AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE
KOMMISS. LEITUNG: PROF. DR. MATTHIAS EVERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

REGULATION DER ÜBEREXPRESSION DES KERATINOZYTENWACHSTUMSFAKTORS IN FIBROSIERENDEN ERKRANKUNGEN DER HAUT

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Christiane Schellenberger

2015

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE
KOMMISS. LEITUNG: PROF. DR. MATTHIAS EVERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

REGULATION DER ÜBEREXPRESSION DES KERATINOZYTENWACHSTUMSFAKTORS IN FIBROSIERENDEN ERKRANKUNGEN DER HAUT

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Christiane Schellenberger

2015

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Anja Katrin Boßerhoff
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Sigrid Karrer
Tag der mündlichen Prüfung:	09.10.2015

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung 4

1 Einleitung 6

1.1 Struktur und Funktion der Haut 6

1.2 Funktionen dermaler Fibroblasten und ihre Rolle im Rahmen der Wundheilung .. 9

1.3 Fibrosierende Erkrankungen der Haut 11

1.3.1 Keloid 11

1.3.2 Sklerodermie 13

1.4 Der Keratinozytenwachstumsfaktor 19

1.4.1 Struktur, Bindungseigenschaften und Signalkaskade 19

1.4.2 Die Rolle des Keratinozytenwachstumsfaktors im Rahmen der kutanen Wundheilung 21

1.4.3 KGF-Überexpression in fibrosierenden Erkrankungen der Haut und ihre pathogenetische Relevanz 21

1.5 Regulation der Genexpression 23

1.5.1 Regulation der Transkription durch Transkriptionsfaktoren 23

1.5.2 Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression durch microRNAs 26

1.6 Die Rolle von Transkriptionsfaktoren und microRNAs in der Pathogenese fibrosierender Erkrankungen 28

1.6.1 Transkriptionsfaktoren 28

1.6.2 MicroRNAs 31

2 Zielsetzung 33

3 Ergebnisse 35

3.1 Ergebnisse der *KGF*-Promotoranalysen 35

3.1.1 *In silico*-Analyse des *KGF*-Promotors auf Single-Nukleotid-Polymorphismen . 35

3.1.2 Multiples Alignment sowie Untersuchung des *KGF*-Promotors auf Transkriptionsfaktorbindestellen 35

3.1.3 Reportergenanalysen 37

3.2 Einfluss der microRNA-155 auf die KGF-Expression 45

3.3 MicroRNA-Analysen 48

3.3.1 Regulation anderer Gene durch die microRNA-155 48

3.3.2 MicroRNA-155-Expression in formalin-fixiertem Parrafingewebe keloidaler und sklerodermaler Läsionen 51

3.3.3 Analyse der microRNA-21 51

3.3.4 Analyse der microRNA-125b 53

3.3.5 Analyse der microRNA-196a 55

4 Diskussion 57

4.1 Regulation der Überexpression des Keratinozytenwachsumsfaktors 57

4.1.1 Fehlender Nachweis von Single-Nukleotid-Polymorphismen innerhalb des *KGF*-Promotors 57

4.1.2 Keine Regulation von KGF durch die microRNA-155 in dermalen Fibroblasten 57

4.1.3 Fehlregulation von Transkriptionsfaktoren als Ursache der KGF-Überexpression 58

4.1.4 Zusammenfassung 67

4.2 Diskussion der Ergebnisse der microRNA-Analysen 67

4.2.1 Fehlregulation der microRNA-155 in mit der Krankheit assoziierter Fibroblasten 67

4.2.2 Die Rolle der microRNA-21 in fibrosierenden Hauterkrankungen 69

4.2.3 Fehlregulation der microRNA-125b in der Sklerodermie 71

4.2.4 Die Rolle der microRNA-196a 72

4.2.5 Zusammenfassung 73

5 Materialien und Methoden 75

5.1 Materialien 75

5.1.1 Allgemeine Materialien 75

5.1.2 Geräte 76

5.1.3 Bakterienstämme 78

5.1.4 Primäre Zellen 78

5.1.5 Humane Gewebeproben 78

5.1.6 Vektoren 78

5.1.7 Oligonukleotide 81

5.1.8 MicroRNA–Primer für Expressionsanalysen, sowie microRNA und Small interfering RNA für Transfektionen 82

5.1.9 Medien 82

5.1.10 Antibiotikum 82

5.1.11 Puffer und Lösungen 82

5.2 Methoden 83

5.2.1 Kultivierung von humanen Fibroblasten 83

5.2.2 Herstellung der *KGF*-Promotor-Plasmide 83

5.2.3 Transfektion humaner Zellen mit Plasmiden 93

5.2.4 Luciferase-Reportergen Assay 93

5.2.5 RNA-Analytik 94

5.2.6 Statistische Auswertung 99

6 Abkürzungsverzeichnis 100

7 Literaturverzeichnis 102

8 Danksagung 111

9 Eidesstattliche Erklärung 113

Zusammenfassung

Fibrosierende Erkrankungen, wie das Keloid, die zirkumskripte und die systemische Sklerodermie, sind durch eine erhöhte Kollagenproduktion aktivierter dermaler Fibroblasten gekennzeichnet. Trotz vielgestaltiger Krankheitsbilder wird die pathologische Fibroblastenaktivierung als der entscheidenende pathogenetische Mechanismus angesehen. Epithelial-mesenchymale Interaktionen zwischen den Keratinozyten der Epidermis und den Fibroblasten der Dermis scheinen hierbei eine zentrale Rolle zu spielen. Canady und Kollegen konnten eine doppelt parakrine Wirkschleife identifizieren, an deren Ende dermale Fibroblasten verstärkt aktiviert werden und in der Folge mit einer erhöhten Kollagenproduktion antworten. Ein parakrin wirkender Faktor innerhalb dieser Feedbackschleife ist der Keratinozytenwachstumsfaktor, der von dermalen Fibroblasten erkrankter Personen im Überschuss produziert wird. Der Keratinozytenwachstumsfaktor wirkt ausschließlich auf epitheliale Zellen und induziert in den Keratinozyten der Epidermis die Freisetzung von Oncostatin M, das im Gegenzug die Fibroblastenaktivierung beeinflusst.

Ein Teilaspekt dieser Arbeit war die Untersuchung der Regulation der Überexpression des Keratinozytenwachstumsfaktors in fibrosierenden Hauterkrankungen. Da die KGF-Expression bereits auf mRNA-Ebene erhöht war, wurden drei denkbare zelluläre Kontrollmechanismen näher beleuchtet. Eine „in silico“ - Analyse ergab keine Hinweise auf das Vorliegen von Single-Nukleotid-Polymorphismen innerhalb des *KGF*-Promotors. Zusätzlich wurde der Einfluss der microRNA-155 auf die KGF-Expression untersucht, da KGF bereits als Zielstruktur dieser microRNA in Lungenfibroblasten beschrieben wurde. Es ergab sich jedoch kein Anhalt für eine Regulation von KGF durch die miR-155 in dermalen Fibroblasten. In Reportergen-Analysen waren jedoch *KGF*-Promotorbereiche gesunder Spender in mit der Krankheit assoziierter Fibroblasten signifikant aktiver als in normalen Fibroblasten, womit eine Fehlregulation von Transkriptionsfaktoren identifiziert werden konnte. Die Testung unterschiedlicher *KGF*-Promotorkonstrukte in Reportergen-Analysen ergab eine 220 bp lange *KGF*-Promotorsequenz, die für die Überexpression von KGF in fibrosierenden Erkrankungen entscheidend ist. Die weitere Analyse dieser Sequenz ergab den Transkriptionsfaktor c-Jun als mögliche

fehlregulierte Struktur in fibrosierenden Erkrankungen. Die Arbeit liefert somit einen wichtigen Beitrag, wie die Überexpression des Keratinozytenwachstumsfaktors verursacht wird und bietet eine potentielle Zielstruktur für zukünftige Therapiestrategien.

