=9/16).

Um herauszufinden, ob das Integrin-β1 die Expression von TGF-β beeinflusst, wurden Hepatozyten und HSCs aus Kontroll-Mäusen und aus Mäusen isoliert (2.3.7), in denen die Expression des Integrin-β1 mittels des Mx1-Promotors ausgeschaltet wurde (Mx β1 cKO). Die Gabe von plpC bewirkt die Aktivierung des Mx1-Promotors, so dass die Expression des Integrin-β1 in der gesamten Leber und in der Zirkulation reduziert wird (2.2.3). Zunächst wurde die Expression des Integrin-β1 in den Hepatozyten der Mx-β1-Knockout-Mäuse überprüft. Dafür wurden die isolierten Hepatozyten in RNAzol lysiert, die RNA isoliert (2.4.2), in cDNA mit Oligonukleotiden umgeschrieben (2.4.3) und die Expression von Integrin-β1 mit spezifischen Primern gemessen (2.4.6; 2.1.7.2). Die Ausschaltung des Integrin-β1 konnte mittels qRT-PCR-Analysen in Hepatozyten von Mx-Integrin-β1-KO-Mäusen bestätigt werden (Abbildung 21).

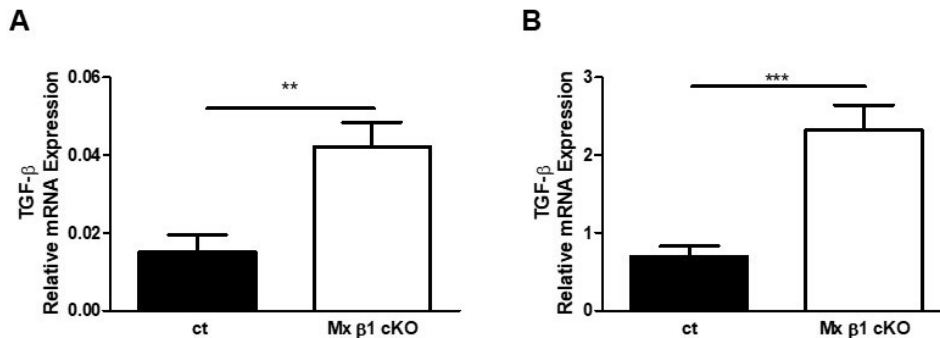


**Abbildung 21: Relative mRNA-Expression von Integrin-β1 in Hepatozyten von Kontroll- und Mx-Integrin-β1-KO-Mäusen**

Die RNA wurde aus den Hepatozyten von Kontroll- (ct) und Mx-Integrin-β1-KO-Mäusen (Mx β1 cKO) isoliert und in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR-Analysen wurde mit spezifischen Oligonukleotiden die Expression von Integrin-β1 analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionen von TGF-β im Verhältnis zu HPRT (ct:  $1.143 \pm 0.2649$ ; Mx β1 cKO:  $0.3281 \pm 0.07999$ ) (n=4/4). (\*p<0,05)

Im nächsten Schritt wurde die mRNA-Expression von TGF-β in den Hepatozyten sowie den HSCs von Mx-Integrin-β1-cKO- und Kontrollmäusen überprüft. Die Hepatozyten und die HSCs wurden in RNAzol lysiert, die RNA isoliert (2.4.2), in cDNA mit Oligonukleotiden umgeschrieben (2.4.3) und die Expression von Integrin-β1 mit

spezifischen Primern gemessen (2.4.6; 2.1.7.2). In Abbildung 22 wird deutlich, dass die Ausschaltung des Integrin- $\beta$ 1 durch den Mx1-Promotor sowohl in den Hepatozyten (A), als auch in den HSCs (B) eine Steigerung der Expression des profibrotischen Zytokins TGF- $\beta$  im Vergleich zu den Kontroll-Zellen bewirkte.



**Abbildung 22: Relative mRNA-Expression von TGF- $\beta$  in Hepatozyten und HSCs von Kontroll- und Mx-Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen**

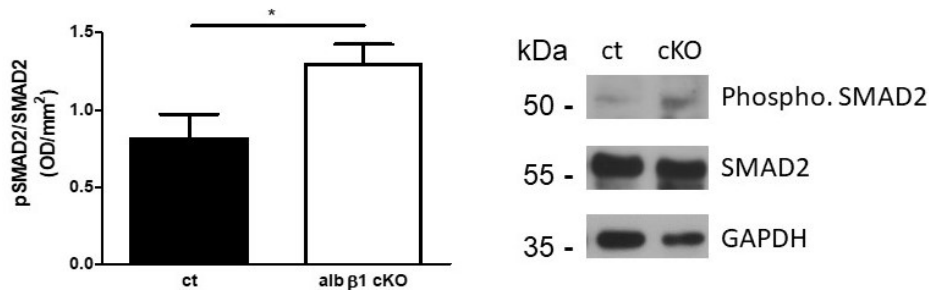
Die RNA wurde aus Hepatozyten (A) (ct: 0.0150 ± 0.004455; Mx  $\beta$ 1 cKO: 0.04210 ± 0.006363) (n=22/28) und HSCs (B) (ct: 0.6978 ± 0.1324; Mx  $\beta$ 1 cKO: 2.322 ± 0.3227) (n=12/11) aus Kontroll- (ct) und Mx-Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen (Mx  $\beta$ 1 cKO) isoliert und in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR-Analysen wurde mit spezifischen Oligonukleotiden die Expression von TGF- $\beta$  analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionen von TGF- $\beta$  im Verhältnis zu HPRT. (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

Diese Experimente deuten darauf hin, dass die Expression von TGF- $\beta$  in Zusammenhang mit dem Integrin- $\beta$ 1 stehen und die Ausschaltung von Integrin- $\beta$ 1 zu einer verstärkten Expression von TGF- $\beta$  führen könnte.

### 3.1.6 Der SMAD-Signalweg in den Lebern von Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen

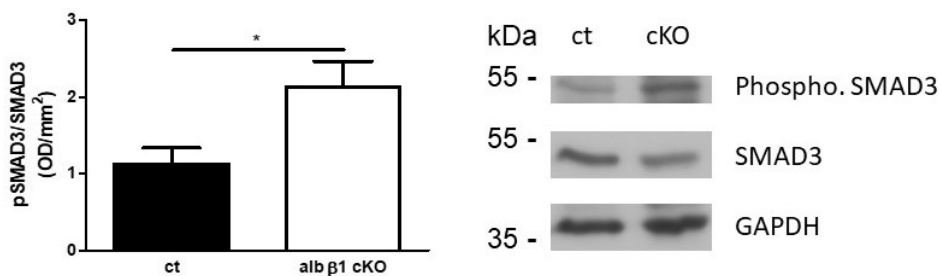
Das aktive TGF- $\beta$  bindet zunächst an den TGF- $\beta$ RII, welcher daraufhin den TGF- $\beta$ RI phosphoryliert. Die Bindung von SMAD2 oder SMAD3 an den TGF- $\beta$ RI führt zur Phosphorylierung der SMAD-Proteine, welche dann einen heteromeren Komplex mit SMAD4 bilden. Dieser Komplex kann dann in den Nukleus translozieren und dort als Transkriptionsfaktor fungieren (1.2.2). Um zu untersuchen, ob die erhöhte TGF- $\beta$ -Proteinkonzentration sowie die Erhöhung des aktiven TGF- $\beta$  auch zu einer Erhöhung des TGF- $\beta$ -Signalweges führt, wurde die Phosphorylierung der SMAD-Proteine in den Lebern der Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen analysiert. Dafür wurden die Proteine aus einem kleinen Stück Leber extrahiert (2.5.2), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und in einer Western Blot-Analyse (2.5.5.1) mittels spezifischer Antikörper die verschiedenen SMAD-Proteine detektiert (2.1.6.1). Die Western Blot-

Analysen zeigten, dass die phosphorylierte Proteinmenge für SMAD2, SMAD3 und SMAD4 im Vergleich zu nicht phosphoryliertem SMAD2 (Abbildung 23), SMAD3 (Abbildung 24) und SMAD4 (Abbildung 25) in den Lebern der Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen anstieg.



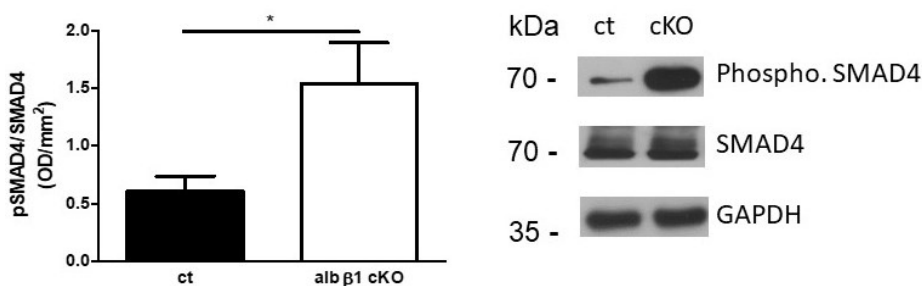
**Abbildung 23: Phosphorylierung von SMAD2 in den Lebern von Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen**

Ein kleines Stück der isolierten Lebern aus Kontroll- (ct) und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen (alb  $\beta$ 1 cKO) wurde in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für phosphoryliertes SMAD2 (Verdünnung 1:1000), SMAD2 (Verdünnung 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (ct: 0.8149  $\pm$  0.1564; alb  $\beta$ 1 cKO: 1.295  $\pm$  0.1307) (n=8/9). (\*p<0,05)



**Abbildung 24: Phosphorylierung von SMAD3 in den Lebern von Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen**

Ein kleines Stück der isolierten Lebern aus Kontroll- (ct) und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen (alb  $\beta$ 1 cKO) wurde in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für phosphoryliertes SMAD3 (Verdünnung 1:1000), SMAD3 (Verdünnung 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (ct: 1.126  $\pm$  0.2106; alb  $\beta$ 1 cKO: 2.132  $\pm$  0.3345) (n=10/12). (\*p<0,05)

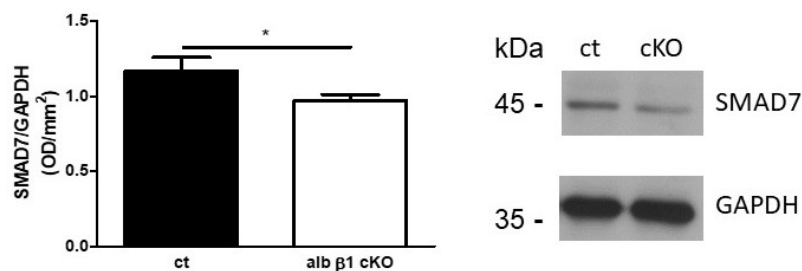


**Abbildung 25: Phosphorylierung von SMAD4 in den Lebern von Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen**

Ein kleines Stück der isolierten Lebern aus Kontroll- (ct) und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen (alb  $\beta$ 1 cKO) wurde in Protein-

Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für phosphoryliertes SMAD4 (Verdünnung 1:1000), SMAD4 (Verdünnung 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (ct:  $0.6073 \pm 0.1295$ ; alb  $\beta 1$  cKO:  $1.539 \pm 0.3574$ ) (n=4/4). (\*p<0,05)

Zusätzlich wurde die Proteinmenge von SMAD7 im Western Blot (2.5.5.1) analysiert. SMAD7 verhindert durch die Bindung an TGF- $\beta$ RI die Phosphorylierung von SMAD2 oder SMAD3 und sorgt so für eine verminderte Aktivität des SMAD-Signalwegs (1.2.2). Abbildung 26 zeigt eine signifikante Verminderung der Proteinmenge von SMAD7 in den Lebern von Integrin- $\beta 1$ -KO-Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen.



**Abbildung 26: Proteinmenge von SMAD7 in den Lebern von Kontroll- und Integrin- $\beta 1$ -KO-Mäusen**

Ein kleines Stück der isolierten Lebern aus Kontroll- (ct) und Integrin- $\beta 1$ -KO-Mäusen (alb  $\beta 1$  cKO) wurde in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für SMAD7 (Verdünnung 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (ct:  $1.211 \pm 0.1067$ ; alb  $\beta 1$  cKO:  $0.9290 \pm 0.05003$ ) (n=7/10). (\*p<0,05)

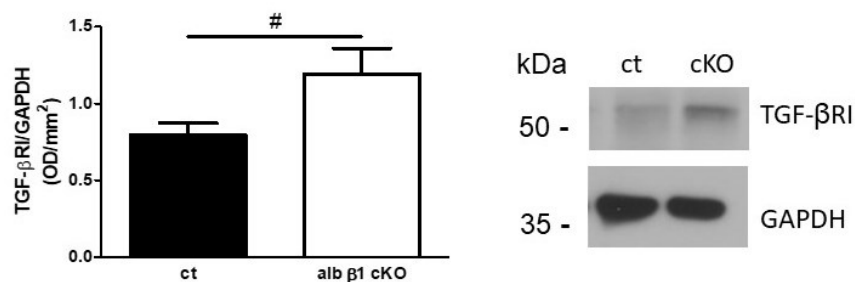
Zusammen zeigen die Western Blot-Analysen, dass der Integrin- $\beta 1$ -Knockout in den Hepatozyten zu einer erhöhten Aktivität des TGF- $\beta$ -SMAD-Signalwegs führt, welches durch eine Erhöhung des aktiven TGF- $\beta$ , einer erhöhten TGF- $\beta$ -Proteinmenge sowie einer Verminderung von SMAD7 herrühren könnte.

### 3.1.7 Die Endozytose in den Lebern von Kontroll- und Integrin- $\beta 1$ -KO-Mäusen

Die Regulation der TGF- $\beta$ -Signalwege erfolgt unter anderem durch die Internalisierung von TGF- $\beta$  und den TGF- $\beta$ -Rezeptoren I und II, wobei zwei Wege möglich sind. Zum einen erfolgt die Internalisierung durch eine clathrinabhängige Endozytose, wobei frühe Endosomen mit dem Marker EEA-1 gebildet werden, und zum anderen durch eine clathrinunabhängige Endozytose, wobei Caveolin-1-reiche Vesikel gebildet werden. Durch die clathrinabhängige Endozytose wird der SMAD-Signalweg aktiviert und die TGF- $\beta$ -Rezeptoren können zurück an die Membranoberfläche gelangen. Die Endozytose durch Caveolin-1 führt zur Degradation, wobei noch verschiedene MAP-Kinasen aktiviert werden können (1.2.3). Um zu klären, ob die erhöhte Aktivität des



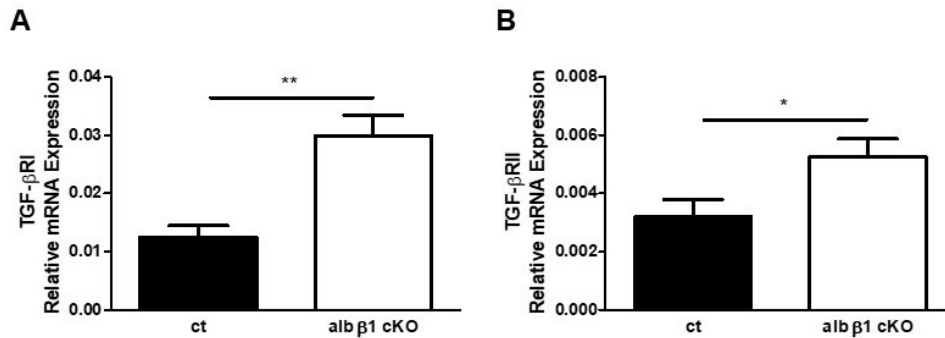
SMAD-Signalwegs durch eine verminderte Degradation der TGF- $\beta$ -Rezeptoren herrührt, wurde zunächst die Proteinmenge von TGF- $\beta$ R1 in den Lebern der Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäuse analysiert. Dafür wurden die Proteine aus einem kleinen Stück Leber extrahiert (2.5.2), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und in einer Western Blot-Analyse (2.5.5.1) mittels spezifischer Antikörper detektiert (2.1.6.1). Die Analyse zeigte eine tendenzielle Erhöhung der Proteinmenge des TGF- $\beta$ R1 in den Lebern der Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäuse im Vergleich zu den Lebern der Kontroll-Mäuse (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Western Blot-Analyse der Proteinmenge von TGF- $\beta$ R1 in den Lebern von Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen**

Ein kleines Stück der isolierten Lebern aus Kontroll- (ct) und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen (alb  $\beta$ 1 cKO) wurde in Proteinlysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für TGF- $\beta$ R1 (Verdünnung 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (ct:  $0.7950 \pm 0.07858$ ; alb  $\beta$ 1 cKO:  $1.192 \pm 0.1692$ ) (n=13/18). (#p<0,1)

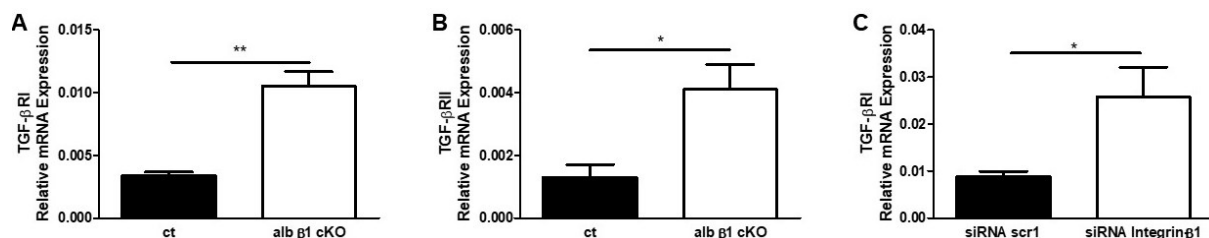
Zur Kontrolle, ob die erhöhte Menge des TGF- $\beta$ R1 auf eine veränderte Expression zurückzuführen ist, wurde diese in qRT-PCR-Experimenten untersucht. Dafür wurde ein kleines Stück der Lebern der Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäuse in RNAzol lysiert, die RNA isoliert (2.4.2), in cDNA mit Oligonukleotiden umgeschrieben (2.4.3) und die Expression der TGF- $\beta$ -Rezeptoren mit spezifischen Primern gemessen (2.4.6; 2.1.7.2). Die Abbildung 28 zeigt eine Steigerung der Expression für TGF- $\beta$ R1 (A) und TGF- $\beta$ R2 (B) in den Lebern der Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäuse im Vergleich zu den Lebern der Kontroll-Mäuse.



**Abbildung 28: Relative mRNA-Expression von TGF-βRI und TGF-βRII in den Lebern von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen**

Die RNA wurde aus einem kleinen Stück Leber aus Kontroll- (ct) und Integrin-β1-KO-Mäusen (alb β1 cKO) isoliert und in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR-Analysen wurden mit spezifischen Oligonukleotiden die Expressionen der TGF-β-Rezeptoren analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von TGF-βRI (A) (ct:  $0.01253 \pm 0.001926$ ; alb β1 cKO:  $0.0299 \pm 0.003505$ ) (n=4/4) und TGF-βRII (B) (ct:  $0.0032 \pm 0.0005971$ ; alb β1 cKO:  $0.00526 \pm 0.0006086$ ) (n=13/15) im Verhältnis zu HPRT. (\*p<0,05; \*\*p<0,01)

Neben den Lebern wurde auch die Expression der TGF-β-Rezeptoren in den Hepatozyten aus den Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen sowie mit Integrin-β1-siRNA transfizierten Zellen untersucht. Dafür wurden Hepatozyten aus Lebern von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen isoliert (2.3.7) und in RNAzol lysiert, wobei ein Teil der Kontroll-Hepatozyten in Kultur genommen wurde. Die Zellen in der Kultur wurden für 16 Stunden mit der Integrin-β1-siRNA oder einer Kontroll-siRNA transient transfiziert (2.3.11) und anschließend in RNAzol lysiert. Die RNA wurde aus allen Zellen isoliert (2.4.2), in cDNA mit Oligonukleotiden umgeschrieben (2.4.3) und die Expression der TGF-β-Rezeptoren mit spezifischen Primern gemessen (2.4.6; 2.1.7.2). Genau wie in den Lebern war auch die Expression der TGF-β-Rezeptoren in den Hepatozyten der Integrin-β1-KO-Mäusen im Vergleich zu den Hepatozyten der Kontroll-Mäuse erhöht (Abbildung 29 A und B). Auch in den mit Integrin-β1-siRNA transfizierten Zellen konnte eine erhöhte Expression des TGF-βRI im Vergleich zu den mit der Kontroll-siRNA transfizierten Hepatozyten festgestellt werden (Abbildung 29 C).



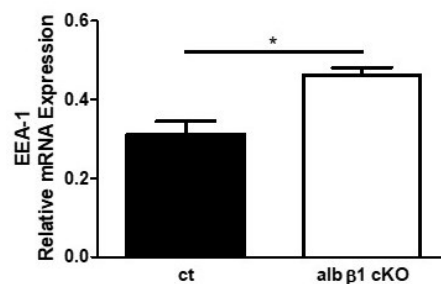
**Abbildung 29: Relative mRNA-Expression von TGF-βRI und TGF-βRII in den Hepatozyten von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen oder mit siRNA transfizierten Zellen**

**A und B:** Die RNA wurde aus Hepatozyten aus Kontroll- (ct) und Integrin-β1-KO-Mäusen (alb β1 cKO) isoliert und in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR-Analysen wurde mit spezifischen Oligonukleotiden die Expression der TGF-β-Rezeptoren analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionen von TGF-βRI (A) (ct:  $0.003375 \pm$

0.0003119; alb  $\beta$ 1 cKO:  $0.0105 \pm 0.001167$ ) (n=4/4) und TGF- $\beta$ RII (B) (ct:  $0.0013 \pm 0.0004021$ ; alb  $\beta$ 1 cKO:  $0.0041 \pm 0.0008042$ ) (n=4/4) im Verhältnis zu HPRT.

**C:** Die Hepatozyten wurden aus der Mausleber isoliert, kultiviert und mit Integrin- $\beta$ 1- oder Kontroll-siRNA transient transfiziert. Die RNA wurde aus den Hepatozyten isoliert und in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR-Analysen wurde mit spezifischen Oligonukleotiden die Expression von TGF- $\beta$ RI analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionen von TGF- $\beta$ RI im Verhältnis zu HPRT (siRNA scr1:  $0.0088 \pm 0.001141$ ; siRNA Integrin- $\beta$ 1:  $0.02575 \pm 0.006350$ ) (n=5/6) (\*\*p<0,01; \*p<0,05)

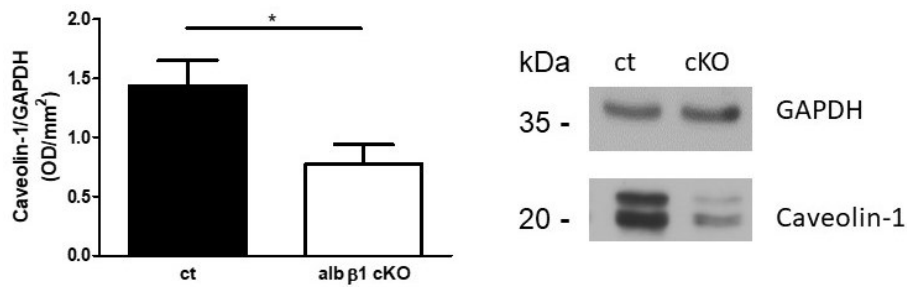
Neben der Expression der TGF- $\beta$ -Rezeptoren wurde auch deren Internalisierung angeschaut. Dafür wurde als erstes in den Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Hepatozyten die Expression des frühen Endosomen Markers EEA-1, welcher einen Hinweis auf eine clathrinvermittelte Internalisierung geben würde, untersucht. Die Hepatozyten wurden aus Lebern von Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen isoliert (2.3.7) und in RNazol lysiert. Die RNA wurde isoliert (2.4.2), in cDNA umgeschrieben (2.4.3) und die Expression von TGF- $\beta$  mit spezifischen Primern (Oligonukleotiden) gemessen (2.4.6; 2.1.7.2). Abbildung 30 zeigt eine Erhöhung der Expression des frühen Endosomen Markers EEA-1 in den Integrin- $\beta$ 1-KO-Hepatozyten im Vergleich zu den Kontroll-Hepatozyten.



**Abbildung 30: Relative mRNA-Expression von EEA-1 in den Hepatozyten von Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen**

Die RNA wurde aus Hepatozyten aus Kontroll- (ct) und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen (alb  $\beta$ 1 cKO) isoliert und in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR-Analysen wurde mit spezifischen Oligonukleotiden die Expression von EEA-1 analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionen von EEA-1 im Verhältnis zu HPRT (ct:  $0.3118 \pm 0.03225$ ; alb  $\beta$ 1 cKO:  $0.4620 \pm 0.01952$ ) (n=5/3). (\*p<0,05)

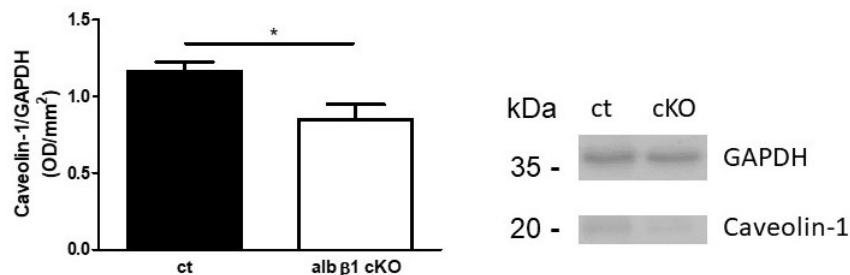
Als zweites wurde die Internalisierung durch Caveolin-1, was auf eine Degradation von Membranproteinen wie den TGF- $\beta$ -Rezeptoren hindeuten würde, angeschaut. Dafür wurde zunächst die Proteinmenge von Caveolin-1 in Western Blot-Analysen (2.5.5.1) mittels spezifischer Antikörper (2.1.6.1) untersucht. Die Analyse ergab eine verringerte Proteinmenge von Caveolin-1 in den Lebern der Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Western Blot-Analyse der Proteinmenge von Caveolin-1 in den Lebern von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen**

Ein kleines Stück der isolierten Lebern aus Kontroll- (ct) und Integrin-β1-KO-Mäusen (alb β1 cKO) wurde in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für Caveolin-1 (Verdünnung 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (ct: 1.436 ± 0.2143; alb β1 cKO: 0.7733 ± 0.1653) (n=11/14). (\*p<0,05)

Zur Bestätigung, dass diese Verminderung von Caveolin-1 durch den Knockout von Integrin-β1 in den Hepatozyten herrührt, wurden Hepatozyten aus den Lebern von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen isoliert (2.3.7). Die Proteine wurden extrahiert (2.5.1), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und in einer Western Blot-Analyse (2.5.5.1) mittels spezifischer Antikörper detektiert (2.1.6.1). Auch in den Integrin-β1-KO-Hepatozyten war Caveolin-1 im Vergleich zu den Kontroll-Hepatozyten verringert (Abbildung 32).

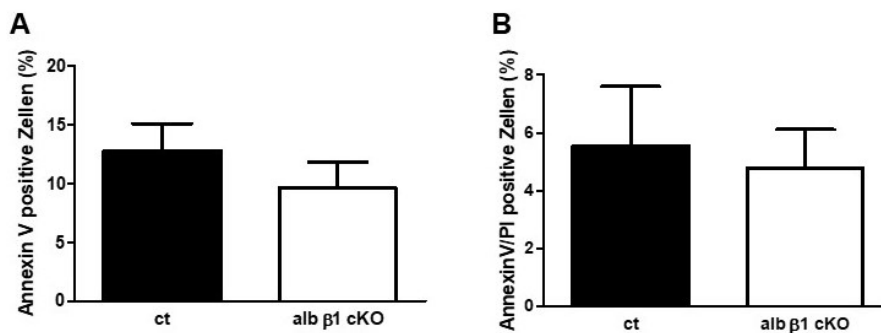


**Abbildung 32: Western Blot-Analyse der Proteinmenge von Caveolin-1 in den Kontroll- und Integrin-β1-KO-Hepatozyten**

Die isolierten Kontroll- und Integrin-β1-KO-Hepatozyten wurden in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für Caveolin-1 (Verdünnung 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (ct: 1.162 ± 0.06322; alb β1 cKO: 0.8463 ± 0.1001) (n=7/8). (\*p<0,05).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die gesteigerte Aktivierung des SMAD-Signalweges aus einer erhöhten Expression der TGF-β Rezeptoren sowie einer verminderten Endozytose durch Caveolin-1 resultieren könnte.

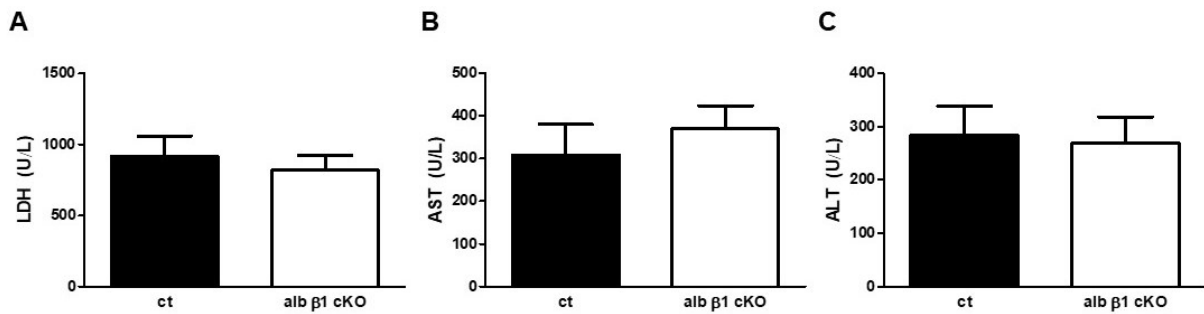
3.1.8 Die Leberfunktion der Kontroll- und konditionellen Integrin- $\beta$ 1-Knockout-Mäuse  
 Die Apoptose von Zellen könnte eine mögliche Ursache für den Anstieg von TGF- $\beta$ , damit einhergehend die verstärkte Aktivierung von Myofibroblasten und die erhöhte Expression von Matrixproteinen, sein (1.5). Daher wurde die Apoptose in den Integrin- $\beta$ 1-KO-Hepatozyten sowie die Leberfunktion kontrolliert. Für die Überprüfung der Apoptose wurden Hepatozyten aus den Lebern von Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen isoliert (2.3.7) und mittels Durchflusszytometrie analysiert (2.3.13). Die durchflusszytometrische Analyse ergab keinen Unterschied in der frühen (Abbildung 33 A) oder in der späten (Abbildung 33 B) Apoptose der Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Hepatozyten. Dies lässt darauf schließen, dass der Knockout des Integrin- $\beta$ 1 die Apoptose der Hepatozyten nicht beeinflusst.



**Abbildung 33: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose von Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Hepatozyten mit Annexin V und PI**

Die Hepatozyten wurden aus Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen isoliert, mit Annexin V und PI gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert ((A) ct: 12,80 ± 2,300; alb  $\beta$ 1 cKO: 9,633 ± 2,226; (B) ct: 5,550 ± 2,050; alb  $\beta$ 1 cKO: 4,800 ± 1,323) (n=2/3).

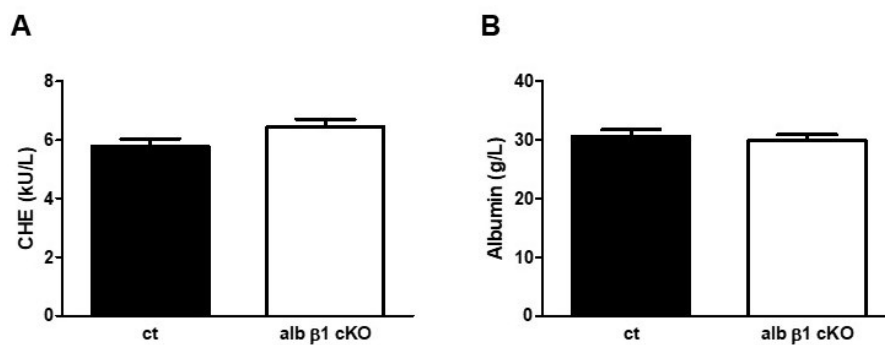
Zur Untersuchung der Leberfunktion wurde das Blut der Versuchstiere auf die Marker LDH (Laktat-Dehydrogenase), AST (Aspartat-Aminotransferase) und ALT (Alanin-Aminotransferase) untersucht. Eine Erhöhung der Werte würde auf eine Schädigung der Hepatozyten hindeuten (1.5.1). Dafür wurde das Blutplasma wie unter 2.2.7 beschrieben isoliert und im Analysezentrum des Universitätsklinikums Heidelberg gemessen. Auch die Analyse des Blutplasmas ergab keinen Unterschied bei den Enzymen LDH, AST und ALT zwischen den Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Tieren (Abbildung 34).



**Abbildung 34: Blutplasmawerte der Enzyme LDH (A), AST (B) und ALT (C) in den Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen**

Das Blutplasma wurde aus den Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen isoliert und zur Analyse in das Analysezentrum abgegeben. Die Enzyme LDH (A) (ct:  $914.3 \pm 145.2$ ; alb β1 cKO:  $819.9 \pm 106.1$ ) (n=32/41), AST (B) (ct:  $309.0 \pm 71.22$ ; alb β1 cKO:  $369.8 \pm 54.25$ ) (n=31/41) und ALT (C) (ct:  $283.0 \pm 55.98$ ; alb β1 cKO:  $269.6 \pm 48.91$ ) (n=32/41) wurden gemessen und ausgewertet.

Des Weiteren wurden im Blutplasma die CHE- (Cholinesterase) und Albumin-Werte überprüft. Diese Werte waren im Blutplasma der Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäuse ebenfalls unverändert (Abbildung 35).



**Abbildung 35: Blutplasmawerte von CHE (A) und Albumin (B) in den Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen**

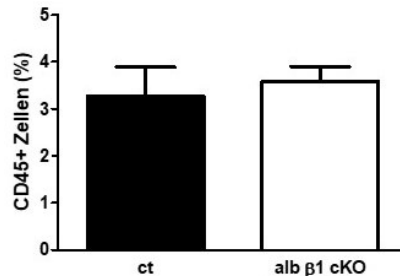
Das Blutplasma wurde aus den Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen isoliert und zur Analyse in das Analysezentrum abgegeben. Die CHE- (A) (ct:  $5.764 \pm 0.2668$ ; alb β1 cKO:  $6.449 \pm 0.2644$ ) (n=32/41) und Albumin-Werte (B) (ct:  $30.61 \pm 1.119$ ; alb β1 cKO:  $29.86 \pm 1.036$ ) (n=32/41) wurden gemessen und ausgewertet.

Die durchflusszytometrische Analyse sowie die Blutwerte zeigen, dass der Integrin-β1 Knockout in den Hepatozyten keinen Einfluss auf die Apoptose der Hepatozyten oder die Leberfunktion hat.

### 3.1.9 Keine Veränderung der Anzahl an Immunzellen durch den konditionellen Integrin-β1-Knockout

Der Integrin-β1-Knockout in den Hepatozyten führt zu einer Erhöhung des TGF-β. Die gesteigerte Menge an TGF-β könnte zu einer vermehrten Infiltration von Immunzellen in der Leber führen (Sanjabi et al., 2017). Daher wurde im nächsten Schritt die Anzahl an Immunzellen in den Lebern von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen überprüft. Dafür wurden die Zellen wie unter 2.3.12 beschrieben vorbereitet und die CD45<sup>+</sup>-

Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte keine Veränderung in der Anzahl an CD45<sup>+</sup>-Zellen in den Lebern von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen (Abbildung 36).



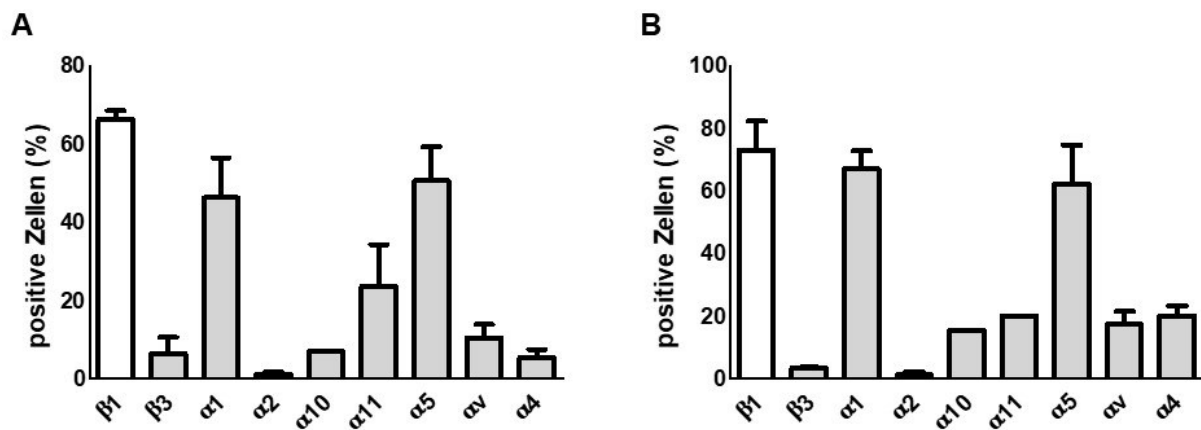
**Abbildung 36: Die Anzahl der CD45<sup>+</sup>-Zellen in den Lebern von Kontroll- und Integrin-β1-KO-Mäusen**

Die isolierten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie mit einem spezifischen Antikörper für CD45<sup>+</sup>-Zellen analysiert (Verdünnung 1:100) (ct: 3.268 ± 0.6205; alb β1 cKO: 3.584 ± 0.3231) (n=10/11).

Die Ausschaltung des Integrin-β1 scheint daher keinen Einfluss auf die Einwanderung von Immunzellen in die Leber zu haben.

### 3.1.10 Der Einfluss des Integrin-Knockouts auf das Zytokin TGF-β

Der Knockout des Integrin-β1 in den Hepatozyten bewirkte eine erhöhte Produktion des Zytokins TGF-β (Abbildung 19). Um herauszufinden, ob weitere Integrin-Untereinheiten den gleichen Effekt zeigen, wurde zunächst ein Integrinprofil der Hepatozyten und der HSCs mittels einer Durchflusszytometrie erstellt. Dafür wurden die Zellen wie unter 2.3.7 beschrieben isoliert. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und die verschiedenen Integrine durchflusszytometrisch analysiert (2.1.6.3; 2.3.12). Abbildung 37 und die Tabelle 7 zeigen eine Übersicht über das Integrinprofil der Hepatozyten (Abbildung 37 A) und der hepatischen Sternzellen (Abbildung 37 B). Daraus ist zu entnehmen, dass die Integrine-β1, -α1 und -α5 sowohl in den HCs als auch in den HSCs am stärksten exprimiert waren. In den Hepatozyten waren die Integrine-β3, -α2, -α10 und -α4 mit unter 10 % am geringsten exprimiert. Die Expression der Integrine-α11 und -αv lagen bei zirka 24 % und 11 %. Auch in den HSCs waren die Integrine-β3 und -α2 am geringsten exprimiert. Die Expression der Integrine-α10, -α11, -αv und -α4 lagen in den HSCs zwischen 16 und 20 %.



**Abbildung 37: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Integrinen auf der Zelloberfläche von Hepatozyten und hepatischen Sternzellen**

Die Zellen wurden aus der Leber isoliert und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Das Integrinprofil der Hepatozyten (A) ( $\beta 1: 66.33 \pm 2.248$ ;  $\beta 3: 6.467 \pm 4.183$ ;  $\alpha 1: 46.33 \pm 10.11$ ;  $\alpha 2: 1.233 \pm 0.5696$ ;  $\alpha 10: 7.0$ ;  $\alpha 11: 23.80 \pm 10.50$ ;  $\alpha 5: 50.67 \pm 8.664$ ;  $\alpha v: 10.50 \pm 3.418$ ;  $\alpha 4: 5.533 \pm 1.997$ ) ( $n=3/3/3/3/1/3/3/3/3$ ) und der hepatischen Sternzellen (B) ( $\beta 1: 73.15 \pm 9.150$ ;  $\beta 3: 3.400 \pm 0.3000$ ;  $\alpha 1: 67.00 \pm 5.900$ ;  $\alpha 2: 1.250 \pm 1.050$ ;  $\alpha 10: 15.5$ ;  $\alpha 11: 20.0$ ;  $\alpha 5: 62.15 \pm 12.55$ ;  $\alpha v: 17.40 \pm 4.100$ ;  $\alpha 4: 20.00 \pm 3.400$ ) ( $n=2/2/2/2/1/1/2/2/2$ ) wurde in einer durchflusszytometrischen Analyse ermittelt. Die Abbildungen zeigen die prozentualen Anteile der positiven Zellen bezogen auf die gesamte Zellzahl.