Die Rolle von microRNAs in der dermalen Fibrose ist Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Forschung. Es wurden bereits zahlreiche profibrotisch und antifibrotisch wirkende microRNAs beschrieben, jedoch ist der Einfluss der unterschiedlichen microRNAs in der Pathogenese der Erkrankung noch nicht abschließend geklärt. Ein weiterer Teilaspekt der Dissertation betraf deshalb die Analyse ausgewählter microRNAs in Fibroblasten und Gewebeschnitten der Haut. Hier konnten die microRNA-155 sowie die microRNA-125b zum ersten Mal als fehlreguliert in dermalen Fibroblasten fibrosierender Erkrankungen identifiziert werden.

Die Untersuchung der Expression unterschiedlicher microRNAs in Gewebeschnitten und primären Zellen und der anschließende Vergleich mit bereits vorliegenden Daten aus der Literatur zeigte jedoch auch, dass die Expressionslevels in den untersuchten Medien (Gewebe versus Zellkultur) zum Teil stark voneinander abweichen können. Hier ist also Vorsicht bei der Interpretation von Daten geboten. Es wird außerdem darauf hingewiesen, dass ein Vergleich von PCR-Expressionsanalysen mit Microarray-Ergebnissen nicht ohne kritisches Hinterfragen vollzogen werden kann. Denn eine Abweichung der microRNA- Basenabfolge kann innerhalb der einen Methode völlig folgenlos bleiben, wohingegen im Rahmen der anderen Methode die Expressionsanalyse dadurch verfälscht werden kann. Zusätzlich konnte in dieser Dissertation nachgewiesen werden, dass die Expression von microRNAs teilweise abhängig von der Passagenzahl in der Zellkultur ist.
Diese Arbeit nennt also mögliche Fallstricke bei der Analyse von microRNAs und mahnt somit zur kritischen Beurteilung bisher angewendeter Verfahren.

1 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Regulation der Überexpression des Keratinozytenwachstumsfaktors in fibrosierenden Erkrankungen der Haut untersucht. Außerdem erfolgte die Analyse der Expression ausgewählter microRNAs in Keloid, zirkumskripter Sklerodermie und systemischer Sklerodermie.

1.1 Struktur und Funktion der Haut

Mit einer Oberfläche von 1,5 – 2 m² ist die Haut das größte Organ des Menschen. Sie stellt nicht nur die äußere Grenze unseres Körpers zur Umwelt dar, sondern erfüllt vielseitige Aufgaben, die für die Integrität des menschlichen Organismus entscheidend sind. Ihre feste Struktur schützt uns vor Umwelteinflüssen mechanischer, chemischer und physikalischer Art. Sie bildet einen äußeren Schutzwall gegen Bakterien und Mikroorganismen und beherbergt Zellen des menschlichen Immunsystems. Als Sinnesorgan vermittelt sie Tast-, Temperatur- und Schmerzempfinden.

Für das Verständnis dieser Arbeit soll zunächst ein Überblick über die einzelnen Schichten der Haut und ihre wichtigsten Zelltypen gegeben werden. Abbildung 1 zeigt den Aufbau der humanen Haut im Querschnitt.

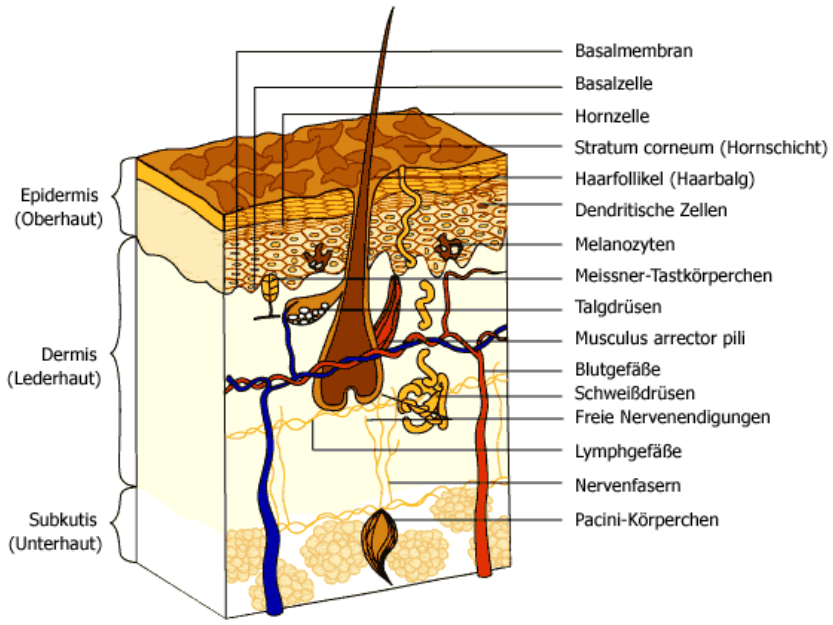


Abbildung 1 Schematischer Aufbau der humanen Haut im Querschnitt. Sie gliedert sich in Oberhaut, Lederhaut und Unterhaut. (Internetquelle 1)

Die menschliche Haut wird histologisch in drei Schichten unterteilt. Man unterscheidet die Epidermis, als oberste Zellschicht, von der darunter liegenden Dermis und der Subkutis, die als Bindeglied zu angrenzendem Gewebe dient.

Die Unterhaut, oder auch **Subkutis** genannt, besteht zum Großteil aus lockerem Bindegewebe. Sie wird von bindegewebigen Septen durchzogen, die sie mit tiefer liegenden Strukturen wie Periost und Muskelfaszien verschieblich verbinden. Zwischen den Septen eingelagertes Fettgewebe übernimmt eine wärmeisolierende, energiespeichernde und polsternde Funktion (Hwa et al., 2011). Die Unterhaut wird von Blutgefäßen und Nerven durchkreuzt, die Versorgungsäste in die weiter apikal gelegenen Schichten abgeben. In der Subkutis von Hand- und Fußsohlen finden sich außerdem die sogenannten Vater-Pacini-Tastkörperchen. Darunter versteht man Mechanorezeptoren, die für das Vibrationsempfinden verantwortlich sind.

Die an die Unterhaut angrenzende **Dermis** dient der Verankerung der darüber liegenden Epidermis. Hauptbestandteile der Lederhaut sind Zellen, Kollagenfasern vom Typ I und III und elastische Fasern, die von Glykosaminoglykanen umgeben sind. Histologisch lässt sich die Dermis in zwei Abschnitte untergliedern. Das der Subkutis anliegende ***Stratum reticulare*** enthält vorwiegend dicke Bündel kollagener und elastischer Fasern. Der wellenförmige Verlauf der Fasern verleiht der Haut ihre mechanische Widerstandsfähigkeit. Bei Zug kommt es zu einer Glättung der kollagenen Faserwellen, elastische Fasern ermöglichen dann die Rückkehr zum Ausgangszustand. Im Stratum reticulare liegt zudem der Ursprung der Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel, Schweiß- und Talgdrüsen. Im ***Stratum papillare*** dominieren dermale Zellen und Matrix. Das Stratum papillare ist faserarm und kennzeichnet sich durch Bindegewebszapfen, die in die unteren epidermalen Schichten hineinragen und somit für eine enge Verzahnung von Unterhaut und Oberhaut sorgen. Jede einzelne Papille enthält eine Kapillarschlinge, die den Nährstofftransport in die gefäßlose Epidermis erleichtert (Lüllmann-Rauch, 2011). In der Dermis findet sich eine Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen. Hierzu zählen Zellen der Immunabwehr wie Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen und Plasmazellen sowie die fasern- und matrixbildenden Fibroblasten, die den Hauptanteil der dermalen Zellen ausmachen. Die Dermis beherbergt zudem Mechanorezeptoren, wie die Meissner-und Ruffinikörperchen. Während die

Meissner-Körperchen vorwiegend in der Dermis der Fingerbeeren, Handflächen und Fußsohlen vorkommen und hier als Berührungssensoren dienen, werden durch die Ruffinikörperchen unterschiedliche Spannungszustände der Haut wahrgenommen (Abraira and Ginty, 2013). Unser Schmerz- und Temperaturempfinden wird zusätzlich durch in der Unterhaut liegende freie Nervenendigungen von Thermo- und Schmerzrezeptoren vermittelt.

Die Verbindung zwischen Dermis und Epidermis gewährleistet eine Basalmembran.

Die Epidermis schirmt unseren Organismus vor schädlichen Umwelteinflüssen ab. Hierzu dient ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel, das je nach Lokalisation in seiner Dicke variiert und zu über 90 % aus Keratinozyten besteht. Die Epidermis wird histologisch in weitere Schichten untergliedert, die die Keratinozyten innerhalb ihres Lebenszyklus durchwandern. Der Weg eines Keratinozyten von der untersten Zellschicht bis an die Hautoberfläche dauert circa vier Wochen. In dieser Zeit unterliegen die Zellen zahlreichen Differenzierungsvorgängen. Von basal nach apikal unterscheidet man folgende Schichten: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum corneum. Das einschichtig aufgebaute *Stratum basale* enthält teilungsfähige Basalzellen kubischer Struktur, die die Regenerationsfähigkeit der Haut gewährleisten. Die Tochterzellen dieser Basalzellen bilden auf ihrem Weg an die Hautoberfläche zunächst das *Stratum spinosum*. Hier sind die Zellen vorwiegend durch Desmosomen miteinander verbunden, was ihnen ein stachelartiges Aussehen verleiht. Das Zytoskelett der Keratinozyten besteht aus Tonofilamenten/Keratinfilamenten und trägt zusammen mit den desmosomalen Zellverbindugen im Stratum spinosum zur Widerstandsfähigkeit der Haut bei. Das darüber liegende *Stratum granulosum* enthält ältere Zellen, die bereits deutlich abgeflacht sind und sogenannte Keratohyalingranula enthalten. Das in den Körnerzellen gespeicherte Keratohyalin stellt eine Vorstufe des Keratins dar. In der obersten Schicht, dem *Stratum corneum*, haben die Keratinozyten die höchste Differenzierungsstufe erreicht und liegen dort als kernlose, flache Hornzellen vor. Im Stratum corneum bilden feste Interzellularkontakte, die sogenannten *tight junctions*, eine lebenswichtige Diffusionsbarriere für unseren Organismus und erschweren außerdem das Eindringen von Mikroorganismen und Bakterien. Das im Stratum corneum vorherrschende Protein Keratin verhindert zusammen mit einer von

Talgdrüsen sezernierten Lipidschicht die Verdunstung von Wasser und schützt den Körper so vor dem Austrocknen (Moll, 2010). Neben den Keratinozyten enthält die Epidermis weitere Zelltypen. Hierzu zählen die Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen. Die im Stratum basale liegenden *Melanozyten* produzieren das Pigment Melanin, das in Melanosomen sezerniert und von umliegenden Keratinozyten aufgenommen wird. Durch die Absorption von UV-Strahlung schützt das Melanin die einzig zur Regeneration befähigten Basalzellen vor strahlungsbedingten DNA-Schäden. Die *Langerhans-Zellen*, professionelle Antigen-präsentierende Zellen unseres Immunsystems, sind in regelmäßigen Abständen (ca. 500 Zellen/mm^2) zwischen den Keratinozyten lokalisiert und sind für die Aufnahme und Verarbeitung von eindringenden Mikroorganismen zuständig. Die *Merkel-Zellen* im Stratum basale und Stratum spinosum sind als Mechanorezeptoren für das Druckempfinden verantwortlich (Lüllmann-Rauch, 2011).

1.2 Funktionen dermaler Fibroblasten und ihre Rolle im Rahmen der Wundheilung

Dermale Fibroblasten bilden die Grundlage der im Rahmen der Dissertation durchgeführten Experimente. Es sollen deshalb hier die wesentlichen Funktionen dermaler Fibroblasten erläutert werden.

Fibroblasten sind Zellen mesenchymalen Ursprungs, die Bestandteil des menschlichen Bindegewebes sind und deshalb ubiquitär in unserem Organismus vorkommen. Fibroblasten der Haut finden sich vorwiegend in den Schichten der Dermis und stehen über lange spindelförmige Zellfortsätze miteinander in Kontakt. Ihre Hauptfunktion besteht in der Produktion und Organisation der Interzellularsubstanz. Fibroblasten sezernieren alle Vorstufen der extrazellulären Matrix. Hierzu gehören Kollagen, Fibrillin und Elastin als Bausteine der Faserbildung, Glykosaminoglykane und Proteoglykane als Bestandteile der Grundsubstanz, Adhäsionsproteine aus der Lamininfamilie sowie Fibronektin. Fibroblasten sind nicht nur für den Aufbau von Interzellularsubstanz verantwortlich, sie steuern auch deren Um- bzw. Abbau durch die Sezernierung von Matrix-Metalloproteasen und sind deshalb essentiell für die Aufrechterhaltung eines physiologischen Gleichgewichts. Hierbei spielt die Kommunikation untereinander und mit anderen Zelltypen, wie etwa

den Keratinozyten der Epidermis, eine wichtige Rolle, weshalb Fibroblasten auch lösliche Faktoren sezernieren, die der Zell-Zell-Interaktion dienen.

Im Rahmen der Geweberegeneration sind genau eben beschriebene Funktionen dermaler Fibroblasten von großer Bedeutung. Die Wundheilung gliedert sich in 3 Phasen: die Inflammations-, die Proliferations- und die Regenerationsphase (Sinno and Prakash, 2013). Zu Beginn der Entzündungsphase erfolgt im Rahmen der primären und sekundären Hämostase die Bildung eines stabilen Blutgerinnsels, bestehend aus aggregierten Thrombozyten und Fibrin. Verletzte Endothelzellen und aktivierte Thrombozyten sezernieren Zytokine, die schließlich die Einwanderung unspezifischer Entzündungszellen wie Makrophagen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten bewirken. Diese dienen dazu, eingedrungene Bakterien und Zellschrott zu beseitigen. Außerdem produzieren sie lösliche Faktoren, die die Zellteilungsrate von Keratinozyten und Fibroblasten beeinflussen und so die nächste Phase der Wundheilung einleiten. In der Proliferationsphase, die etwa 48-72 Stunden nach Verletzung beginnt, spielen eingewanderte und ortsansässige Fibroblasten eine entscheidende Rolle. Durch eine verstärkte Proliferation und die Produktion provisorischer extrazellulärer Matrix, vorwiegend bestehend aus Kollagen Typ III, bilden sie ein Grundgerüst für die Einsprossung neuer Blutgefäße und tragen maßgeblich zur Füllung des Wunddefektes bei. Der Verschluss der Wunde erfolgt dann durch Reepithelialisierung. In der sich anschließenden Regenerationsphase kommt es zu einem allmählichen Umbau der Interzellularsubstanz, den wiederum Fibroblasten durch die Sekretion löslicher Faktoren steuern. Das zunächst gebildete Kollagen Typ III wird abgebaut und durch Kollagen Typ I ersetzt. Spezielle Myofibroblasten führen dann durch Kontraktion zu einer Verfestigung des Narbengewebes (Profyris et al., 2012)(Werner and Grose, 2003).