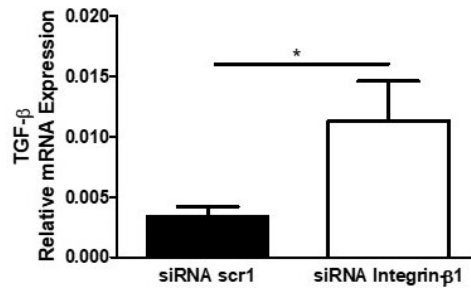
**Tabelle 7: Prozentuale Übersicht des Integrinprofils der Hepatozyten und hepatischen Sternzellen**

Integrine HC	ca. Prozent (%)	Integrine HSC	ca. Prozent (%)
β1	66	β1	73
β3	6	β3	3
α1	46	α1	67
α2	1	α2	1
α10	7	α10	16
α11	24	α11	20
α5	51	α5	62
αv	11	αv	17
α4	6	α4	20

Als nächstes sollten die Integrine mittels siRNA ausgeschaltet werden. Aufgrund der geringen Ausbeute an HSCs bei der Zellisolation wurden für die Ausschaltung der Integrin-Untereinheiten lediglich Hepatozyten verwendet. Als Positivkontrolle der



transienten Transfektion wurden zunächst Hepatozyten mit einer Integrin- $\beta$ 1-siRNA und als Negativkontrolle mit einer Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 16 Stunden wurden die Zellen in RNAzol lysiert, die RNA isoliert (2.4.2), in cDNA mit Oligonukleotiden umgeschrieben (2.4.3) und die Expression von TGF- $\beta$  mit spezifischen Primern gemessen (2.4.6; 2.1.7.2). Die transiente Transfektion mit der Integrin- $\beta$ 1-siRNA bewirkte einen Anstieg der Expression von TGF- $\beta$  im Vergleich zu Kontroll-siRNA (Abbildung 38).



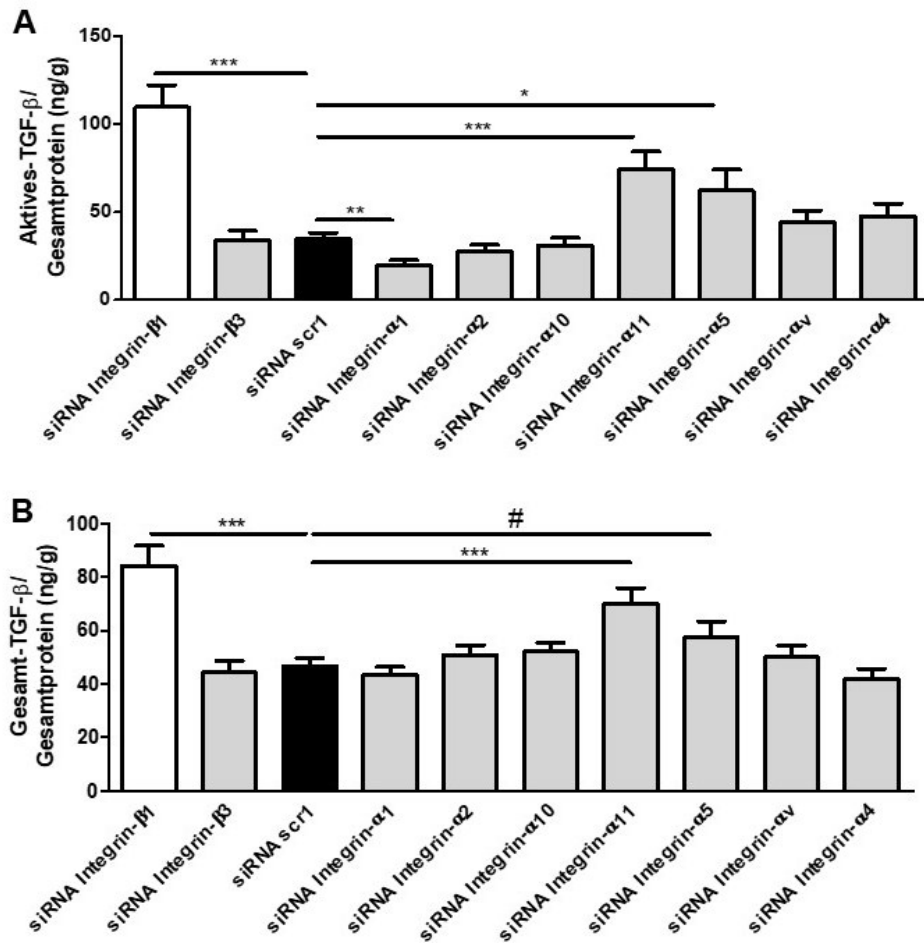
**Abbildung 38: Relative mRNA-Expression von TGF- $\beta$  in siRNA-transfizierten Hepatozyten**

Die Hepatozyten wurden aus der Mausleber isoliert, kultiviert und mit verschiedenen siRNAs für Integrin-Untereinheiten oder einer Kontroll-siRNA transient transfiziert. Die RNA wurde aus den Hepatozyten isoliert und in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR-Analysen wurde mit spezifischen Oligonukleotiden die Expression von TGF- $\beta$  analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionen von TGF- $\beta$  im Verhältnis zu HPRT (siRNA scr1:  $0.003367 \pm 0.0008452$ ; siRNA Integrin- $\beta$ 1:  $0.01135 \pm 0.003260$ ) ( $n=6/6$ ). (\* $p<0,05$ )

Dieses Ergebnis ist ähnlich zu den qRT-PCR Daten der Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Hepatozyten.

Der Knockout der verschiedenen Integrin-Untereinheiten in den Hepatozyten erfolgte ebenfalls mittels einer siRNA-Behandlung. Dafür wurden die Hepatozyten aus den Lebern von Mäusen isoliert und in Kultur genommen (2.3.7). Die Hepatozyten wurden mit verschiedenen siRNAs für die Integrin-Untereinheiten sowie einer Kontroll-siRNA (scr1) transient transfiziert (2.3.11). Nach 16 Stunden wurde die Proteinmenge sowie die Konzentration von TGF- $\beta$  in einem Luciferase-Assay analysiert (2.5.7). Dafür wurden die Hepatozyten wie unter 2.5.3 beschrieben vorbereitet. Wie der Integrin- $\beta$ 1-Knockout in den Hepatozyten (Abbildung 9), zeigte auch die Ausschaltung des Integrin- $\beta$ 1 mittels siRNA einen Anstieg des aktiven TGF- $\beta$  sowie der gesamten TGF- $\beta$ -Proteinmenge im Vergleich zu den mit der Kontroll-siRNA (scr1) behandelten Zellen (wie oben gezeigt, Abbildung 38). Auch die transiente Transfektion mit der  $\alpha$ 11-siRNA führte zu einer Erhöhung des aktiven TGF- $\beta$  sowie der gesamten TGF- $\beta$ -Proteinmenge im Vergleich zu den Zellen mit der Kontroll-siRNA. Die Ausschaltung des Integrin- $\alpha$ 5 zeigte eine Steigerung des aktiven TGF- $\beta$  sowie einen erhöhten Trend

der TGF- $\beta$ -Proteinmenge im Vergleich zu den mit der Kontroll-siRNA behandelten Hepatozyten. Die Behandlungen mit den siRNAs für die Untereinheiten Integrin- $\beta$ 3, - $\alpha$ v, - $\alpha$ 2 und - $\alpha$ 4 wiesen keine Unterschiede in der TGF- $\beta$ -Proteinmenge oder im aktiven TGF- $\beta$  auf. Die Behandlung mit der siRNA für das Integrin- $\alpha$ 1 führte zu einer Verringerung des aktiven TGF- $\beta$  im Vergleich zu der Behandlung mit der Kontroll-siRNA, wobei die gesamte Proteinmenge von TGF- $\beta$  unverändert blieb (Abbildung 39 A und B).



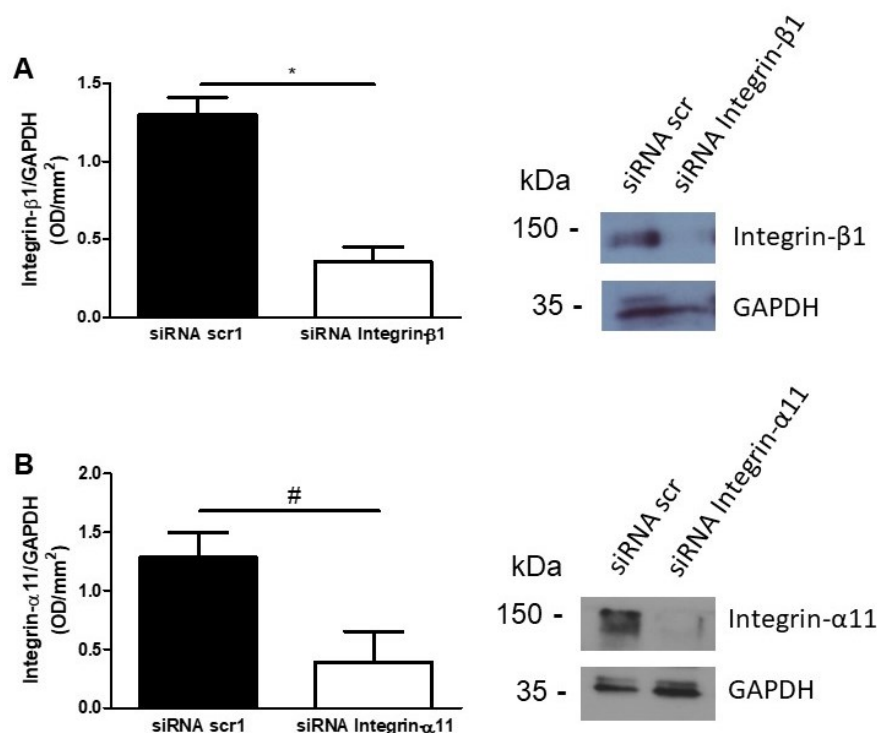
**Abbildung 39: Analyse des aktiven und gesamten TGF- $\beta$ -Gehaltes in siRNA-behandelten und Kontroll-Hepatozyten**

Die Hepatozyten wurden aus der Mausleber isoliert, kultiviert und mit verschiedenen siRNAs für Integrin-Untereinheiten oder einer Kontroll-siRNA transient transfiziert. Mittels eines Luciferase-Assays wurde das biologisch aktive TGF- $\beta$  (A) (siRNA Integrin- $\beta$ 1: 109.6 ± 12.47; - $\beta$ 3: 34.26 ± 5.221; scr1: 34.81 ± 3.399; - $\alpha$ 1: 20.08 ± 2.666; - $\alpha$ 2: 27.60 ± 3.923; - $\alpha$ 10: 31.23 ± 4.192; - $\alpha$ 11: 74.37 ± 10.06; - $\alpha$ 5: 62.23 ± 11.98; - $\alpha$ v: 44.31 ± 6.424; - $\alpha$ 4: 47.65 ± 7.209) (n=41/21/41/29/29/37/29/29/29) sowie die gesamte TGF- $\beta$ -Proteinmenge (B) (siRNA Integrin- $\beta$ 1: 84.17 ± 7.619; - $\beta$ 3: 44.33 ± 4.135; scr1: 46.74 ± 2.860; - $\alpha$ 1: 43.40 ± 3.070; - $\alpha$ 2: 50.99 ± 3.522; - $\alpha$ 10: 52.06 ± 3.348; - $\alpha$ 11: 70.07 ± 5.875; - $\alpha$ 5: 57.35 ± 6.103; - $\alpha$ v: 49.94 ± 4.499; - $\alpha$ 4: 41.70 ± 3.893) (n=36/21/36/25/25/25/33/25/25/25) im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge in den Hepatozyten gemessen. (#p<0,1; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

Dies weist darauf hin, dass neben dem Integrin- $\beta$ 1 die Integrin-Untereinheiten- $\alpha$ 11 und vermutlich  $\alpha$ 5 das Zytokin TGF- $\beta$  in den Hepatozyten beeinflussen könnten.

### 3.1.11 Nachweis der Ausschaltung der transienten Transfektion von Integrin- $\alpha$ 11 und - $\beta$ 1

Um herauszufinden, ob die Ausschaltung des Integrin- $\beta$ 1 und Integrin- $\alpha$ 11 mittels siRNA erfolgreich war, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Dafür wurden Hepatozyten wie unter 2.3.7 beschrieben isoliert und mit den siRNAs für die beiden Integrin-Untereinheiten sowie eine Kontroll-siRNA (scr1) transient transfiziert (2.3.11). Nach 16 Stunden wurden die Proteine extrahiert (2.5.1), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und in einer Western Blot-Analyse (2.5.5.1) mittels spezifischer Antikörper das Integrin- $\alpha$ 11 und - $\beta$ 1 detektiert (2.1.6.1). Die Western Blot-Analyse zeigte eine Ausschaltung des Integrin- $\beta$ 1 durch die transiente Transfektion mit der Integrin- $\beta$ 1-siRNA im Vergleich zur Kontroll-siRNA (Abbildung 40 A). Durch die transiente Transfektion mit der Integrin- $\alpha$ 11-siRNA konnte ein Trend zur Verringerung der Proteinmenge von Integrin- $\alpha$ 11 in den Western Blot Analysen festgestellt werden (Abbildung 40 B).



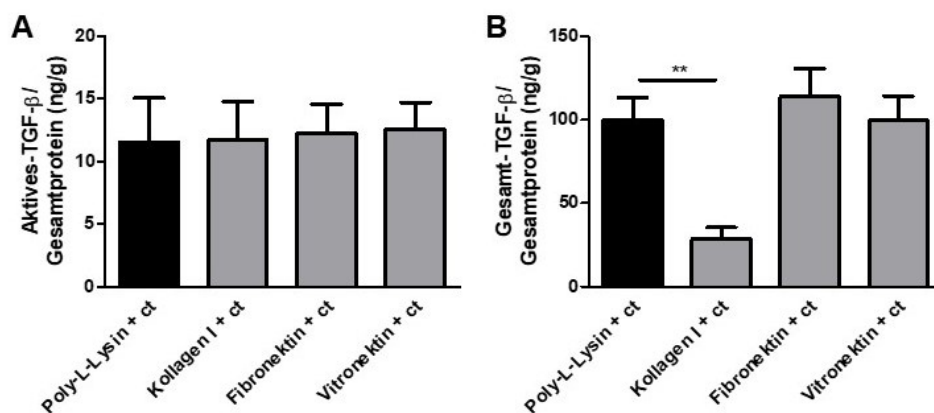
**Abbildung 40: Western Blot-Analyse der Ausschaltung von Integrin- $\alpha$ 11 und - $\beta$ 1 mittels siRNA in Hepatozyten**

Die transient transfizierten Hepatozyten wurden in Proteinlysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für Integrin- $\beta$ 1 (Verdünnung 1:1000) (A) (siRNA scr1:  $1.298 \pm 0.1118$ ; siRNA Integrin- $\beta$ 1:  $0.3559 \pm 0.09658$ ) ( $n=2/2$ ), Integrin- $\alpha$ 11 (Verdünnung 1:1000) (B) (siRNA scr1:  $1.283 \pm 0.2116$ ; siRNA Integrin- $\alpha$ 11:  $0.3899 \pm 0.2649$ ) ( $n=3/2$ ) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot. (# $p < 0,1$ ; \* $p < 0,05$ )

Diese Analysen weisen darauf hin, dass die transiente Transfektion zu einer Ausschaltung der Untereinheiten geführt hat.

### 3.1.12 Kollagen I beeinflusst das Zytokin TGF- $\beta$

Die Ausschaltung von verschiedenen Integrin-Untereinheiten in Hepatozyten können den Proteingehalt von TGF- $\beta$  beeinflussen. Da die Integrine als Rezeptoren für Matrixproteine wirken, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob nicht nur die Matrixrezeptoren der Zelle, sondern auch die Matrixproteine selbst einen Einfluss auf das TGF- $\beta$  haben können. Dafür wurden die Zellen wie unter 2.3.7 beschrieben isoliert und die gewünschte Zellzahl in 48-Lochplatten ausgesät. Vorab wurden die einzelnen Vertiefungen mit den Matrixproteinen Kollagen I, Fibronektin oder Vitronektin beschichtet. Als Kontrollen dienten mit Poly-L-Lysin beschichtete Vertiefungen, da hierbei keine Interaktion mit den Integrinen zu erwarten ist (Salmela et al., 2017). Die Zellen wurden für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen wie unter 2.5.3 beschrieben vorbereitet und das aktive TGF- $\beta$  und die gesamte TGF- $\beta$ -Proteinmenge analysiert. In Abbildung 41 ist zu erkennen, dass die Matrixproteine Fibronektin und Vitronektin keinen Einfluss auf das aktive oder das gesamte TGF- $\beta$  in den Hepatozyten im Vergleich zur Kultivierung auf Poly-L-Lysin hatten (A und B). Die Interaktion von Kollagen I mit den Hepatozyten scheint aber die gesamte TGF- $\beta$ -Proteinmenge zu verringern, wobei das aktive TGF- $\beta$  auch bei der Kultivierung auf Kollagen I im Vergleich zu Poly-L-Lysin unverändert war (Abbildung 41 A und B).



**Abbildung 41: Analyse des aktiven und des gesamten TGF- $\beta$ -Gehalts in den auf Matrixproteinen kultivierten Hepatozyten**

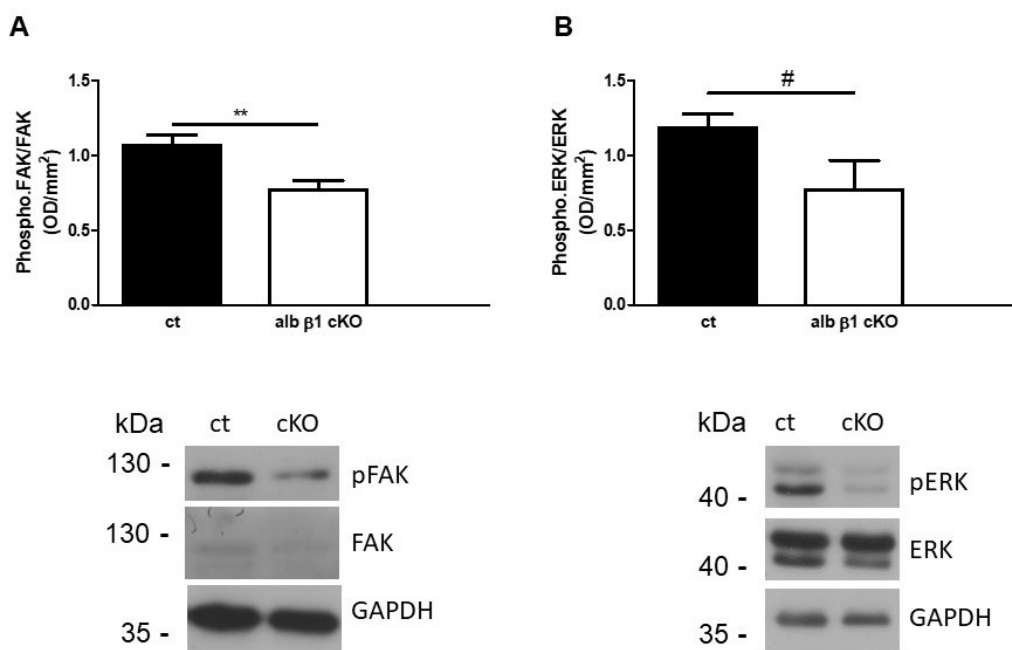
Die isolierten Hepatozyten wurden in 48-Lochplatten, welche vorab mit Poly-L-Lysin, Kollagen I, Fibronektin oder Vitronektin beschichtet wurden, ausgesät. Die Kultivierung erfolgte für 24 Stunden im Brutschrank. Mittels eines Luciferase-Assays wurden das biologisch aktive TGF- $\beta$  ((A) Poly-L-Lysin:  $11.52 \pm 3.541$ ; Kollagen I:  $11.71 \pm 3.096$ ;

Fibronectin:  $12.22 \pm 2.317$ ; Vitronectin:  $12.52 \pm 2.198$  (n= 22/11/22/24) und das gesamte TGF- $\beta$  ((B) Poly-L-Lysin:  $100.2 \pm 13.17$ ; Kollagen I:  $28.39 \pm 7.082$ ; Fibronectin:  $113.9 \pm 16.76$ ; Vitronectin:  $99.53 \pm 14.70$ ) (n=14/6/14/24) im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge ermittelt. (\*\*p<0,01)

Dies könnte auf einen Einfluss von Kollagen I auf TGF- $\beta$  hindeuten.

### 3.1.13 Der Integrin- $\beta$ 1-Knockout bewirkt eine verminderte Integrin-Signalweitergabe

Das Integrin- $\beta$ 1 kann mit vielen verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten eine Verbindung eingehen und besitzt somit diverse Liganden, wodurch zahlreiche Signalwege aktiviert werden können (1.3.2). Durch die Ausschaltung des Integrin- $\beta$ 1 in den Hepatozyten, sollte es daher zu einer verringerten Integrin-Signalweitergabe kommen. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden die Signalwege von FAK und ERK untersucht. Dafür wurden Hepatozyten aus den Lebern von Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen isoliert (2.3.7) und für 45 Minuten in Kulturmedium ohne FCS in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß im Inkubator kultiviert. Im Anschluss wurden die Proteine extrahiert (2.5.1), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und in einer Western Blot-Analyse (2.5.5.1) mittels spezifischer Antikörper detektiert (2.1.6.1). Wie erwartet, kam es in den Integrin- $\beta$ 1-KO-Hepatozyten zu einer Verminderung der Phosphorylierung von FAK im Vergleich zu den Kontroll-Hepatozyten (Abbildung 42 A). Die Phosphorylierung von ERK zeigte nur eine Tendenz zur Verminderung im Vergleich zu den Kontroll-Hepatozyten (Abbildung 42 B).



**Abbildung 42: Western Blot-Analyse der Phosphorylierung von FAK und ERK in den Kontroll- und Integrin- $\beta$ 1-KO-Hepatozyten**

Die isolierten Kontroll- (ct) und Integrin- $\beta$ 1-KO-Hepatozyten (alb  $\beta$ 1 cKO) wurden für 45 Minuten in Kulturmedium

ohne FCS im Inkubator kultiviert und im Anschluss in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für phosphoryliertes FAK (pFAK) (Verdünnung 1:1000), FAK (Verdünnungen 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000) (A) (ct:  $1.070 \pm 0.06992$ ; alb  $\beta 1$  cKO:  $0.7710 \pm 0.06044$ ) (n=16/15) sowie für phosphoryliertes ERK (pERK) (Verdünnung 1:1000), ERK (Verdünnungen 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000) (B) (ct:  $1.187 \pm 0.09080$ ; alb  $\beta 1$  cKO:  $0.7704 \pm 0.1975$ ) (n=5/5). Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot. (#p<0,1; \*\*p<0,01)

Durch den Knockout des Integrin- $\beta 1$  in den Hepatozyten wurde der Integrin-Signalweg verändert. Möglicherweise hat dies einen Einfluss auf die Expression des profibrotischen Zytokins TGF- $\beta$ . Wie bereits unter Punkt 1.4 beschrieben, interagieren der Integrin- und TGF- $\beta$ -Signalweg auf verschiedenen Ebenen miteinander, wobei die Inaktivierung des einen zur Inhibition des anderen führen kann.

Zusammenfassend bewirkt der Knockout des Integrin- $\beta 1$ , zumindest in den Hepatozyten und den HSCs, eine erhöhte Expression von TGF- $\beta$ . In den Hepatozyten konnte zudem eine erhöhte Menge des Proteins TGF- $\beta$  festgestellt werden. Die verstärkte Aktivierung des TGF- $\beta$ -SMAD-Signalwegs in den Lebern der Integrin- $\beta 1$ -KO-Mäuse könnte auf die erhöhte Expression von TGF- $\beta$  und der TGF- $\beta$  Rezeptoren sowie auf die verminderte Menge von SMAD7 zurückzuführen sein. Dies würde auch die vermehrte Differenzierung der HSCs zu Myofibroblasten, wodurch die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen erhöht wird, erklären. Die zahlreichen Interaktionspunkte zwischen dem Integrin- und dem TGF- $\beta$ -Signalweg bilden einen möglichen Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer pharmakologischer Therapien.

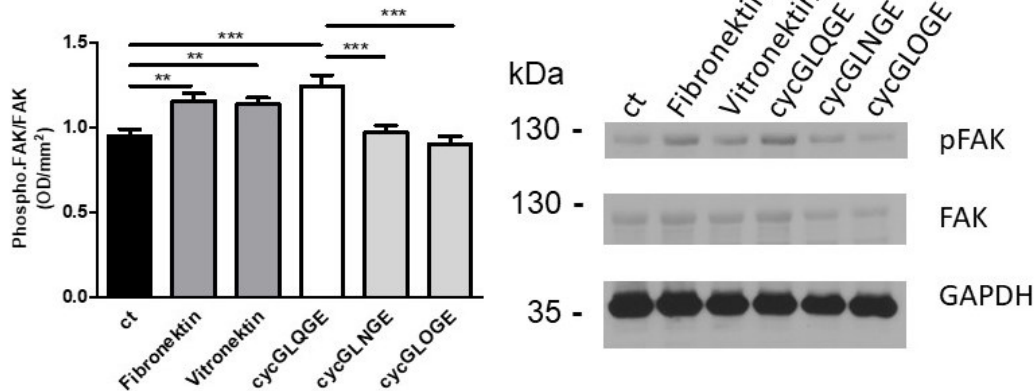
### 3.2 Modulation der Integrin-Matrix-Interaktion

Eine wichtige Funktion der Integrine ist die Interaktion mit der Umgebung und damit verbunden die Wahrnehmung von verschiedenen Signalen. Zudem sind sie für die Struktur und den Aufbau der extrazellulären Matrix essentiell (Kadler et al., 2008). Eine Modulation der Interaktion der Integrine mit der Umgebung könnte dazu führen, dass verschiedene Signalwege, welche für die Proliferation, Differenzierung oder Überleben der Zelle wichtig sind, aktiviert oder inhibiert werden. Da viele Integrine bestimmte Peptidsequenzen erkennen und an diese binden, wie die RGD oder GFOGER und GLOGER Sequenz (1.3), bilden solche kleinen Peptidsequenzen eine gute Möglichkeit für eine Modulation der Integrine. Die Ausschaltung des Integrin- $\beta 1$  in Hepatozyten bewirkt eine verminderte Phosphorylierung von FAK, was mit einer verstärkten Expression von TGF- $\beta$  assoziiert ist und damit einhergehend zu einer Akkumulation

von Matrixproteinen in der Leber führt (3.1). Ein Integrin-bindendes Molekül, welches die Phosphorylierung von FAK in den Hepatozyten erhöht, könnte die Expression von TGF- $\beta$  vermindern und so die Akkumulation der Matrixproteine verringern. Die Ausschaltung von sowohl Integrin- $\beta$ 1 als auch Integrin- $\alpha$ 11 zeigt eine Erhöhung von TGF- $\beta$ . Da die beiden Untereinheiten im Kollagen-Rezeptor vorkommen, stellt sich die Frage, welche Sequenz verwendet werden kann. Die Peptidsequenzen GFOGER und GLOGER wurden bereits als Bindesequenz für Integrine, die an Kollagen binden, identifiziert ((Zhang et al., 2003); (Siljander et al., 2004); (Kim et al., 2005)). In dieser Arbeit wurden drei Peptide für eine mögliche pharmakologische Behandlung in der Fibrose untersucht, wobei alle drei eine Modifikation der Peptidsequenz GFOGER sind: GLQGE, GLNGE und GLOGE.

### 3.2.1 Veränderung der Phosphorylierung von FAK durch die cycPeptide

Zur Überprüfung, ob die Peptide für eine pharmakologische Behandlung in Betracht gezogen werden können, wurde die Phosphorylierung von FAK nach der Behandlung mit den Peptiden analysiert. Dafür wurden die  $2 \times 10^5$  Hepatozyten in Kulturmedium ohne FCS in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und eine Stunde im Brutschrank kultiviert. Zur Behandlung der Zellen wurden 0,05 mg/ml der cycPeptide hinzugegeben und für 45 Minuten im Brutschrank kultiviert. Als Kontrolle dienten zum einen unbehandelte und zum anderen mit Fibronectin oder Vitronectin stimulierte Hepatozyten. Im Anschluss wurden die Proteine extrahiert (2.5.1), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und in einer Western Blot-Analyse (2.5.5.1) mittels spezifischer Antikörper detektiert (2.1.6.1). Die Western Blot-Analyse ergab eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung von FAK durch die Behandlung mit Fibronectin und Vitronectin im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Die Behandlung mit dem cycGLQGE zeigte ebenfalls eine verstärkte Phosphorylierung von FAK im Vergleich zu den unbehandelten oder mit dem cycGLNGE oder cycGLOGE behandelten Hepatozyten. Die Behandlung mit den cycGLNGE oder cycGLOGE Peptiden hatte keinen Effekt auf die Phosphorylierung von FAK im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abbildung 43).

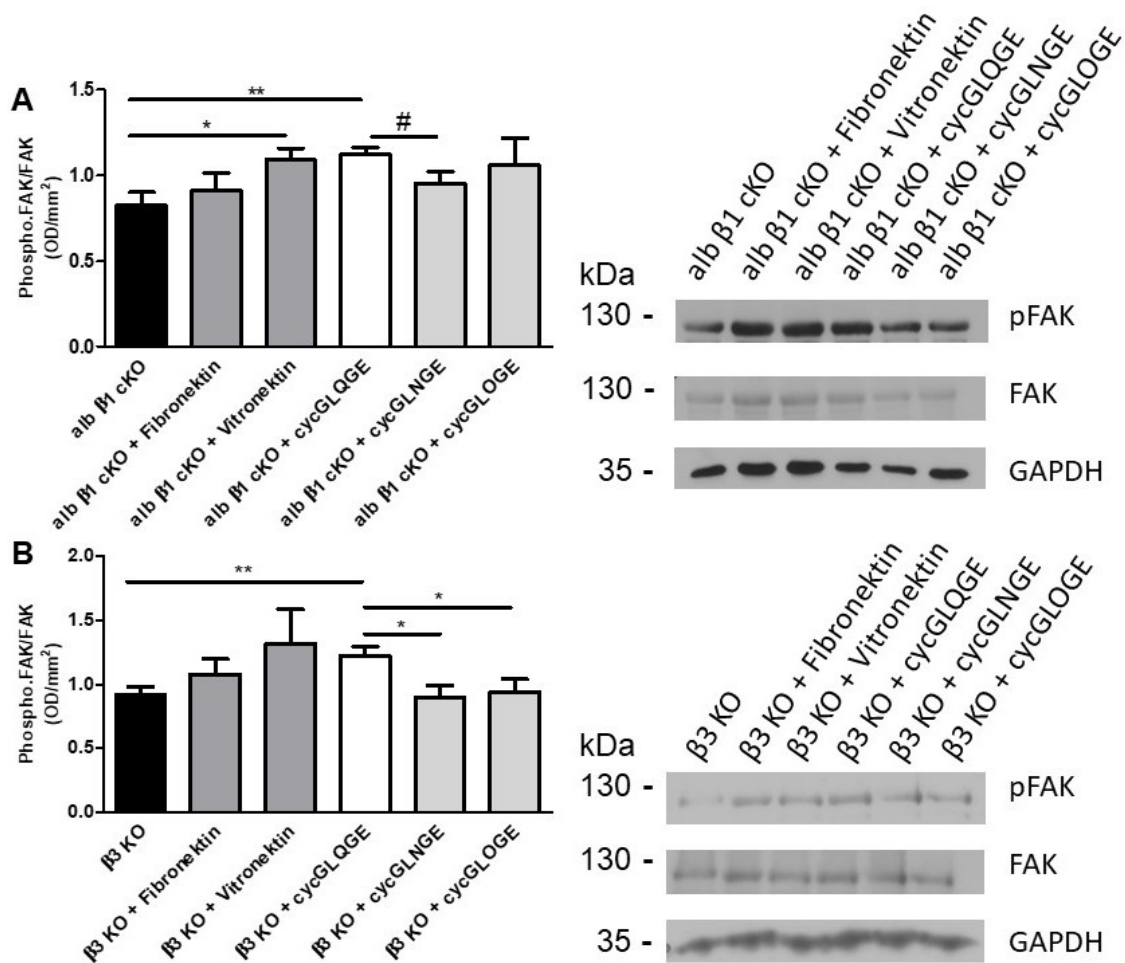


**Abbildung 43: Western Blot-Analyse der Phosphorylierung von FAK in den behandelten Hepatozyten**

$2 \times 10^5$  der isolierten Hepatozyten wurden für eine Stunde in Kulturmedium ohne FCS kultiviert und anschließend für 45 Minuten mit den cycPeptiden behandelt. Im Anschluss wurden die Hepatozyten in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für phosphoryliertes FAK (pFAK) (Verdünnungen 1:1000), FAK (Verdünnungen 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000) (ct:  $0.9481 \pm 0.04150$ ; Fibronektin:  $1.155 \pm 0.04399$ ; Vitronektin:  $1.137 \pm 0.03669$ ; cycGLQGE:  $1.242 \pm 0.06425$ ; cycGLNGE:  $0.9684 \pm 0.04174$ ; cycGLOGE:  $0.8998 \pm 0.04795$ ) (n=35/31/31/29/30/30). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot. (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

Zur Kontrolle, ob die Peptide die gleiche Wirkung auch auf die Integrin- $\beta$ 1-KO-Hepatozyten haben, wurden diese wie unter 2.3.7 beschrieben isoliert. Zudem wurden Hepatozyten von Integrin- $\beta$ 3-KO Tieren verwendet (2.2.2). Der Versuchsaufbau war gleich wie bei den Wildtyp-Hepatozyten. Die Behandlung mit dem cycGLQGE ergab sowohl in den Integrin- $\beta$ 1-KO als auch in den Integrin- $\beta$ 3-KO-Hepatozyten eine erhöhte Phosphorylierung von FAK im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abbildung 44 A und B). In den Integrin- $\beta$ 3-KO-Hepatozyten zeigte die Behandlung mit dem cycGLQGE außerdem eine erhöhte Phosphorylierung von FAK im Vergleich zu der Behandlung mit cycGLNGE oder cycGLOGE. Zudem ergab die Stimulation mit Vitronektin eine Zunahme der Phosphorylierung von FAK im Vergleich zu den unbehandelten Integrin- $\beta$ 1-KO-Hepatozyten (Abbildung 44 A). Die Behandlungen mit den cycGLNGE oder cycGLOGE Peptiden ergaben keine signifikanten Veränderungen, genauso wie die Stimulation mit Fibronektin. Da die Ausschaltung von Integrin- $\beta$ 1 in Hepatozyten nur begrenzt erfolgreich ist, können keine Rückschlüsse darüber gezogen werden, ob cycGLQGE Integrin- $\beta$ 1 aktiviert.





**Abbildung 44: Western Blot-Analyse der Phosphorylierung von FAK in den behandelten Integrin-β1- und Integrin-β3-KO-Hepatozyten**

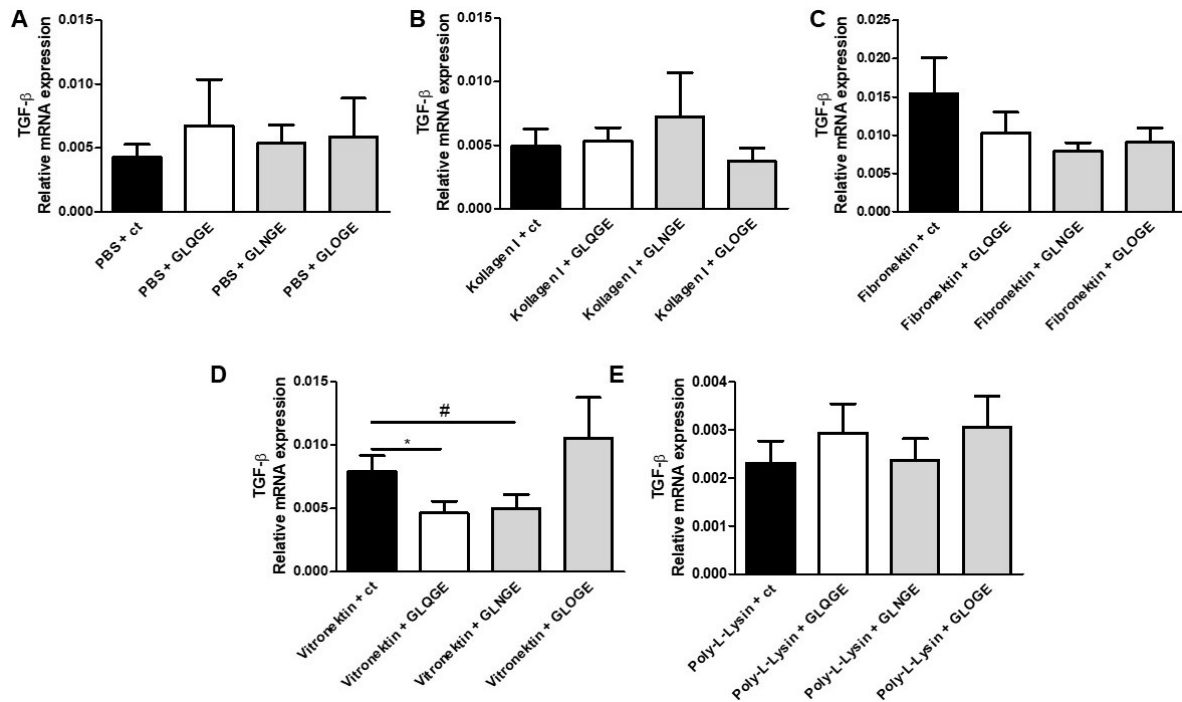
Die isolierten Integrin-β1- (A) (alb β1 cKO: 0.8261 ± 0.07398; alb β1 cKO + Fibronektin: 0.9092 ± 0.1051; alb β1 cKO + Vitronektin: 1.090 ± 0.06817; alb β1 cKO + cycGLQGE: 1.121 ± 0.04192; alb β1 cKO + cycGLNGE: 0.9502 ± 0.07220; alb β1 cKO + cycGLOGE: 1.056 ± 0.1619) (n=13/12/12/10/10/9) und Integrin-β3-KO-Hepatozyten (B) (β3 KO: 0.9149 ± 0.06616; β3 KO + Fibronektin: 1.078 ± 0.1201; β3 KO + Vitronektin: 1.318 ± 0.2677; β3 KO + cycGLQGE: 1.223 ± 0.07240; β3 KO + cycGLNGE: 0.8950 ± 0.09526; β3 KO + cycGLOGE: 0.9372 ± 0.1041) (n=6/6/7/7/6/6) wurden für eine Stunde in Kulturmedium ohne FCS kultiviert und anschließend für 45 Minuten mit den cycPeptiden behandelt. Im Anschluss wurden die Hepatozyten in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für phosphoryliertes FAK (pFAK) (Verdünnungen 1:1000), FAK (Verdünnungen 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot. (#p<0,1; \*p<0,5; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

Diese Ergebnisse zeigen, dass das cycGLQGE die Phosphorylierung von FAK in den Hepatozyten erhöht und daher möglicherweise für eine pharmakologische Behandlung in Frage kommen könnte.

### 3.2.2 Die Wirkung der Peptide auf die Produktion von TGF-β in Hepatozyten

Die verstärkte Expression von TGF-β in den Integrin-β1-KO-Hepatozyten könnte auf die verminderte Phosphorylierung von FAK zurückzuführen sein. Da das Peptid cycGLQGE die Phosphorylierung von FAK sowohl in den Hepatozyten als auch in den

Integrin- $\beta$ 1-KO-Hepatozyten erhöht, wurde im nächsten Schritt die Expression von TGF- $\beta$  in den Hepatozyten überprüft. Dafür wurden die Zellen wie unter 2.3.7 beschrieben isoliert und die gewünschte Zellzahl in 48-Lochplatten ausgesät. Um mögliche Interaktionspartner vorab zu bestimmen, wurden die einzelnen Vertiefungen mit jeweils 10  $\mu$ g/ml Kollagen I, Fibronektin oder Vitronektin für mindestens eine Stunde im Inkubator beschichtet und so verschiedene Integrine teilweise in Anspruch genommen. Als Kontrollen dienten mit PBS oder 0,01 % Poly-L-Lysin beschichtete Vertiefungen, da bei Poly-L-Lysin keine Interaktion mit den Integrinen zu erwarten war. Zur Behandlung der Zellen wurden 0,05 mg/ml der Peptide hinzugegeben und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen in RNAzol lysiert, die RNA isoliert (2.4.2), in cDNA mit Oligonukleotiden umgeschrieben (2.4.3) und die Expression von TGF- $\beta$  mit spezifischen Primern gemessen (2.4.6; 2.1.7.2). Wie in der Abbildung 45 ersichtlich ist, verminderte lediglich das Peptid GLQGE die TGF- $\beta$ -Expression in Hepatozyten im Vergleich zu unbehandelten Zellen, wenn diese in mit Vitronektin beschichteten Vertiefungen ausgesät wurden. Zudem zeigte das Peptid GLNGE ein Trend zur Verminderung der Expression von TGF- $\beta$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in diesen Vertiefungen (Abbildung 45 D). Bei den Beschichtungen mit PBS, Kollagen I, Fibronektin oder Poly-L-Lysin zeigte keines der Peptide einen Einfluss auf die Expression von TGF- $\beta$  im Vergleich zu den unbehandelten Hepatozyten (Abbildung 45 A; B; C; E).

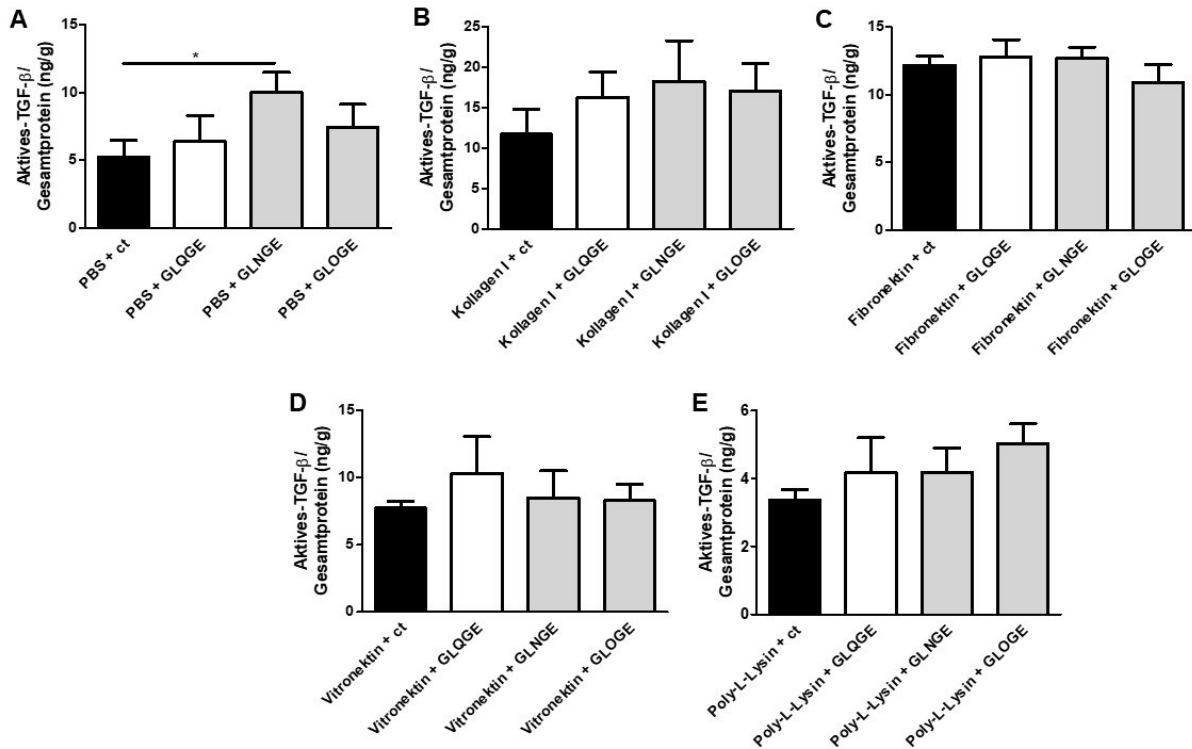


#### Abbildung 45: Relative mRNA-Expression von TGF-β in den behandelten Hepatozyten

Die isolierten Hepatozyten wurden in 48-Lochplatten, welche vorab mit PBS (A) (ct:  $0.004263 \pm 0.001026$ ; GLQGE:  $0.006763 \pm 0.003615$ ; GLNGE:  $0.005371 \pm 0.001461$ ; GLOGE:  $0.005863 \pm 0.003026$ ) ( $n=8/8/7/8$ ), 10  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen I (B) (ct:  $0.004929 \pm 0.001356$ ; GLQGE:  $0.005325 \pm 0.001058$ ; GLNGE:  $0.007238 \pm 0.003470$ ; GLOGE:  $0.003725 \pm 0.001081$ ) ( $n=7/8/8/8$ ), 10  $\mu\text{g/ml}$  Fibronectin (C) (ct:  $0.01518 \pm 0.004906$ ; GLQGE:  $0.01016 \pm 0.002759$ ; GLNGE:  $0.007343 \pm 0.0009950$ ; GLOGE:  $0.008983 \pm 0.001954$ ) ( $n=26/28/21/23$ ), 10  $\mu\text{g/ml}$  Vitronectin (D) (ct:  $0.007896 \pm 0.001281$ ; GLQGE:  $0.004632 \pm 0.0009369$ ; GLNGE:  $0.004985 \pm 0.001118$ ; GLOGE:  $0.01054 \pm 0.003207$ ) ( $n=23/25/20/20$ ) oder 0,01% Poly-L-Lysin (E) (ct:  $0.002311 \pm 0.0004552$ ; GLQGE:  $0.002939 \pm 0.0006068$ ; GLNGE:  $0.002375 \pm 0.0004437$ ; GLOGE:  $0.003058 \pm 0.0006439$ ) ( $n=18/18/12/12$ ) beschichtet wurden, ausgesät. Die Behandlung mit den Peptiden erfolgte für 24 Stunden. Im Folgenden wurde die RNA aus den Hepatozyten isoliert und in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR-Analysen wurde mit spezifischen Oligonukleotiden die Expression von TGF-β analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionen von TGF-β im Verhältnis zu HPRT. (# $p < 0,1$ ; \* $p < 0,05$ )

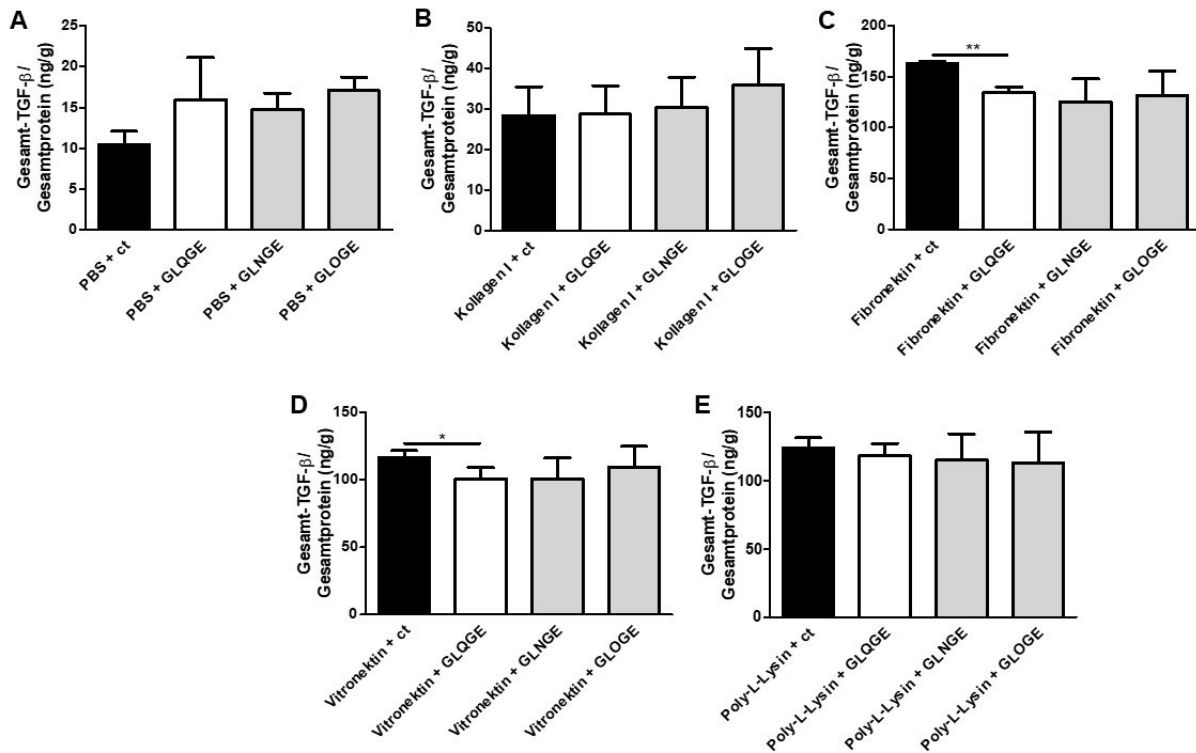
Zusätzlich zu den qRT-PCR-Analysen wurde die aktive und die gesamte TGF-β-Proteinmenge in den behandelten Hepatozyten untersucht (2.5.7). Dafür wurden die Zellen wie unter 2.3.7 beschrieben isoliert und analog zu den qRT-PCR-Analysen behandelt. Die Zellen wurden wie unter 2.5.3 beschrieben vorbereitet. Lediglich die Behandlung mit dem Peptid GLNGE zeigte in den PBS-beschichteten Vertiefungen eine Erhöhung des aktiven TGF-β im Vergleich zu den unbehandelten Hepatozyten. Die Peptide GLQGE und GLOGE zeigten in diesen Vertiefungen hingegen keinen Effekt (Abbildung 46 A). Bei den Beschichtungen mit Kollagen I, Fibronectin, Vitronectin oder Poly-L-Lysin zeigte keines der verwendeten Peptide einen Effekt auf die Aktivierung von TGF-β im Vergleich zu den unbehandelten Hepatozyten (Abbildung 46 B; C; D und E). Abbildung 48 zeigt das gesamte TGF-β im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge. Dabei bewirkte das Peptid GLQGE eine Verminderung des gesamten TGF-β-Gehalts im Vergleich zu unbehandelten Hepatozyten, wenn diese entweder auf Vitronectin oder auf Fibronectin kultiviert wurden. Die Peptide GLNGE

und GLOGE hatten auf diesen Beschichtungen keinen Einfluss auf die gesamte TGF- $\beta$ -Menge (Abbildung 47 C und D). Bei der Kultivierung der Hepatozyten auf PBS, Kollagen I oder Poly-L-Lysin zeigte keines der Peptide einen Unterschied im gesamten TGF- $\beta$ -Gehalt (Abbildung 47 A, B und E).



**Abbildung 46: Analyse des aktiven TGF- $\beta$ -Gehalts in den behandelten Hepatozyten**

Die isolierten Hepatozyten wurden in 48-Lochplatten, welche vorab mit PBS (A) (ct:  $5.246 \pm 1.264$ ; GLQGE:  $6.378 \pm 1.927$ ; GLNGE:  $10.02 \pm 1.484$ ; GLOGE:  $7.432 \pm 1.699$ ) ( $n=8$ ), 10  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen I (B) (ct:  $11.71 \pm 3.096$ ; GLQGE:  $16.29 \pm 3.120$ ; GLNGE:  $18.26 \pm 5.009$ ; GLOGE:  $17.09 \pm 3.380$ ) ( $n=11/9/10/11$ ), 10  $\mu\text{g/ml}$  Fibronectin (C) (ct:  $12.18 \pm 0.6625$ ; GLQGE:  $12.81 \pm 1.256$ ; GLNGE:  $12.69 \pm 0.8091$ ; GLOGE:  $10.89 \pm 1.335$ ) ( $n=7/6/6/6$ ), 10  $\mu\text{g/ml}$  Vitronectin (D) (ct:  $7.747 \pm 0.4800$ ; GLQGE:  $10.34 \pm 2.719$ ; GLNGE:  $8.477 \pm 2.028$ ; GLOGE:  $8.288 \pm 1.210$ ) ( $n=8/7/5/6$ ) oder 0,01% Poly-L-Lysin (E) (ct:  $3.372 \pm 0.2987$ ; GLQGE:  $4.177 \pm 1.031$ ; GLNGE:  $4.189 \pm 0.7085$ ; GLOGE:  $5.026 \pm 0.5870$ ) ( $n=5/5/5/5$ ) beschichtet wurden, ausgesät. Die Behandlung mit den Peptiden erfolgte für 24 Stunden. Mittels eines Luciferase-Assays wurde das biologisch aktive TGF- $\beta$  im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge ermittelt. (\* $p < 0,05$ )



**Abbildung 47: Analyse des gesamten TGF-β-Gehalts in den behandelten Hepatozyten**

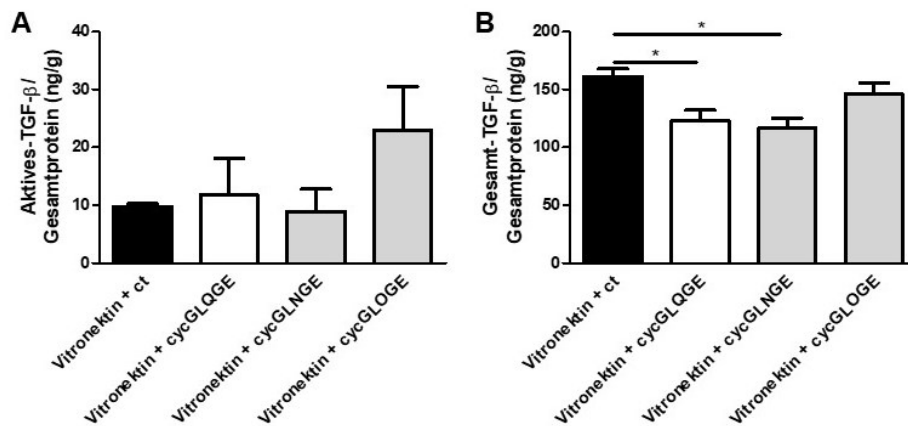
Die isolierten Hepatozyten wurden in 48-Lochplatten, welche vorab mit PBS (A) (ct:  $10.40 \pm 1.678$ ; GLQGE:  $15.94 \pm 5.182$ ; GLNGE:  $14.71 \pm 2.034$ ; GLOGE:  $17.08 \pm 1.660$ ) ( $n=4$ ),  $10 \mu\text{g/ml}$  Kollagen I (B) (ct:  $28.39 \pm 7.082$ ; GLQGE:  $28.75 \pm 7.039$ ; GLNGE:  $30.43 \pm 7.418$ ; GLOGE:  $35.85 \pm 9.046$ ) ( $n=6$ ),  $10 \mu\text{g/ml}$  Fibronectin (C) (ct:  $163.1 \pm 1.886$ ; GLQGE:  $134.1 \pm 5.575$ ; GLNGE:  $125.6 \pm 22.51$ ; GLOGE:  $131.2 \pm 24.55$ ) ( $n=5$ ),  $10 \mu\text{g/ml}$  Vitronectin (D) (ct:  $116.6 \pm 5.123$ ; GLQGE:  $100.8 \pm 8.237$ ; GLNGE:  $100.9 \pm 15.43$ ; GLOGE:  $109.6 \pm 15.20$ ) ( $n=5$ ) oder  $0,01\%$  Poly-L-Lysin (E) (ct:  $124.2 \pm 7.283$ ; GLQGE:  $118.3 \pm 8.986$ ; GLNGE:  $115.3 \pm 19.00$ ; GLOGE:  $113.0 \pm 22.86$ ) ( $n=5$ ) beschichtet wurden, ausgesät. Die Behandlung mit den Peptiden erfolgte für 24 Stunden. Mittels eines Luciferase-Assays wurde das gesamte TGF-β im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge ermittelt. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Peptid GLQGE einen Einfluss auf die TGF-β-Expression hat. Zudem könnte die umgebende Matrix ebenfalls einen Einfluss auf die Wirkung der Peptide nehmen, da die Verminderung des gesamten TGF-β-Gehalts durch das GLQGE nur in mit Vitronectin und Fibronectin beschichteten Vertiefungen gemessen und die Expression von TGF-β nur auf Vitronectin kultivierten Hepatozyten verändert wurde.

### 3.2.3 Die Wirkung der Peptide auf die Produktion von TGF-β in Huh-7-Zellen

Zur Bestätigung, dass die Peptide auch einen Einfluss auf die TGF-β-Produktion in weiteren Leberzellen haben, wurden Zellen aus der Hepatomzelllinie Huh-7 verwendet (2.3.6). Die Zellen wurden in eine mit  $10 \mu\text{g/ml}$  Vitronectin beschichtete 48-Lochplatte ausgesät, mit  $0,05 \text{ mg/ml}$  der Peptide behandelt und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die aktive und die gesamte TGF-β-Proteinmenge in den Huh-7-Zellen untersucht (2.5.7). Dafür wurden die Zellen wie unter 2.5.3 beschrieben

vorbereitet. Die Behandlung mit den Peptiden bewirkte in den Huh-7-Zellen keinen Unterschied in der Menge des aktiven TGF- $\beta$  (Abbildung 48 A). Das gesamte TGF- $\beta$  im Verhältnis zur gesamten Proteinmenge wurde in den auf Vitronektin kultivierten Huh-7-Zellen durch die Behandlung mit den Peptiden cycGLQGE und cycGLNGE vermindert. Das Peptid cycGLOGE zeigte hingegen keine Wirkung auf die Produktion von TGF- $\beta$  (Abbildung 48 B).



**Abbildung 48: Analyse des aktiven und gesamten TGF- $\beta$ -Gehalts in den behandelten Huh-7-Zellen**

Die isolierten Hepatozyten wurden in 48-Lochplatten, welche vorab mit 10  $\mu$ g/ml Vitronektin beschichtet wurden, ausgesät. Die Behandlung mit den Peptiden erfolgte für 24 Stunden. Mittels eines Luciferase-Assays wurde das aktive (A) (Vitronektin + ct:  $9.806 \pm 0.4927$ ; + cycGLQGE:  $14.96 \pm 7.769$ ; + cycGLNGE:  $11.92 \pm 3.410$ ; + cycGLOGE:  $25.68 \pm 9.951$ ) ( $n=3$ ) und gesamte (B) (Vitronektin + ct:  $161.2 \pm 6.805$ ; + cycGLQGE:  $122.9 \pm 9.114$ ; + cycGLNGE:  $116.5 \pm 8.886$ ; + cycGLOGE:  $145.9 \pm 10.17$ ) ( $n=5$ ) TGF- $\beta$  im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge ermittelt. (\* $p < 0,05$ )

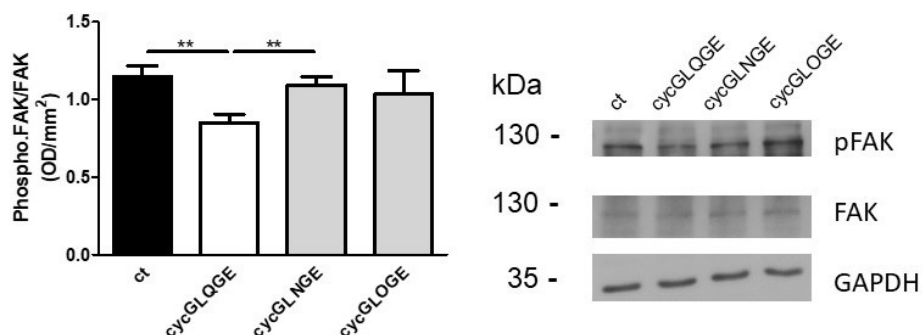
Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Peptide zur Verminderung des Zytokins TGF- $\beta$  verwendet werden könnten.

### 3.2.4 Der Einfluss der Peptide auf Integrin-Signalwege in 3T3-Zellen

Signale aus der Umgebung werden von der Zelle durch eine Bindung von Liganden an Integrine wahrgenommen. Die Integrine leiten die Signale in die Zelle weiter, wobei verschiedene Signalwege aktiviert werden können. Darunter zählen auch Signalwege, welche für die Proliferation und Differenzierung wichtig sind. Das Peptid cycGLQGE bewirkt in Hepatozyten eine verstärkte Phosphorylierung von FAK, welches mit einer verminderten TGF- $\beta$ -Produktion korreliert. Die Aktivierung der Fibroblasten wird direkt über das Zytokin TGF- $\beta$  reguliert und damit einhergehend auch die Matrixproduktion. In hepatischen Sternzellen, konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Inhibierung des FAK-Signalwegs die Differenzierung zu Myofibroblasten vermindert wird und dadurch weniger Matrixproteine gebildet werden (1.3.2). Zur Überprüfung, ob die

Peptide auch einen ähnlichen Einfluss auf verschiedene Integrin-Signalwege in Fibroblasten haben, wurde die fibroblastische 3T3-Zelllinie verwendet. Zunächst wurde die Wirkung der Peptide auf den FAK-Signalweg untersucht, da bereits gezeigt wurde, dass zum einen das Peptid cycGLQGE die Phosphorylierung von FAK in Hepatozyten erhöht und zum anderen der FAK-Signalweg für die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten wichtig ist (1.3.2).

Als erstes wurden Western Blot-Analysen in 3T3-Zellen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in Kulturmedium ohne FCS in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und eine Stunde im Brutschrank kultiviert. Zur Behandlung der Zellen wurden 0,05 mg/ml der cycPeptide hinzugegeben und für 45 Minuten im Brutschrank kultiviert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Proteine wurden extrahiert (2.5.1), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und in einer Western Blot-Analyse (2.5.5.1) mittels spezifischer Antikörper detektiert (2.1.6.1). In Abbildung 49 ist zu sehen, dass durch die Behandlung mit dem cycGLQGE die Phosphorylierung von FAK abgenommen hat im Vergleich zu den unbehandelten oder zu den mit dem cycGLNGE behandelten 3T3-Zellen. Die Behandlung mit den anderen Peptiden cycGLNGE oder cycGLOGE hatte keinen Effekt auf die Phosphorylierung von FAK.

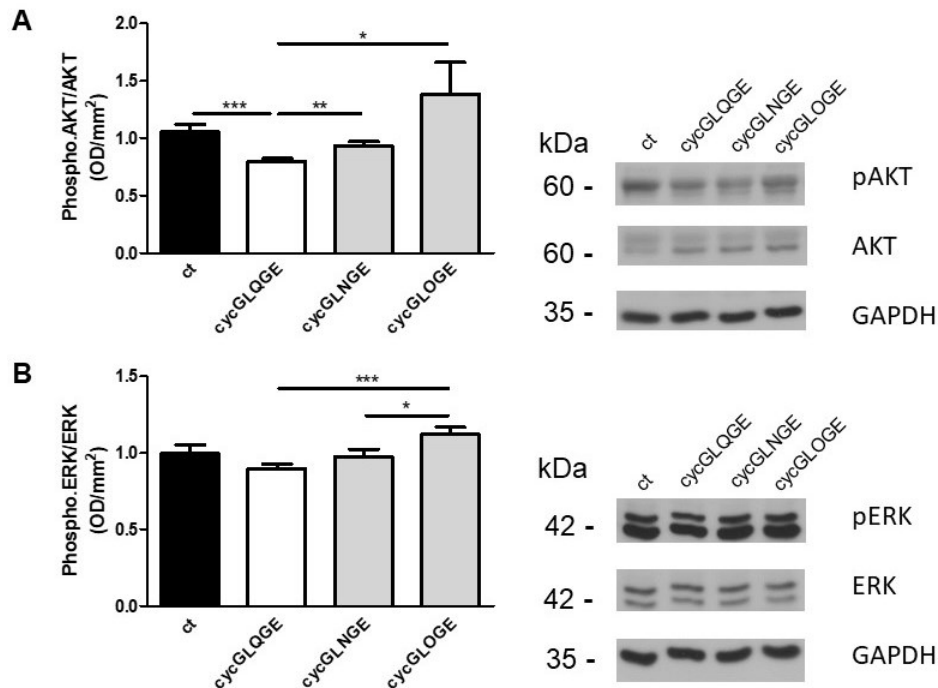


**Abbildung 49: Western Blot-Analyse der Phosphorylierung von FAK in den 3T3-Zellen**

Die unbehandelten und die behandelten Zellen wurden in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für phosphoryliertes FAK (Verdünnung 1:1000), FAK (Verdünnung 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (ct: 1.150 ± 0.06886; cycGLQGE: 0.8516 ± 0.05303; cycGLNGE: 1.094 ± 0.05187; cycGLOGE: 1.036 ± 0.1500) (n=15/15/12/12). (\*\*p<0,01)

Dies zeigt, dass das cycGLQGE den FAK-Signalweg auch in Fibroblasten beeinflusst. Im Folgenden wurde noch die Phosphorylierung der Signalmoleküle AKT und ERK angeschaut. Der Versuchsablauf war dabei identisch zu den Versuchen mit FAK. Auch die Phosphorylierung von AKT wurde durch die Behandlung mit dem cycGLQGE signifikant vermindert im Vergleich zu den unbehandelten oder zu den mit dem cycGLNGE oder cycGLOGE behandelten 3T3-Zellen (Abbildung 50 A). Im Gegensatz

dazu hatte weder das cycGLQGE, das cycGLNGE noch das cycGLOGE einen Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK in den 3T3-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten 3T3-Zellen. Durch die Behandlung mit dem cycGLQGE oder dem cycGLNGE wurde jedoch die Phosphorylierung von ERK vermindert im Vergleich zu der Behandlung mit dem cycGLOGE (Abbildung 50 B).



**Abbildung 50: Western Blot-Analyse der Phosphorylierung von AKT und ERK in den 3T3-Zellen**

Die unbehandelten und die behandelten Zellen wurden in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für phosphoryliertes und nicht phosphoryliertes AKT (Verdünnung 1:1000) (A) (ct: 1.053 ± 0.06712; cycGLQGE: 0.8004 ± 0.02174; cycGLNGE: 0.9317 ± 0.03822; cycGLOGE: 1.381 ± 0.2797) (n=20/21/20/20) sowie für phosphoryliertes und nicht phosphoryliertes ERK (Verdünnung 1:1000) (B) (ct: 0.9929 ± 0.06079; cycGLQGE: 0.8935 ± 0.03284; cycGLNGE: 0.9729 ± 0.04890; cycGLOGE: 1.121 ± 0.04761) (n=24/24/20/20) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot. (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

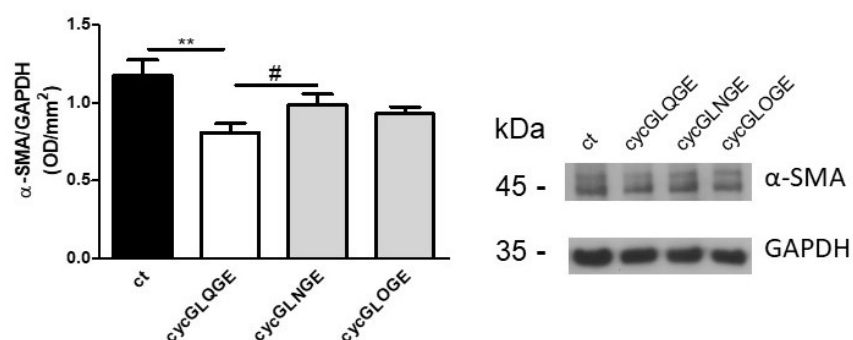
Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass cycGLQGE einen Einfluss auf den FAK- und AKT-Signalweg hat.

### 3.2.5 Verminderte Differenzierung der 3T3-Zellen durch das cycGLQGE

Die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten wird in der Leber unter anderem von der Phosphorylierung von FAK reguliert (1.3.2). Die Behandlung der Fibroblasten aus der 3T3-Zelllinie mit dem cycGLQGE führt zu einer verminderten Phosphorylierung von FAK, wodurch möglicherweise die Differenzierung zu Myofibroblasten inhibiert wird. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Western



Blot-Analysen mit den 3T3-Zellen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in eine 48-Lochplatte ausgesät, mit 0,05 mg/ml der cycPeptide behandelt und für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Proteine wurden extrahiert (2.5.1), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und in einer Western Blot-Analyse (2.5.5.1) mittels spezifischer Antikörper detektiert (2.1.6.1). Das cycGLQGE bewirkte eine Verminderung des Myofibroblastenmarkers  $\alpha$ -SMA im Vergleich zu unbehandelten Zellen, sowie eine verringerte Tendenz im Vergleich zu den mit dem cycGLNGE behandelten 3T3-Zellen (Abbildung 51). Die Behandlung mit dem cycGLNGE oder cycGLOGE zeigte keinen Einfluss auf die  $\alpha$ -SMA-Produktion.



**Abbildung 51: Western Blot-Analyse der Proteinmenge von  $\alpha$ -SMA in den 3T3-Zellen**

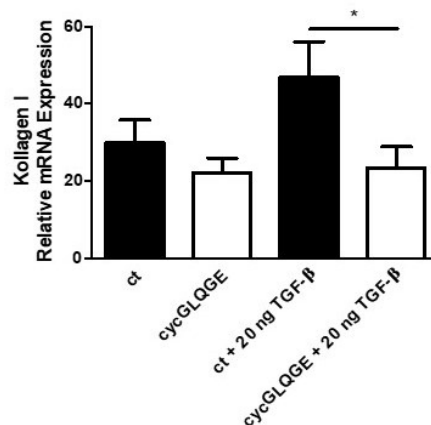
Die unbehandelten und die behandelten Zellen wurden in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für  $\alpha$ -SMA (Verdünnung 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (ct: 1.176 ± 0.1011; cycGLQGE: 0.8065 ± 0.06052; cycGLNGE: 0.9865 ± 0.06983; cycGLOGE: 0.9281 ± 0.04597) (n=15/16/15/15). (#p<0,1; \*\*p<0,01)

Somit scheint das cycGLQGE die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten verringern zu können, welches in Zusammenhang mit der Phosphorylierung von FAK stehen könnte.

### 3.2.6 Das cycGLQGE beeinflusst die Produktion von Matrixproteinen in 3T3-Zellen

Die verminderte Phosphorylierung von FAK in den Fibroblasten und damit einhergehend die Inhibierung der Differenzierung zu Myofibroblasten, könnte die Expression von Matrixproteinen direkt beeinflussen. Zur Überprüfung, ob ein direkter Zusammenhang besteht, wurde zunächst die Expression von Kollagen I in unbehandelten, mit Peptiden behandelten, in unbehandelten + mit TGF- $\beta$  stimulierten und mit Peptiden behandelten + mit TGF- $\beta$  stimulierten Zellen analysiert. Dafür wurden die Zellen in eine 48-Lochplatte ausgesät. Nach zwei Stunden wurden die Zellen mit 0,05 mg/ml cycGLQGE behandelt und nach drei Stunden mit 20 ng TGF- $\beta$  stimuliert.

Nach einer Inkubationszeit von 15 Stunden erfolgte eine erneute Behandlung sowie nach 16 Stunden eine erneute Stimulation. Nach 24 Stunden wurde die RNA aus den Zellen isoliert (3.3.2) und in cDNA mit Oligonukleotiden umgeschrieben (2.4.3). Die Expression von Kollagen I wurde mit spezifischen Primern gemessen (2.4.6; 2.1.7.2). Die qRT-PCR-Analysen ergaben eine Verringerung der Kollagen I-Expression bei der Behandlung mit dem cycGLQGE und der gleichzeitigen Stimulation mit dem profibrotischen Zytokin TGF- $\beta$  im Vergleich zu den unbehandelten aber stimulierten Zellen. Eine Behandlung mit dem cycGLQGE ohne eine Stimulation mit TGF- $\beta$  führte zu keiner Veränderung in der Expression von Kollagen I im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abbildung 52).

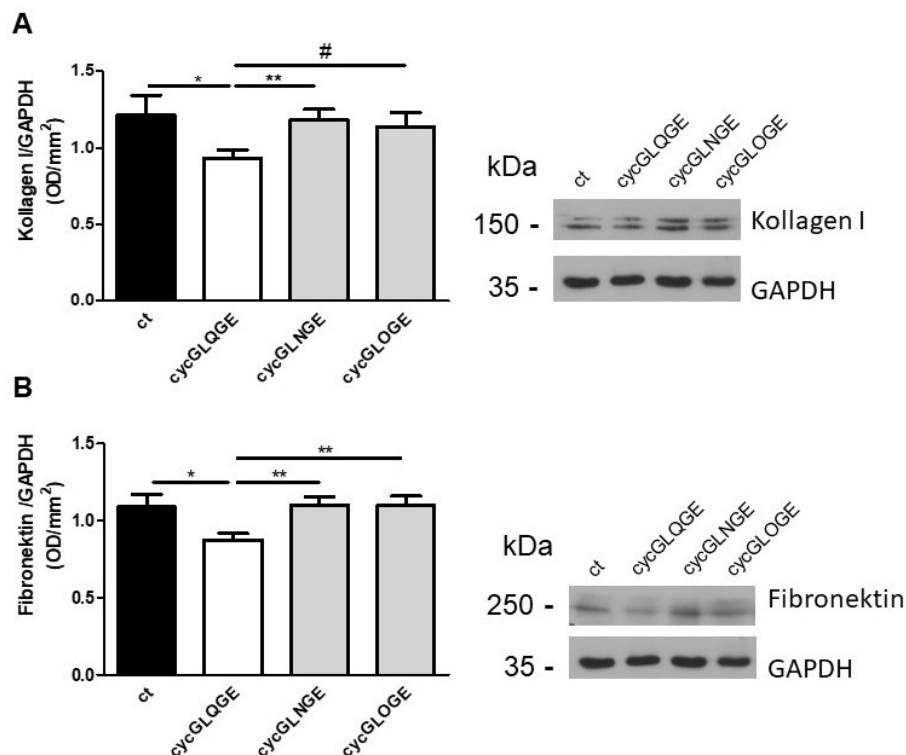


**Abbildung 52: Relative mRNA-Expression von Kollagen I in 3T3-Zellen**

Die 3T3-Zellen wurden mit dem Kulturmedium (ct) oder mit Kulturmedium mit cycGLQGE (cycGLQGE) für eine Stunde inkubiert. Es folgte bei der Hälfte der Zellen eine Stimulation mit 20 ng TGF- $\beta$  (ct + 20 ng TGF- $\beta$ /cycGLQGE + 20 ng TGF- $\beta$ ). Die Behandlung sowie die Stimulation wurden nach 15 Stunden wiederholt. Nach 24 Stunden wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR-Analysen wurde mit spezifischen Oligonukleotiden die Expression von Kollagen I analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionen von Kollagen I im Verhältnis zu HPRT (ct:  $29.89 \pm 5.865$ ; cycGLQGE:  $22.20 \pm 3.785$ ; ct + 20 ng TGF- $\beta$ :  $46.98 \pm 9.121$ ; cycGLQGE + 20 ng TGF- $\beta$ :  $23.43 \pm 5.455$ ) (n=14). (\*p<0,05)

In Western Blot-Analysen wurde der Effekt von cycGLQGE auf die Produktion von Kollagen I und Fibronectin in den 3T3-Zellen überprüft. Dafür wurden die Zellen in eine 48-Lochplatte ausgesät und mit 0,05 mg/ml der cycPeptiden für 24 Stunden behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Proteine wurden extrahiert (2.5.1), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und in einer Western Blot-Analyse (2.5.5.1) mittels spezifischer Antikörper detektiert (2.1.6.1). Die Western Blot-Analysen zeigten, dass durch die Behandlung mit dem cycGLQGE sowohl die Kollagen I-, (Abbildung 53 A) als auch die Fibronectin-Proteinmenge (Abbildung 53 B) in den 3T3-Zellen vermindert war im Vergleich zu den unbehandelten oder zu den mit dem cycGLNGE behandelten Zellen. Im Vergleich zu den mit dem cycGLOGE behandelten

Zellen zeigte die Behandlung mit dem cycGLQGE bei Kollagen I einen Trend und bei Fibronectin eine Verminderung der Proteinmenge.

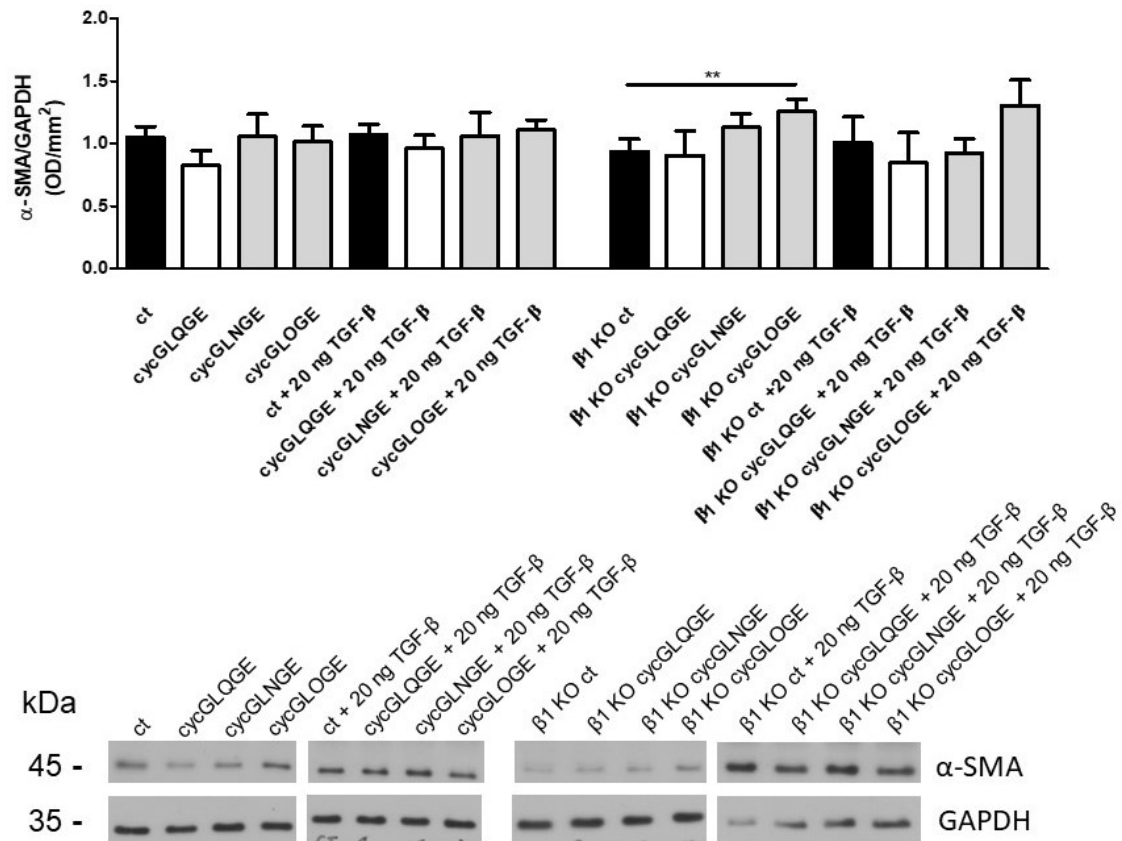


**Abbildung 53: Western Blot-Analyse der Proteinmenge von Kollagen I und Fibronectin in den 3T3-Zellen**  
 Die 24 h unbehandelten und behandelten Zellen wurden in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für Kollagen I (A) (ct: 1.212 ± 0.1302; cycGLQGE: 0.9312 ± 0.05315; cycGLNGE: 1.179 ± 0.07168; cycGLOGE: 1.138 ± 0.09426) (n=60/59/56/59) (Verdünnung 1:4000), Fibronectin (B) (ct: 1.088 ± 0.08261; cycGLQGE: 0.8762 ± 0.04238; cycGLNGE: 1.101 ± 0.05285; cycGLOGE: 1.096 ± 0.06329) (n=56/56/52/57) (Verdünnung 1:5000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot. (#p<0,1; \*p<0,05; \*\*p<0,01)

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das cycGLQGE eine direkte Wirkung auf Fibroblasten haben könnte und dabei die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen reguliert.