Die Wundheilung stellt einen äußerst komplexen Prozess dar und bedarf einer Vielzahl von regulierenden Mechanismen. Eine große Rolle spielen hierbei Zell-Zell-Kommunikation und Zell-Matrix-Interaktionen, vermittelt durch Zytokine und Wachstumsfaktoren. Mit TGF-β (transforming growth factor β), VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (plateled derived growth factor), MMPs (matrix-metalloproteases) und TIMPS (tissue inhibitor of metalloproteases) sind wichtige Vertreter genannt (Wolfram et al., 2009). Von großer Bedeutung für eine effektive

Wundheilung ist die rechtzeitige Terminierung der Vorgänge bzw. die Balance zwischen Kollagenauf- und abbau in der Regenerationsphase der Wundheilung. Die exzessive Produktion von extrazellulärer Matrix durch aktivierte Fibroblasten in fibrosierenden Erkrankungen der Haut wird als eine Art fehlgesteuerte Wundheilung verstanden.

1.3 Fibrosierende Erkrankungen der Haut

Trotz vielgestaltiger Krankheitsbilder zeichnen sich fibrosierende Erkrankungen der Haut, wie die zirkumskripte und systemische Sklerodermie oder auch das Keloid, durch eine verstärkte Produktion extrazellulärer Matrix-Komponenten durch aktivierte Fibroblasten aus. Es soll nun ein Überblick über die in dieser Arbeit thematisierten Erkrankungen gegeben werden.

1.3.1 Keloid

Keloide sind benigne wulstartige Bindegewebsvermehrungen, die sich im Bereich verletzter Haut bilden und durch eine überschießende Narbenbildung entstehen. Gewebstraumata jeglicher Art, seien es Verbrennungen, Wunden durch Operationen oder Einstichstellen von Nadeln und Piercings, können potentiell zu Keloiden entarten. Anders als hypertrophe Narben wachsen Keloide über den ursprünglichen Wundrand hinaus, infiltrieren gesundes umliegendes Gewebe und sind nicht spontan reversibel.

Während Keloidbildung bei Kaukasiern nur selten beobachtet wird (Inzidenz von < 1% in Großbritannien), treten Keloide in der afrikanischen Bevölkerung mit einer Inzidenzrate von 4,5 – 16 % gehäuft auf (Seifert and Mrowietz, 2009). Das Erkrankungsalter liegt zwischen dem 10. und 30. Lebensjahr. Die häufigsten Prädilektionsstellen sind Oberarme, Schultern, Brust, Wangen und Ohrläppchen (siehe Abbildung 2).

Abbildung 2 Narbenkeloid im Bereich des Brustbeins. Das Wachstum überschreitet die Narbenränder und kann zu Kontrakturen des umliegenden Gewebes führen. (Internetquelle 2)

Neben der oft psychisch belastenden ästhetischen Problematik leiden Patienten unter Juckreiz, Berührungsempfindlichkeit und Dysästhesien. Flächig auftretende Keloide können durch dermatogene Kontrakturen auch zu Bewegungseinschränkungen und damit zu einer erheblichen Reduktion der Lebensqualität führen.

Histologisch imponieren, im Vergleich zu normalem Narbengewebe, eine vermehrte Anzahl an großen, dicken, dichtgepackten Bündeln kollagener Typ I- und Typ III-Fasern (Verhaegen et al., 2009). Außerdem konnte eine erhöhte Anzahl von T-Lymphozyten (CD3+, CD4+, CD45RO+, und HLA-DR+) und dendritischen Zellen (CD1a+, CD36+, HLA-DR+, und ICAM-1+) nachgewiesen werden (Santucci et al., 2001).

Die Ätiologie von Keloiden ist weitgehend ungeklärt. Familiäre Häufungen sowie die erhöhte Inzidenz in der schwarzen Bevölkerung legen eine genetische Disposition nahe. Mehrere Studien diskutieren eine immunologische Komponente durch ein erhöhtes Vorkommen bestimmter HLA-Phänotypen bei Patienten mit keloidalen Narben. Hier sind die verstärkte Assoziation mit HLA-DRB1*15 in kaukasischen Keloidpatienten (Brown et al., 2008) sowie HLA-DQA1*0104, DQB1*0501 und DQB1*0503 in chinesischen Patienten zu erwähnen (Lu et al., 2008).

Im Zentrum der gegenwärtigen Forschung steht die Akkumulation extrazellulärer Matrix durch aktivierte Fibroblasten. Zahlreiche Erklärungsansätze tragen zum besseren Verständnis ursächlicher molekularer Mechanismen bei. So konnten mehrere unterschiedliche Zytokine und Wachstumsfaktoren identifiziert werden, die

für die Aktivierung der Fibroblasten verantwortlich sind. Hierzu zählen: TGF-β, VEGF, CTGF, Activin, SCF und Interleukin-6 (Seifert and Mrowietz, 2009). Eine Schlüsselrolle in der Keloid-Pathogenese wird dem Wachstumsfaktor TGF-β zugeschrieben. In Keloid-Gewebe findet sich zudem eine erhöhte Expression von TIMP-1 und TIMP-2, den Gegenspielern der Metalloproteasen, die somit den Abbau zellulärer Matrix verhindern (Ulrich et al., 2010). Die Dysbalance zwischen MMPs und TIMPs kann für die Akkumulation von extrazellulärer Matrix in Keloid-Gewebe verantwortlich sein. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass sich Keloid-Fibroblasten resistent gegenüber der FAS-induzierten Apoptose verhalten. Eine längere Lebensdauer von Fibroblasten kann eine verstärkte Kollagenablagerung in Keloid-Gewebe verursachen (Chodon et al., 2000).

Die Therapie von Keloiden ist häufig langwierig und wenig effektiv. Die traditionelle chirurgische Resektion von Keloiden zeigt hohe Rezidivraten, die zwischen 45 % und 100 % rangieren, und ist damit als Monotherapie obsolet. Heute existiert eine Vielzahl an Behandlungsmöglichkeiten, die häufig kombiniert angewendet werden müssen, um positive Effekte zu erzielen. Hierzu zählen: Okklusivverbände, Kryotherapie, intrafokale Injektionen von Kortikosteroiden, 5-Fluorouracil- und Interferon α, Radio- und Lasertherapie sowie topisch angewendete Silikonpflaster. Neuere Behandlungsoptionen setzen auf die gezielte Blockierung profibrotischer Faktoren wie TGF-β (Gauglitz et al., 2011).

1.3.2 Sklerodermie

Der Begriff Sklerodermie umfasst eine Reihe seltener Erkrankungen, deren führendes gemeinsames Kennzeichen eine bindegewebige Verhärtung der Haut darstellt. Man unterscheidet generell eine auf die Haut limitierte Form, zirkumskripte Sklerodermie genannt, von einer auch innere Organe betreffenden Ausprägung, der systemischen Sklerodermie.