3.2.7 Der Einfluss von cycGLQGE auf die Produktion von  $\alpha$ -SMA in MC3T3-E1-Zellen  
 In der Fibroblasten-3T3-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass das cycGLQGE die Differenzierung zu Myofibroblasten vermindert, wodurch weniger Kollagen und Fibronectin gebildet wurde. Zur Kontrolle, ob das cycGLQGE auch auf andere Kollagen-produzierende Zellen einen Einfluss ausübt, wurden MC3T3-E1-Zellen wie unter 2.3.5 beschrieben in Kultur genommen. Carla Sens konnte im Rahmen ihrer Doktorarbeit das Integrin- $\beta$ 1 in diesen Zellen mittels lentiviraler Partikel und shRNA

ausschalten (Sens 2017). Für die Experimente wurde eine Zelllinie ohne einen Knockout sowie eine Zelllinie mit einem Integrin- $\beta$ 1-Knockout verwendet. Zunächst wurde die Expression von  $\alpha$ -SMA in unbehandelten, mit Peptiden behandelten, in unbehandelten + mit TGF- $\beta$  stimulierten und behandelten + mit TGF- $\beta$  stimulierten Zellen analysiert. Dafür wurden die Zellen in eine 48-Lochplatte ausgesät. Nach zwei Stunden wurden die Zellen mit 0,05 mg/ml cycGLQGE behandelt und nach drei Stunden mit 20 ng TGF- $\beta$  stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Stunden erfolgte eine erneute Behandlung sowie nach 16 Stunden eine erneute Stimulation. Nach 24 Stunden wurden die Proteine extrahiert (2.5.1), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und in einer Western Blot-Analyse (2.5.5.1) mittels spezifischer Antikörper detektiert (2.1.6.1). Die Proteinmenge von  $\alpha$ -SMA blieb in den MC3T3-E1-Zellen, ohne und mit gleichzeitiger TGF- $\beta$  Stimulation, mit der Behandlung von cycGLQGE oder cycGLNGE unverändert. Auch in den Integrin- $\beta$ 1-KO-MC3T3-E1-Zellen, ohne und mit gleichzeitiger TGF- $\beta$  Stimulation, war kein Unterschied in der Proteinmenge von  $\alpha$ -SMA bei der Behandlung mit dem cycGLQGE oder cycGLNGE festzustellen (Abbildung 54). Die Behandlung mit dem cycGLOGE zeigte ebenfalls keine verminderte  $\alpha$ -SMA-Produktion bei den mit TGF- $\beta$  stimulierten Zellen. Die Proteinmenge von  $\alpha$ -SMA wurde sogar durch die Behandlung mit dem cycGLOGE im Vergleich zu unbehandelten Integrin- $\beta$ 1-KO-MC3T3-E1-Zellen erhöht.



**Abbildung 54: Western Blot-Analyse der Proteinmenge von  $\alpha$ -SMA in den MC3T3-E1-Zellen**

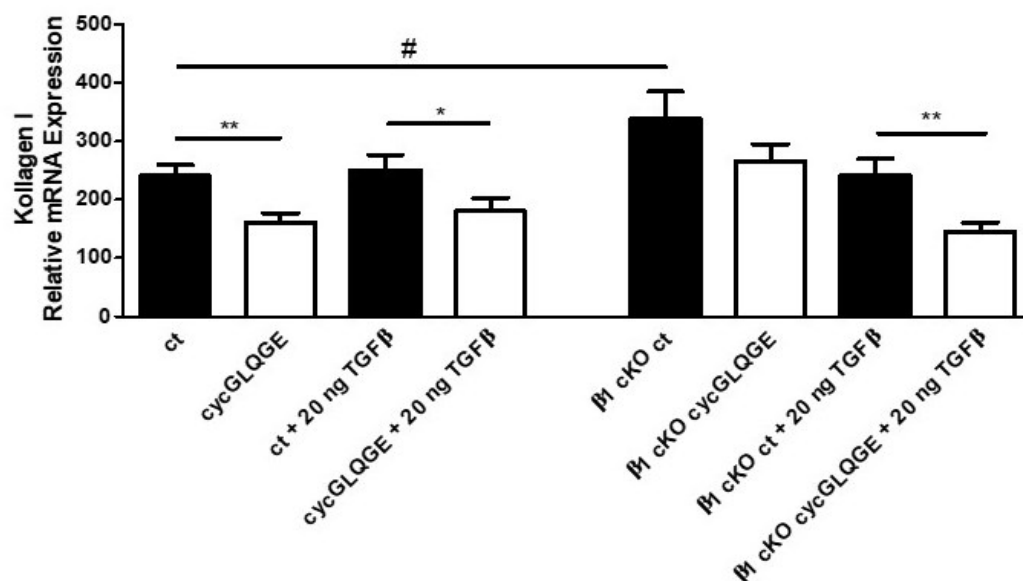
Die unbehandelten und die behandelten Zellen wurden in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für  $\alpha$ -SMA (Verdünnung 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (ct:  $1.049 \pm 0.08758$ ; cycGLQGE:  $0.8262 \pm 0.1196$ ; cycGLNGE:  $1.056 \pm 0.1802$ ; cycGLOGE:  $1.017 \pm 0.1253$ ; ct + 20 ng TGF- $\beta$ :  $1.076 \pm 0.07851$ ; cycGLQGE + 20 ng TGF- $\beta$ :  $0.9608 \pm 0.1054$ ; cycGLNGE + 20 ng TGF- $\beta$ :  $1.057 \pm 0.1920$ ; cycGLOGE + 20 ng TGF- $\beta$ :  $1.111 \pm 0.08071$ ;  $\beta$ 1 cKO ct:  $0.9394 \pm 0.09886$ ;  $\beta$ 1 cKO cycGLQGE:  $0.9077 \pm 0.1930$ ;  $\beta$ 1 cKO cycGLNGE:  $1.130 \pm 0.1099$ ;  $\beta$ 1 cKO cycGLOGE:  $1.257 \pm 0.09904$ ;  $\beta$ 1 cKO ct + 20 ng TGF- $\beta$ :  $1.007 \pm 0.2067$ ;  $\beta$ 1 cKO cycGLQGE + 20 ng TGF- $\beta$ :  $0.8483 \pm 0.2396$ ;  $\beta$ 1 cKO cycGLNGE:  $0.9201 \pm 0.1162$ ;  $\beta$ 1 cKO cycGLOGE:  $1.307 \pm 0.2053$ ) (n=8). (\*\*p<0,01)

Somit könnte das cycGLQGE lediglich in 3T3-Fibroblasten eine Wirkung auf die Differenzierung haben und nicht noch auf andere Kollagen-produzierende Zellen, wobei das cycGLOGE eventuell einen Einfluss auf die MC3T3-E1-Zellen haben könnte.

### 3.2.8 Die Wirkung von cycGLQGE auf die Produktion von Kollagen I in den MC3T3-E1-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Peptide doch einen Einfluss auf die Expression von Kollagen I in den MC3T3-E1-Zellen haben könnten, wurden qRT-PCR-Analysen und Western Blot-Analysen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in eine 48-Lochplatte ausgesät. Nach zwei Stunden wurden die Zellen mit 0,05 mg/ml cycGLQGE behandelt und nach

drei Stunden mit 20 ng TGF- $\beta$  stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Stunden erfolgte eine erneute Behandlung sowie nach 16 Stunden eine erneute Stimulation. Nach 24 Stunden wurde die RNA aus den Zellen isoliert (2.4.2) und in cDNA mit Oligonukleotiden umgeschrieben (2.4.3). Die Expression von Kollagen I wurde mit spezifischen Primern gemessen (2.4.6; 2.1.7.2). Die relative mRNA-Expression von Kollagen I wurde sowohl ohne als auch mit TGF- $\beta$  Stimulation mit dem cycGLQGE vermindert im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-MC3T3-E1-Zellen (linke Hälfte des Graphen in Abbildung 55). Im Vergleich dazu, verringerte das cycGLQGE in den Integrin- $\beta$ 1-KO-MC3T3-E1-Zellen die Kollagen I-Expression nur bei einer gleichzeitigen Stimulation mit TGF- $\beta$  (rechte Hälfte des Graphen in Abbildung 55). Die Ausschaltung des Integrin- $\beta$ 1 zeigte zudem eine erhöhte Tendenz der Kollagen I-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen mit Integrin- $\beta$ 1-Expression. Zudem bewirkt das cycGLQGE eine verminderte Expression von Kollagen I in den MC3T3-E1-Zellen, wobei die Ausschaltung des Integrin- $\beta$ 1 diesen Effekt aufhob.

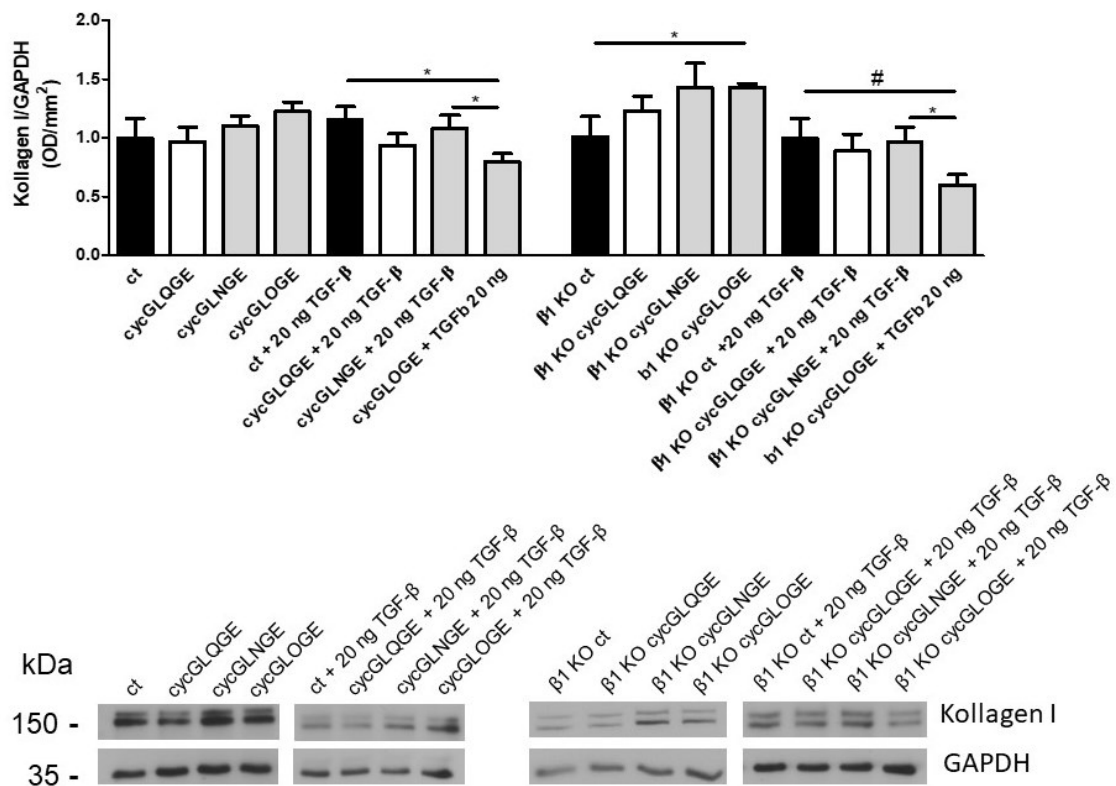


**Abbildung 55: Relative mRNA-Expression von Kollagen I in MC3T3-E1-Zellen**

Die MC3T3-E1-Zellen wurden mit dem Kulturmedium (ct) oder mit Kulturmedium mit cycGLQGE (cycGLQGE) für eine Stunde inkubiert. Es folgte bei der Hälfte der Zellen eine Stimulation mit 20 ng TGF- $\beta$  (ct + 20 ng TGF- $\beta$ /cycGLQGE + 20 ng TGF- $\beta$ ). Die Behandlung sowie die Stimulation wurden nach 15 Stunden wiederholt. Nach 24 Stunden wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR-Analysen wurde mit spezifischen Oligonukleotiden die Expression von Kollagen I analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionen von Kollagen I im Verhältnis zu HPRT (ct:  $240.5 \pm 19.20$ ; cycGLQGE:  $161.1 \pm 16.34$ ; ct + 20 ng TGF- $\beta$ :  $251.1 \pm 26.27$ ; cycGLQGE + 20 ng TGF- $\beta$ :  $180.9 \pm 22.09$ ;  $\beta$ 1 cKO ct:  $338.4 \pm 47.24$ ;  $\beta$ 1 cKO cycGLQGE:  $265.8 \pm 29.50$ ;  $\beta$ 1 cKO ct + 20 ng TGF- $\beta$ :  $240.6 \pm 29.67$ ;  $\beta$ 1 cKO cycGLQGE + 20 ng TGF- $\beta$ :  $145.4 \pm 16.23$ ) (n=24/20/21/20/24/19/20/21). (#p<0,1; \*p<0,05; \*\*p<0,01)

Die Produktion von Kollagen I wurde zudem in Western Blot-Analysen überprüft. Dafür wurden die Zellen in eine 48-Lochplatte ausgesät und mit 0,05 mg/ml der cycPeptide behandelt. Es folgten die gleichen Behandlungs- und Stimulationszeiten wie für die

qRT-PCR-Analysen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Proteine wurden extrahiert (2.5.1), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und in einer Western Blot-Analyse (2.5.5.1) mittels spezifischer Antikörper detektiert (2.1.6.1). Die Western Blot-Analysen zeigten im Gegensatz zur den qRT-PCR-Analysen keine Unterschiede in der Kollagen I-Produktion bei der Behandlung mit dem cycGLQGE oder mit dem cycGLNGE im Vergleich zu den unbehandelten MC3T3-E1-Zellen. Auch in den Integrin- $\beta$ 1-KO-MC3T3-E1-Zellen hatten weder das cycGLQGE noch das cycGLNGE einen Effekt auf die Kollagen I-Proteinmenge im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abbildung 56). Das Peptid cycGLOGE verringerte die Proteinmenge von Kollagen I bei einer gleichzeitigen Stimulation mit TGF- $\beta$  sowohl in den MC3T3-E1-, als auch in den Integrin- $\beta$ 1-KO-MC3T3-E1-Zellen im Vergleich zu mit dem cycGLNGE behandelten Zellen. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen zeigte die Behandlung mit dem cycGLOGE bei den Integrin- $\beta$ 1-KO-MC3T3-E1-Zellen einen Trend und bei den MC3T3-E1-Zellen eine Verminderung der Kollagen I-Proteinmenge bei gleichzeitiger Stimulation mit TGF- $\beta$ . Ohne die Stimulation mit TGF- $\beta$  erhöhte das cycGLOGE die Proteinmenge von Kollagen I in den Integrin- $\beta$ 1-KO-MC3T3-E1-Zellen.



**Abbildung 56: Western Blot-Analyse der Proteinmenge von Kollagen I in den MC3T3-E1-Zellen**

Die unbehandelten und die behandelten Zellen wurden in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für Kollagen I (Verdünnung 1:4000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist ein

repräsentativer Western Blot (ct:  $0.9975 \pm 0.1675$ ; cycGLQGE:  $0.9686 \pm 0.1222$ ; cycGLNGE:  $1.100 \pm 0.08694$ ; cycGLOGE:  $1.226 \pm 0.07776$ ; ct + 20 ng TGF- $\beta$ :  $1.154 \pm 0.1126$ ; cycGLQGE + 20 ng TGF- $\beta$ :  $0.9357 \pm 0.09966$ ; cycGLNGE + 20 ng TGF- $\beta$ :  $1.083 \pm 0.1096$ ; cycGLOGE + 20 ng TGF- $\beta$ :  $0.7974 \pm 0.07181$ ;  $\beta$ 1 cKO ct:  $1.013 \pm 0.1718$ ;  $\beta$ 1 cKO cycGLQGE:  $1.232 \pm 0.1209$ ;  $\beta$ 1 cKO cycGLNGE:  $1.428 \pm 0.2054$ ;  $\beta$ 1 cKO cycGLOGE:  $1.430 \pm 0.03171$ ;  $\beta$ 1 cKO ct + 20 ng TGF- $\beta$ :  $0.9988 \pm 0.1646$ ;  $\beta$ 1 cKO cycGLQGE + 20 ng TGF- $\beta$ :  $0.8877 \pm 0.1445$ ;  $\beta$ 1 cKO cycGLNGE:  $0.9679 \pm 0.1216$ ;  $\beta$ 1 cKO cycGLOGE:  $0.6029 \pm 0.08662$ ) (n=8). (#p<0,1; \*p<0,05)

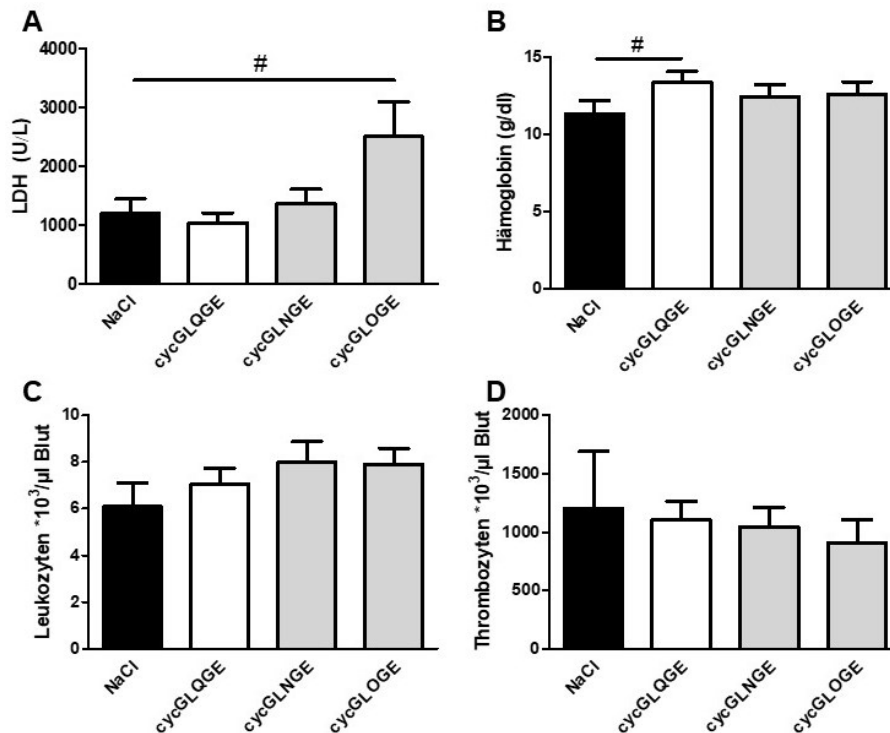
Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das cycGLQGE einen Einfluss auf die Kollagen I-Expression in den MC3T3-E1-Zellen hat, wobei die Proteinmenge aber nach 24 Stunden unverändert blieb. Das cycGLOGE hatte bei einer gleichzeitigen Stimulation mit TGF- $\beta$  einen Einfluss auf die Produktion von Kollagen I, wobei der Integrin- $\beta$ 1-KO keinen Unterschied ausmachte.

### 3.2.9 Auswirkung der Peptide auf gesunde Mäuse

Die *in vitro* Daten zeigten, dass das Peptid GLQGE einen direkten Einfluss auf die TGF- $\beta$ -Expression in Hepatozyten hatte, vermutlich indem es die Phosphorylierung von FAK erhöhte. Zusätzlich verringerte das Peptid die Phosphorylierung von FAK in Fibroblasten, was mit einer Inhibierung der Differenzierung zu Myofibroblasten einherging und weniger Matrixproteine wurden gebildet. Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die Peptide einen ähnlichen Einfluss auf eine Fibrose haben könnten und als mögliche pharmakologische Substanz für eine Behandlung einer Fibrose in Frage kommen. Um eine toxische Reaktion auszuschließen, wurden die Peptide vorab in gesunde Mäuse injiziert. Dafür wurde den Mäusen 10 Tage lang 0,5 mg der Peptide und als Kontrolle NaCl injiziert (2.2.6). Am Ende des Versuchs wurden die Tiere versuchsbedingt getötet und die Proben entnommen (2.2.7). Um eine toxische Reaktion zu erkennen, wurde der LDH-Wert, welcher auf eine Zellschädigung hindeuten würde, der Hämoglobin-Wert, was einen Rückschluss auf die Sauerstoffversorgung gibt, die Leukozyten-Anzahl, welche einen Aufschluss über Entzündungsreaktionen gibt, und die Thrombozyten-Anzahl, welche eine Rolle bei der Blutstillung spielen, untersucht. In Abbildung 57 sind die Blutwerte der behandelten Mäuse zu sehen. Die Behandlung mit dem cycGLOGE führte zu einem erhöhten Trend des LDH-Wertes im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Mäuse. Das cycGLNGE und das cycGLQGE zeigten keinen Unterschied in den LDH-Werten (Abbildung 57 A). Das cycGLQGE bewirkte eine tendenzielle Erhöhung von Hämoglobin im Blut im Vergleich zu den Kontrollmäusen, wobei das cycGLNGE und cycGLOGE keinen Einfluss auf den Hämoglobin-Wert hatten (Abbildung 57 B). Alle drei Peptide zeigten



keinen Effekt auf die Anzahl der Leukozyten (Abbildung 57 C) oder der Thrombozyten (Abbildung 57 D).



**Abbildung 57: Blutplasmawerte von LDH (A), Hämoglobin (B), Leukozyten (C) und Thrombozyten (D) in den Versuchsmäusen**

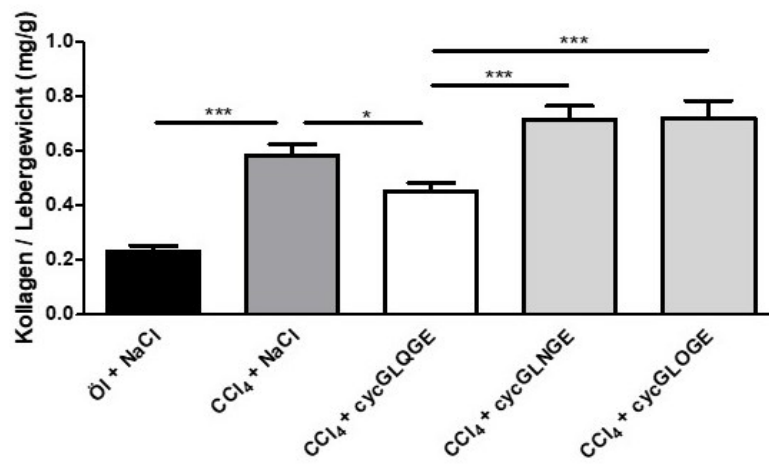
Das Blut und das Blutplasma wurde aus den Versuchsmäusen isoliert und eigenständig oder im Analysezentrum des Universitätsklinikums Heidelberg gemessen. Die LDH- (A) (NaCl:  $1190 \pm 252.8$ ; cycGLQGE:  $1027 \pm 176.5$ ; cycGLNGE:  $1360 \pm 247.3$ ; cycGLOGE:  $2506 \pm 596.9$ ) ( $n=10/10/10/10$ ), Hämoglobin- (B) (NaCl:  $11.32 \pm 0.8335$ ; cycGLQGE:  $13.36 \pm 0.6808$ ; cycGLNGE:  $12.42 \pm 0.7588$ ; cycGLOGE:  $12.57 \pm 0.8122$ ) ( $n=10/9/10/10$ ), Leukozyten- (C) (NaCl:  $6.100 \pm 0.9930$ ; cycGLQGE:  $7.055 \pm 0.6709$ ; cycGLNGE:  $7.987 \pm 0.8812$ ; cycGLOGE:  $7.909 \pm 0.6692$ ) ( $n=10/9/10/10$ ) und Thrombozyten-Wert (D) (NaCl:  $1130 \pm 443.7$ ; cycGLQGE:  $1103 \pm 159.6$ ; cycGLNGE:  $962.9 \pm 170.2$ ; cycGLOGE:  $924.0 \pm 177.9$ ) ( $n=10/9/10/10$ ) wurden gemessen und ausgewertet. ( $\#p < 0,1$ )

Somit könnten die Peptide für eine pharmakologische Behandlung in Frage kommen, da keine akute toxische Reaktion in gesunden Mäusen zu beobachten war.

### 3.2.10 Der Einfluss der Peptide auf die Matrix in der Leberfibrose

Da die Peptide keine toxischen Reaktionen hervorgerufen haben und die *in vitro* Daten auf eine mögliche pharmakologische Wirkung hindeuten, sollte im nächsten Schritt die Behandlung *in vivo* auf eine Fibrose untersucht werden. Dafür wurde das CCl<sub>4</sub>-Modell für eine Induktion einer Leberfibrose in Mäusen verwendet, wobei den Mäusen über einen Zeitraum von 42 Tagen drei Mal pro Woche CCl<sub>4</sub> injiziert wurde (2.2.4). Parallel wurden Kontrolltiere mit Öl, dem Verdünnungsmittel von CCl<sub>4</sub>, injiziert. Die Behandlung der Mäuse mit den Peptiden erfolgte in den letzten 10 Tagen der Leberfibrose, wobei den Mäusen 0,5 mg der Peptide oder als Kontrolle NaCl injiziert wurde (2.2.6). Am

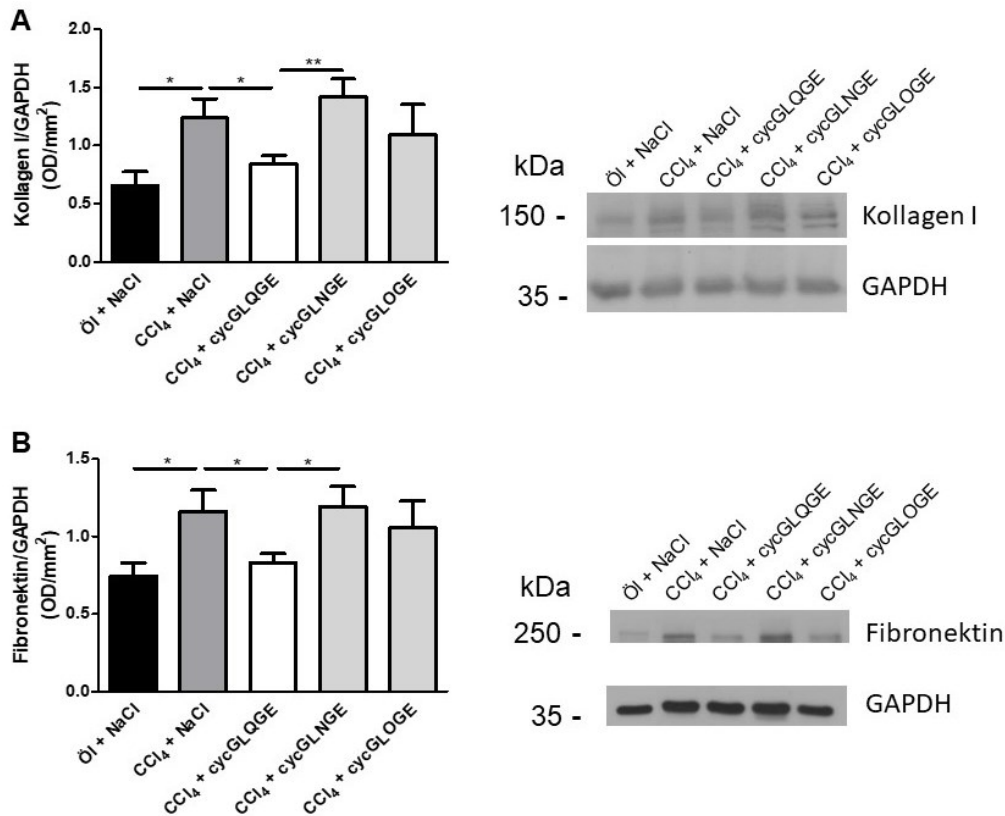
Ende des Versuchs wurden die Tiere versuchsbedingt getötet und die Proben entnommen (2.2.7). Die Kollagenmenge in den Lebern wurde mittels einer biochemischen Analyse untersucht (2.5.8). Die biochemische Analyse (Abbildung 58) zeigte eine Erhöhung der Kollagenmenge in den Lebern der CCl<sub>4</sub>-injizierten Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen, welche Öl injiziert bekommen haben. Die Kollagenmenge in den Lebern der mit cycGLQGE behandelten Mäusen war im Vergleich zu den mit cycGLNGE, cycGLOGE oder mit NaCl behandelten Mäusen vermindert.



**Abbildung 58: Biochemische Analyse des Kollagengehalts in Lebern der Mäuse im CCl<sub>4</sub>-Modell**

Die Injektion der Chemikalie CCl<sub>4</sub> führt in den Mäusen zu einer Leberfibrose. In den letzten 10 Tagen des Versuchs wurden die Mäuse entweder mit zyklisierten Peptiden oder mit NaCl als Kontrolle behandelt. Nach 6 Wochen wurden die Mäuse versuchsbedingt getötet und die Proben entnommen. Die Kollagenmenge der Lebern der Versuchsmäuse wurde in einer biochemischen Analyse und im Verhältnis zum Lebergewicht bestimmt (Öl + NaCl: 0.2331 ± 0.02020; CCl<sub>4</sub> + NaCl: 0.5831 ± 0.04244; CCl<sub>4</sub> + cycGLQGE: 0.4531 ± 0.03049; CCl<sub>4</sub> + cycGLNGE: 0.7172 ± 0.04735; CCl<sub>4</sub> + cycGLOGE: 0.7201 ± 0.06567) (n=36/36/43/40/30). (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001)

Darüber hinaus wurden Kollagen I und Fibronectin zusätzlich in einzelnen Lebern mittels Western Blots-Analysen überprüft (2.5.5.1). Dafür wurden die Proteine aus einem kleinen Stück Leber extrahiert (2.5.2), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (2.5.5.1). Das Kollagen I und Fibronectin wurden mittels spezifischer Antikörper detektiert (2.1.6.1). Auch die Western Blot-Analyse ergab eine Erhöhung von Kollagen I (Abbildung 59 A) und Fibronectin (Abbildung 59 B) durch die Injektion von CCl<sub>4</sub> im Vergleich zur Injektion mit Öl. Die Behandlung von cycGLQGE führte zu einer Verringerung von Kollagen I und Fibronectin in den Lebern im Vergleich zu den Lebern der Mäuse, welche mit NaCl oder mit cycGLNGE behandelt wurden. Die Behandlung mit dem cycGLOGE zeigte keinen Unterschied im Western Blot im Vergleich zu der Behandlung mit dem cycGLQGE.



**Abbildung 59: Western Blot-Analyse von Kollagen I und Fibronectin in den Lebern der Mäuse im CCl<sub>4</sub>-Modell**

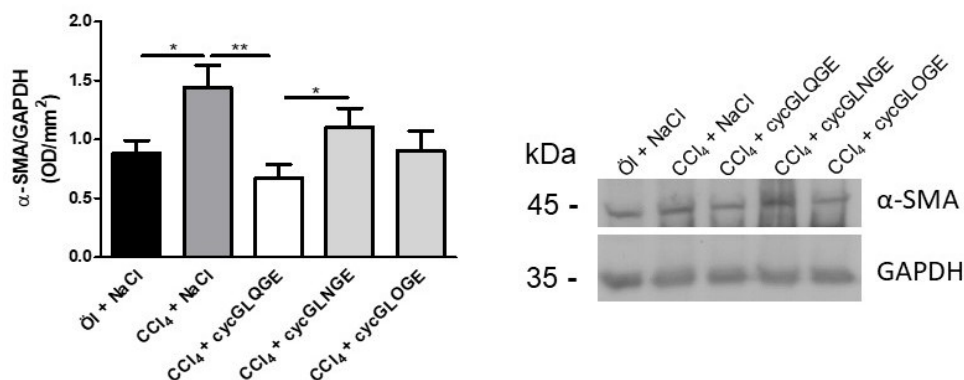
Ein kleines Stück der isolierten Lebern der Versuchstiere wurde in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für Kollagen I (Verdünnung 1:4000) (A) (Ö1 + NaCl: 0.6585 ± 0.1176; CCl<sub>4</sub> + NaCl: 1.237 ± 0.1632; CCl<sub>4</sub> + cycGLQGE: 0.8425 ± 0.07201; CCl<sub>4</sub> + cycGLNGE: 1.421 ± 0.1519; CCl<sub>4</sub> + cycGLOGE: 1.096 ± 0.2563) (n=8), Fibronectin (Verdünnung 1:5000) (B) (Ö1 + NaCl: 0.7443 ± 0.08655; CCl<sub>4</sub> + NaCl: 1.161 ± 0.1375; CCl<sub>4</sub> + cycGLQGE: 0.8279 ± 0.06262; CCl<sub>4</sub> + cycGLNGE: 1.193 ± 0.1292; CCl<sub>4</sub> + cycGLOGE: 1.056 ± 0.1721) (n=11/8/12/12/12) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt sind jeweils ein repräsentativer Western Blot. (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Peptid cycGLQGE die Fibronectin- und Kollagenmenge auch *in vivo* in einer Leberfibrose vermindert.

### 3.2.11 Verminderung des Myofibroblastenmarkers $\alpha$ -SMA durch cycGLQGE in der Leberfibrose

Die verringerte Matrixakkumulation könnte auf eine verminderte Aktivierung der Myofibroblasten hindeuten. Da das Peptid cycGLQGE *in vitro* bereits gezeigt hat, dass es die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten inhibieren kann, ist ein vergleichbarer Effekt auch *in vivo* denkbar. Daher wurde der Myofibroblastenmarker  $\alpha$ -SMA in den Lebern der Versuchstiere in Western Blot-Analysen kontrolliert. (2.5.5.1). Dafür wurden die Proteine aus einem kleinen Stück Leber extrahiert (2.5.2), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und auf eine

Nitrozellulosemembran transferiert (2.5.5.1). Das Protein  $\alpha$ -SMA wurde mit spezifischen Antikörpern detektiert (2.1.6.1). Abbildung 60 zeigt, dass die Injektion von  $\text{CCl}_4$  eine Erhöhung der Proteinmenge des Myofibroblastenmarkers  $\alpha$ -SMA in den Lebern zu Folge hatte im Vergleich zu den Öl-injizierten Lebern. Die Behandlung mit dem cycGLQGE verringerte die Proteinmenge von  $\alpha$ -SMA in den Lebern im Vergleich zu den mit cycGLNGE oder mit NaCl behandelten Mäusen. Die Behandlung mit dem cycGLOGE zeigte keinen Unterschied im Western Blot im Vergleich zu der Behandlung mit dem cycGLQGE.



**Abbildung 60: Western Blot-Analyse von  $\alpha$ -SMA in den Lebern der Mäuse im  $\text{CCl}_4$ -Modell**

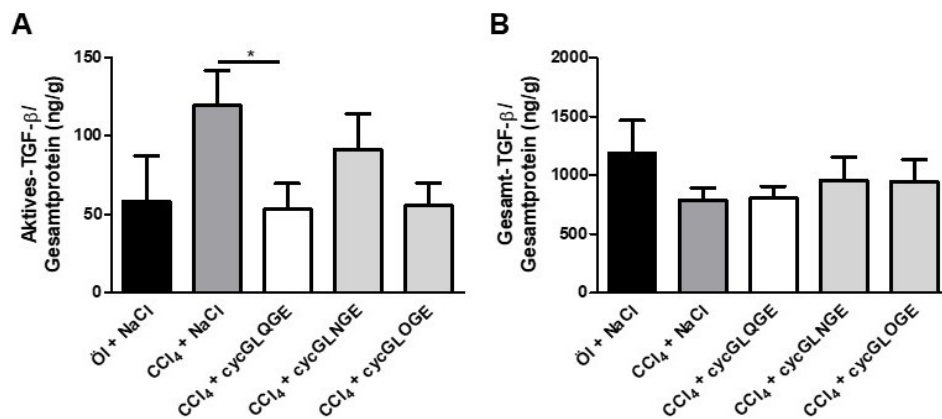
Ein kleines Stück der isolierten Lebern der Versuchstiere wurde in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für  $\alpha$ -SMA (Verdünnung 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (Öl + NaCl:  $0,8785 \pm 0,1116$ ;  $\text{CCl}_4$  + NaCl:  $1,437 \pm 0,1937$ ;  $\text{CCl}_4$  + cycGLQGE:  $0,6705 \pm 0,1175$ ;  $\text{CCl}_4$  + cycGLNGE:  $1,105 \pm 0,1599$ ;  $\text{CCl}_4$  + cycGLOGE:  $0,9003 \pm 0,1729$ ) (n=8). (\*p<0,05; \*\*p<0,01)

Dieses Ergebnis zeigt, dass das Peptid cycGLQGE die Differenzierung von Zellen zu Myofibroblasten vermindert, wodurch vermutlich die verminderte Menge an Kollagen und Fibronectin herrührt.

### 3.2.12 TGF- $\beta$ in der Leberfibrose

Bei der Leberfibrose wird das profibrotische Zytokin TGF- $\beta$  verstärkt exprimiert und spielt bei der Aktivierung der Myofibroblasten eine wichtige Rolle (1.1.2). Da der Myofibroblastenmarker in den mit cycGLQGE behandelten Lebern verringert ist, könnte dies mit einer verminderten Expression von TGF- $\beta$  einher gehen. Zudem konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass das Peptid cycGLQGE die TGF- $\beta$  mRNA-Expression in Hepatozyten und TGF- $\beta$ -Protein in Huh-7-Zellen vermindert. Um dies zu überprüfen, wurden zum einen das aktive und zum anderen das gesamte TGF- $\beta$  in den verschiedenen Lebern mittels eines Luciferase-Assays gemessen (2.5.7). Dafür

wurden die Lebern wie unter 2.5.3 beschrieben vorbereitet. Eine Erhöhung des aktiven oder der gesamten TGF- $\beta$ -Proteinmenge konnte in den CCl<sub>4</sub>-injizierten Mäusen im Vergleich zu den Öl-injizierten Mäusen nicht festgestellt werden (Abbildung 61 A und B). Jedoch zeigte die Analyse des Luciferase-Assays eine Verringerung des biologisch aktiven TGF- $\beta$  in den Lebern der cycGLQGE behandelten Mäuse im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Mäusen. Die Peptide cycGLNGE und cycGLOGE wiesen keine Wirkung auf die Menge des aktiven TGF- $\beta$  auf (Abbildung 61 A). Die gesamte TGF- $\beta$ -Proteinmenge blieb in allen Proben unverändert (Abbildung 61 B).