1.3.2.1 Zirkumskripte Sklerodermie

Bei der zirkumskripten Sklerodermie handelt es sich um die lokalisierte Form der Sklerodermie, bei der an umschriebenen Stellen der Haut plaqueartige Sklerosierungen auftreten. Als auslösende Faktoren werden Traumata, Medikamente, Bestrahlung und Infektionen mit z.B Borrelia burgdorferi diskutiert. Es werden weitere Subtypen unterschieden, bei denen es auch zu einer Beteiligung der

unter der Haut liegenden Strukturen wie Muskeln, Fettgewebe und Knochen kommen kann. Bis heute existieren keine einheitlichen Klassifikationssysteme der unterschiedlichen Subgruppen der zirkumskripten Sklerodermie. Die aktuelle AWMF-Leitlinie der deutschen dermatologischen Gesellschaft beschreibt vier Hauptformen: den Plaque-Typ, die generalisierte, die lineare und die tiefe Form der zirkumskripten Sklerodermie. Der Plaque-Typ und die generalisierte Form unterscheiden sich lediglich in der Anzahl betroffener Hautareale. Eine generalisierte zirkumskripte Sklerodermie liegt vor, wenn mindestens drei anatomische Körperregionen typische Hautveränderungen aufweisen. Der lineare Subtyp ist durch bandförmige in Längsrichtung verlaufende Herde, die bevorzugt an Extremitäten oder der seitlichen Stirnregion auftreten, gekennzeichnet. Die tiefe Form umschreibt fibrotische Umbauvorgänge in Fett- und Muskelgewebe.

Mit einer Inzidenzrate von 2,7/ 100 000 Individuen ist die zirkumskripte Sklerodermie eine seltene Erkrankung (Peterson et al., 1997). Hellhäutige Menschen sind häufiger betroffen als Individuen mit dunkler Hautfarbe. Betrachtet man die Geschlechterverteilung, erkranken mehr Frauen als Männer (Fett and Werth, 2011a). Das Auftreten der einzelnen Unterformen variiert je nach Alter, wobei lineare Subtypen vorwiegend Kinder betreffen. Der Plaque-Typ stellt die häufigste Erkrankungsform bei Erwachsenen dar (Leitenberger JJ et al., 2009).

Abbildung 3 zeigt eine Patientin mit einer zirkumskripten Sklerodermie vom Plaque-Typ. Klinisch imponieren zu Beginn entzündlich-ödematöse Erytheme, die sich anschließend in stark sklerotische elfenbeinfarbene Herde umwandeln. Ein rötlicher Randsaum, der sogenannte „lilac ring“, wird als Zeichen einer aktiven Fibrosierung verstanden.

Abbildung 3 Morphea vom Plaquetyp: Kreisrunde sklerodermale Läsionen von rötlich livider Farbe. Am häufigsten betroffen ist der Körperstamm. (Internetquelle 3)

Die zirkumskripte Sklerodermie ist eine sehr variable Erkrankung, deren Ausprägung von rein kosmetischen Nachteilen bis hin zu schweren körperlichen Beeinträchtigungen reicht.

Histologisch betrachtet finden sich wie auch in keloidalen Narben dicke Bündel kollagener Fasern vom Typ I und III. Neben einer verstärkten Kollagenakkumulation ist die Expression von Hyaluronsäure, einem Vertreter der Glykosaminoglykane, im Vergleich zu gesunder Haut erhöht (Passos et al., 2003).

Die genauen Ursachen für die Entstehung der zirkumskripten Sklerodermie sind nach aktuellem Stand der Forschung nicht hinreichend bekannt. Die Pathogenese erscheint multifaktoriell. Wie auch im Falle von Keloiden wird eine autoimmunologische Genese erörtert. Dies wird gestützt durch die Vergesellschaftung mit anderen Autoimmun- oder rheumatischen Erkrankungen in bis zu 30 % der Erwachsenen (Leitenberger JJ et al., 2009). Zudem finden sich Autoantikörper wie antinukleäre, anti-Histon-oder anti-Topoisomerase II α- Antikörper und positive Rheumafaktoren (Takehara and Sato, 2005).

Molekularpathogenetisch steht die exzessive Kollagenablagerung im Vordergrund, wobei aktivierten Fibroblasten eine zentrale Rolle zugeschrieben wird. Der Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in der Pathogenese der Erkrankung konnte für TGF-β und die Interleukine 2, 4, 6, 8 und 17 nachgewiesen werden (Kurzinski and Torok, 2011). Es finden sich ebenso Veränderungen im Verhältnis der Metalloproteasen zu deren Gegenspielern. Tomimura und Kollegen identifizierten

inhibierende Autoantikörper gegen MMP-1 in Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie (Tomimura et al., 2008).

Bisher existieren keine kausalen Therapieansätze für die Behandlung der zirkumskripten Sklerodermie. Die Entwicklung evidenzbasierter Behandlungsstrategien durch die Testung bereits erprobter Therapeutika in großen randomisierten Studien wird durch die geringe Inzidenz der Erkrankung erschwert. Außerdem fehlt es an objektiven Messparametern, die den Behandlungserfolg angewandter Therapien objektiv erfassen (Fett and Werth, 2011b). Aktuell wird eine Vielzahl an unterschiedlichen Therapeutika eingesetzt. Umschriebene oberflächliche Läsionen werden vorwiegend mit einer lokalen Applikation von Kortikosteroiden, Tacrolimus oder Calcipotriol behandelt. Außerdem kann eine lokale UV-Bestrahlung der betroffenen Haut mit UV-A, auch in Kombination mit Psoralen (sogenannte PUVA-Therapie), gute Ergebnisse erzielen. Krankhafte Veränderungen mit Beteiligung des Muskelgewebes oder ein disseminierter großflächiger Befall bedürfen einer systemischen Therapie mit Kortikosteroiden oder Chemotherapeutika wie Methotrexat. Die besten Ergebnisse lassen sich erzielen, wenn die Behandlung in einem frühen aktiven Stadium der Erkrankung erfolgt. Kam es bereits zu einer fortgeschrittenen dermalen Fibrosierung, sind oben genannte Behandlungsmethoden wenig effektiv (Zwischenberger and Jacobe, 2011).

1.3.2.2 Systemische Sklerodermie

Die systemische Sklerodermie stellt eine autoimmunologisch induzierte Multisystemerkrankung dar. Im Unterschied zur zirkumskripten Sklerodermie prägen bei der systemischen Sklerodermie neben der verstärkten Fibrose der Haut zusätzliche Symptome wie das Raynaudphänomen, Sklerodaktylie und Akrosklerose das klinische Bild. Einen wesentlichen Punkt stellt außerdem die Beteiligung innerer Organe dar (Fett and Werth, 2011a). Es lassen sich zwei Verlaufsformen abgrenzen: die limitierte kutane und die diffuse kutane systemische Sklerodermie. Sie unterscheiden sich im Ausmaß der dermalen Sklerosierung. Die diffuse systemische Sklerodermie stellt die schneller und schwerer verlaufende Ausprägung mit frühzeitigen Organbeteiligungen dar. Die limitierte kutane Form ist durch den bevorzugten Befall der distalen Extremitäten bis zu den Grundgelenken und des Gesichts gekennzeichnet, eine Fibrosierung innerer Organe wird erst im späten

Krankheitsverlauf beobachtet (Chung et al., 2006). Eine Unterform der limitierten Ausprägung stellt das sogenannte CREST-Syndrom dar, das folgende Symptome vereint: **C**alcinosis cutis, **R**aynaud-Phänomen, **E** (engl.esophagus) Ösophagusbeteiligung mit Schluckbeschwerden, **S**klerodaktylie und **T**eleangieektasien.