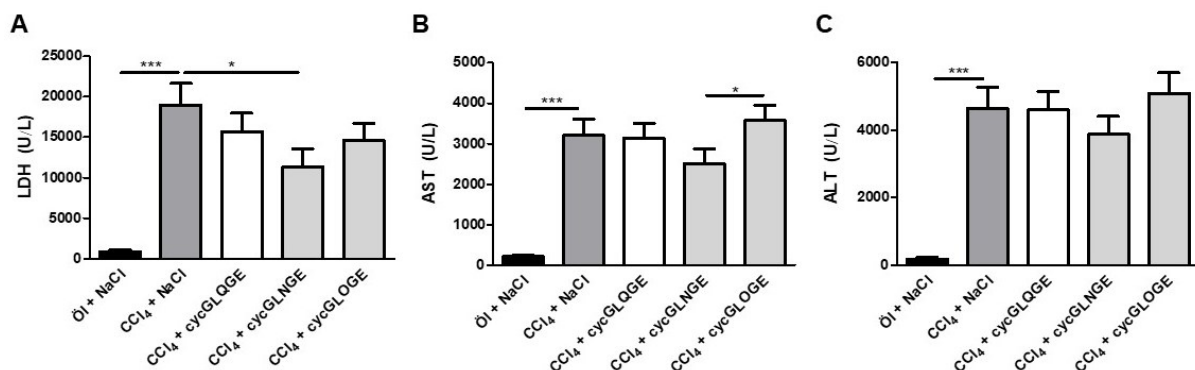
**Abbildung 61: Analyse des aktiven und gesamten TGF- $\beta$ -Gehalts in den Lebern der Mäuse im CCl<sub>4</sub>-Modell**  
Mittels eines Luciferase-Assays wurde das biologisch aktive TGF- $\beta$  (A) (Öl + NaCl: 58.16 ± 29.21; CCl<sub>4</sub> + NaCl: 119.7 ± 22.08; CCl<sub>4</sub> + cycGLQGE: 53.20 ± 16.49; CCl<sub>4</sub> + cycGLNGE: 91.30 ± 22.69; CCl<sub>4</sub> + cycGLOGE: 55.49 ± 14.60) (n=5/22/13/11/12) sowie die gesamte TGF- $\beta$ -Proteinmenge (B) (Öl + NaCl: 1183 ± 285.3; CCl<sub>4</sub> + NaCl: 783.4 ± 107.1; CCl<sub>4</sub> + cycGLQGE: 801.7 ± 104.2; CCl<sub>4</sub> + cycGLNGE: 954.8 ± 202.6; CCl<sub>4</sub> + cycGLOGE: 944.4 ± 187.7) (n=12/22/15/15/12) im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge in den Lebern der Versuchsmäuse gemessen. (\*p<0,05)

Durch die Behandlung mit dem cycGLQGE könnte die Menge an aktivem TGF- $\beta$  vermindert und die Differenzierung von verschiedenen Zellen zu Myofibroblasten verringert werden (1.1.2).

### 3.2.13 Die Leberfunktion der CCl<sub>4</sub>-Versuchsmäuse

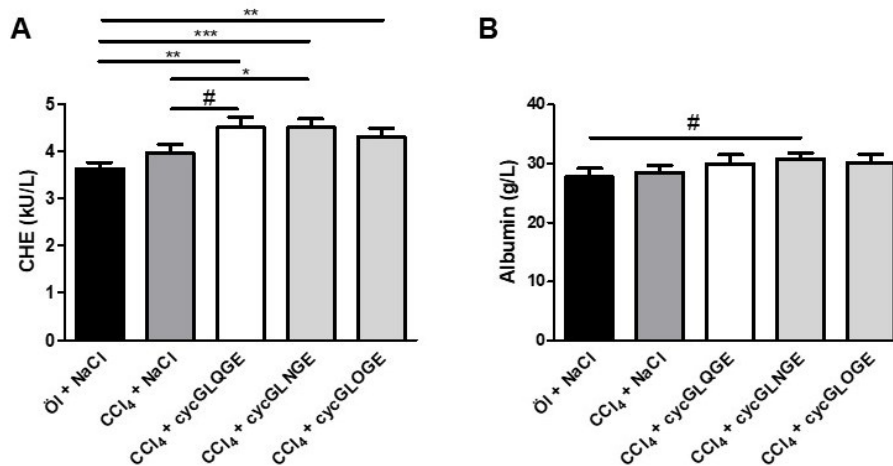
Bei der Entstehung einer Leberfibrose wird normalerweise das Zytokin TGF- $\beta$  verstärkt exprimiert (1.5). Da es jedoch keinen Unterschied in der TGF- $\beta$ -Proteinmenge zwischen den Öl- und den CCl<sub>4</sub>-injizierten Mäusen gab, wurden zur Überprüfung der Methode verschiedene Leberfunktionswerte angeschaut. Zum einen wurden die Enzyme LDH, AST und ALT und zum anderen die CHE- und Albumin-Werte im Blutplasma der Versuchstiere gemessen. Eine Erhöhung von LDH, AST oder ALT würde auf eine Schädigung und eine Verminderung der CHE- oder Albumin-Werte auf

eine verminderte Syntheseleistung der Leber hindeuten (1.5.1). Dafür wurde das Blutplasma wie unter 2.2.7 beschrieben isoliert und im Analysezentrum des Universitätsklinikums Heidelberg gemessen. Die Analyse des Blutplasmas zeigte, dass die Enzyme LDH, AST und ALT in den CCl<sub>4</sub>-injizierten Mäusen erhöht waren im Vergleich zu den Kontrollmäusen (Abbildung 62 A, B und C). Dies spricht für eine Schädigung der Leber durch die Injektionen von CCl<sub>4</sub>. Eine Behandlung mit dem cycGLNGE ergab lediglich eine Verringerung des LDH-Wertes im Blutplasma im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Mäusen, jedoch nicht bei den AST- und ALT-Werten, sowie eine Verminderung des AST-Wertes im Vergleich zu den mit cycGLOGE behandelten Mäusen (Abbildung 62 A, B und C). Einen Unterschied in den LDH-, AST- oder ALT-Werten konnte bei der Behandlung mit den Peptiden cycGLQGE oder cycGLOGE im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Mäusen nicht festgestellt werden (Abbildung 62 A, B und C). Die Syntheseleistung der Leber wurde durch die Injektionen mit CCl<sub>4</sub> im Vergleich zu den Öl-injizierten Mäusen nicht beeinträchtigt (Abbildung 63 A und B). Jedoch kam es durch die Behandlung mit den verschiedenen Peptiden zu einer Verbesserung der CHE-Werte im Vergleich zu den Öl-injizierten und mit NaCl behandelten Mäusen (Abbildung 63 A). Die Albumin-Werte waren durch die Behandlung mit den verschiedenen Peptiden im Vergleich zu NaCl behandelten Mäusen nicht verändert, wobei die Behandlung mit cycGLNGE einen erhöhten Trend zeigte (Abbildung 63 B).



**Abbildung 62: Blutplasmawerte der Enzyme LDH (A), AST (B) und ALT (C) in den Versuchsmäusen im CCl<sub>4</sub>-Modell**

Das Blutplasma wurde aus den Versuchsmäusen isoliert und zur Analyse in das Analysezentrum abgegeben. Die Enzyme LDH (A) (Öl + NaCl: 896.7 ± 164.0; CCl<sub>4</sub> + NaCl: 18980 ± 2652; CCl<sub>4</sub> + cycGLQGE: 15690 ± 2269; CCl<sub>4</sub> + cycGLNGE: 11320 ± 2259; CCl<sub>4</sub> + cycGLOGE: 14620 ± 2105) (n=29/30/34/32/27), AST (B) (Öl + NaCl: 211.0 ± 47.46; CCl<sub>4</sub> + NaCl: 3211 ± 405.3; CCl<sub>4</sub> + cycGLQGE: 3136 ± 374.0; CCl<sub>4</sub> + cycGLNGE: 2508 ± 358.3; CCl<sub>4</sub> + cycGLOGE: 3576 ± 365.8) (n=29/30/34/32/27) und ALT (C) (Öl + NaCl: 184.1 ± 46.32; CCl<sub>4</sub> + NaCl: 4641 ± 628.7; CCl<sub>4</sub> + cycGLQGE: 4597 ± 544.3; CCl<sub>4</sub> + cycGLNGE: 3871 ± 533.6; CCl<sub>4</sub> + cycGLOGE: 5086 ± 604.5) (n=21/22/26/24/19) wurden gemessen und ausgewertet. (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001)



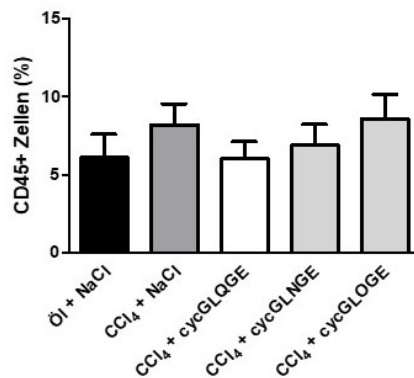
**Abbildung 63: Blutplasmawerte von CHE (A) und Albumin (B) in den Versuchsmäusen im CCl<sub>4</sub>-Modell**

Das Blutplasma wurde aus den Versuchsmäusen isoliert und zur Analyse in das Analysezentrum abgegeben. Die CHE- (A) (ÖI + NaCl: 3.626 ± 0.1321; CCl<sub>4</sub> + NaCl: 3.963 ± 0.1811; CCl<sub>4</sub> + cycGLQGE: 4.495 ± 0.2240; CCl<sub>4</sub> + cycGLNGE: 4.501 ± 0.1759; CCl<sub>4</sub> + cycGLOGE: 4.302 ± 0.1747) (n=20/22/26/24/19) und Albumin-Werte (B) (ÖI + NaCl: 27.77 ± 1.427; CCl<sub>4</sub> + NaCl: 28.48 ± 1.139; CCl<sub>4</sub> + cycGLQGE: 29.95 ± 1.526; CCl<sub>4</sub> + cycGLNGE: 30.79 ± 0.9949; CCl<sub>4</sub> + cycGLOGE: 30.15 ± 1.320) (n=21/22/26/24/19) wurden gemessen und ausgewertet. (#p<0,1; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Injektionen von CCl<sub>4</sub> zu einer Schädigung der Leberzellen führt, wobei die Syntheseleistung unverändert bleibt. Die Behandlung mit den Peptiden führt zu einer verbesserten Syntheseleistung der Leber, verhindert aber nicht die Schädigung der Leberzellen durch CCl<sub>4</sub>.

### 3.2.14 Keine Veränderung der Anzahl an Immunzellen in der Leberfibrose

Neben der Leberschädigung und Leberfunktion wurde auch überprüft, ob durch die Behandlung mit den Peptiden die Anzahl der Immunzellen in der Leber verändert war. Dafür wurden die Zellen wie unter 2.3.12 beschrieben vorbereitet und die CD45<sup>+</sup>-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen ergab keinen Unterschied in der Anzahl der CD45<sup>+</sup>-Zellen zwischen den Öl-injizierten oder den CCl<sub>4</sub>-injizierten Mäusen. Auch die Behandlung mit den verschiedenen Peptiden veränderte die Anzahl der CD45<sup>+</sup>-Zellen in der Leber nicht (Abbildung 64).



**Abbildung 64: Die Anzahl der CD45<sup>+</sup>-Zellen in der Leberfibrose**

Das Isolierte Gewebe wurde zerkleinert, in Verdauemedium für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend filtriert. Die isolierten Zellen wurden abzentrifugiert, gefärbt und mittels Durchflusszytometrie mit einem spezifischen Antikörper für CD45<sup>+</sup>-Zellen analysiert (Verdünnung 1:100) (Öl + NaCl: 6.121 ± 1.489; CCl<sub>4</sub> + NaCl: 8.223 ± 1.349; CCl<sub>4</sub> + cycGLQGE: 6.034 ± 1.093; CCl<sub>4</sub> + cycGLNGE: 6.930 ± 1.302; CCl<sub>4</sub> + cycGLOGE: 8.588 ± 1.572) (n=27/25/35/34/25).

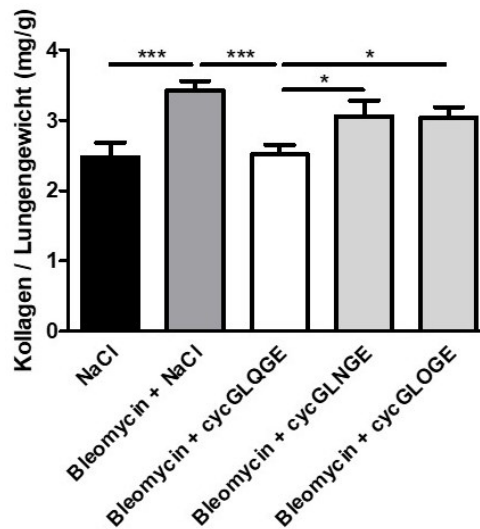
Somit könnte die Wirkung von cycGLQGE lediglich auf die Inhibierung der Differenzierung von Zellen zu Myofibroblasten und damit einhergehend auf eine verringerte Akkumulation von Matrixproteinen hindeuten, wobei die Immunantwort nicht beeinflusst wird.

### 3.2.15 Der Einfluss der Peptide auf die Matrix in der Lungenfibrose

Wie auch bei der Leberfibrose wird bei der Lungenfibrose vermehrt extrazelluläre Matrix gebildet, wobei verschiedene Zytokine und Chemokine freigesetzt werden und Myofibroblasten aktiviert werden (1.6). Das Peptid cycGLQGE hat gezeigt, dass es die Akkumulation von Kollagen und Fibronectin in der Leberfibrose vermindert (3.2.10), indem es die Aktivierung der Myofibroblasten inhibiert (3.2.11). Um zu klären, ob das cycGLQGE auch andere Fibrosen mindern kann, wurde das Peptid als Behandlung in der Lungenfibrose eingesetzt. Zunächst wurde die Entwicklung einer Lungenfibrose durch die einmalige intratracheale Injektion von 0,05 U Bleomycin hervorgerufen (2.2.5). Die Behandlung mit den Peptiden erfolgte in den letzten 10 Tagen der 21-tägigen Fibroseentwicklung, wobei den Mäusen 1 mg cycGLQGE, cycGLNGE oder cycGLOGE subkutan injiziert wurde. Die Behandlung mit NaCl wurde als Kontrolle verwendet (2.2.6). Am Ende des Versuchs wurden die Tiere versuchsbedingt getötet und die Proben entnommen (2.2.7). Die Kollagenmenge in den Lungen wurde mittels einer biochemischen Analyse untersucht (2.5.8). Abbildung 65 zeigt die biochemische Analyse des Kollagengehalts in den Lungen der Versuchstiere. Die intratracheale Injektion von Bleomycin bewirkte einen Anstieg des Kollagengehalts in den Lungen



der mit NaCl behandelten Mäuse (Bleomycin + NaCl) im Vergleich zu den Kontrollmäusen (NaCl). Die Behandlung mit dem Peptid cycGLQGE bewirkte eine Verringerung der Kollagenmenge in den Lungen im Vergleich zu den mit NaCl, mit cycGLNGE oder mit cycGLOGE behandelten Mäusen. Das cycGLNGE und das cycGLOGE zeigten keine Effekte auf die Kollagenmenge in den Lungen im Vergleich zu der Behandlung mit NaCl (Abbildung 65).

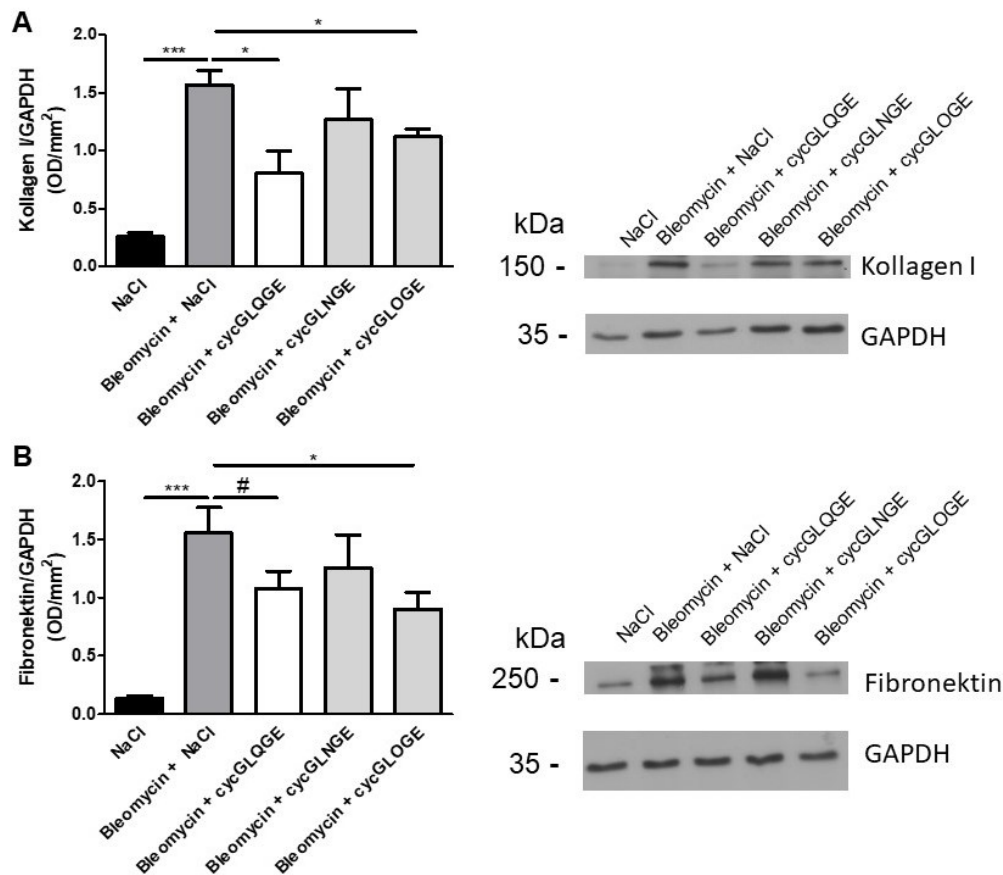


**Abbildung 65: Biochemische Analyse des Kollagengehalts in der Lunge der Mäuse in der Lungenfibrose**

Die intratracheale Injektion von Bleomycin führt in den Mäusen zu einer Lungenfibrose. In den letzten 10 Tagen des Versuchs wurden die Mäuse entweder mit den zyklisierten Peptiden GLQGE, GLNGE, GLOGE (cycGLQGE/cycGLNGE/cycGLOGE) oder der mit NaCl als Kontrolle behandelt. Nach 21 Tagen wurden die Mäuse versuchsbedingt getötet und die Proben entnommen. Die Kollagenmenge der Lungen der Versuchsmäuse wurde in einer biochemischen Analyse und im Verhältnis zum Lebergewicht bestimmt (NaCl: 2.478 ± 0.2089; Bleomycin + NaCl: 3.432 ± 0.1295; Bleomycin + cycGLQGE: 2.516 ± 0.1342; Bleomycin + cycGLNGE: 3.059 ± 0.2226; Bleomycin + cycGLOGE: 3.038 ± 0.1515) (n=18/18/17/17/18). (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001)

Zusätzlich wurden Kollagen I und Fibronectin in einzelnen Lungen mittels Western Blots-Analysen überprüft. Dafür wurden die Proteine aus einem kleinen Stück Lunge extrahiert (2.5.2), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (2.5.5.1). Das Kollagen I und Fibronectin wurden mittels spezifischer Antikörper detektiert (2.1.6.1). Die Western Blot-Analyse zeigte eine erhöhte Kollagen I- und Fibronectin-Proteinmenge in den Lungen der Bleomycin-injizierten Mäuse im Vergleich zu den nicht Bleomycin-injizierten Mäusen (NaCl). Zusätzlich ist in der Western Blot-Analyse zu erkennen, dass durch die Behandlung der Mäuse mit dem cycGLOGE sowohl die Kollagen I-, als auch die Fibronectin-Proteinmenge in den Lungen verringert war im Vergleich zu den Bleomycin-injizierten und mit NaCl behandelten Mäusen (Abbildung 66 A und B). Auch die Lungen der Mäuse, welche mit dem Peptid cycGLQGE behandelt wurden, zeigten eine verringerte Kollagen I-Proteinmenge in den Western Blots im Vergleich zu den Bleomycin-

injizierten und mit NaCl behandelten Mäusen (Abbildung 66 A), sowie einen verringerten Trend bei der Fibronektin-Proteinmenge (Abbildung 66 B).



**Abbildung 66: Western Blot-Analyse von Kollagen I und Fibronektin in den Lungen der Mäuse im Bleomycin-Modell**

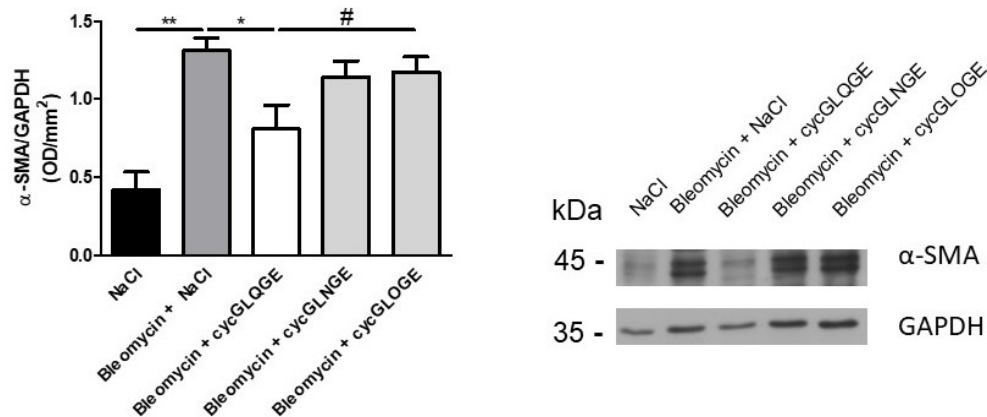
Ein kleines Stück der isolierten Lunge der Versuchstiere wurde in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für Kollagen I (Verdünnung 1:4000) (A) (NaCl:  $0.2553 \pm 0.04143$ ; Bleomycin + NaCl:  $1.569 \pm 0.1250$ ; Bleomycin + cycGLQGE:  $0.8064 \pm 0.1877$ ; Bleomycin + cycGLNGE:  $1.272 \pm 0.2599$ ; Bleomycin + cycGLOGE:  $1.124 \pm 0.06202$ ) ( $n=4/3/3/4/4$ ), Fibronektin (Verdünnung 1:5000) (B) (NaCl:  $0.1355 \pm 0.02260$ ; Bleomycin + NaCl:  $1.552 \pm 0.2224$ ; Bleomycin + cycGLQGE:  $1.073 \pm 0.1519$ ; Bleomycin + cycGLNGE:  $1.258 \pm 0.2818$ ; Bleomycin + cycGLOGE:  $0.9028 \pm 0.1434$ ) ( $n=7/8/8/8/8$ ) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt sind jeweils ein repräsentativer Western Blot. (# $p < 0,1$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

Diese Ergebnisse zeigen, dass das cycGLQGE sowohl in der Leber- als auch in der Lungenfibrose die Akkumulation von Kollagen vermindert.

### 3.2.16 Verminderung der Myofibroblasten durch cycGLQGE in der Lungenfibrose

Um zu überprüfen, ob die Verringerung der Matrixproteine mit einer geringeren Aktivierung der Myofibroblasten zusammenhängt, wie in der Leber auch, wurde der Myofibroblastenmarker  $\alpha$ -SMA in den einzelnen Lungen der Versuchstiere in Western Blot-Analysen kontrolliert (2.5.5.1). Dafür wurden die Proteine aus einem kleinen Stück

Lunge extrahiert (2.5.2), auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.5.5) und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (2.5.5.1). Das Protein  $\alpha$ -SMA wurde mit spezifischen Antikörpern detektiert (2.1.6.1). Die  $\alpha$ -SMA-Proteinmenge war in den Lungen der Bleomycin-injizierten Mäuse in den Western Blot-Analysen erhöht im Vergleich zu den Mäusen ohne Lungenfibrose (NaCl) (Abbildung 67). Wie in der Leber, zeigte das Peptid cycGLQGE auch in der Lunge eine verminderte  $\alpha$ -SMA-Proteinmenge in den Western Blot-Analysen im Vergleich zu den Bleomycin-injizierten und mit NaCl behandelten Mäusen. Zusätzlich war auch ein verminderter Trend in der Proteinmenge von  $\alpha$ -SMA in den Lungen der mit cycGLQGE behandelten Mäusen im Vergleich zu der Behandlung mit cycGLOGE zu erkennen. Die Peptide cycGLNGE und cycGLOGE zeigten keine Veränderung in der Proteinmenge von  $\alpha$ -SMA im Vergleich zu den Bleomycin-injizierten und mit NaCl behandelten Mäusen.



**Abbildung 67: Western Blot-Analyse von  $\alpha$ -SMA in den Lungen der Mäuse im Bleomycin-Modell**

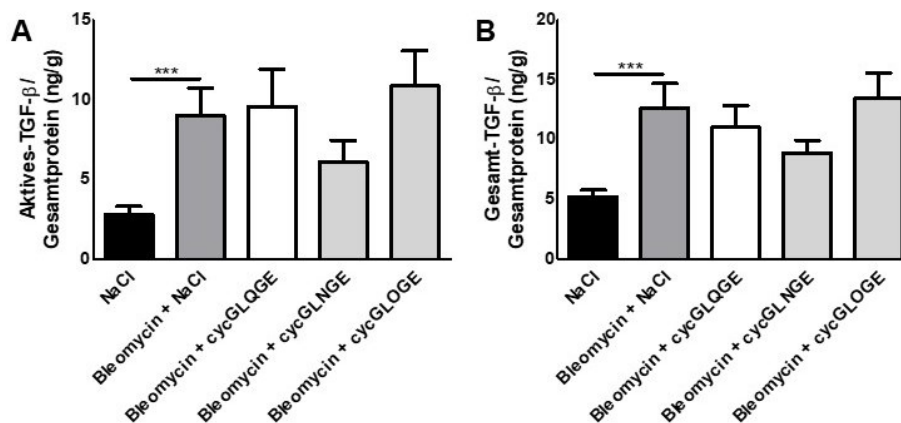
Ein kleines Stück der isolierten Lunge der Versuchstiere wurde in Protein-Lysepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5%igen BSA-Lösung geblockt. Mittels spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion für  $\alpha$ -SMA (Verdünnung 1:1000) und GAPDH (Verdünnung 1:10000). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (NaCl:  $0.4164 \pm 0.1197$ ; Bleomycin + NaCl:  $1.310 \pm 0.08472$ ; Bleomycin + cycGLQGE:  $0.8091 \pm 0.1548$ ; Bleomycin + cycGLNGE:  $1.140 \pm 0.1043$ ; Bleomycin + cycGLOGE:  $1.173 \pm 0.09871$ ) (n=4). (#p<0,1; \*p<0,05; \*\*p<0,01)

Auch in der Lunge scheint das Peptid cycGLQGE die Matrixakkumulation zu vermindern, indem es die Differenzierung von Zellen zu Myofibroblasten inhibiert.

### 3.2.17 TGF- $\beta$ in der Lungenfibrose

Verschiedene Zytokine, aber vor allem TGF- $\beta$ , spielen bei der Entwicklung einer Lungenfibrose eine wichtige Rolle (1.6). TGF- $\beta$  ist bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten beteiligt und damit auch an der verstärkten Produktion von Matrixproteinen (1.1.1). Die Verminderung der Matrixakkumulation, sowie die

geringere Proteinmenge von  $\alpha$ -SMA, in der Lungenfibrose durch das cycGLQGE könnte mit der verringerten Menge an aktivem TGF- $\beta$  zu tun haben. Um zu überprüfen, ob die reduzierte Kollagenmenge in der Lungenfibrose durch die Behandlung mit dem cycGLQGE ebenfalls mit einer verringerten Menge an aktivem TGF- $\beta$  zusammenhängt, wurde zum einen das aktive und zum anderen das gesamte TGF- $\beta$  in den verschiedenen Lungen mittels eines Luciferase-Assays gemessen (2.5.7). Dafür wurden die Lungen wie unter 2.5.3 beschrieben vorbereitet. Die Injektion von Bleomycin bewirkte in den Lungen der Mäuse sowohl einen Anstieg des aktiven als auch der gesamten Menge an TGF- $\beta$  im Vergleich zu den Lungen der nicht Bleomycin-injizierten Mäuse (NaCl). Im Gegensatz zur Leberfibrose, zeigte das cycGLQGE in der Lungenfibrose weder einen Effekt auf das aktive TGF- $\beta$ , noch auf die gesamte Menge an TGF- $\beta$ . Das cycGLNGE und das cycGLOGE zeigten ebenfalls keinen Einfluss auf das aktive TGF- $\beta$  oder die gesamte Menge an TGF- $\beta$  (Abbildung 68 A und B).



**Abbildung 68: Analyse des aktiven und gesamten TGF- $\beta$ -Gehalts in den Lungen der Mäuse im Bleomycin-Modell**

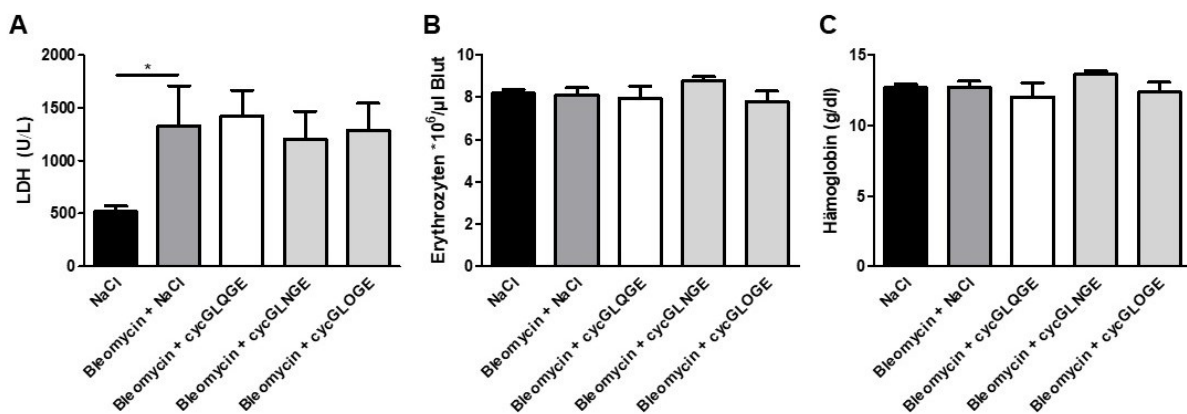
Mittels eines Luciferase-Assays wurde das biologisch aktive TGF- $\beta$  (A) (NaCl:  $2.799 \pm 0.4836$ ; Bleomycin + NaCl:  $8.976 \pm 1.750$ ; Bleomycin + cycGLQGE:  $9.570 \pm 2.353$ ; Bleomycin + cycGLNGE:  $6.067 \pm 1.374$ ; Bleomycin + cycGLOGE:  $10.85 \pm 2.199$ ) ( $n=20/17/15/16/18$ ) sowie die gesamte TGF- $\beta$ -Proteinmenge (B) (NaCl:  $5.207 \pm 0.5367$ ; Bleomycin + NaCl:  $12.60 \pm 2.067$ ; Bleomycin + cycGLQGE:  $11.00 \pm 1.805$ ; Bleomycin + cycGLNGE:  $8.853 \pm 1.069$ ; Bleomycin + cycGLOGE:  $13.46 \pm 2.066$ ) ( $n=22/17/16/17/17$ ) im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge in den Lungen der Versuchsmäuse gemessen. (\*\* $p < 0,001$ )

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das cycGLQGE sowohl in der Lungen- als auch in der Leberfibrose die Akkumulation von Kollagen vermindern könnte, dies aber in der Lunge womöglich TGF- $\beta$ -unabhängig ist.

### 3.2.18 Blutwerte der Versuchstiere in der Lungenfibrose

Die Behandlung mit dem Peptid cycGLQGE führt zu einer geringeren Aktivierung der Myofibroblasten, was in einer verminderten Akkumulation von Matrixproteinen

während der Lungenfibrose führt. Um zu untersuchen, ob die Wirkung des cycGLQGE auf die Matrix auch im Blut messbare Konsequenzen zeigt, wurden der LDH-Wert, die Anzahl an Erythrozyten sowie die Menge an Hämoglobin ermittelt. Der LDH-Wert ist dabei ein Indikator für Zellschädigung und die Erythrozytenzahl sowie der Hämoglobin-Wert einer für die Sauerstoffübertragung. Dafür wurden das Blut und das Blutplasma wie unter 2.2.7 beschrieben isoliert und eigenständig oder im Analysezentrum des Universitätsklinikums Heidelberg gemessen. In Abbildung 69 ist zu erkennen, dass durch die Injektion von Bleomycin der LDH-Wert in den Mäusen anstieg im Vergleich zu den Mäusen, welche keine Bleomycininjektion bekommen haben (Abbildung 69 A). Die Anzahl der Erythrozyten sowie der Hämoglobin-Wert wurde durch die Injektion von Bleomycin nicht beeinflusst (Abbildung 69 B und C). Die Behandlung mit den verschiedenen Peptiden bewirkte jedoch keine Verringerung des LDH-Wertes und hatte auch keinen Einfluss auf die Erythrozytenzahl sowie auf den Hämoglobin-Wert (Abbildung 69 A, B und C).



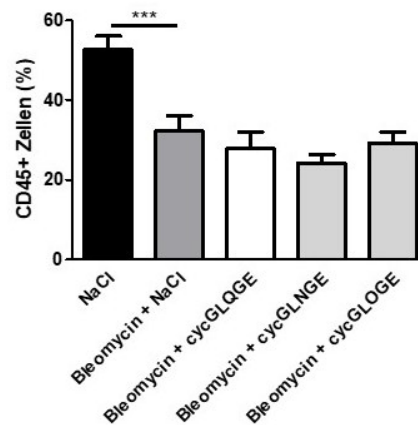
**Abbildung 69: Analyse der LDH-Werte, Anzahl an Erythrozyten und Hämoglobin-Werte in den Versuchsmäusen im Bleomycin-Modell**

Das Blut und das Blutplasma wurde aus den Versuchsmäusen isoliert und eigenständig oder im Analysezentrum des Universitätsklinikums Heidelberg gemessen. Das Enzyme LDH (A) (NaCl: 519.3  $\pm$  52.24; Bleomycin + NaCl: 1326  $\pm$  383.3; Bleomycin + cycGLQGE: 1420  $\pm$  247.8; Bleomycin + cycGLNGE: 1201  $\pm$  266.3 ; Bleomycin + cycGLOGE: 1288  $\pm$  255.0) (n=23/17/17/17/17), die Erythrozytenzahl (B) (NaCl: 8.197  $\pm$  0.1643; Bleomycin + NaCl: 8.102  $\pm$  0.3500; Bleomycin + cycGLQGE: 7.951  $\pm$  0.5674; Bleomycin + cycGLNGE: 8.788  $\pm$  0.1847; Bleomycin + cycGLOGE: 7.787  $\pm$  0.5210) (n=20/16/10/13/12) und der Hämoglobin-Wert (C) (NaCl: 12.68  $\pm$  0.2603; Bleomycin + NaCl: 12.71  $\pm$  0.4323; Bleomycin + cycGLQGE: 12.02  $\pm$  0.9972; Bleomycin + cycGLNGE: 13.61  $\pm$  0.2655; Bleomycin + cycGLOGE: 12.36  $\pm$  0.7154) (n=20/16/10/13/12) wurden gemessen und ausgewertet. (\*p < 0,05)

Die Blutwerte zeigen, dass es durch die Injektion von Bleomycin zu Zellschäden in der Maus kommt, die Sauerstoffübertragung im Blut davon aber nicht beeinträchtigt ist. Zudem scheinen die Peptide keinen Einfluss auf die Zellschädigung zu haben.

### 3.2.19 Keine Veränderung der Anzahl an Immunzellen in der Lungenfibrose durch die Behandlung mit den Peptiden

In der Leberfibrose wurde die Anzahl der Immunzellen durch die Behandlung der Peptide nicht verändert. Um zu überprüfen, ob durch die Behandlung mit den Peptiden auch während der Lungenfibrose die Anzahl der Immunzellen unverändert bleibt, wurden die Zellen wie unter 2.3.12 beschrieben vorbereitet und die CD45<sup>+</sup>-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte eine Verringerung der Anzahl an CD45<sup>+</sup>-Zellen in den Lungen der Bleomycin-injizierter Mäuse im Vergleich zu den Mäusen, welche keine Bleomycininjektion erhalten haben (Abbildung 70). Die Behandlung mit den Peptiden bewirkte keine Veränderung in der Anzahl der CD45<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu der Behandlung mit NaCl.



**Abbildung 70: Die Anzahl der CD45<sup>+</sup>-Zellen in der Lungenfibrose**

Die isolierten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie mit einem spezifischen Antikörper für CD45<sup>+</sup>-Zellen analysiert (Verdünnung 1:100) (NaCl: 52.59 ± 3.446; Bleomycin + NaCl: 32.26 ± 3.793; Bleomycin + cycGLQGE: 27.77 ± 4.317; Bleomycin + cycGLNGE: 24.16 ± 2.183; Bleomycin + cycGLOGE: 29.15 ± 2.778) (n=24/18/17/17/18). (\*\*\*)p<0,001

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Peptide keinen Einfluss auf die Rekrutierung von Immunzellen haben und die Immunantwort nicht beeinflussen.

## 4 Diskussion

Fibrosen sind durch die Akkumulation von Matrixproteinen, vor allem Kollagenfasern, charakterisiert (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). Dabei spielt das Zytokin TGF-β eine wichtige Rolle, da es die Aktivierung von Myofibroblasten, welche die Kollagenfasern in der Fibrose synthetisieren, stimulieren kann. Die Regulation von TGF-β wird unter anderem von Integrinen beeinflusst, wodurch diese auch einen direkten Einfluss auf die Fibrose ausüben ((Henderson and Sheppard, 2013); (Conroy

et al., 2016)). Das Integrin- $\beta$ 1 bildet mit anderen Integrin-Untereinheiten ein Integrindimer und besitzt daher viele verschiedene Liganden, wie die Matrixproteine Kollagen oder Fibronectin. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Integrin- $\beta$ 1 in der Leber und dessen Rolle bei der Entwicklung einer Leberfibrose. Im zweiten Teil wird die Modulation von Integrinen mit Hilfe kleiner Peptide *in vitro* und *in vivo*, sowohl in einer experimentellen Leber-, als auch in einer Lungenfibrose, analysiert.

#### 4.1 Der Knockout von Integrin- $\beta$ 1 in Hepatozyten bewirkt die Bildung einer Leberfibrose

Bekannt ist, dass die Matrix einen Einfluss auf die Entstehung einer Fibrose hat. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass das Fehlen von Fibronectin in der Leber zu einer erhöhten Verfügbarkeit von TGF- $\beta$  führt, wodurch die Fibrogenese eingeleitet wird (Kawelke et al., 2011). Jedoch scheint nicht nur Fibronectin alleine einen Einfluss auf das Zytokin TGF- $\beta$  zu haben, sondern auch die einzelnen Isoformen. Klingberg et al. haben gezeigt, dass die Spleißvariante EDA-Fibronectin, welches vermehrt bei der Fibrose gebildet wird, die Einlagerung vom latenten TGF- $\beta$  in die Matrix begünstigt. Die Inhibierung von EDA-Fibronectin mittels Antikörper führte zu einer Verminderung vom latenten TGF- $\beta$  in der Matrix. Die Spleißvariante EDB-Fibronectin oder Fibronectin ohne EDA und EDB bewirkten eine verminderte Einlagerung des latenten TGF- $\beta$  im Vergleich zu EDA-Fibronectin (Klingberg et al., 2018). Darüber hinaus scheint das EDA-Fibronectin wichtig für die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten zu sein, da die Inhibierung von EDA-Fibronectin mittels Antikörper die Expression von  $\alpha$ -SMA und Kollagen I vermindert (Serini et al., 1998). Zudem wurde gezeigt, dass Kollagen die Expression der TGF- $\beta$ -Rezeptoren in HL-1 Zellen (Herzmuskelzelllinie) vermindert und so einen Einfluss auf den TGF- $\beta$ -Signalweg nimmt, wobei die Proteine SMAD2/3 weniger phosphoryliert werden. Eine Interaktion mit dem Integrin- $\beta$ 1 scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen. Das Kollagen bewirkt im Integrin-Signalweg eine Erhöhung der Phosphorylierung von FAK, welche durch einen Integrin- $\beta$ 1-Antikörper aufgehoben wird. Zudem führt das Kollagen zu einer vermehrten Proliferation der Zellen, welches durch den Integrin- $\beta$ 1-Antikörper wieder vermindert werden konnte. Daher scheint Kollagen bei der Entwicklung einer Herzfibrose eventuell modifizierende Eigenschaften zu besitzen (Lu et al., 2016). Eine

verminderte Phosphorylierung von FAK und AKT wurde auch in Fibroblasten festgestellt, welche auf einer Kollagen-I-Matrix kultiviert wurden. Dabei wurde auch gezeigt, dass mit der geringeren Phosphorylierung von FAK die Apoptose der Fibroblasten zunahm. Durch die Behandlung mit einem Integrin- $\beta$ 1-Antikörper wurde der Effekt von Kollagen I jedoch aufgehoben (Xia et al., 2004). Die Wirkung von Kollagen auf die Phosphorylierung von FAK scheint dabei aber vom Zelltyp abhängig zu sein. Dekkers et. al haben in BTSM Zellen (*engl.: bovine tracheal smooth muscle*) gezeigt, dass die Kultivierung auf Kollagen I zu einer erhöhten Phosphorylierung von FAK sowie zu einer verstärkten Proliferation führt (Dekkers et al., 2013). Dies zeigt, dass die Zusammensetzung der Matrix die Entwicklung einer Fibrose und die Phosphorylierung von FAK beeinflussen kann, wobei die Wirkung vom Zelltyp abhängig ist. Dabei scheint die Interaktion zwischen Kollagen und den Integrinen wichtig zu sein. In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die Interaktion zwischen der Matrix und Integrinen auf die Bildung einer Leberfibrose hat. Die Integrine, welche an Kollagen binden können, besitzen alle das Integrin- $\beta$ 1 als die  $\beta$ -Untereinheit ( $\alpha$ 1 $\beta$ 1,  $\alpha$ 2 $\beta$ 1,  $\alpha$ 10 $\beta$ 1 und  $\alpha$ 11 $\beta$ 1). Die Abbildung 9 belegt die Ausschaltung des Integrin- $\beta$ 1 in den Hepatozyten.