Die systemische Sklerodermie ist wie auch die zirkumskripte Sklerodermie eine sehr seltene Erkrankung. In den USA wird eine Inzidenz von 3- 12/ 1 Million Individuen angegeben. Frauen erkranken 3 - 5 Mal häufiger als Männer (Braun-Falco et al., 2005). Anders als die zirkumskripte Sklerodermie hat die systemische Form eine sehr schlechte Prognose. Die in bis zu 70 % der Fälle auftretende pulmonale Beteiligung stellt die häufigste Todesursache bei Patienten mit systemischer Sklerodermie dar.

Die Lebensqualität der Patienten ist stark eingeschränkt. Schon in frühen Stadien leiden sie unter der schmerzhaften Raynaudsymptomatik. Die fortschreitende Fibrosierung der Haut führt zu Bewegungseinschränkungen der Extremitäten und zum Verlust des Mienenspiels mit erschwerter Mundöffnung. Abbildung 4 zeigt eine Patientin mit Mikrostomie. Dysphagie und Refluxbeschwerden sind durch die in 90 % der Fälle auftretende Ösphagusbeteiligung bedingt. In späten Stadien treten Symptome des Nieren- und Lungenversagens in den Vordergrund.

Abbildung 4 Patientin mit Mikrostomie. Im Medizinjargon spricht man auch vom sogenannten Tabaksbeutelmund. Radiär auf die Lippen zulaufende Einziehungen erschweren die Mundöffnung. Dies kann zu einer verminderten Nahrungsaufnahme und Problemen beim Sprechen führen. (Internetquelle 4)

Die histopathologische Untersuchung betroffener Hautareale zeigt eine verstärkte Akkumulation dicker, dicht aneinander liegender Kollagenfasern vom Typ I und III. In

frühen Stadien lassen sich außerdem inflammatorische Zellinfiltrate nachweisen. Späte Stadien sind geprägt von einer starken Sklerosierung, atrophischen Schweißdrüsen und fehlenden Blutgefäßen (Krieg and Takehara, 2009).

Auch im Falle der systemischen Sklerodermie ist die Pathogenese trotz zahlreicher Erklärungsansätze noch nicht genau verstanden. Ähnlich wie bei der zirkumskripten Sklerodermie scheinen eine genetische Disposition und Assoziation mit HLA-Haplotypen sowie autoimmunologische Prozesse durch die Bildung von bestimmten Autoantikörpern eine Rolle zu spielen. Mit einer Inzidenzrate von 1,6 % in Familien mit systemischer Sklerodermie im Vergleich zu 0,026 % in der Normalbevölkerung ist die familiäre Prädisposition der stärkste Risikofaktor für die Entwicklung einer systemischen Sklerodermie (Allanore et al., 2010). Der Nachweis spezifischer Autoantikörper bei Patienten mit systemischer Sklerodermie ist seit langem bekannt und liefert Hinweise zur Diagnosestellung, zum klinischen Verlauf und zur Prognoseeinschätzung. In 85-99 % der Fälle werden antinukleäre Antikörper (ANA) gefunden. Weitere gut untersuchte Antikörper sind Anti-Zentromer-AK (ACA) und Anti-Topoisomerase-AK (Mierau et al., 2011). Welche Rolle Autoantikörper bei der Krankheitsentstehung und vor allem bei den pathologisch führenden fibrotischen Vorgängen spielen, ist jedoch unbekannt.

Im Fokus wissenschaftlicher Forschung steht die übermäßige Kollagenproduktion durch aktivierte Fibroblasten. Zytokine und Wachstumsfaktoren wie TGF-β, PDGF, CCL2, CTGF, IL-1, 2, 3 ,4, 10 und 17 sind wie auch im Falle von Keloiden und zirkumskripter Sklerodermie von entscheidender pathogenetischer Relevanz (Bhattacharyya et al., 2011). Ebenso finden sich Störungen im Kollagenabbau. Die Expression von TIMP-1 in Sklerodermie-Fibroblasten ist erhöht und es konnten Autoantikörper gegen die MMPs 1-3 in Seren von erkrankten Personen nachgewiesen werden (Jinnin, 2010). Außerdem fanden sich erniedrigte Levels von MMP-1, 2 und 3 in dermalen Fibroblasten erkrankter Personen (Kuroda and Shinkai, 1997) . Auch Sklerodermie-Fibroblasten sind Apoptose-resistent (Jelaska and Korn, 2000).

Die Therapie ist abhängig von der jeweiligen Ausprägung der Erkrankung. Bisherige Behandlungsmethoden können den Krankheitsprogress zwar verringern, eine Heilung der Erkrankung ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Im

Vordergrund steht die Eindämmung der entzündlichen Vorgänge durch Immunsuppressiva. Die schmerzhafte Raynaudsymptomatik kann durch verminderte Kälteexposition, Nikotinkarenz und Einnahme vasoaktiver Substanzen wie Calciumkanal-Blocker oder Angiotensin II-Rezeptorantagonisten gelindert werden (Sinnathurai and Schrieber, 2013). Die Behandlung bei Organfibrose beinhaltet ACE-Hemmer bei renaler Beteiligung, Protonenpumpen-Inhibitoren bei Refluxbeschwerden sowie Calcium-Antagonisten, Prostacyclin-Analoga und Endothelin$_1$-Rezeprotantagonisten bei pulmonaler Hypertonie. Zur Therapie der kutanen Fibrose werden ähnliche Behandlungsstrategien wie im Falle der zirkumskripten Sklerodermie angewendet.

1.4 Der Keratinozytenwachstumsfaktor

Die kutane Fibrosierung durch verstärkte Kollagenproduktion aktivierter Fibroblasten wird als eine übermäßig ablaufende Geweberegeneration verstanden. Wie schon in Punkt 1.2 erwähnt, spielt hierbei die Interaktion zwischen den unterschiedlichen Zelltypen der Haut eine wichtige Rolle. Parakrin wirkende Zytokine und Wachstumsfaktoren sind die entscheidenden Mediatoren in dem komplexen Wechselspiel zwischen Keratinozyten und Fibroblasten im Rahmen der Wundheilung. Der Keratinozytenwachstumsfaktor ist ein Beispiel für solch ein parakrin wirkendes Zytokin.

1.4.1 Struktur, Bindungseigenschaften und Signalkaskade

Der Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF) gehört zu den Fibroblastenwachstumsfaktoren, einer Familie mit 23 Mitgliedern ähnlicher Struktur und Funktion, und wird deshalb auch FGF-7 genannt. KGF wurde erstmals im Jahr 1989 als ein von Lungenfibroblasten sezerniertes und parakrin auf epitheliale Zellen wirkendes Protein beschrieben (Finch et al., 1989). Nach derzeitigem Stand wird KGF nicht nur von Fibroblasten in verschiedensten Organen, sondern auch von Endothelzellen und glatten Muskelzellen gebildet. Das KGF-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 15, enthält 4 Exons und kodiert für ein 22,5 kD großes Polypeptid, bestehend aus 194 Aminosäuren. Fibroblastenwachstumsfaktoren werden von Zellen mesenchymalen Usprungs produziert und üben eine zellteilungsfördernde Wirkung auf Zellen ekto-, endo- und mesodermaler Herkunft aus. Der Keratinozytenwachstumsfaktor jedoch wirkt ausschließlich mitogen auf

epitheliale Zellen. Hierzu zählen neben den Keratinozyten der Epidermis auch Epithelzellen der Lunge, der Leber, der Pankreasgänge sowie der Cornea (Steiling and Werner, 2003).

Wichtig für die Gewebediffusion und Aktivierung der Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs) ist die Bindung an Heparin, Heparansulfat-Proteoglykane und das FGF-Bindeprotein (Werner, 1998). Ihre biologische Wirkung erzielen FGFs über die Interaktion mit ihren Rezeptoren FGFR 1-4, alle vom Typ der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Auch hier nimmt KGF eine Ausnahmestellung ein. Während FGF-1 beispielsweise an alle vier Rezeptoren bindet, existiert für KGF nur ein einziger Rezeptor, der FGFR III b-Rezeptor (Ornitz et al., 1996). FGF-Rezeptoren bestehen im Wesentlichen aus drei unterschiedlichen Strukturen. Einem extrazellulären Anteil mit drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Ig-1-3), einer transmembranären hydrophoben Helix, sowie einer zytosolischen Region mit Tyrosin-Kinase-Aktivität. Ein saurer Bereich zwischen Ig I und II ist wichtig für die Heparinbindung. Abbildung 5 stellt den Aufbau in schematischer Form dar.

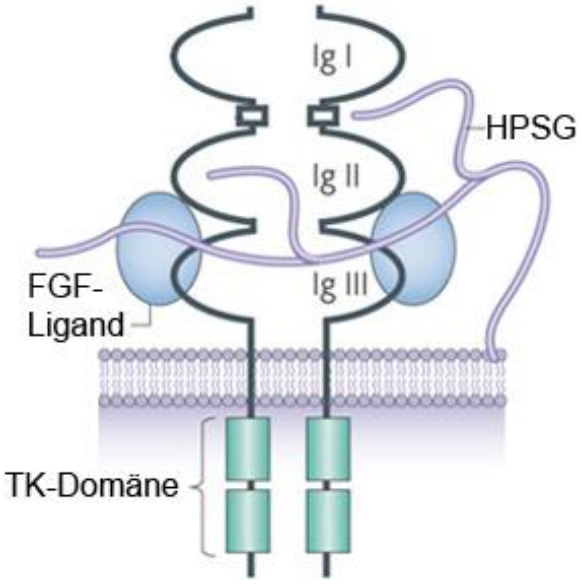


Abbildung 5 Schematischer Aufbau eines Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptors mit Ligandenbindung. Abgebildet ist die dimerisierte aktive Form, bestehend aus zwei Rezeptoren mit ihren jeweiligen Liganden (FGF). Ein Rezeptor enthält drei extrazelluläre immunglobulin-ähnliche Domänen (Ig I-III). Ein saurer Bereich zwischen Ig-1 und 2 bindet Heparansulfatproteoglykane (HPSG), die für die Affinität der FGFs zu ihren Rezeptoren wichtig sind. (Quelle: (Turner and Grose, 2010), modifiziert)

Der KGF spezifische FGFR IIIb entsteht durch alternatives Splicing des FGFR2. Die Interaktion des KGF-Liganden mit seinem Rezeptor führt zur Bildung eines

Rezeptorkomplexes, bestehend aus zwei KGF-Molekülen, die jeweils an einen Rezeptor gebunden sind. Heparin fungiert als Bindeglied des Rezeptordimers. Die Bildung des Komplexes löst eine Autophosphorylierung der intrazellulären Rezeptoranteile aus, was wiederum zur Rekrutierung und Aktivierung von Signalmolekülen wie z.B der Phospholipase-Cγ oder der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) führt (Boilly et al., 2000).

1.4.2 Die Rolle des Keratinozytenwachstumsfaktors im Rahmen der kutanen Wundheilung

KGF spielt eine entscheidende Rolle während der embryonalen Entwicklung sowie bei der Homöostase von enddifferenziertem Gewebe durch die Stimulierung von Proliferation, Migration und Differenzierung epithelialer Zellen. Diese Funktion legt eine Beteiligung von KGF an Gewebereparaturprozessen im Rahmen der Wundheilung nahe. mRNA-Analysen in Mäusen zeigten eine um bis zu 160-fach erhöhte Expression von KGF durch Fibroblasten während der kutanen Wundheilung (Werner et al., 1992). Erhöhte KGF-mRNA–Levels wurden ebenso in Wunden menschlicher Haut gefunden. Auch hier waren vorrangig dermale Fibroblasten in der unmittelbaren Umgebung der Wunde für die verstärkte Expression von KGF verantwortlich (Marchese et al., 1995). Wachstumsfaktoren wie PDGF und EGF, Tumornekrosefaktor α, aber auch Interleukin-1 und -6 stimulieren die Produktion von KGF während der Wundheilung (Brauchle et al., 1994)(Chedid et al., 1994). Die Behandlung von Wunden mit rekombinantem KGF führte zu einer verbesserten Reepithelialisierung der Läsionen, was die wichtige Funktion von KGF in Gewebereparaturprozessen unterstreicht (Staiano-Coico et al., 1993)(Pierce et al., 1994).

1.4.3 KGF-Überexpression in fibrosierenden Erkrankungen der Haut und ihre pathogenetische Relevanz

Epithelial-mesenchymale Interaktionen sind enorm wichtig für die Homöostase der Haut. Der Keratinozytenwachstumsfaktor stellt einen wichtigen parakrinen Effektor im Zusammenspiel von Fibroblasten der Dermis und Keratinozyten der Epidermis dar. In den letzten Jahren kristallisierte sich heraus, dass die Kommunikation zwischen diesen beiden Zelltypen auch in der Pathogenese von Keloiden und systemischer Sklerodermie von Bedeutung sein kann. Vor diesem Hintergrund, und mit dem

Wissen um die wichtige Funktion von KGF in der Wundheilung, untersuchten Canady und Kollegen die Expression des Keratinozytenwachstumsfaktors in Fibroblasten keloidaler und sklerodermaler Läsionen. Ihre Hypothese: KGF wirkt über einen doppelt parakrinen Mechanismus aktivierend auf die Fibroblasten der Dermis und trägt so entscheidend zur Pathogenese fibrosierender Erkrankungen bei.

Sie fanden eine konstitutive Überexpression des Keratinozytenwachstumsfaktors KGF in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Ebenso konnte die erhöhte KGF-Expression in mit den Erkrankungen assoziiertem Gewebe nachgewiesen werden. Sogar Seren von Keloid- und Sklerodermie-Patienten wiesen erhöhte KGF-Werte auf. Ihre Hypothese bestätigend beschreiben sie eine doppelt-parakrine Feedback-Schleife zwischen dermalen Fibroblasten und epidermalen Keratinozyten, die in der verstärkten EZM-Produktion von Fibroblasten resultiert. Der von Fibroblasten der Dermis übermäßig produzierte Keratinozytenwachstumsfaktor stimuliert in Keratinozyten die Freisetzung von Oncostatin M (OSM). OSM wirkt daraufhin rückkoppelnd auf die Fibroblasten und induziert die verstärkte Produktion von Kollagen (ColI1α), FAP α, einem allgemeinen Aktivitätsmarker, und uPA (Urokinase-Plasminogen-Aktivator). Die erhöhte uPA-Expression hatte positiven Einfluss auf die Fibroblastenmigration.

Die Studie eröffnete eine neue Sichtweise auf die Pathogenese fibrosierender Erkrankungen, indem sie ein schlüssiges Gesamtkonzept für die Aktivierung kutaner Fibroblasten im Zusammenspiel mit den Keratinozyten der Epidermis lieferte (Canady et al., 2013). Abbildung 6 zeigt den eben beschriebenen doppelt parakrinen Wirkmechanismus des Keratinozytenwachstumsfaktors.