Die Integrine fungieren als Sensoren für die Zellen, wodurch diese die umliegenden Matrixproteine erkennen und bei Bedarf Signale zum Umbau der Matrix weiterleiten können (Kechagia et al., 2019). Der Knockout des Integrin- $\beta$ 1 in den Hepatozyten, wodurch diese die Matrix verändert wahrnehmen, führte zu einer erhöhten Expression von Kollagen I, Kollagen II und Kollagen III (Abbildung 10 bis 13). Neben den Kollagenproteinen war auch die Expression von Fibronectin in diesen Lebern erhöht (Abbildung 10 und 12). Die vermehrte Produktion der Matrixproteine könnte auf eine fehlende Interaktion zwischen der Zelle und der umliegenden Matrix hindeuten. Zumindest geht die Expression der Matrixproteine mit einer verstärkten Differenzierung von Zellen, vor allem HSCs, zu Myofibroblasten einher (Abbildung 14 und 15), welches auf eine gesteigerte TGF- $\beta$ -Expression und Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalweges zurückzuführen ist (Abbildung 16 bis 19 und Abbildung 23 bis 25). Diese Ergebnisse werden durch die Veröffentlichung von Masuzaki et al. bestätigt, die ebenfalls gezeigt haben, dass durch den Integrin- $\beta$ 1-Knockout in Hepatozyten die Expression sowie das aktive TGF- $\beta$  in den Lebern erhöht ist und dadurch verstärkt Myofibroblasten aktiviert werden (Masuzaki et al., 2021). Des Weiteren weisen die Ergebnisse dieser Arbeit Parallelen zu der Entstehung einer Leberfibrose auf. Eine



Leberfibrose entsteht durch die Schädigung der Leber. Dabei wird vermehrt TGF- $\beta$  freigesetzt, resultierend aus der Apoptose von Zellen, wodurch Myofibroblasten aktiviert werden und große Mengen an Matrixproteinen produzieren (Bataller and Brenner, 2005). Im Gegensatz zur Entstehung einer Leberfibrose durch äußere Einflüsse, wie zum Beispiel einer Hepatitis-Viren-Infektion oder Fettleibigkeit, waren die LDH-, AST- und ALT-Werte in den Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen nicht erhöht. Auch die Syntheseleistung der Leber war in den Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen unverändert, was darauf hindeutet, dass durch den Knockout keine Schädigung der Leber entsteht (Abbildung 34 und 35). Die unveränderte Anzahl an apoptotischen Zellen stützen diesen Verdacht (Abbildung 33). Es scheint, als würde der Knockout des Integrin- $\beta$ 1 in den Hepatozyten zu einer fehlerhaften Wahrnehmung der extrazellulären Matrix führen, woraufhin TGF- $\beta$  produziert und freigesetzt wird, wodurch indirekt Matrixproteine exprimiert werden. Dies führt zu der Entwicklung einer Leberfibrose, ohne dabei zellschädigend zu sein.

Nicht nur der Knockout des Integrin- $\beta$ 1 führte zu einer Erhöhung der TGF- $\beta$ -Proteinmenge in den Hepatozyten, sondern auch der Knockdown mittels siRNA (Abbildung 39). Zudem ergab der Knockdown von Integrin- $\alpha$ 11 und Integrin- $\alpha$ 5 ebenfalls einen Anstieg der TGF- $\beta$ -Proteinmenge (Abbildung 39). Interessanterweise führte der Knockdown des Integrin- $\alpha$ 1 zu keiner Veränderung der Proteinmenge von Gesamt-TGF- $\beta$ , verringerte aber die Menge vom aktiven TGF- $\beta$  (Abbildung 39 A). Weniger aktives TGF- $\beta$  könnte zu einer verminderten Myofibroblastendifferenzierung, damit einhergehend letztendlich auch einer verringerten Kollagen-Expression, führen und möglicherweise die Akkumulation von Kollagen während einer Fibrose inhibieren. Diese Vermutung wird jedoch durch eine bereits veröffentlichte Arbeit widerlegt, die zeigt, dass die Ausschaltung des Integrin- $\alpha$ 1 zu einer Erhöhung von Kollagen in Lebern führt (Williams et al., 2015). Auch eine Beteiligung von Integrin- $\alpha$ 1 an der Aktivierung von TGF- $\beta$  wurde bisher nicht beschrieben, lediglich für die Integrine  $\alpha$  $\beta$ 3,  $\alpha$  $\beta$ 5,  $\alpha$  $\beta$ 6,  $\alpha$  $\beta$ 8 und  $\alpha$  $\beta$ 1 ((Wipff and Hinz, 2008); (Henderson et al., 2013)). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Wahrnehmung der Matrix durch die Zellen auch die Matrixproduktion beeinflussen kann, unabhängig vom Einfluss auf eine TGF- $\beta$  Veränderung. Der Knockdown des Integrin- $\beta$ 3, - $\alpha$ 2, - $\alpha$ 10, - $\alpha$ v und - $\alpha$ 4 zeigt keinen Unterschied in der Menge an TGF- $\beta$  (Abbildung 39). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass diese Integrine in einer geringen Menge auf der Zelloberfläche der Hepatozyten vorliegen und daher kaum Einfluss auf die Interaktion mit der Matrix

ausüben. Im Gegensatz zu den Integrinen  $\beta 1$ ,  $\alpha 11$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 1$ , welche alle in einer größeren Menge vorliegen und daher vermutlich auch einen relevanten Einfluss auf die Signalweiterleitung, beziehungsweise im Falle von Integrin- $\alpha 1$  auf die Wahrnehmung der Matrix durch die Zellen, haben könnten (Abbildung 37 A). Dies deutet daraufhin, dass die Interaktion zwischen den Hepatozyten und der Matrix, vor allem Kollagen, wichtig ist und so, neben anderen Faktoren, das Zytokin TGF- $\beta$  reguliert wird. Die verminderte Proteinmenge von Gesamt-TGF- $\beta$  in Hepatozyten, welche auf Kollagen I kultiviert wurden, unterstützen diese Vermutung (Abbildung 41 B). Zudem könnte die verminderte Proteinmenge von Gesamt-TGF- $\beta$  zu einer geringeren TGF- $\beta$ -Signalübertragung führen, wie es bereits in Herzmuskelzellen beschrieben wurde (Lu et al., 2016) und so die Entstehung einer Fibrose mit beeinflussen.

Ein weiterer Grund für die verstärkte Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalweges könnte, neben der fehlenden Interaktion der Zelle mit der Matrix, auch eine verminderte Internalisierung von TGF- $\beta$  und dessen Rezeptoren sein. Die Internalisierung kann dabei über eine Clathrin-vermittelte Internalisierung oder durch Caveolae vonstattengehen. Die Clathrin-vermittelte Internalisierung wird durch die Interaktion vom Transkriptionsfaktor AP2 mit den TGF- $\beta$  Rezeptoren eingeleitet, wodurch es zur Bildung von frühen Endosomen kommt. Dabei werden die Proteine SMAD2/3 oder SMAD 1 weiterhin phosphoryliert und der TGF- $\beta$ -Signalweg ist weiterhin aktiv ((Yao et al., 2002); (Hayes et al., 2002); (Shi et al., 2007)). In den Integrin- $\beta 1$ -KO-Mäusen scheint die Internalisierung von TGF- $\beta$  Clathrin-vermittelt zu sein. Neben der verstärkten Phosphorylierung der SMAD Proteine (Abbildung 23 bis 25) konnte auch eine erhöhte Expression des frühen Endosomen Markers EEA-1 in den Integrin- $\beta 1$ -KO-Hepatozyten festgestellt werden (Abbildung 30). Dem gegenüber wurde eine verminderte Proteinmenge von Caveolin-1, welche besonders häufig in Caveolae vorkommen, sowohl in den Lebern (Abbildung 31) als auch in den Hepatozyten (Abbildung 32) der Integrin- $\beta 1$ -KO-Mäusen ermittelt. Die Internalisierung der Caveolae erfolgt durch die Bindung von SMAD7 an die TGF- $\beta$  Rezeptoren. Die Ubiquitinligase SMURF2 interagiert mit dem SMAD7 Protein, wodurch dieses ubiquitiniert und die Degradation in Lysosomen eingeleitet wird ((Di Guglielmo et al., 2003); (Bizet et al., 2012)). Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass das Integrin- $\beta 1$  in Prostatakrebszellen die Expression von Caveolin-1 reguliert. Dabei wurde gezeigt, dass durch die Ausschaltung des Integrin- $\beta 1$  mittels siRNA die Expression von

Caveolin-1 ebenfalls abnahm (Pellinen et al., 2018). Ein ähnlicher Mechanismus scheint auch in Hepatozyten vorzuliegen, da in dieser Arbeit ebenfalls eine Verminderung von Caveolin-1 durch den Knockout von Integrin- $\beta$ 1 festgestellt wurde (Abbildung 32). Durch die Verringerung der Caveolin-1-Proteinmenge wurden wahrscheinlich die TGF- $\beta$  Rezeptoren weniger degradiert, was zu einer verstärkten TGF- $\beta$  Signalweiterleitung führt. Interessanterweise kann TGF- $\beta$  die Expression von Caveolin-1 in Lungenfibroblasten unterdrücken, was zu einem positiven *Feedback Loop* in der TGF- $\beta$  Signalweiterleitung führt (Wang et al., 2006). Die Verringerung von Caveolin-1 wurde auch schon in anderen Fibrosen, wie der Herzfibrose (Miyasato et al., 2011), der Lungenfibrose (Wang et al., 2006) oder der Nierenfibrose (Chen et al., 2010) beobachtet. Bei der Nierenfibrose konnte zudem gezeigt werden, dass die Verringerung von Caveolin-1 durch den Knockout vom Integrin- $\alpha$ 1 hervorgerufen wurde. Somit scheint nicht nur das Integrin- $\beta$ 1, sondern womöglich auch andere Integrine die Expression von Caveolin-1 und somit den TGF- $\beta$ -Signalweg zu regulieren. Neben einer verminderten Caveolin-1-Proteinmenge konnte in den Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen auch eine geringere Proteinmenge an SMAD7 festgestellt werden (Abbildung 26), wodurch der TGF- $\beta$ -Signalweg weniger inhibiert wird (Hayashi et al., 1997). Die verringerte Degradation der TGF- $\beta$  Rezeptoren könnte eine Erklärung für den Trend zu einer erhöhten Proteinmenge von TGF- $\beta$ RI in den Lebern der Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen sein (Abbildung 27). Möglicherweise ist dies nur einer der Gründe für die Erhöhung des TGF- $\beta$ -Rezeptors, da parallel dazu auch eine gesteigerte Expression von TGF- $\beta$ RI und TGF- $\beta$ RII sowohl in den Lebern (Abbildung 28), als auch in den Hepatozyten (Abbildung 29) der Integrin- $\beta$ 1-KO-Mäusen zu sehen war. Dies deutet darauf hin, dass das Zytokin TGF- $\beta$  die Expression seiner eigenen Rezeptoren in den Hepatozyten fördern könnte. Dieser Effekt wurde bereits in Fibroblasten beobachtet, wo die erhöhte Menge von TGF- $\beta$  mit einer erhöhten Menge an TGF- $\beta$  Rezeptoren korreliert und die Expression womöglich ebenfalls begünstigt ((Chin et al., 2001); (Petridou et al., 2000)).

Zusammenfassend deutet der Knockout des Integrin- $\beta$ 1 in den Hepatozyten auf die Entstehung einer Leberfibrose hin, ohne dabei die Zellen zu schädigen. Der Integrin- $\beta$ 1-Knockout hat eine verringerte Proteinmenge von Caveolin-1 zur Folge, wodurch die Degradation der TGF- $\beta$ -Rezeptoren vermindert, der TGF- $\beta$ -Signalweg verstärkt aktiviert und auch vermehrt TGF- $\beta$  in den Hepatozyten gebildet wird. Womöglich führt auch die fehlende Interaktion der Zellen mit der Matrix zu der erhöhten Expression von

TGF- $\beta$ , was in einer Akkumulation von Matrixproteinen endet. Eine ähnliche Reaktion auf eine fehlerhafte Matrixinteraktion konnten Kawelke et al. in HSCs finden. Dabei wurde die Interaktion zwischen den HSCs und Fibronectin durch einen Fibronectin-Knockout gehemmt, was zu einer Erhöhung des aktiven TGF- $\beta$  und damit auch zu einer verstärkten Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalwegs führte. Zudem konnte eine erhöhte Expression von Kollagen, sowie TGF- $\beta$ RII, festgestellt werden. Die Gabe von Fibronectin führte zu einer Normalisierung der Expression von Kollagen und TGF- $\beta$ RII, sowie dem aktiven TGF- $\beta$  (Kawelke et al., 2011).

#### 4.1.1 Der Integrin-FAK-Signalweg beeinflusst die Entstehung einer Fibrose

Durch die Interaktion mit Liganden geben Integrine verschiedene Signale an die Zelle weiter, was über die verschiedenen Kinasen geschieht. Eine der wichtigsten Kinasen für die Signalweiterleitung von Integrinen ist FAK, welches unter anderem mit dem Überleben der Zelle, der Differenzierung oder der Signaltransduktion durch Wachstumsfaktoren assoziiert ist (Parsons, 2003). Durch die Aktivierung von FAK werden auch andere Signalwege, wie der PI3K/AKT- oder ERK-Signalweg, angeregt (Stupack and Cheresch, 2002). In der Leber konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibierung von FAK die Differenzierung der HSC zu Myofibroblasten hemmt (Zhao et al., 2017). In Lungenfibroblasten wurde ein ähnlicher Mechanismus beobachtet, wobei die Rekrutierung von Fibroblasten über das Integrin- $\beta$ 1 erfolgt und die Inhibierung von FAK zu einer verminderten Aktivierung von Myofibroblasten führt (Zhao et al., 2016). Des Weiteren ist in Tumoren die Phosphorylierung von FAK häufig erhöht, was zu einer verstärkten Proliferation von Zellen führt (Murphy et al., 2020). Die Inhibierung von FAK in Hepatozyten verhindert die Bildung von Lebertumoren, indem der AKT/ERK/Cyclin D1-Signalweg vermindert aktiviert wird (Shang et al., 2015). Es wurde gezeigt, dass die Ausschaltung des Integrin- $\beta$ 1 in Hepatozyten die Proliferation vermindert, wodurch die Regeneration der Leber verschlechtert wird ((Speicher et al., 2014); (Bogorad et al., 2014)). Darüber hinaus scheint der Knockdown des Integrin- $\beta$ 1 zu einer Verringerung der Phosphorylierung von FAK und ERK zu führen ((Saleem et al., 2009); (Bogorad et al., 2014)). Auch in dieser Arbeit konnte durch den Knockout des Integrin- $\beta$ 1 in Hepatozyten eine verminderte Phosphorylierung von FAK, sowie ein Trend zur Verringerung von ERK beobachtet werden (Abbildung 42). Die verringerte Integrin-Signalweiterleitung in den Hepatozyten führt schließlich zu einer verstärkten

Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalwegs, wodurch vermehrt Matrixproteine exprimiert werden. Dieses Ergebnis wird durch die Arbeiten von Weng et al. bestätigt, die gezeigt haben, dass durch die Inhibierung von FAK in Hepatozyten unter anderem der Wnt- und TGF- $\beta$ -Signalweg hochreguliert sind und deshalb vermehrt Kollagen produziert wird (Weng et al., 2020). Daher kann die Inhibierung von FAK zwar die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten hemmen, aber in Hepatozyten zu einer verstärkten Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalweges führen, wodurch mehr Matrixproteine exprimiert werden. Neben dem Integrin- $\beta$ 1 scheint auch das Integrin- $\alpha$ 11 für die Aktivierung von FAK und ERK wichtig zu sein. Die Deletion der zytoplasmatischen Region von Integrin- $\alpha$ 11 führte in C2C12-Zellen (Muskelzellen) zu einer verminderten Phosphorylierung von FAK und ERK (Erusappan et al., 2019). Dies zeigt, dass eine fehlerhafte Interaktion zwischen den Hepatozyten und der Matrix, insbesondere Kollagen, zu einer Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalweges führt und in einer Leberfibrose resultiert.

#### 4.2 Die Modulation der Integrin-Matrix-Interaktion mittels kleiner Peptide

Die fehlerhafte Interaktion der Integrin- $\beta$ 1-KO-Hepatozyten mit der extrazellulären Matrix führte zu einer verminderten Phosphorylierung von FAK. Zudem konnte eine vermehrte Expression des Zytokins TGF- $\beta$  in diesen Zellen beobachtet werden, was zur Bildung einer Leberfibrose führte (4.1). Die Ausschaltung des Integrin- $\beta$ 1 und - $\alpha$ 11 *in vitro*, beide als Interaktionspartner für Kollagen bekannt, führte zu einer Erhöhung von TGF- $\beta$  (Abbildung 39), wohingegen die Kultivierung von Hepatozyten auf Kollagen I zu einer Verminderung von TGF- $\beta$  führte (Abbildung 41 B). Daher stellt sich die Frage, ob die Modulation der Interaktion der Integrine mit der Matrix, vor allem mit Kollagen, einen Einfluss auf die Expression von TGF- $\beta$  hat und dadurch die Fibrogenese inhibiert werden kann. Da FAK eines der wichtigsten Integrin-Signalmoleküle ist, welches unter anderem mit dem Überleben der Zelle, die Differenzierung oder der Signaltransduktion durch Wachstumsfaktoren assoziiert ist (Parsons, 2003), könnte zudem die Signalweiterleitung über FAK zu einer Regulierung der Expression von Kollagen und damit auch der Fibrose führen. Bereits bekannt ist, dass durch die Inhibierung von FAK in den Hepatozyten vermehrt Kollagen exprimiert wird (Weng et al., 2020). Die Integrine- $\alpha$ 1 $\beta$ 1, - $\alpha$ 2 $\beta$ 1 und - $\alpha$ 11 $\beta$ 1 haben alle die Peptidsequenz GFOGER als Kollagenbindesequenz (Siljander et al., 2004). In der Literatur wird belegt, dass neben

dem Peptid GFOGER auch das modifizierte Peptid GLOGER ebenfalls an das Integrin- $\alpha 1\beta 1$ , - $\alpha 2\beta 1$  und - $\alpha 11\beta 1$  bindet (Zhang et al., 2003). Daher wurde in dieser Arbeit für die Modulation der Interaktion der Integrine mit der Matrix, speziell mit Kollagen, drei synthetische Peptide untersucht. Die verwendeten Peptide GLQGE, GLNGE und GLOGE sind Modifikationen der Kollagenbindesequenz GFOGER beziehungsweise von GLOGER.

Die Vermutung, dass die Signalweiterleitung durch FAK die TGF- $\beta$ -Expression regulieren kann, konnte durch die Behandlung mit dem cycGLQGE Peptid bestätigt werden. Die mit dem cycGLQGE-Peptid behandelten Hepatozyten zeigten eine verstärkte Phosphorylierung von FAK (Abbildung 43), sowie eine geringere TGF- $\beta$ -Expression, wenn die Hepatozyten auf Vitronektin kultiviert wurden (Abbildung 45). Zudem konnte in den Zellen, welche auf Vitronektin oder Fibronektin kultiviert und mit dem Peptid cycGLQGE behandelt wurden, eine verminderte Proteinmenge von TGF- $\beta$  festgestellt werden (Abbildung 47). In den auf Kollagen I kultivierten Hepatozyten führte die Behandlung mit dem cycGLQGE zu keiner Verminderung von TGF- $\beta$ . Dies lässt darauf schließen, dass das cycGLQGE eine Interaktion mit den Kollagenbindenden Integrinen eingeht und diese Interaktion durch die Kultivierung auf Kollagen I inhibiert wird. Jedoch scheint eine Interaktion der Zellen mit Matrixproteinen wichtig für die Wirkung des cycGLQGE zu sein, da bei der Kultivierung der Hepatozyten auf PBS oder Poly-L-Lysin, wobei keine Interaktion mit Integrinen zu erwarten ist (Salmela et al., 2017), keine Veränderung der Proteinmenge von TGF- $\beta$  beobachtet wurde (Abbildung 47). Die aktivierte Konformation der Integrine wird sowohl durch die Bindung von  $Mg^{2+}$ , als auch durch die Bindung von Matrixproteinen stabilisiert (Plow et al., 2000). Daher könnte durch die Kultivierung der Zellen auf den verschiedenen Matrixproteinen die Bindung von Liganden begünstigt werden und auch erklären, warum das cycGLQGE keinen Effekt auf die Poly-L-Lysin oder PBS kultivierten Zellen hatte. Neben den Hepatozyten konnte das cycGLQGE die gesamte Proteinmenge von TGF- $\beta$  in auf Vitronektin kultivierten Huh-7-Zellen verringern (Abbildung 48). Daher könnte das Peptid cycGLQGE nicht nur in der Leberfibrose, sondern auch in Lebertumoren die Wirkung von TGF- $\beta$  regulieren. Uneindeutige Ergebnisse zeigte das Peptid cycGLNGE. Das Peptid hatte keinen Effekt auf die Phosphorylierung von FAK (Abbildung 43), zeigt aber ein Trend zur Verringerung der Expression von TGF- $\beta$  auf Vitronektin kultivierten Hepatozyten (Abbildung 45) und vermindert, genau wie das cycGLQGE, die gesamte Proteinmenge von TGF- $\beta$  in auf Vitronektin kultivierten Huh-

7-Zellen (Abbildung 48 B). Dem gegenüber hatte es aber keine Auswirkung auf die gesamte Proteinmenge von TGF- $\beta$  (Abbildung 47) und erhöhte sogar die Menge an aktivem TGF- $\beta$  in auf PBS kultivierten Hepatozyten (Abbildung 46 A). Das Peptid cycGLOGE scheint weder einen Effekt auf die Phosphorylierung von FAK (Abbildung 43), noch auf die gesamte Proteinmenge von TGF- $\beta$ , sowohl in Hepatozyten (Abbildung 47), als auch in Huh-7-Zellen (Abbildung 48), zu haben, obwohl eine Interaktion zwischen der Peptidsequenz GLOGER und Integrinen nachgewiesen wurde (Zhang et al., 2003).

Weder der Knockout des Integrin- $\beta$ 3, noch des Integrin- $\beta$ 1 in Hepatozyten konnte die Wirkung des cycGLQGE auf die Erhöhung der Phosphorylierung von FAK beeinflussen (Abbildung 44), was darauf hindeutet, dass das cycGLQGE mit mehreren Integrinen interagieren kann und nicht unbedingt spezifisch für die kollagenbindenden Integrine ist. Jedoch muss dabei beachtet werden, dass in den Integrin- $\beta$ 1-KO-Hepatozyten noch zirka 20 % Integrin- $\beta$ 1-positive Zellen vorhanden sind (Abbildung 9 B) und diese möglicherweise ausreichen, um eine Wirkung des cycGLQGE hervorzurufen. Die beiden Peptide cycGLNGE und cycGLOGE zeigen auch in den KO-Hepatozyten keine Wirkung auf die Phosphorylierung von FAK (Abbildung 44), was auf eine fehlende Interaktion mit Integrinen hindeutet.

Die Experimente mit MC3T3-E1-Zellen zeigen widersprüchliche Ergebnisse, die keine eindeutige Aussage auf eine spezifische Wirkung mit einer Interaktion mit dem Integrin- $\beta$ 1 zulassen. Dafür spricht, dass die mRNA-Expression von Kollagen I in den cycGLQGE behandelten MC3T3-E1-Zellen verringert wird, was in den Integrin- $\beta$ 1-KO-MC3T3-E1-Zellen nicht der Fall ist (Abbildung 55). Dies deutet auf eine spezifische Interaktion mit dem Integrin- $\beta$ 1 hin. Dem gegenüber blieb aber die Proteinmenge von Kollagen I unverändert (Abbildung 56). Zudem konnte bei einer gleichzeitigen Stimulation mit TGF- $\beta$  und einer Behandlung mit dem cycGLQGE eine Verminderung der Expression von Kollagen I, sowohl in den Integrin- $\beta$ 1-KO-MC3T3-E1, als auch Kontrollzellen, beobachtet werden (Abbildung 55), was darauf hindeuten könnte, dass TGF- $\beta$  die Wirkung vom cycGLQGE verstärkt. TGF- $\beta$  fördert die Expression von verschiedenen Integrinen (Margadant and Sonnenberg, 2010), wodurch die Stimulation mit TGF- $\beta$  auch zu einer erhöhten Expression von Integrinen führen könnte und dadurch das cycGLQGE entweder eine größere Wahrscheinlichkeit hat, einen geeigneten Interaktionspartner zu finden, oder aber auch unspezifische Interaktionen zustande kommen könnten. Die Auswirkung der Stimulation mit TGF- $\beta$  auf die MC3T3-

E1-Zellen sollte daher weiter untersucht werden. Jedoch zeigte auch die Proteinmenge von Kollagen I in den mit dem cycGLQGE behandelten und mit TGF- $\beta$  stimulierten Zellen keinen Unterschied (Abbildung 56). Interessanterweise zeigte das Kontrollpeptid cycGLOGE einen Effekt auf die Proteinmenge von Kollagen I in den MC3T3-E1-Zellen. Die Behandlung mit dem cycGLOGE führte in den Integrin- $\beta$ 1-KO-MC3T3-E1-Zellen zu einer Erhöhung des Proteins Kollagen I (Abbildung 56), was auf eine verstärkte Aktivierung dieser Zellen zurückzuführen ist (Abbildung 54), aber bei gleichzeitiger Stimulation mit TGF- $\beta$  zu einer Verringerung und zwar sowohl in den wildtypischen, als auch in den Integrin- $\beta$ 1-KO-MC3T3-E1-Zellen (Abbildung 56). Dies deutet auf eine ähnliche Wirkweise wie das cycGLQGE hin, da auch beim cycGLOGE die Wirkung durch die Stimulation mit TGF- $\beta$  verändert wurde. Dies zeigt zudem, dass die Modifikationen der Peptide unterschiedliche Wirkungen haben. Diese Vermutung wird aus der Literatur gestützt, wo beschrieben ist, dass die Peptidsequenz GFOGER spezifisch für das Integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 ist und die Differenzierung der Osteoblasten, die Aktivierung von FAK und die Mineralisation der extrazellulären Matrix fördert, und zwar auf ähnliche Weise wie Kollagen dies auch tut ((Reyes and García, 2004); (Clark et al., 2020)). Möglicherweise hat das Peptid cycGLOGE noch weitere Bindungspartner außer dem für das GFOGER spezifische Integrin- $\alpha$ 2 $\beta$ 1, da die Menge an Kollagen I nur in den Integrin- $\beta$ 1-KO-MC3T3-E1-Zellen erhöht war, obwohl in diesen Zellen keine Bindung an das Integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 zustande kommen kann.

Eine unterschiedliche Wirkung von Kollagen I und dem Peptid GFOGER haben Smithmyer et al. in Fibroblasten nachgewiesen. Hier konnten sie zeigen, dass durch die Kultivierung auf einem Kollagen I Hydrogel die Fibroblasten weniger  $\alpha$ -SMA produzieren, als bei der Kultivierung auf einem GFOGER Hydrogel (Smithmyer et al., 2018). Bei der Behandlung von fibroblastischen 3T3-Zellen mit den Peptiden konnte ebenfalls unterschiedliche Wirkungen festgestellt werden. Die Behandlung mit dem cycGLQGE bewirkte eine schwächere Aktivierung von FAK sowie AKT, wohingegen das cycGLNGE und das cycGLOGE keinen Einfluss zeigten (Abbildung 49 und 50 A). Die Verminderung der Phosphorylierung von AKT kann dabei ein nachgelagerter Effekt der verringerten Aktivierung von FAK sein (Xia et al., 2004), oder aber auch durch das Peptid cycGLQGE verursacht sein. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass eine verminderte Phosphorylierung von FAK die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten inhibiert und dadurch weniger Matrixproteine produziert werden ((Thannickal et al., 2003); (Zhao et al., 2016)). Diese Aussagen konnten in dieser



Arbeit bestätigt werden. Durch die Behandlung mit dem cycGLQGE wurde nicht nur die Phosphorylierung von FAK vermindert (Abbildung 49), sondern auch die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten (Abbildung 51) und damit einhergehend die Produktion von Kollagen und Fibronectin (Abbildung 53). Die Experimente mit den 3T3-Zellen zeigen, dass das cycGLQGE je nach Zellart einen unterschiedlichen Effekt haben kann, wie es bei der Bindung zu Kollagen auch der Fall ist.

Zusammenfassend zeigen die Peptide, dass die Modifikation von Integrin-Bindesequenzen unterschiedliche Wirkungen haben können. Dabei hat das Peptid cycGLQGE gezeigt, dass es für eine mögliche pharmakologische Behandlung in Frage kommt, da es zum einen die Expression des profibrotischen Zytokins TGF- $\beta$  in den Hepatozyten vermindert und zum anderen die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten, und damit einhergehend die Matrixproduktion, inhibiert.

#### 4.2.1 Das Peptid cycGLQGE verbessert die experimentelle Leberfibrose

Die Injektion der Peptide in gesunde Versuchstiere führte zu keiner toxischen Reaktion (Abbildung 57). Auch Blutwerte, die hier nicht gezeigt wurden, wie Kreatinin, Glukose, Lipase oder das leberspezifischen Enzym AST, waren durch die Injektion der Peptide weder erhöht, noch verringert. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Peptide für die Behandlung einer Leberfibrose geeignet waren. Für die Induktion einer Leberfibrose in einer Maus wurde das CCl<sub>4</sub>-Versuchsmodell gewählt, da es in vielen Aspekten einer menschlichen Leberfibrose ähnelt, wie zum Beispiel die Erhöhung von proinflammatorischen Zytokinen, die zu einer Differenzierung der Myofibroblasten führen und damit einhergehend die Akkumulation von Matrixproteinen bewirken (Yanguas et al., 2016). Wie durch die Literatur bekannt, führte die Injektion von CCl<sub>4</sub> auch in dieser Arbeit zu einer Akkumulation der Matrixproteine Kollagen und Fibronectin (Abbildung 58 und 59), was auf eine verstärkte Myofibroblastendifferenzierung zurückzuführen ist (Abbildung 60) (Iwaisako et al., 2014). Die *in vitro*-Versuche, in denen das cycGLQGE gezeigt hatte, dass es die Expression von Kollagen und Fibronectin vermindert (Abbildung 53), wurden durch die *in vivo*-Versuche bestätigt. Sowohl die Produktion von Kollagen, als auch von Fibronectin, wurden durch die Behandlung mit dem cycGLQGE in den fibrotischen Lebern vermindert (Abbildung 58 und 59). Diese Verringerung der Matrixproteine ging, wie auch schon *in vitro* gezeigt (Abbildung 51),

mit einer reduzierten Myofibroblastendifferenzierung einher (Abbildung 60). Durch die Behandlung mit dem cycGLQGE verringerte sich auch das aktive TGF- $\beta$  (Abbildung 61 A), wodurch sich die geringere Differenzierung der Myofibroblasten erklären ließe. TGF- $\beta$  wurde bereits als eines der wichtigsten Zytokine in der Differenzierung der Fibroblasten und HSCs zu Myofibroblasten beschrieben ((Gabbiani, 2003); (Dewidar et al., 2019)). Das Gesamt-TGF- $\beta$  blieb bei der Behandlung mit dem Peptid *in vivo* unverändert, was aber eventuell auf einen methodischen Fehler zurückzuführen ist. Bei der Messung des Gesamt-TGF- $\beta$  konnte nämlich auch keine Erhöhung in den Lebern der CCl<sub>4</sub> behandelten Mäuse im Vergleich zu den Kontrolllebern festgestellt werden (Abbildung 61 B), obwohl aus der Literatur hervorgeht, dass die Injektion von CCl<sub>4</sub> die Produktion von TGF- $\beta$  erhöht (Niu et al., 2016). Ein weiteres Indiz für einen methodischen Fehler bei der Messung des Gesamten-TGF- $\beta$  lieferten die Blutmesswerte von LDH, AST und ALT. Diese drei Messwerte, welche einen Hinweis auf eine Zellschädigung geben, waren alle durch die Injektion von CCl<sub>4</sub> erhöht im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abbildung 62). Dieses Ergebnis, aber nicht das Ergebnis der Messung des Gesamt-TGF- $\beta$ , stimmt mit der Literatur überein, in der bereits beschrieben wurde, dass die Injektion von CCl<sub>4</sub> zu Zellschäden in den Versuchstieren führt, wodurch pro-inflammatorische Zytokine, wie TGF- $\beta$ , freigesetzt werden ((Shi et al., 1998); (Yanguas et al., 2016)). Die Behandlung mit dem Peptid cycGLNGE ergab, auf die Blutwerte bezogen, keine eindeutige Erkenntnis. Zwar verbesserte das cycGLNGE den LDH-Wert, was auf eine geringe Zellschädigung hindeutet, aber sowohl der AST-, als auch der ALT-Wert waren unverändert (Abbildung 62). Dies könnte damit zusammenhängen, dass das LDH nicht nur bei der Schädigung der Leber, sondern auch bei Schädigung von anderen Zellen freigesetzt wird (Chan et al., 2013). ALT hingegen wird hauptsächlich bei der Schädigung der Leber freigesetzt (Giannini et al., 2005), was darauf hindeutet, dass das cycGLNGE zwar einen Einfluss auf den Zellschaden nehmen kann, dieser aber nicht leberspezifisch ist. Unklare Ergebnisse zeigten die CHE- und Albumin-Werte, welche einen Hinweis auf die Syntheseleistung der Leber geben. Die CHE-Werte waren durch die Behandlung mit den Peptiden erhöht und auch der Albumin-Wert stieg durch das cycGLNGE tendenziell an (Abbildung 63). Bei einer Leberschädigung sollte die Syntheseleistung der Leber abnehmen und bei erhaltener Leberfunktion diese erhöht sein (Thomas L., 2000). Da jedoch durch die Gabe von CCl<sub>4</sub> die CHE- und Albumin-Werte im Vergleich zu den Werten der Kontrolltiere unverändert waren, unterstützen

diese Ergebnisse zwar eine Verbesserung der Funktion durch die Peptide, beweisen aber nicht, dass das cycGLQGE die Syntheseleistung verbessert. Darüber hinaus konnte keine veränderte Infiltration von Immunzellen in den Lebern der CCl<sub>4</sub>-injizierten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen mittels Durchflusszytometrie festgestellt werden, wobei auch die Behandlung mit den Peptiden keinen Einfluss auf die Anzahl an CD45<sup>+</sup>-Zellen zeigte (Abbildung 64). Dies steht im Widerspruch zu der Literatur, aus der hervorgeht, dass die Injektion von CCl<sub>4</sub> eine verstärkte Immunantwort in der Leber auslöst (Heindryckx et al., 2009).

Zusammenfassend bestätigten die *in vivo*-Versuche die *in vitro* durchgeführten Versuche und zeigen, dass das Peptid cycGLQGE, nicht aber das cycGLNGE oder cycGLOGE, die Leberfibrose vermindert, indem es zum einen das profibrotische Zytokin TGF- $\beta$ , zumindest das aktive TGF- $\beta$ , verringert und zum anderen die Myofibroblastendifferenzierung inhibiert. Die Verminderung des aktiven TGF- $\beta$  kann dabei einen direkten Einfluss auf die Differenzierung von Zellen zu Myofibroblasten haben. Um diesen Einfluss weiter zu untersuchen, wurde die Wirkung der Peptide in einem weiteren Fibrose-Modell untersucht.

#### 4.2.2 Das Peptid cycGLQGE verbessert die experimentelle Lungenfibrose

Die Ergebnisse der Leberversuche zeigen, dass das Peptid cycGLQGE die Akkumulation von Matrixproteinen inhibiert und somit ein vielversprechendes Molekül in der Therapie einer Fibrose darstellt. Zum einen konnte gezeigt werden, dass es die Phosphorylierung von FAK in Hepatozyten erhöht und die TGF- $\beta$ -Expression in diesen Zellen vermindert. Dadurch könnte ein indirekter Einfluss auf die Differenzierung von Fibroblasten und HSCs zu Myofibroblasten bestehen. Das cycGLQGE hatte aber auch *in vitro* gezeigt, dass es in der Fibroblasten-Zelllinie 3T3 die Phosphorylierung von FAK vermindert, wodurch die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten direkt beeinflusst wurde. In einem Modell der Lungenfibrose sollte hier untersucht werden, ob das cycGLQGE zum einen leberspezifisch wirkt, indem es die Expression von TGF- $\beta$  in den Hepatozyten vermindert und dadurch die Differenzierung von Zellen zu Myofibroblasten inhibiert, oder aber einen generellen Effekt auf die Myofibroblastendifferenzierung ausüben kann.

Die Injektion von Bleomycin bewirkte, wie in der Literatur beschrieben (Moeller et al., 2008), eine Akkumulation von Matrixproteinen (Abbildung 65 und 66) einhergehend

mit einer vermehrten Myofibroblastendifferenzierung (Abbildung 67) und einer gesteigerten Menge an aktiven und Gesamt-TGF- $\beta$  (Abbildung 68). Wie auch schon in der Leberfibrose, konnte in der Lungenfibrose durch die Behandlung mit dem cycGLQGE die Akkumulation von Kollagen und Fibronectin vermindert werden (Abbildung 65 und 66). Auch die Differenzierung von Zellen zu Myofibroblasten wurde durch das Peptid cycGLQGE verringert (Abbildung 67). Anders als in der Leber, scheint dieser Effekt aber TGF- $\beta$  unabhängig zu sein, da weder das aktive, noch das Gesamt-TGF- $\beta$  durch das cycGLQGE in den Lungen verändert wurde (Abbildung 68). Der erhöhte LDH-Wert im Blut der Bleomycin-injizierten Mäuse zeigte eine Schädigung von Zellen an, wodurch die gesteigerte Menge an TGF- $\beta$  zu erklären ist. Wie bei TGF- $\beta$  blieb auch der LDH-Wert durch die Behandlung mit den Peptiden unverändert (Abbildung 69 A). Im Gegensatz zu gesunden Mäusen, wo das cycGLQGE ein Trend zu erhöhtem Hämoglobin im Blut gezeigt hatte (Abbildung 57), wurde in den Mäusen mit einer Bleomycin Injektion kein Unterschied im Hämoglobin-Wert oder in der Erythrozyten-Anzahl gemessen (Abbildung 69 A und B). Allerdings zeigte auch die Injektion von Bleomycin im Vergleich zu den Kontrollmäusen keinen Unterschied im Hämoglobin-Wert oder in der Anzahl der Erythrozyten (Abbildung 69 A und B), obwohl in der Literatur bereits beschrieben wurde, dass Bleomycin die Sauerstoffversorgung verschlechtert (Geng et al., 2016). Ebenfalls unverändert blieb die mittels Durchflusszytometrie bestimmte Anzahl der CD45<sup>+</sup>-Zellen bei der Behandlung mit den Peptiden. Interessanterweise verringerte die Gabe von Bleomycin aber die Anzahl der Immunzellen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 70). Dies ist im Widerspruch zur Literatur, in der beschrieben wird, dass durch die Injektion von Bleomycin eine Immunantwort hervorgerufen wird, wobei diese ihren Höhepunkt um Tag 14 Tag nach der Injektion hat. Auch wenn die Immunantwort nach 14 Tagen schwächer werden sollte, sollte auch noch am Tag 21, der Zeitpunkt an dem dieser Versuch geendet hat, eine Immunantwort zu erwarten sein ((Degryse et al., 2010); (Schiller et al., 2015)).

Zusammenfassend wurde das Peptid cycGLQGE in gesunden Mäusen gut vertragen und zeigte sowohl *in vitro*, als auch *in vivo*, dass es ein mögliches pharmakologisches Molekül ist, welches in der Behandlung einer Fibrose eingesetzt werden könnte. Das cycGLQGE konnte zeigen, dass es die Expression des profibrotischen Zytokins TGF- $\beta$  in Hepatozyten verringern kann. Zudem konnte es die Myofibroblastendifferenzierung sowohl *in vitro*, in der Fibroblasten-Zelllinie 3T3, als auch *in vivo*, in der Leber- und Lungenfibrose, inhibieren. Diese Wirkungen führten zu

einer geringeren Akkumulation von Matrixproteinen. Darüber hinaus hatte es keinen Einfluss auf die Immunantwort.

## 5 Zusammenfassung

Eine Fibrose resultiert aus einer Schädigung des Gewebes eines Organs, wobei Zytokine und Chemokine freigesetzt werden. Das profibrotische Zytokin TGF- $\beta$  fördert unter anderem die Differenzierung von Zellen zu Myofibroblasten. Diese exprimieren vermehrt Matrixproteine, welche in das beschädigte Organ eingelagert werden. Dadurch kann es bei anhaltender Schädigung zu einem Organversagen und zum Tod kommen. In dieser Arbeit wurde zum einen die Integrin-Matrix-Interaktion in der Leber analysiert und zum anderen eine Möglichkeit der Modulation einer solchen Interaktion bearbeitet.

Dabei stellte sich heraus, dass die Interaktion zwischen dem Integrin- $\beta$ 1 und der extrazellulären Matrix für die Regulation der Expression von TGF- $\beta$  in Hepatozyten eine wichtige Rolle spielt. Die Ausschaltung des Integrin- $\beta$ 1 führte in den Hepatozyten zu einer verstärkten mRNA- und Proteinexpression von TGF- $\beta$ , wodurch der TGF- $\beta$ -Signalweg verstärkt aktiviert wurde. Die gesteigerte Expression von TGF- $\beta$  führte außerdem zu einer vermehrten Differenzierung von Zellen zu Myofibroblasten, wodurch es zu einer Akkumulation von Matrixproteinen in den Lebern kam. Durch das Fehlen des Integrin- $\beta$ 1 verringerte sich die Phosphorylierung des an Integrine bindenden Proteins FAK. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine fehlende Interaktion in Hepatozyten zwischen dem Integrin- $\beta$ 1 und der umliegenden Matrix zu einer Leberfibrose führen kann.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte solch eine Interaktion zwischen Integrienen und der Matrix mit Hilfe von Peptiden moduliert werden. Dabei stellte sich heraus, dass das Peptid cycGLQGE die Fähigkeit besitzt, die Entwicklung einer Fibrose zu beeinflussen. Das cycGLQGE führte in Hepatozyten zu einer verstärkten Phosphorylierung von FAK sowie zu einer verminderten Expression von TGF- $\beta$ . Darüber hinaus konnte es die Differenzierung von 3T3-Fibroblasten zu Myofibroblasten, vermutlich durch eine verminderte Phosphorylierung von FAK, inhibieren, wodurch die Expression von Matrixproteinen verringert wurde. Dieser Effekt konnte auch in einer experimentellen Leberfibrose beobachtet werden, wo das cycGLQGE das aktive TGF- $\beta$  und die Myofibroblastendifferenzierung verringerte und weniger Matrixproteine eingelagert wurden. Auch in einer experimentellen Lungenfibrose konnte das cycGLQGE die Differenzierung von Zellen zu Myofibroblasten vermindern, was mit einer geringeren Akkumulation von Matrixproteinen einherging.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Interaktion zwischen der Matrix und Hepatozyten zu einer Fibrose in der Leber führen kann. Zudem könnte das Peptid cycGLQGE als ein neues pharmakologisches Molekül in der Therapie einer Fibrose Verwendung finden, da es die Fähigkeit besitzt die Differenzierung von Zellen zu Myofibroblasten zu inhibieren.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abe, M., Harpel, J.G., Metz, C.N., Nunes, I., Loskutoff, D.J., and Rifkin, D.B. (1994). An assay for transforming growth factor-beta using cells transfected with a plasminogen activator inhibitor-1 promoter-luciferase construct. *Anal. Biochem.* *216*, 276–284.
- Adamson, I.Y. (1976). Pulmonary toxicity of bleomycin. *Environ. Health Perspect.* *16*, 119–125.
- Adamson, I.Y. (1984). Drug-induced pulmonary fibrosis. *Environ. Health Perspect.* *55*, 25–36.
- Adamson, I.Y.R., and Bowden, D.H. (1974). The Pathogenesis of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *Am. J. Pathol.* *77*, 185–198.
- Agostini, C., and Gurrieri, C. (2006). Chemokine/cytokine cocktail in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* *3*, 357–363.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Fibroblasts and Their Transformations: The Connective-Tissue Cell Family*. Mol. Biol. Cell 4th Ed.
- Araya, J., Cambier, S., Morris, A., Finkbeiner, W., and Nishimura, S.L. (2006). Integrin-Mediated Transforming Growth Factor- $\beta$  Activation Regulates Homeostasis of the Pulmonary Epithelial-Mesenchymal Trophic Unit. *Am. J. Pathol.* *169*, 405–415.
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M.H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., et al. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* *468*, 557–561.
- Asano, Y., Ihn, H., Yamane, K., Jinnin, M., and Tamaki, K. (2006). Increased Expression of Integrin  $\alpha v \beta 5$  Induces the Myofibroblastic Differentiation of Dermal Fibroblasts. *Am. J. Pathol.* *168*, 499–510.
- Bachem, M.G., Sell, K.-M., Melchior, R., Kropf, J., Eller, T., and Gressner, A.M. (1993). Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and transforming growth factor  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ) stimulate fibronectin synthesis and the transdifferentiation of fat-storing cells in the rat liver into myofibroblasts. *Virchows Arch. B* *63*, 123.
- Bakin, A.V., Tomlinson, A.K., Bhowmick, N.A., Moses, H.L., and Arteaga, C.L. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J. Biol. Chem.* *275*, 36803–36810.
- Bakowska, J., and Adamson, I.Y. (1998). Collagenase and gelatinase activities in bronchoalveolar lavage fluids during bleomycin-induced lung injury. *J. Pathol.* *185*, 319–323.



- Bandyopadhyay, A., Rothschild, G., Kim, S., Calderwood, D.A., and Raghavan, S. (2012). Functional differences between kindlin-1 and kindlin-2 in keratinocytes. *J. Cell Sci.* *125*, 2172–2184.
- Barrett, S., Collins, M., Kenny, C., Ryan, E., Keane, C.O., and Crowe, J. (2003). Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. *J. Med. Virol.* *71*, 212–218.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2008). PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* *16*, 585–601.
- Bataller, R., and Brenner, D.A. (2005). Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* *115*, 209–218.
- Baumeister, S.E., Völzke, H., Marschall, P., John, U., Schmidt, C.-O., Flessa, S., and Alte, D. (2008). Impact of fatty liver disease on health care utilization and costs in a general population: a 5-year observation. *Gastroenterology* *134*, 85–94.
- Bej, A.K., Mahbubani, M.H., and Atlas, R.M. (1991). Amplification of Nucleic Acids by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Other Methods and their Applications. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *26*, 301–334.
- Ben-Ari, Z., Pappo, O., Druzd, T., Sulkes, J., Klein, T., Samra, Z., Gadba, R., Tambur, A.R., Tur-Kaspa, R., and Mor, E. (2004). Role of cytokine gene polymorphism and hepatic transforming growth factor beta1 expression in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Cytokine* *27*, 7–14.
- Berg, R.A. (1982). Determination of 3- and 4-hydroxyproline. *Methods Enzymol.* *82 Pt A*, 372–398.
- Bergers, G., and Song, S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-Oncol.* *7*, 452–464.
- Bhowmick, N.A., Zent, R., Ghiassi, M., McDonnell, M., and Moses, H.L. (2001). Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *J. Biol. Chem.* *276*, 46707–46713.
- Bizet, A.A., Liu, K., Tran-Khanh, N., Saksena, A., Vorstenbosch, J., Finnson, K.W., Buschmann, M.D., and Philip, A. (2011). The TGF- $\beta$  co-receptor, CD109, promotes internalization and degradation of TGF- $\beta$  receptors. *Biochim. Biophys. Acta* *1813*, 742–753.
- Bizet, A.A., Tran-Khanh, N., Saksena, A., Liu, K., Buschmann, M.D., and Philip, A. (2012). CD109-mediated degradation of TGF- $\beta$  receptors and inhibition of TGF- $\beta$  responses involve regulation of SMAD7 and Smurf2 localization and function. *J. Cell. Biochem.* *113*, 238–246.
- Bledzka, K., Liu, J., Xu, Z., Perera, H.D., Yadav, S.P., Bialkowska, K., Qin, J., Ma, Y.-Q., and Plow, E.F. (2012). Spatial Coordination of Kindlin-2 with Talin Head Domain in Interaction with Integrin  $\beta$  Cytoplasmic Tails. *J. Biol. Chem.* *287*, 24585–24594.

- Blum, R.H., Carter, S.K., and Agre, K. (1973). A clinical review of bleomycin—a new antineoplastic agent. *Cancer* 31, 903–914.
- Bogorad, R.L., Yin, H., Zeigerer, A., Nonaka, H., Ruda, V., Zerial, M., Anderson, D.G., and Koteliansky, V. (2014). Nanoparticle-formulated siRNA targeting integrins inhibits hepatocellular carcinoma progression in mice. *Nat. Commun.* 5, 3869.
- Borkham-Kamphorst, E., Kovalenko, E., van Roeyen, C.R.C., Gassler, N., Bomble, M., Ostendorf, T., Floege, J., Gressner, A.M., and Weiskirchen, R. (2008). Platelet-derived growth factor isoform expression in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury. *Lab. Invest.* 88, 1090–1100.
- Böttcher, R.T., Stremmel, C., Meves, A., Meyer, H., Widmaier, M., Tseng, H.-Y., and Fässler, R. (2012). Sorting nexin 17 prevents lysosomal degradation of  $\beta$ 1 integrins by binding to the  $\beta$ 1-integrin tail. *Nat. Cell Biol.* 14, 584–592.
- Bouvard Daniel, Brakebusch Cord, Gustafsson Erika, Aszódi Attila, Bengtsson Therese, Berna Alejandro, and Fässler Reinhard (2001). Functional Consequences of Integrin Gene Mutations in Mice. *Circ. Res.* 89, 211–223.
- Brooks, P.C., Strömblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P., and Cheresh, D.A. (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85, 683–693.
- Brown, N.F., and Marshall, J.F. (2019). Integrin-Mediated TGF $\beta$  Activation Modulates the Tumour Microenvironment. *Cancers* 11, 1221.
- Bucala, R., Spiegel, L.A., Chesney, J., Hogan, M., and Cerami, A. (1994). Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol. Med.* 1, 71–81.
- Burnette, W.N. (1981). “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195–203.
- Calalb, M.B., Polte, T.R., and Hanks, S.K. (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol. Cell. Biol.* 15, 954–963.
- Canbay, A., Friedman, S., and Gores, G.J. (2004). Apoptosis: The nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 39, 273–278.
- Casini, A., Pinzani, M., Milani, S., Grappone, C., Galli, G., Jezequel, A.M., Schuppan, D., Rotella, C.M., and Surrenti, C. (1993). Regulation of extracellular matrix synthesis by transforming growth factor  $\beta$ 1 in human fat-storing cells. *Gastroenterology* 105, 245–253.
- Chambers, R.C., and Mercer, P.F. (2015). Mechanisms of Alveolar Epithelial Injury, Repair, and Fibrosis. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 12, S16–S20.

- Chan, F.K.-M., Moriwaki, K., and De Rosa, M.J. (2013). Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 979, 65–70.
- Chaudhary, N.I., Schnapp, A., and Park, J.E. (2006). Pharmacologic Differentiation of Inflammation and Fibrosis in the Rat Bleomycin Model. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 769–776.
- Chaudhury, A., and Howe, P.H. (2009). The Tale of Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) Signaling: A Soigné Enigma. *IUBMB Life* 61, 929–939.
- Chen, H.-C., Appeddu, P.A., Parsons, J.T., Hildebrand, J.D., Schaller, M.D., and Guan, J.-L. (1995). Interaction of Focal Adhesion Kinase with Cytoskeletal Protein Talin. *J. Biol. Chem.* 270, 16995–16999.
- Chen, X., Whiting, C., Borza, C., Hu, W., Mont, S., Bulus, N., Zhang, M.-Z., Harris, R.C., Zent, R., and Pozzi, A. (2010). Integrin  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 Regulates Epidermal Growth Factor Receptor Activation by Controlling Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ -Dependent Caveolin-1 Expression. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3048–3058.
- Chen, Y.-T., Chang, F.-C., Wu, C.-F., Chou, Y.-H., Hsu, H.-L., Chiang, W.-C., Shen, J., Chen, Y.-M., Wu, K.-D., Tsai, T.-J., et al. (2011). Platelet-derived growth factor receptor signaling activates pericyte-myofibroblast transition in obstructive and post-ischemic kidney fibrosis. *Kidney Int.* 80, 1170–1181.
- Chilosi, M., Poletti, V., Zamò, A., Lestani, M., Montagna, L., Piccoli, P., Pedron, S., Bertaso, M., Scarpa, A., Murer, B., et al. (2003). Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 162, 1495–1502.
- Chin, G.S., Liu, W., Peled, Z., Lee, T.Y., Steinbrech, D.S., Hsu, M., and Longaker, M.T. (2001). Differential expression of transforming growth factor-beta receptors I and II and activation of Smad 3 in keloid fibroblasts. *Plast. Reconstr. Surg.* 108, 423–429.
- Choi, Y.H., Burdick, M.D., and Strieter, R.M. (2010). Human Circulating Fibrocytes Have The Capacity To Differentiate Osteoblasts And Chondrocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 662–671.
- Chong, S.G., Sato, S., Kolb, M., and Gauldie, J. (2019). Fibrocytes and fibroblasts—Where are we now. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 116, 105595.
- Chu, T.M., and Kawinski, E. (1998). Plasmin, Subtilisin-like Endoproteases, Tissue Plasminogen Activator, and Urokinase Plasminogen Activator Are Involved in Activation of Latent TGF- $\beta$ 1 in Human Seminal Plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 128–134.
- Cicchini, C., Laudadio, I., Citarella, F., Corazzari, M., Steindler, C., Conigliaro, A., Fantoni, A., Amicone, L., and Tripodi, M. (2008). TGFbeta-induced EMT requires focal adhesion kinase (FAK) signaling. *Exp. Cell Res.* 314, 143–152.
- Clark, D.A., and Coker, R. (1998). Molecules in focus Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 293–298.

- Clark, A.Y., Martin, K.E., García, J.R., Johnson, C.T., Theriault, H.S., Han, W.M., Zhou, D.W., Botchwey, E.A., and García, A.J. (2020). Integrin-specific hydrogels modulate transplanted human bone marrow-derived mesenchymal stem cell survival, engraftment, and reparative activities. *Nat. Commun.* *11*, 114.
- Claussen, C.A., and Long, E.C. (1999). Nucleic Acid recognition by metal complexes of bleomycin. *Chem. Rev.* *99*, 2797–2816.
- Conroy, K.P., Kitto, L.J., and Henderson, N.C. (2016).  $\alpha v$  integrins: key regulators of tissue fibrosis. *Cell Tissue Res.* *365*, 511–519.
- Constandinou, C., Henderson, N., and Iredale, J.P. (2005). Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol. Med.* *117*, 237–250.
- Czaja, M.J. (2002). Induction and regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* *4*, 759–767.
- Dallas, S.L., Park-Snyder, S., Miyazono, K., Twardzik, D., Mundy, G.R., and Bonewald, L.F. (1994). Characterization and autoregulation of latent transforming growth factor beta (TGF beta) complexes in osteoblast-like cell lines. Production of a latent complex lacking the latent TGF beta-binding protein. *J. Biol. Chem.* *269*, 6815–6821.
- Danen, E.H.J. (2013). *Integrins: An Overview of Structural and Functional Aspects* (Landes Bioscience).
- Degryse, A.L., Tanjore, H., Xu, X.C., Polosukhin, V.V., Jones, B.R., McMahon, F.B., Gleaves, L.A., Blackwell, T.S., and Lawson, W.E. (2010). Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *299*, L442–L452.
- Dekkers, B.G.J., Spanjer, A.I.R., van der Schuyt, R.D., Kuik, W.J., Zaagsma, J., and Meurs, H. (2013). Focal adhesion kinase regulates collagen I-induced airway smooth muscle phenotype switching. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *346*, 86–95.
- Della Latta, V., Cecchetti, A., Del Ry, S., and Morales, M.A. (2015). Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. *Pharmacol. Res.* *97*, 122–130.
- Dewidar, B., Meyer, C., Dooley, S., and Meindl-Beinker, N. (2019). TGF- $\beta$  in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis—Updated 2019. *Cells* *8*.
- Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F., and Wrana, J.L. (2003). Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat. Cell Biol.* *5*, 410–421.
- Dooley, S., and ten Dijke, P. (2012). TGF- $\beta$  in progression of liver disease. *Cell Tissue Res.* *347*, 245–256.
- Du, R., Sun, W., Xia, L., Zhao, A., Yu, Y., Zhao, L., Wang, H., Huang, C., and Sun, S. (2012). Hypoxia-Induced Down-Regulation of microRNA-34a Promotes EMT by Targeting the Notch Signaling Pathway in Tubular Epithelial Cells. *PLoS ONE* *7*.

- Dubois, C.M., Laprise, M.-H., Blanchette, F., Gentry, L.E., and Leduc, R. (1995). Processing of Transforming Growth Factor 1 Precursor by Human Furin Convertase. *J. Biol. Chem.* *270*, 10618–10624.
- Edlund, S., Landström, M., Heldin, C.-H., and Aspenström, P. (2002). Transforming Growth Factor- $\beta$ -induced Mobilization of Actin Cytoskeleton Requires Signaling by Small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol. Biol. Cell* *13*, 902–914.
- Egan, J.J., Stewart, J.P., Hasleton, P.S., Arrand, J.R., Carroll, K.B., and Woodcock, A.A. (1995). Epstein-Barr virus replication within pulmonary epithelial cells in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax* *50*, 1234–1239.
- Ekert, J.E., Murray, L.A., Das, A.M., Sheng, H., Giles-Komar, J., and Rycyzyn, M.A. (2011). Chemokine (C-C motif) ligand 2 mediates direct and indirect fibrotic responses in human and murine cultured fibrocytes. *Fibrogenesis Tissue Repair* *4*, 23.
- Erusappan, P., Alam, J., Lu, N., Zeltz, C., and Gullberg, D. (2019). Integrin  $\alpha$ 11 cytoplasmic tail is required for FAK activation to initiate 3D cell invasion and ERK-mediated cell proliferation. *Sci. Rep.* *9*, 15283.
- Fabregat, I., Moreno-Càceres, J., Sánchez, A., Dooley, S., Dewidar, B., Giannelli, G., and Dijke, P. ten (2016). TGF- $\beta$  signalling and liver disease. *FEBS J.* *283*, 2219–2232.
- Faulkner, J.L., Szykalski, L.M., Springer, F., and Barnes, J.L. (2005). Origin of interstitial fibroblasts in an accelerated model of angiotensin II-induced renal fibrosis. *Am. J. Pathol.* *167*, 1193–1205.
- Fava, R.A., and McClure, D.B. (1987). Fibronectin-associated transforming growth factor. *J. Cell. Physiol.* *131*, 184–189.
- Feghali, C.A., and Wright, T.M. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *2*, d12-26.
- Fischer, A.N.M., Herrera, B., Mikula, M., Proell, V., Fuchs, E., Gotzmann, J., Schulte-Hermann, R., Beug, H., and Mikulits, W. (2005). Integration of Ras subeffector signaling in TGF- $\beta$  mediated late stage hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* *26*, 931–942.
- Fleischman, R.W., Baker, J.R., Thompson, G.R., Schaeppi, U.H., Illievski, V.R., Cooney, D.A., and Davis, R.D. (1971). Bleomycin-induced interstitial pneumonia in dogs. *Thorax* *26*, 675–682.
- van der Flier, A., and Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* *305*, 285–298.
- Friedman, S.L. (2004). Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* *1*, 98–105.
- Gabbiani, G. (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J. Pathol.* *200*, 500–503.

- Gallagher, A.J., and Schiemann, W.P. (2006).  $\beta 3$  Integrin and Src facilitate transforming growth factor- $\beta$  mediated induction of epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res.* **8**, R42.
- Gan, Q., Yoshida, T., Li, J., and Owens, G.K. (2007). Smooth muscle cells and myofibroblasts use distinct transcriptional mechanisms for smooth muscle alpha-actin expression. *Circ. Res.* **101**, 883–892.
- Ge, G., and Greenspan, D.S. (2006). BMP1 controls TGF $\beta$ 1 activation via cleavage of latent TGF $\beta$ -binding protein. *J. Cell Biol.* **175**, 111–120.
- Geng, X., Dufu, K., Hutchaleelaha, A., Xu, Q., Li, Z., Li, C., Patel, M.P., Vlahakis, N., Lehrer-Graiwer, J., and Oksenberg, D. (2016). Increased hemoglobin–oxygen affinity ameliorates bleomycin-induced hypoxemia and pulmonary fibrosis. *Physiol. Rep.* **4**.
- Giannini, E.G., Testa, R., and Savarino, V. (2005). Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ Can. Med. Assoc. J.* **172**, 367–379.
- Goldstein, J.M., and Wagers, A.J. (2018). What's in a (Sub)strain? *Stem Cell Rep.* **11**, 303–305.
- Gomperts, B.N., and Strieter, R.M. (2007). Fibrocytes in lung disease. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 449–456.
- Gotzmann, J., Huber, H., Thallinger, C., Wolschek, M., Jansen, B., Schulte-Hermann, R., Beug, H., and Mikulits, W. (2002). Hepatocytes convert to a fibroblastoid phenotype through the cooperation of TGF-beta1 and Ha-Ras: steps towards invasiveness. *J. Cell Sci.* **115**, 1189–1202.
- Gray, A.M., and Mason, A.J. (1990). Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* **247**, 1328–1330.
- Green, H., and Meuth, M. (1974). An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**, 127–133.
- Groppe, J., Hinck, C.S., Samavarchi-Tehrani, P., Zubieta, C., Schuermann, J.P., Taylor, A.B., Schwarz, P.M., Wrana, J.L., and Hinck, A.P. (2008). Cooperative assembly of TGF-beta superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding. *Mol. Cell* **29**, 157–168.
- Guillot, L., Nathan, N., Tabary, O., Thouvenin, G., Le Rouzic, P., Corvol, H., Amselem, S., and Clement, A. (2013). Alveolar epithelial cells: Master regulators of lung homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 2568–2573.
- Hahm, K., Lukashev, M.E., Luo, Y., Yang, W.J., Dolinski, B.M., Weinreb, P.H., Simon, K.J., Chun Wang, L., Leone, D.R., Lobb, R.R., et al. (2007). Alpha beta6 integrin regulates renal fibrosis and inflammation in Alport mouse. *Am. J. Pathol.* **170**, 110–125.
- Hall, M.-C., Young, D.A., Waters, J.G., Rowan, A.D., Chantry, A., Edwards, D.R., and Clark, I.M. (2003). The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the

regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J. Biol. Chem.* 278, 10304–10313.

Hamilton, M., and Wolfman, A. (1998). Oncogenic Ha-Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activity requires signaling through the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 28155–28162.

Harburger, D.S., Bouaouina, M., and Calderwood, D.A. (2009). Kindlin-1 and -2 Directly Bind the C-terminal Region of  $\beta$  Integrin Cytoplasmic Tails and Exert Integrin-specific Activation Effects. *J. Biol. Chem.* 284, 11485–11497.

Hashimoto, N., Phan, S.H., Imaizumi, K., Matsuo, M., Nakashima, H., Kawabe, T., Shimokata, K., and Hasegawa, Y. (2010). Endothelial–Mesenchymal Transition in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 43, 161–172.

Hata, A., Lagna, G., Massagué, J., and Hemmati-Brivanlou, A. (1998). Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev.* 12, 186–197.

Hay, E.D. (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat. (Basel)* 154, 8–20.

Hay, J., Shahzeidi, S., and Laurent, G. (1991). Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. *Arch. Toxicol.* 65, 81–94.

Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.-Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Wrana, J.L., et al. (1997). The MAD-Related Protein Smad7 Associates with the TGF $\beta$  Receptor and Functions as an Antagonist of TGF $\beta$  Signaling. *Cell* 89, 1165–1173.

Hayashida, T., Wu, M.-H., Pierce, A., Poncelet, A.-C., Varga, J., and Schnaper, H.W. (2007). MAP-kinase activity necessary for TGF $\beta$ 1-stimulated mesangial cell type I collagen expression requires adhesion-dependent phosphorylation of FAK tyrosine 397. *J. Cell Sci.* 120, 4230–4240.

Hayes, S., Chawla, A., and Corvera, S. (2002). TGF $\beta$  receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes. *J. Cell Biol.* 158, 1239–1249.

Headley, L., Bi, W., Wilson, C., Collum, S.D., Chavez, M., Darwiche, T., Mertens, T.C.J., Hernandez, A.M., Siddiqui, S.R., Rosenbaum, S., et al. (2018). Low-dose administration of bleomycin leads to early alterations in lung mechanics. *Exp. Physiol.* 103, 1692–1703.

Hecker, L., Logsdon, N.J., Kurundkar, D., Kurundkar, A., Bernard, K., Hock, T., Meldrum, E., Sanders, Y.Y., and Thannickal, V.J. (2014). Reversal of Persistent Fibrosis in Aging by Targeting Nox4-Nrf2 Redox Imbalance. *Sci. Transl. Med.* 6, 231ra47.

Hegner, B., Schaub, T., Catar, R., Kusch, A., Wagner, P., Essin, K., Lange, C., Riemekasten, G., and Dragun, D. (2016). Intrinsic Deregulation of Vascular Smooth Muscle and Myofibroblast Differentiation in Mesenchymal Stromal Cells from Patients with Systemic Sclerosis. *PLoS ONE* 11.

- Heindryckx, F., Colle, I., and Van Vlierberghe, H. (2009). Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int. J. Exp. Pathol.* *90*, 367–386.
- Henderson, N.C., and Sheppard, D. (2013). Integrin-mediated regulation of TGF $\beta$  in fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1832*, 891–896.
- Henderson, N.C., Arnold, T.D., Katamura, Y., Giacomini, M.M., Rodriguez, J.D., McCarty, J.H., Pellicoro, A., Raschperger, E., Betsholtz, C., Ruminiski, P.G., et al. (2013). Targeting of  $\alpha$  v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nat. Med.* *19*, 1617–1624.
- Hernandez-Gea, V., and Friedman, S.L. (2011). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu. Rev. Pathol.* *6*, 425–456.
- Herzog, E.L., and Bucala, R. (2010). Fibrocytes in health and disease. *Exp. Hematol.* *38*, 548–556.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. (1992). Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Bio/Technology* *10*, 413–417.
- Hill, C., Jones, M.G., Davies, D.E., and Wang, Y. (2019). Epithelial-mesenchymal transition contributes to pulmonary fibrosis via aberrant epithelial/fibroblastic cross-talk. *J. Lung Health Dis.* *3*, 31–35.
- Hinck, A.P. (2012). Structural studies of the TGF- $\beta$ s and their receptors – insights into evolution of the TGF- $\beta$  superfamily. *FEBS Lett.* *586*, 1860–1870.
- Hinck, A.P., Mueller, T.D., and Springer, T.A. (2016). Structural Biology and Evolution of the TGF- $\beta$  Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *8*, a022103.
- Hodivala-Dilke, K.M., McHugh, K.P., Tsakiris, D.A., Rayburn, H., Crowley, D., Ullman-Culleré, M., Ross, F.P., Collier, B.S., Teitelbaum, S., and Hynes, R.O. (1999).  $\beta$ 3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J. Clin. Invest.* *103*, 229–238.
- Horan, G.S., Wood, S., Ona, V., Li, D.J., Lukashev, M.E., Weinreb, P.H., Simon, K.J., Hahm, K., Allaire, N.E., Rinaldi, N.J., et al. (2008). Partial inhibition of integrin  $\alpha$ (v) $\beta$ 6 prevents pulmonary fibrosis without exacerbating inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *177*, 56–65.
- Hou, W., and Syn, W.-K. (2018). Role of Metabolism in Hepatic Stellate Cell Activation and Fibrogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.* *6*.
- Howe, A.K., Aplin, A.E., and Juliano, R.L. (2002). Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *12*, 30–35.
- Humphreys, B.D., Lin, S.-L., Kobayashi, A., Hudson, T.E., Nowlin, B.T., Bonventre, J.V., Valerius, M.T., McMahon, A.P., and Duffield, J.S. (2010). Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am. J. Pathol.* *176*, 85–97.
- Humphries, J.D., Byron, A., and Humphries, M.J. (2006). INTEGRIN LIGANDS. *J. Cell Sci.* *119*, 3901–3903.



Hung, C., Linn, G., Chow, Y.-H., Kobayashi, A., Mittelsteadt, K., Altemeier, W.A., Gharib, S.A., Schnapp, L.M., and Duffield, J.S. (2013). Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *188*, 820–830.

Hynes, R.O. (2002). Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* *110*, 673–687.

Im, Y.-H., Kim, H.T., Kim, I.Y., Factor, V.M., Hahm, K.-B., Anzano, M., Jang, J.-J., Flanders, K., Haines, D.C., Thorgeirsson, S.S., et al. (2001). Heterozygous Mice for the Transforming Growth Factor- $\beta$  Type II Receptor Gene Have Increased Susceptibility to Hepatocellular Carcinogenesis. *Cancer Res.* *61*, 6665–6668.

Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M., and Miyazono, K. (1997). Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* *389*, 622–626.

Inouye, S., and Shimomura, O. (1997). The use of Renilla luciferase, Oplophorus luciferase, and apoaequorin as bioluminescent reporter protein in the presence of coelenterazine analogues as substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *233*, 349–353.

Iredale, J.P. (2007). Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J. Clin. Invest.* *117*, 539–548.

Ishida, Y., Kimura, A., Kondo, T., Hayashi, T., Ueno, M., Takakura, N., Matsushima, K., and Mukaida, N. (2007). Essential Roles of the CC Chemokine Ligand 3-CC Chemokine Receptor 5 Axis in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis through Regulation of Macrophage and Fibrocyte Infiltration. *Am. J. Pathol.* *170*, 843–854.

Iwaisako, K., Jiang, C., Zhang, M., Cong, M., Moore-Morris, T.J., Park, T.J., Liu, X., Xu, J., Wang, P., Paik, Y.-H., et al. (2014). Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E3297–E3305.

Janji, B., Melchior, C., Gouon, V., Vallar, L., and Kieffer, N. (1999). Autocrine TGF-beta-regulated expression of adhesion receptors and integrin-linked kinase in HT-144 melanoma cells correlates with their metastatic phenotype. *Int. J. Cancer* *83*, 255–262.

Jiao, J., Ooka, K., Fey, H., Fiel, M.I., Rahmman, A.H., Kojima, K., Hoshida, Y., Chen, X., de Paula, T., Vetter, D., et al. (2016). Interleukin-15 receptor  $\alpha$  on hepatic stellate cells regulates hepatic fibrogenesis in mice. *J. Hepatol.* *65*, 344–353.

Jinde, K., Nikolic-Paterson, D.J., Huang, X.R., Sakai, H., Kurokawa, K., Atkins, R.C., and Lan, H.Y. (2001). Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* *38*, 761–769.

Jung, K.Y., Chen, K., Kretzler, M., and Wu, C. (2007). TGF- $\beta$ 1 Regulates the PINCH-1–Integrin-Linked Kinase- $\alpha$ -Parvin Complex in Glomerular Cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* *18*, 66–73.

- Kadler, K.E., Hill, A., and Canty-Laird, E.G. (2008). Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 495–501.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* *119*, 1420–1428.
- Kanzler, S., Meyer, E., Lohse, A.W., Schirmacher, P., Henninger, J., Galle, P.R., and Blessing, M. (2001). Hepatocellular expression of a dominant-negative mutant TGF- $\beta$  type II receptor accelerates chemically induced hepatocarcinogenesis. *Oncogene* *20*, 5015–5024.
- Karonen, T., Jeskanen, L., and Keski-Oja, J. (1997). Transforming growth factor beta 1 and its latent form binding protein-1 associate with elastic fibres in human dermis: accumulation in actinic damage and absence in anetoderma. *Br. J. Dermatol.* *137*, 51–58.
- Kashiwagi, H., Schwartz, M.A., Eigenthaler, M., Davis, K.A., Ginsberg, M.H., and Shattil, S.J. (1997). Affinity modulation of platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 by beta3-endonexin, a selective binding partner of the beta3 integrin cytoplasmic tail. *J. Cell Biol.* *137*, 1433–1443.
- Kattla, J.J., Carew, R.M., Heljić, M., Godson, C., and Brazil, D.P. (2008). Protein kinase B/Akt activity is involved in renal TGF- $\beta$ 1-driven epithelial-mesenchymal transition in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *295*, F215–F225.
- Kawelke, N., Vasel, M., Sens, C., Au, A. von, Dooley, S., and Nakchbandi, I.A. (2011). Fibronectin protects from excessive liver fibrosis by modulating the availability of and responsiveness of stellate cells to active TGF- $\beta$ . *PloS One* *6*, e28181.
- Kechagia, J.Z., Ivaska, J., and Roca-Cusachs, P. (2019). Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 457–473.
- Kendall, R.T., and Feghali-Bostwick, C.A. (2014). Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front. Pharmacol.* *5*.
- Khalil, N., Xu, Y.D., O'Connor, R., and Duronio, V. (2005). Proliferation of pulmonary interstitial fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta1-induced release of extracellular fibroblast growth factor-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK. *J. Biol. Chem.* *280*, 43000–43009.
- Kim, J.K., Xu, Y., Xu, X., Keene, D.R., Gurusiddappa, S., Liang, X., Wary, K.K., and Höök, M. (2005). A novel binding site in collagen type III for integrins  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 2 $\beta$ 1. *J. Biol. Chem.* *280*, 32512–32520.
- Kim, K.K., Wei, Y., Szekeres, C., Kugler, M.C., Wolters, P.J., Hill, M.L., Frank, J.A., Brumwell, A.N., Wheeler, S.E., Kreidberg, J.A., et al. (2009). Epithelial cell  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin links  $\beta$ -catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* *119*, 213–224.
- Kisseleva, T. (2017). The Origin of Fibrogenic Myofibroblasts in Fibrotic Liver. *Hepatology*. *Baltim. Md* *65*, 1039–1043.

- Kisseleva, T., Cong, M., Paik, Y., Scholten, D., Jiang, C., Benner, C., Iwaisako, K., Moore-Morris, T., Scott, B., Tsukamoto, H., et al. (2012). Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 9448–9453.
- Klingberg, F., Chau, G., Walraven, M., Boo, S., Koehler, A., Chow, M.L., Olsen, A.L., Im, M., Lodyga, M., Wells, R.G., et al. (2018). The fibronectin ED-A domain enhances recruitment of latent TGF- $\beta$ -binding protein-1 to the fibroblast matrix. *J. Cell Sci.* *131*.
- Knudsen, L., and Ochs, M. (2018). The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. *Histochem. Cell Biol.* *150*, 661–676.
- Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitlmann, L., Godar, S., Stockinger, H., and Seed, B. (1996).  $\alpha$ L $\beta$ 2 Integrin/LFA-1 Binding to ICAM-1 Induced by Cytohesin-1, a Cytoplasmic Regulatory Molecule. *Cell* *86*, 233–242.
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* *269*, 1427–1429.
- Lacy-Hulbert, A., Smith, A.M., Tissire, H., Barry, M., Crowley, D., Bronson, R.T., Roes, J.T., Savill, J.S., and Hynes, R.O. (2007). Ulcerative colitis and autoimmunity induced by loss of myeloid  $\alpha$ v integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15823–15828.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Lagarrigue, F., Kim, C., and Ginsberg, M.H. (2016). The Rap1-RIAM-talin axis of integrin activation and blood cell function. *Blood* *128*, 479–487.
- Lagenaur, C., and Lemmon, V. (1987). An L1-like molecule, the 8D9 antigen, is a potent substrate for neurite extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 7753–7757.
- Lamar, J.M., Iyer, V., and DiPersio, C.M. (2008). Integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 potentiates TGF $\beta$ -mediated induction of MMP-9 in immortalized keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* *128*, 575–586.
- Lan, T., Kisseleva, T., and Brenner, D.A. (2015). Deficiency of NOX1 or NOX4 Prevents Liver Inflammation and Fibrosis in Mice through Inhibition of Hepatic Stellate Cell Activation. *PloS One* *10*, e0129743.
- Lange, T.S., Bielinsky, A.K., Kirchberg, K., Bank, I., Herrmann, K., Krieg, T., and Scharffetter-Kochanek, K. (1994). Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> Differentially Regulate  $\beta$ 1 Integrin-Mediated Adhesion of Dermal Fibroblasts and Keratinocytes to Various Extracellular Matrix Proteins. *Exp. Cell Res.* *214*, 381–388.
- Lee, M.K., Pardoux, C., Hall, M.C., Lee, P.S., Warburton, D., Qing, J., Smith, S.M., and Derynck, R. (2007). TGF- $\beta$  activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J.* *26*, 3957–3967.
- Lee, S.-J., Kim, K.-H., and Park, K.-K. (2014). Mechanisms of fibrogenesis in liver cirrhosis: The molecular aspects of epithelial-mesenchymal transition. *World J. Hepatol.* *6*, 207–216.

- Li, B., and Wang, J.H.-C. (2011). Fibroblasts and Myofibroblasts in Wound Healing: Force Generation and Measurement. *J. Tissue Viability* 20, 108–120.
- Li, J., and Springer, T.A. (2017). Integrin extension enables ultrasensitive regulation by cytoskeletal force. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 4685.
- Li, J., Qu, X., Yao, J., Caruana, G., Ricardo, S.D., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., and Bertram, J.F. (2010). Blockade of endothelial-mesenchymal transition by a Smad3 inhibitor delays the early development of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes* 59, 2612–2624.
- Li, M., Luan, F., Zhao, Y., Hao, H., Zhou, Y., Han, W., and Fu, X. (2016). Epithelial-mesenchymal transition: An emerging target in tissue fibrosis. *Exp. Biol. Med.* 241, 1–13.
- Li, X., Zhu, L., Wang, B., Yuan, M., and Zhu, R. (2017). Drugs and Targets in Fibrosis. *Front. Pharmacol.* 8.
- Lin, S.-L., Kisseleva, T., Brenner, D.A., and Duffield, J.S. (2008). Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am. J. Pathol.* 173, 1617–1627.
- Lin, X., Liang, M., and Feng, X.H. (2000). Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.* 275, 36818–36822.
- Lindmark, H., and Guss, B. (1999). SFS, a Novel Fibronectin-Binding Protein from *Streptococcus equi*, Inhibits the Binding between Fibronectin and Collagen. *Infect. Immun.* 67, 2383–2388.
- Liu, W., Hou, Y., Chen, H., Wei, H., Lin, W., Li, J., Zhang, M., He, F., and Jiang, Y. (2011). Sample preparation method for isolation of single-cell types from mouse liver for proteomic studies. *PROTEOMICS* 11, 3556–3564.
- Lo, K.W.-H., Jiang, T., Gagnon, K.A., Nelson, C., and Laurencin, C.T. (2014). Small Molecule based Musculoskeletal Regenerative Engineering. *Trends Biotechnol.* 32, 74–81.
- Lu, Y.-Y., Lin, Y.-K., Kao, Y.-H., Chung, C.-C., Yeh, Y.-H., Chen, S.-A., and Chen, Y.-J. (2016). Collagen regulates transforming growth factor- $\beta$  receptors of HL-1 cardiomyocytes through activation of stretch and integrin signaling. *Mol. Med. Rep.* 14, 3429–3436.
- Ludbrook, S.B., Barry, S.T., Delves, C.J., and Horgan, C.M.T. (2003). The integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 is a receptor for the latency-associated peptides of transforming growth factors  $\beta$ 1 and  $\beta$ 3. *Biochem. J.* 369, 311–318.
- Luo, K., and Lodish, H.F. (1997). Positive and negative regulation of type II TGF- $\beta$  receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *EMBO J.* 16, 1970–1981.

- Lyons, R.M., Keski-Oja, J., and Moses, H.L. (1988). Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J. Cell Biol.* *106*, 1659–1665.
- Lyons, R.M., Gentry, L.E., Purchio, A.F., and Moses, H.L. (1990). Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J. Cell Biol.* *110*, 1361–1367.
- Ma, L.-J., Yang, H., Gaspert, A., Carlesso, G., Barty, M.M., Davidson, J.M., Sheppard, D., and Fogo, A.B. (2003). Transforming growth factor-beta-dependent and -independent pathways of induction of tubulointerstitial fibrosis in beta6(-/-) mice. *Am. J. Pathol.* *163*, 1261–1273.
- Macias, M.J., Martin-Malpartida, P., and Massagué, J. (2015). Structural determinants of SMAD function in TGF- $\beta$  signaling. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 296–308.
- Mackinnon, A.C., Qadota, H., Norman, K.R., Moerman, D.G., and Williams, B.D. (2002). C. elegans PAT-4/ILK Functions as an Adaptor Protein within Integrin Adhesion Complexes. *Curr. Biol.* *12*, 787–797.
- Makarev, E., Izumchenko, E., Aihara, F., Wysocki, P.T., Zhu, Q., Buzdin, A., Sidransky, D., Zhavoronkov, A., and Atala, A. (2016). Common pathway signature in lung and liver fibrosis. *Cell Cycle* *15*, 1667–1673.
- Margadant, C., and Sonnenberg, A. (2010). Integrin–TGF- $\beta$  crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep.* *11*, 97–105.
- Markose, D., Kirkland, P., Ramachandran, P., and Henderson, N.C. (2018). Immune cell regulation of liver regeneration and repair. *J. Immunol. Regen. Med.* *2*, 1–10.
- Massagué, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev.* *19*, 2783–2810.
- Masuzaki, R., Ray, K.C., Roland, J., Zent, R., Lee, Y.A., and Karp, S.J. (2021). Integrin  $\beta$ 1 Establishes Liver Microstructure and Modulates Transforming Growth Factor  $\beta$  during Liver Development and Regeneration. *Am. J. Pathol.* *191*, 309–319.
- McCay, P.B., Lai, E.K., Poyer, J.L., DuBose, C.M., and Janzen, E.G. (1984). Oxygen- and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. Observation of lipid radicals in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* *259*, 2135–2143.
- McHugh, K.P., Hodivala-Dilke, K., Zheng, M.H., Namba, N., Lam, J., Novack, D., Feng, X., Ross, F.P., Hynes, R.O., and Teitelbaum, S.L. (2000). Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J. Clin. Invest.* *105*, 433–440.
- Mehta, V. (2005). Radiation pneumonitis and pulmonary fibrosis in non-small-cell lung cancer: pulmonary function, prediction, and prevention. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *63*, 5–24.
- Mimura, Y., Ihn, H., Jinnin, M., Asano, Y., Yamane, K., and Tamaki, K. (2005). Constitutive Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase Is Involved in the Myofibroblast Differentiation of Scleroderma Fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* *124*, 886–892.

- Mitchell, H., Choudhury, A., Pagano, R.E., and Leof, E.B. (2004). Ligand-dependent and -independent Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptor Recycling Regulated by Clathrin-mediated Endocytosis and Rab11. *Mol. Biol. Cell* *15*, 4166–4178.
- Miyasato, S.K., Loeffler, J., Shohet, R., Zhang, J., Lindsey, M., and Le Saux, C.J. (2011). Caveolin-1 modulates TGF- $\beta$ 1 signaling in cardiac remodeling. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* *30*, 318–329.
- Miyazono, K., Olofsson, A., Colosetti, P., and Heldin, C.H. (1991). A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J.* *10*, 1091–1101.
- Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gauldie, J., and Kolb, M. (2008). The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 362–382.
- Montanez, E., Ussar, S., Schifferer, M., Bösl, M., Zent, R., Moser, M., and Fässler, R. (2008). Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev.* *22*, 1325–1330.
- Moore, B.B., Murray, L., Das, A., Wilke, C.A., Herrygers, A.B., and Toews, G.B. (2006). The Role of CCL12 in the Recruitment of Fibrocytes and Lung Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *35*, 175–181.
- Moser, M., Nieswandt, B., Ussar, S., Pozgajova, M., and Fässler, R. (2008). Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat. Med.* *14*, 325–330.
- Moser, M., Bauer, M., Schmid, S., Ruppert, R., Schmidt, S., Sixt, M., Wang, H.-V., Sperandio, M., and Fässler, R. (2009). Kindlin-3 is required for beta2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nat. Med.* *15*, 300–305.
- Mu, D., Cambier, S., Fjellbirkeland, L., Baron, J.L., Munger, J.S., Kawakatsu, H., Sheppard, D., Broaddus, V.C., and Nishimura, S.L. (2002). The integrin  $\alpha\beta$ 8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF- $\beta$ 1. *J. Cell Biol.* *157*, 493–507.
- Mueller, S., Millonig, G., and Seitz, H.K. (2009). Alcoholic liver disease and hepatitis C: A frequently underestimated combination. *World J. Gastroenterol. WJG* *15*, 3462–3471.
- Munger, J.S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M.J., Dalton, S.L., Wu, J., Pittet, J.F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M.A., et al. (1999). The integrin  $\alpha$ v $\beta$ 6 binds and activates latent TGF  $\beta$  1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* *96*, 319–328.
- Murphy, J.M., Rodriguez, Y.A.R., Jeong, K., Ahn, E.-Y.E., and Lim, S.-T.S. (2020). Targeting focal adhesion kinase in cancer cells and the tumor microenvironment. *Exp. Mol. Med.* *52*, 877–886.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., and Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* *42*, 3858–3863.

- Nakatsukasa, H., Nagy, P., Evarts, R.P., Hsia, C.C., Marsden, E., and Thorgeirsson, S.S. (1990). Cellular distribution of transforming growth factor-beta 1 and procollagen types I, III, and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* *85*, 1833–1843.
- Ng, Y.Y., Huang, T.P., Yang, W.C., Chen, Z.P., Yang, A.H., Mu, W., Nikolic-Paterson, D.J., Atkins, R.C., and Lan, H.Y. (1998). Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int.* *54*, 864–876.
- Nishimura, S.L. (2009). Integrin-Mediated Transforming Growth Factor- $\beta$  Activation, a Potential Therapeutic Target in Fibrogenic Disorders. *Am. J. Pathol.* *175*, 1362–1370.
- Niu, L., Cui, X., Qi, Y., Xie, D., Wu, Q., Chen, X., Ge, J., and Liu, Z. (2016). Involvement of TGF- $\beta$ 1/Smad3 Signaling in Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Mice. *PLoS ONE* *11*.
- Nova, Z., Skovierova, H., and Calkovska, A. (2019). Alveolar-Capillary Membrane-Related Pulmonary Cells as a Target in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *Int. J. Mol. Sci.* *20*.
- Okada, H., Danoff, T.M., Kalluri, R., and Neilson, E.G. (1997). Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* *273*, F563–F574.
- Paralkar, V.M., Vukicevic, S., and Reddi, A.H. (1991). Transforming growth factor  $\beta$  type 1 binds to collagen IV of basement membrane matrix: Implications for development. *Dev. Biol.* *143*, 303–308.
- Parsons, J.T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell Sci.* *116*, 1409–1416.
- Patsenker, E., Popov, Y., Stickel, F., Jonczyk, A., Goodman, S.L., and Schuppan, D. (2008). Inhibition of integrin  $\alpha$ v $\beta$ 6 on cholangiocytes blocks transforming growth factor-beta activation and retards biliary fibrosis progression. *Gastroenterology* *135*, 660–670.
- Pellinen, T., Blom, S., Sánchez, S., Välimäki, K., Mpindi, J.-P., Azegrouz, H., Strippoli, R., Nieto, R., Vitón, M., Palacios, I., et al. (2018). ITGB1-dependent upregulation of Caveolin-1 switches TGF $\beta$  signalling from tumour-suppressive to oncogenic in prostate cancer. *Sci. Rep.* *8*, 2338.
- Petridou, S., Maltseva, O., Spanakis, S., and Masur, S.K. (2000). TGF- $\beta$  Receptor Expression and Smad2 Localization Are Cell Density Dependent in Fibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *41*, 89–95.
- Pfaffl, M.W., and Riedmaier, I. (2011). Die Real-Time-RT-PCR-Datenanalyse im Fokus der MIQE-Richtlinie. *BIOSpektrum* *17*, 295–297.
- Phillips, R.J., Burdick, M.D., Hong, K., Lutz, M.A., Murray, L.A., Xue, Y.Y., Belperio, J.A., Keane, M.P., and Strieter, R.M. (2004). Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J. Clin. Invest.* *114*, 438–446.

- Piera-Velazquez, S., Li, Z., and Jimenez, S.A. (2011). Role of Endothelial-Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Fibrotic Disorders. *Am. J. Pathol.* *179*, 1074–1080.
- Piguet, P.F., and Vesin, C. (1994). Treatment by human recombinant soluble TNF receptor of pulmonary fibrosis induced by bleomycin or silica in mice. *Eur. Respir. J.* *7*, 515–518.
- Piguet, P.F., Collart, M.A., Grau, G.E., Sappino, A.P., and Vassalli, P. (1990). Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature* *344*, 245–247.
- Pilling, D., Fan, T., Huang, D., Kaul, B., and Gomer, R.H. (2009). Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PloS One* *4*, e7475.
- Plow, E.F., Haas, T.A., Zhang, L., Loftus, J., and Smith, J.W. (2000). Ligand Binding to Integrins. *J. Biol. Chem.* *275*, 21785–21788.
- Pohlers, D., Brenmoehl, J., Löffler, I., Müller, C.K., Leipner, C., Schultze-Mosgau, S., Stallmach, A., Kinne, R.W., and Wolf, G. (2009). TGF- $\beta$  and fibrosis in different organs — molecular pathway imprints. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1792*, 746–756.
- Prasse, A., Pechkovsky, D.V., Toews, G.B., Jungraithmayr, W., Kollert, F., Goldmann, T., Vollmer, E., Müller-Quernheim, J., and Zissel, G. (2006). A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *173*, 781–792.
- Puthawala, K., Hadjiangelis, N., Jacoby, S.C., Bayongan, E., Zhao, Z., Yang, Z., Devitt, M.L., Horan, G.S., Weinreb, P.H., Lukashev, M.E., et al. (2008). Inhibition of integrin  $\alpha(v)\beta6$ , an activator of latent transforming growth factor- $\beta$ , prevents radiation-induced lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *177*, 82–90.
- Razani, B., Zhang, X.L., Bitzer, M., Gersdorff, G. von, Böttinger, E.P., and Lisanti, M.P. (2001). Caveolin-1 Regulates Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ /SMAD Signaling through an Interaction with the TGF- $\beta$  Type I Receptor. *J. Biol. Chem.* *276*, 6727–6738.
- Reyes, C.D., and García, A.J. (2004).  $\alpha2\beta1$  integrin-specific collagen-mimetic surfaces supporting osteoblastic differentiation. *J. Biomed. Mater. Res. A* *69*, 591–600.
- Reynolds, L.E., Conti, F.J., Lucas, M., Grose, R., Robinson, S., Stone, M., Saunders, G., Dickson, C., Hynes, R.O., Lacy-Hulbert, A., et al. (2005). Accelerated re-epithelialization in  $\beta3$ -integrin-deficient mice is associated with enhanced TGF- $\beta1$  signaling. *Nat. Med.* *11*, 167–174.
- Reynolds, L.E., Conti, F.J., Silva, R., Robinson, S.D., Iyer, V., Rudling, R., Cross, B., Nye, E., Hart, I.R., DiPersio, C.M., et al. (2008).  $\alpha3\beta1$  integrin-controlled Smad7 regulates reepithelialization during wound healing in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 965–974.



- Roberts, A.B., McCune, B.K., and Sporn, M.B. (1992). TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int.* *41*, 557–559.
- Robertson, I.B., Horiguchi, M., Zilberberg, L., Dabovic, B., Hadjiolova, K., and Rifkin, D.B. (2015). Latent TGF- $\beta$ -binding proteins. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* *47*, 44–53.
- Rock, J.R., Barkauskas, C.E., Cronce, M.J., Xue, Y., Harris, J.R., Liang, J., Noble, P.W., and Hogan, B.L.M. (2011). Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, E1475–E1483.
- Rockey, D.C., Bell, P.D., and Hill, J.A. (2015). Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure. *N. Engl. J. Med.* *372*, 1138–1149.
- Rognoni, E., Widmaier, M., Jakobson, M., Ruppert, R., Ussar, S., Katsougkri, D., Böttcher, R.T., Lai-Cheong, J.E., Rifkin, D.B., McGrath, J.A., et al. (2014). Kindlin-1 controls Wnt and TGF- $\beta$  availability to regulate cutaneous epithelial stem cell proliferation. *Nat. Med.* *20*, 350–359.
- Rolli, M., Fransvea, E., Pilch, J., Saven, A., and Felding-Habermann, B. (2003). Activated integrin  $\alpha 3$  cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 9482–9487.
- Roth, S., Michel, K., and Gressner, A.M. (1998). (latent) transforming growth factor beta in liver parenchymal cells, its injury-dependent release, and paracrine effects on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* *27*, 1003–1012.
- Rowley, J.E., and Johnson, J.R. (2014). Pericytes in Chronic Lung Disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *164*, 178–188.
- Ruiz, V., Ordóñez, R.Ma., Berumen, J., Ramírez, R., Uhal, B., Becerril, C., Pardo, A., and Selman, M. (2003). Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *285*, L1026–L1036.
- Safaeian, L., Jafarian-Dehkordi, A., Rabbani, M., Sadeghi, H.M., Afshar-Moghaddam, N., and Sarahroodi, S. (2013). Comparison of bleomycin-induced pulmonary apoptosis between NMRI mice and C57BL/6 mice. *Res. Pharm. Sci.* *8*, 43–50.
- Saharinen, J., and Keski-Oja, J. (2000). Specific Sequence Motif of 8-Cys Repeats of TGF- $\beta$  Binding Proteins, LTBP1s, Creates a Hydrophobic Interaction Surface for Binding of Small Latent TGF- $\beta$ . *Mol. Biol. Cell* *11*, 2691–2704.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* *239*, 487–491.
- Sakai, N., Wada, T., Yokoyama, H., Lipp, M., Ueha, S., Matsushima, K., and Kaneko, S. (2006). Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 14098–14103.

- Saleem, S., Li, J., Yee, S.-P., Fellows, G.F., Goodyer, C.G., and Wang, R. (2009).  $\beta$ 1 integrin/FAK/ERK signalling pathway is essential for human fetal islet cell differentiation and survival. *J. Pathol.* *219*, 182–192.
- Salmela, M., Jokinen, J., Tiitta, S., Rappu, P., Cheng, R.H., and Heino, J. (2017). Integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 in nonactivated conformation can induce focal adhesion kinase signaling. *Sci. Rep.* *7*, 3414.
- Salton, F., Volpe, M.C., and Confalonieri, M. (2019). Epithelial–Mesenchymal Transition in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Medicina (Mex.)* *55*.
- Sanjabi, S., Oh, S.A., and Li, M.O. (2017). Regulation of the Immune Response by TGF- $\beta$ : From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *9*, a022236.
- Scaffidi, A.K., Petrovic, N., Moodley, Y.P., Fogel-Petrovic, M., Kroeger, K.M., Seeber, R.M., Eidne, K.A., Thompson, P.J., and Knight, D.A. (2004).  $\alpha$ v $\beta$ 3 Integrin Interacts with the Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) Type II Receptor to Potentiate the Proliferative Effects of TGF $\beta$ 1 in Living Human Lung Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *279*, 37726–37733.
- Schiller, H.B., Fernandez, I.E., Burgstaller, G., Schaab, C., Scheltema, R.A., Schwarzmayr, T., Strom, T.M., Eickelberg, O., and Mann, M. (2015). Time- and compartment-resolved proteome profiling of the extracellular niche in lung injury and repair. *Mol. Syst. Biol.* *11*.
- Schmidt, S., Nakchbandi, I., Ruppert, R., Kawelke, N., Hess, M.W., Pfaller, K., Jurdic, P., Fässler, R., and Moser, M. (2011). Kindlin-3–mediated signaling from multiple integrin classes is required for osteoclast-mediated bone resorption. *J. Cell Biol.* *192*, 883–897.
- Scholten, D., Trebicka, J., Liedtke, C., and Weiskirchen, R. (2015). The carbon tetrachloride model in mice. *Lab. Anim.* *49*, 4–11.
- Schoppet, M., Chavakis, T., Al-Fakhri, N., Kanse, S.M., and Preissner, K.T. (2002). Molecular interactions and functional interference between vitronectin and transforming growth factor-beta. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *82*, 37–46.
- Schuppan, D., Ruehl, M., Somasundaram, R., and Hahn, E.G. (2001). Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin. Liver Dis.* *21*, 351–372.
- Scotton, C.J., and Chambers, R.C. (2007). Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest* *132*, 1311–1321.
- Scotton, C.J., Krupiczkoj, M.A., Königshoff, M., Mercer, P.F., Lee, Y.C.G., Kaminski, N., Morser, J., Post, J.M., Maher, T.M., Nicholson, A.G., et al. (2009). Increased local expression of coagulation factor X contributes to the fibrotic response in human and murine lung injury. *J. Clin. Invest.* *119*, 2550–2563.
- Sebald, W., Nickel, J., Zhang, J.-L., and Mueller, T.D. (2004). Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. *Biol. Chem.* *385*, 697–710.

- Sebti, S.M., Mignano, J.E., Jani, J.P., Srimatkandada, S., and Lazo, J.S. (1989). Bleomycin hydrolase: molecular cloning, sequencing, and biochemical studies reveal membership in the cysteine proteinase family. *Biochemistry* 28, 6544–6548.
- Serini, G., Bochaton-Piallat, M.-L., Ropraz, P., Geinoz, A., Borsi, L., Zardi, L., and Gabbiani, G. (1998). The Fibronectin Domain ED-A Is Crucial for Myofibroblastic Phenotype Induction by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1. *J. Cell Biol.* 142, 873.
- Shang, N., Arteaga, M., Zaidi, A., Stauffer, J., Cotler, S.J., Zeleznik-Le, N., Zhang, J., and Qiu, W. (2015). FAK is required for c-Met/ $\beta$ -catenin-driven hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. Baltimore, Md 61, 214–226.
- Sheppard, D. (2005). Integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta. *Cancer Metastasis Rev.* 24, 395–402.
- Sherman, K.E. (1991). Alanine aminotransferase in clinical practice. A review. *Arch. Intern. Med.* 151, 260–265.
- Shi, J., Aisaki, K., Ikawa, Y., and Wake, K. (1998). Evidence of Hepatocyte Apoptosis in Rat Liver after the Administration of Carbon Tetrachloride. *Am. J. Pathol.* 153, 515–525.
- Shi, W., Chang, C., Nie, S., Xie, S., Wan, M., and Cao, X. (2007). Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling. *J. Cell Sci.* 120, 1216–1224.
- Shimaoka, M., Xiao, T., Liu, J.-H., Yang, Y., Dong, Y., Jun, C.-D., McCormack, A., Zhang, R., Joachimiak, A., Takagi, J., et al. (2003). Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell* 112, 99–111.
- Sibille, Y., and Reynolds, H.Y. (1990). Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141, 471–501.
- Siljander, P.R.-M., Hamaia, S., Peachey, A.R., Slatter, D.A., Smethurst, P.A., Ouwehand, W.H., Knight, C.G., and Farndale, R.W. (2004). Integrin Activation State Determines Selectivity for Novel Recognition Sites in Fibrillar Collagens\*. *J. Biol. Chem.* 279, 47763–47772.
- Sims, D.E. (1986). The pericyte—A review. *Tissue Cell* 18, 153–174.
- Singh, R., and Czaja, M.J. (2007). Regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22 Suppl 1, S45-48.
- Smithmyer, M.E., Spohn, J.B., and Kloxin, A.M. (2018). Probing Fibroblast Activation in Response to Extracellular Cues with Whole Protein- or Peptide-Functionalized Step-Growth Hydrogels. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4, 3304–3316.
- Sookoian, S., and Pirola, C.J. (2015). Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: From systems biology to the personalized medicine. *World J. Gastroenterol.* WJG 21, 711–725.

- Sottile, J., Shi, F., Rublyevska, I., Chiang, H.-Y., Lust, J., and Chandler, J. (2007). Fibronectin-dependent collagen I deposition modulates the cell response to fibronectin. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 293, C1934–C1946.
- Speicher, T., Siegenthaler, B., Bogorad, R.L., Ruppert, R., Petzold, T., Padriša-Altes, S., Bachofner, M., Anderson, D.G., Koteliensky, V., Fässler, R., et al. (2014). Knockdown and knockout of  $\beta 1$ -integrin in hepatocytes impairs liver regeneration through inhibition of growth factor signalling. *Nat. Commun.* 5, 3862.
- Springer, T.A., and Dustin, M.L. (2012). Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 107–115.
- Stegemann, H. (1958). Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin-T und p-Dimethylaminobenzaldehyd. *Biol. Chem.* 311, 41–45.
- Sternberg, N., Hamilton, D., and Hoess, R. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination: II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *J. Mol. Biol.* 150, 487–507.
- Strieter, R.M. (2008). What Differentiates Normal Lung Repair and Fibrosis? *Proc. Am. Thorac. Soc.* 5, 305–310.
- Stupack, D.G., and Cheresch, D.A. (2002). Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell Sci.* 115, 3729–3738.
- Sun, Z., Tseng, H.-Y., Tan, S., Senger, F., Kurzawa, L., Dedden, D., Mizuno, N., Wasik, A.A., They, M., Dunn, A.R., et al. (2016). Kank2 activates talin, reduces force transduction across integrins and induces central adhesion formation. *Nat. Cell Biol.* 18, 941–953.
- Sun, Z., Costell, M., and Fässler, R. (2019). Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *Nat. Cell Biol.* 21, 25–31.
- Syn, W.-K., Choi, S.S., Liaskou, E., Karaca, G.F., Agboola, K.M., Oo, Y.H., Mi, Z., Pereira, T.A., Zdanowicz, M., Malladi, P., et al. (2011). Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 53, 106–115.
- Tachibana, K., Sato, T., D'Avirro, N., and Morimoto, C. (1995). Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK. *J. Exp. Med.* 182, 1089–1099.
- Tacke, F., and Weiskirchen, R. (2010). Pathophysiologie der Leberfibrose. *Internist* 51, 21–29.
- Tadokoro, S., Shattil, S.J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R.C., Pereda, J.M. de, Ginsberg, M.H., and Calderwood, D.A. (2003). Talin Binding to Integrin  $\beta$  Tails: A Final Common Step in Integrin Activation. *Science* 302, 103–106.
- Taipale, J., Koli, K., and Keski-Oja, J. (1992). Release of transforming growth factor-beta 1 from the pericellular matrix of cultured fibroblasts and fibrosarcoma cells by plasmin and thrombin. *J. Biol. Chem.* 267, 25378–25384.

- Taura, K., Miura, K., Iwaisako, K., Osterreicher, C.H., Kodama, Y., Penz-Osterreicher, M., and Brenner, D.A. (2010). Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology*. Baltimore, Md 51, 1027–1036.
- Thannickal, V.J., Lee, D.Y., White, E.S., Cui, Z., Larios, J.M., Chacon, R., Horowitz, J.C., Day, R.M., and Thomas, P.E. (2003). Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* 278, 12384–12389.
- Theodosiou, M., Widmaier, M., Böttcher, R.T., Rognoni, E., Veelders, M., Bharadwaj, M., Lambacher, A., Austen, K., Müller, D.J., Zent, R., et al. (2016). Kindlin-2 cooperates with talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *ELife* 5, e10130.
- Thomas, A.Q., Lane, K., Phillips, J., Prince, M., Markin, C., Speer, M., Schwartz, D.A., Gaddipati, R., Marney, A., Johnson, J., et al. (2002). Heterozygosity for a Surfactant Protein C Gene Mutation Associated with Usual Interstitial Pneumonitis and Cellular Nonspecific Interstitial Pneumonitis in One Kindred. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 1322–1328.
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 349–363.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350–4354.
- Travis, M.A., Reizis, B., Melton, A.C., Masteller, E., Tang, Q., Proctor, J.M., Wang, Y., Bernstein, X., Huang, X., Reichardt, L.F., et al. (2007). Loss of integrin  $\alpha\beta 8$  on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* 449, 361–365.
- Tsakiri, K.D., Cronkhite, J.T., Kuan, P.J., Xing, C., Raghu, G., Weissler, J.C., Rosenblatt, R.L., Shay, J.W., and Garcia, C.K. (2007). Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 7552–7557.
- Tsukamoto, H. (1999). Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 23, 911–916.
- Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L., and Wrana, J.L. (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95, 779–791.
- Tu, Y., Wu, S., Shi, X., Chen, K., and Wu, C. (2003). Migfilin and Mig-2 Link Focal Adhesions to Filamin and the Actin Cytoskeleton and Function in Cell Shape Modulation. *Cell* 113, 37–47.
- Umezawa, H., Ishizuka, M., Maeda, K., and Takeuchi, T. (1967). Studies on bleomycin. *Cancer* 20, 891–895.

- Vekemans, K., and Braet, F. (2005). Structural and functional aspects of the liver and liver sinusoidal cells in relation to colon carcinoma metastasis. *World J. Gastroenterol.* *WJG 11*, 5095–5102.
- Walsh, J.E., and Young, M.R.I. (2011). TGF-beta regulation of focal adhesion proteins and motility of premalignant oral lesions via protein phosphatase 1. *Anticancer Res.* *31*, 3159–3164.
- Wang, B., Dolinski, B.M., Kikuchi, N., Leone, D.R., Peters, M.G., Weinreb, P.H., Violette, S.M., and Bissell, D.M. (2007). Role of alphavbeta6 integrin in acute biliary fibrosis. *Hepatology*. *Baltim. Md 46*, 1404–1412.
- Wang, Q., Usinger, W., Nichols, B., Gray, J., Xu, L., Seeley, T.W., Brenner, M., Guo, G., Zhang, W., Oliver, N., et al. (2011). Cooperative interaction of CTGF and TGF- $\beta$  in animal models of fibrotic disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* *4*, 4.
- Wang, T., Li, B.-Y., Danielson, P.D., Shah, P.C., Rockwell, S., Lechleider, R.J., Martin, J., Manganaro, T., and Donahoe, P.K. (1996). The Immunophilin FKBP12 Functions as a Common Inhibitor of the TGF $\beta$  Family Type I Receptors. *Cell* *86*, 435–444.
- Wang, W., Liu, Q., Zhang, Y., and Zhao, L. (2014). Involvement of ILK/ERK1/2 and ILK/p38 pathways in mediating the enhanced osteoblast differentiation by micro/nanotopography. *Acta Biomater.* *10*, 3705–3715.
- Wang, X.M., Zhang, Y., Kim, H.P., Zhou, Z., Feghali-Bostwick, C.A., Liu, F., Ifedigbo, E., Xu, X., Oury, T.D., Kaminski, N., et al. (2006). Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Exp. Med.* *203*, 2895–2906.
- Wang, Y.-C., Chen, Q., Luo, J.-M., Nie, J., Meng, Q.-H., Shuai, W., Xie, H., Xia, J.-M., and Wang, H. (2019). Notch1 promotes the pericyte-myofibroblast transition in idiopathic pulmonary fibrosis through the PDGFR/ROCK1 signal pathway. *Exp. Mol. Med.* *51*, 1–11.
- Weisend, C.M., Kundert, J.A., Suvorova, E.S., Prigge, J.R., and Schmidt, E.E. (2009). Cre activity in fetal albCre mouse hepatocytes: Utility for developmental studies. *Genes*. *N. Y. N 2000 47*, 789–792.
- Weiss, A., and Attisano, L. (2013). The TGFbeta Superfamily Signaling Pathway: TGFbeta Superfamily Signaling Pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *2*, 47–63.
- Wells, R.G., Gilboa, L., Sun, Y., Liu, X., Henis, Y.I., and Lodish, H.F. (1999). Transforming growth factor-beta induces formation of a dithiothreitol-resistant type I/Type II receptor complex in live cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 5716–5722.
- Weng, Y., Lieberthal, T.J., Zhou, V.X., Lopez-Ichikawa, M., Armas-Phan, M., Bond, T.K., Yoshida, M.C., Choi, W.-T., and Chang, T.T. (2020). Liver epithelial focal adhesion kinase modulates fibrogenesis and hedgehog signaling. *JCI Insight* *5*.
- White, E.S., Sagana, R.L., Booth, A.J., Yan, M., Cornett, A.M., Bloomheart, C.A., Tsui, J.L., Wilke, C.A., Moore, B.B., Ritzenthaler, J.D., et al. (2010). Control of fibroblast fibronectin expression and alternative splicing via the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Exp. Cell Res.* *316*, 2644–2653.

- Williams, A.S., Kang, L., Zheng, J., Grueter, C., Bracy, D.P., James, F.D., Pozzi, A., and Wasserman, D.H. (2015). Integrin  $\alpha$ 1-null Mice Exhibit Improved Fatty Liver When Fed a High Fat Diet Despite Severe Hepatic Insulin Resistance. *J. Biol. Chem.* *290*, 6546–6557.
- Willis, B.C., and Borok, Z. (2007). TGF- $\beta$ -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*
- Wipff, P., and Hinz, B. (2008). Integrins and the activation of latent transforming growth factor  $\beta$ 1 – An intimate relationship. *Eur. J. Cell Biol.* *87*, 601–615.
- Wipff, P.-J., Rifkin, D.B., Meister, J.-J., and Hinz, B. (2007). Myofibroblast contraction activates latent TGF- $\beta$ 1 from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* *179*, 1311–1323.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massagué, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* *370*, 341–347.
- Wu, C.-F., Chiang, W.-C., Lai, C.-F., Chang, F.-C., Chen, Y.-T., Chou, Y.-H., Wu, T.-H., Linn, G.R., Ling, H., Wu, K.-D., et al. (2013). Transforming growth factor  $\beta$ -1 stimulates profibrotic epithelial signaling to activate pericyte-myofibroblast transition in obstructive kidney fibrosis. *Am. J. Pathol.* *182*, 118–131.
- Wuyts, W.A., Agostini, C., Antoniou, K.M., Bouros, D., Chambers, R.C., Cottin, V., Egan, J.J., Lambrecht, B.N., Lories, R., Parfrey, H., et al. (2013). The pathogenesis of pulmonary fibrosis: a moving target. *Eur. Respir. J.* *41*, 1207–1218.
- Wynn, T. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* *214*, 199–210.
- Wynn, T.A. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J. Clin. Invest.* *117*, 524–529.
- Wynn, T.A. (2011). Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J. Exp. Med.* *208*, 1339–1350.
- Wynn, T.A., and Ramalingam, T.R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.* *18*, 1028–1040.
- Xia, H., Nho, R.S., Kahm, J., Kleidon, J., and Henke, C.A. (2004). Focal Adhesion Kinase Is Upstream of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt in Regulating Fibroblast Survival in Response to Contraction of Type I Collagen Matrices via a  $\beta$ 1 Integrin Viability Signaling Pathway \*. *J. Biol. Chem.* *279*, 33024–33034.
- Xie, L., Law, B.K., Chytil, A.M., Brown, K.A., Aakre, M.E., and Moses, H.L. (2004). Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia N. Y. N* *6*, 603–610.
- Xiong, J.-P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S.L., and Arnaout, M.A. (2002). Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 in Complex with an Arg-Gly-Asp Ligand. *Science* *296*, 151–155.
- Xu, R., Zhang, Z., and Wang, F.-S. (2012). Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Cell. Mol. Immunol.* *9*, 296–301.

- Yamashita, M., Fatyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z., and Zhang, Y.E. (2008). TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF- $\beta$ . *Mol. Cell* *31*, 918–924.
- Yang, Z., Mu, Z., Dabovic, B., Jurukovski, V., Yu, D., Sung, J., Xiong, X., and Munger, J.S. (2007). Absence of integrin-mediated TGF $\beta$ 1 activation in vivo recapitulates the phenotype of TGF $\beta$ 1-null mice. *J. Cell Biol.* *176*, 787–793.
- Yanguas, S.C., Cogliati, B., Willebrords, J., Maes, M., Colle, I., van den Bossche, B., de Oliveira, C.P.M.S., Andraus, W., Alves, V.A.F., Leclercq, I., et al. (2016). Experimental models of liver fibrosis. *Arch. Toxicol.* *90*, 1025–1048.
- Yao, D., Ehrlich, M., Henis, Y.I., and Leof, E.B. (2002). Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptors Interact with AP2 by Direct Binding to  $\beta$ 2 Subunit. *Mol. Biol. Cell* *13*, 4001–4012.
- Yi, J.Y., Shin, I., and Arteaga, C.L. (2005). Type I Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptor Binds to and Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase. *J. Biol. Chem.* *280*, 10870–10876.
- Yoshida, T., and Owens, G.K. (2005). Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circ. Res.* *96*, 280–291.
- Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Nakatani, T., Tsujinoue, H., Yanase, K., Namisaki, T., Imazu, H., et al. (2002). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology* *36*, 850–860.
- Yu, J., Hu, Y., Gao, Y., Li, Q., Zeng, Z., Li, Y., and Chen, H. (2018). Kindlin-2 regulates hepatic stellate cells activation and liver fibrogenesis. *Cell Death Discov.* *4*, 93.
- Zeisberg, E.M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A.L., McMullen, J.R., Gustafsson, E., Chandraker, A., Yuan, X., Pu, W.T., Roberts, A.B., et al. (2007). Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med.* *13*, 952–961.
- Zeisberg, E.M., Potenta, S.E., Sugimoto, H., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2008). Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *19*, 2282–2287.
- Zhang, Y.E. (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* *19*, 128–139.
- Zhang, K., Gharaee-Kermani, M., Jones, M.L., Warren, J.S., and Phan, S.H. (1994). Lung monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *153*, 4733–4741.
- Zhang, K., Gharaee-Kermani, M., McGarry, B., Remick, D., and Phan, S.H. (1997). TNF-alpha-mediated lung cytokine networking and eosinophil recruitment in pulmonary fibrosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *158*, 954–959.
- Zhang, W.-M., Kapyla, J., Puranen, J.S., Knight, C.G., Tiger, C.-F., Pentikainen, O.T., Johnson, M.S., Farndale, R.W., Heino, J., and Gullberg, D. (2003). alpha 11beta 1



integrin recognizes the GFOGER sequence in interstitial collagens. *J. Biol. Chem.* 278, 7270–7277.

Zhang, Y., Lee, T.C., Guillemin, B., Yu, M.C., and Rom, W.N. (1993). Enhanced IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 150, 4188–4196.

Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D.J., Hemmati-Brivanlou, A., and Derynck, R. (2001). Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 974–979.

Zhang, Y., Venugopal, S.K., He, S., Liu, P., Wu, J., and Zern, M.A. (2007). Ethanol induces apoptosis in hepatocytes by a pathway involving novel protein kinase C isoforms. *Cell. Signal.* 19, 2339–2350.

Zhao, X.-K., Cheng, Y., Liang Cheng, M., Yu, L., Mu, M., Li, H., Liu, Y., Zhang, B., Yao, Y., Guo, H., et al. (2016). Focal Adhesion Kinase Regulates Fibroblast Migration via Integrin beta-1 and Plays a Central Role in Fibrosis. *Sci. Rep.* 6, 19276.

Zhao, X.-K., Yu, L., Cheng, M.-L., Che, P., Lu, Y.-Y., Zhang, Q., Mu, M., Li, H., Zhu, L.-L., Zhu, J.-J., et al. (2017). Focal Adhesion Kinase Regulates Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrosis. *Sci. Rep.* 7.

Zhao, Y.-L., Zhu, R.-T., and Sun, Y.-L. (2016). Epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis. *Biomed. Rep.* 4, 269–274.

Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L., and Thomsen, G.H. (1999). A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 400, 687–693.

Zuo, W., and Chen, Y.-G. (2009). Specific activation of mitogen-activated protein kinase by transforming growth factor-beta receptors in lipid rafts is required for epithelial cell plasticity. *Mol. Biol. Cell* 20, 1020–1029.

Thomas L. (2000). *Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik* (Frankfurt am Main: TH-Books-Verlagsgesellschaft mbH).

## 7 Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Name, Vorname: Hamelmann, Stefan  
Geburtsdatum: 20.09.1990  
Geburtsort: Bremen

### **Schulischer Werdegang**

1997 – 2001      Grundschule an der Curiestraße  
2001 – 2003      Schulzentrum an der Bergiusstraße  
2003 – 2007      Integrierte Stadteilschule an der Bergiusstraße  
2007 – 2010      Gymnasium Horn  
  
09/2010 – 08/2011      Freiwilliges ökologisches Jahr beim Allgemeinen Deutschen  
Fahrrad Club Bremen

### **Universitärer Werdegang**

10/2011 – 09/2014      Bachelorstudium an der Universität Osnabrück  
Studiengang: Biowissenschaften  
  
12.09.2014              Lokalisation von PTTs (Protein Trap Transposons) in der "Morin"-  
Kollektion: Linie 110-588, 110-598, 110-621, 110-623, 110-740  
Note: 1,9  
  
10/2014 – 10/2016      Masterstudium an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Studiengang: Biologie  
  
25.10.2016              Regulation der Expression von KSRP  
Note: 1,4

### **Beruflicher Werdegang:**

- 03/2017 – 02/2021 Universitätsklinikum Heidelberg, Institut für Immunologie und Serologie  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter  
Promotion
- 04/2021 – jetzt Universitätsklinikum Heidelberg, Pathologisches Institut, Abteilung Neuropathologie  
Wissenschaftlicher Projektmanager

### **Zusatzqualifikationen**

- 09/2020 Projektmanagement Kurs bei impuls plus
- 02/2021 GxP-Intensivtraining bei der Pharmaakademie

## 8 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen Personen, die mir bei der Durchführung meine Dissertation geholfen und mich während der ganzen Zeit unterstützt haben.

Besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. med. Inaam Nakchbandi für die außergewöhnlich gute Betreuung sowie für die Möglichkeit, meine Dissertation in Ihrer Arbeitsgruppe und über ein so spannendes Thema zu verfassen. Ich bedanke mich auch herzlichst für die intensiven Gespräche und dass ich während meiner Promotionszeit so viel lernen und mich weiterentwickeln konnte.

Ein großer Dank geht auch an meine Gutachter für die Zeit und die Mühe, welche Sie in diese Arbeit investieren.

Ich möchte mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. Meuer bedanken, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und die enge Zusammenarbeit mit den anderen Arbeitsgruppen am Institut.

Vor allem möchte ich mich auch bei meinen ehemaligen Kollegen Dr. Katrin Huck, Dr. Hiba Ghura, Alexander Lubosch, Franziska Wirth und Caren Zöller bedanken. Es war eine sehr schöne und unvergessliche Zeit mit euch im Labor mit sehr vielen wundervollen Erinnerungen.

Meiner Familie und meiner Frau Lisa gebühren ebenfalls ein spezieller Dank. Ihr habt mich immer unterstützt und mir wertvolle Ratschläge gegeben. Vielen Dank auch für die Geduld und das Ermuntern in schwierigen Phasen.