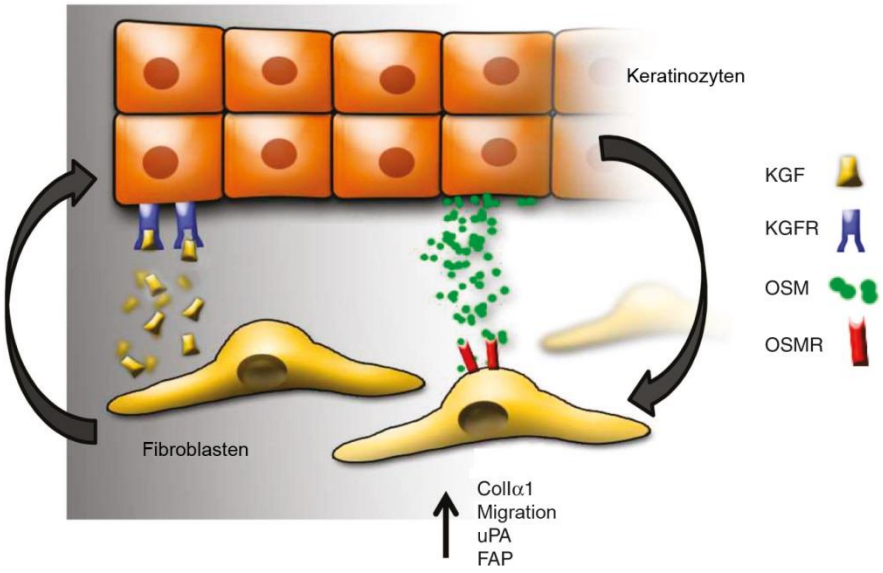


Abbildung 6 Dargestellt ist die doppelt-parakrine Wirkungsweise des Keratinozytenwachstumsfaktors KGF. KGF wird von Fibroblasten sezerniert und stimuliert in Keratinozyten die Freisetzung von Oncostatin M (OSM). OSM wirkt rückkoppelnd aktivierend auf die Fibroblasten, die mit einer erhöhten Expression von Kollagen (Collα1), uPA und FAP antworten. uPA fördert die Fibroblastenmigration. (Quelle: (Canady et al., 2013), modifiziert)

1.5 Regulation der Genexpression

Im Kern dieser Arbeit steht die Frage, wie die Überexpression des Keratinozytenwachstumsfaktors in fibrosierenden Erkrankungen der Haut reguliert wird. Die Expression eines Gens gliedert sich in drei große Abschnitte: Transkription, Co- und posttranskriptionale Modifikation und Translation. Die Genexpression eukaryotischer Zellen stellt einen stark regulierten Prozess dar. Eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen kontrolliert den reibungslosen Ablauf der drei Teilabschnitte. Es wird jedoch vermutet, dass die stärkste Kontrolle der Expression eines Gens auf transkriptioneller Ebene erfolgt.

1.5.1 Regulation der Transkription durch Transkriptionsfaktoren

Während der Transkription entsteht eine Kopie eines Gen-spezifischen DNA-Abschnitts in Form von mRNA. Die im Zellkern stattfindende Transkription wird in drei Phasen unterteilt: Initiation, Elongation und Termination. Während der Initiation kommt es zur Bindung der RNA-Polymerase II an eine dem zu transkribierenden Gen vorgeschaltete Sequenz, dem sogenannten Kernpromotor. Nach ihrer Bindung synthetisiert die RNA-Polymerase II eine zur DNA-Matrize komplementäre mRNA-Kette im Rahmen der Elongation. Die Freisetzung des mRNA-Produkts am Ende

eines Gens sowie die Ablösung der RNA-Polymerase II von der DNA werden als Termination zusammengefasst (Watson et al., 2010).

Die regulatorisch bedeutsamen Elemente während der Transkription werden in *cis*- und *trans*-Elemente eingeteilt. Unter *cis*-Elementen versteht man spezifische DNA-Sequenzen, die als Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, den sogenannten *trans*-Elementen, dienen (Maston et al., 2006).

Für die Initiation der Transkription entscheidend ist die Bindung der RNA-Polymerase II an den sogenannten Kernpromotor. Dieser Begriff bezeichnet spezifische, durch *in vitro*-Experimente ermittelte DNA-Abschnitte, die von den sechs allgemeinen Transkriptionsfaktoren TF II A, B, D, E, F, H erkannt werden und mit deren Hilfe die RNA-Polymerase II rekrutiert wird (Roeder, 1996). Bisher konnten in humanen Promotoren sechs solcher Elemente identifiziert werden. Hierzu zählen: TATA-Box, Inr (Initiator), DPE (Downstream-Promotorelement), DCE (Downstream-Kernelement), BRE (TF II B-Erkennungselement) und MTE (motif ten element) (Kadonaga, 2012). Abbildung 7 zeigt die Konsensussequenzen und Lokalisation der sechs unterschiedlichen Kernpromotorelemente.

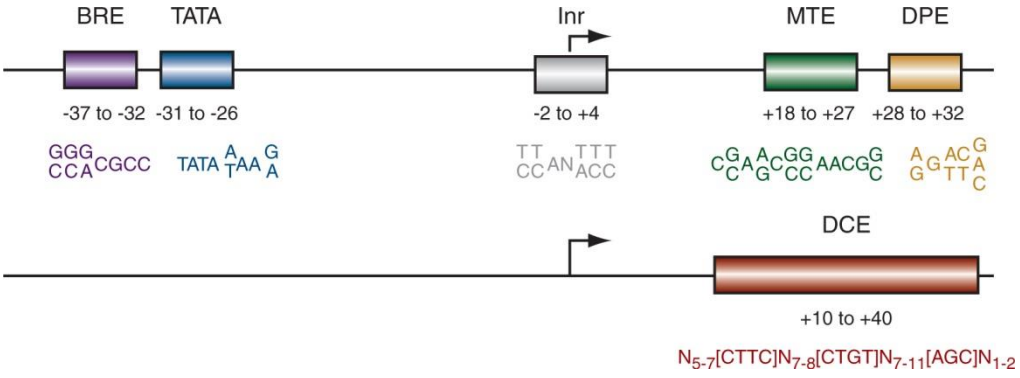


Abbildung 7 Lokalisation der sechs häufigsten Sequenzelemente des RNA-Polymerase-II-Kernpromotors in Bezug auf den Transkriptionsstart. Die angegebenen Konsensussequenzen wurden experimentell bzw. durch Computeranalysen ermittelt. (Quelle: (Maston et al., 2006), modifiziert)

Statistische Analysen von mehr als 10.000 humanen Promotoren zeigen, dass ca. 74 % aller Promotorsequenzen mindestens eines der obig genannten Elemente aufweisen (Gershenzon and Ioshikhes, 2005). Allgemeine Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase II bilden den sogenannten Präinitiationskomplex, der eine erste, jedoch noch lose Verbindung zwischen der RNA-Polymerase II und der zu transkribierenden nachgeschalteten Gensequenz darstellt (Smale and Kadonaga,

2003). *In vitro* Experimente zeigten, dass dieser Komplex nur eine schwache Transkription des Zielgens bewirken kann. Man spricht hier auch von der basalen Transkriptionsrate.

Für die zusätzliche Stimulation der Transkription *in vivo* sind weitere Aktivatoren nötig. Als Aktivatoren werden spezifische Transkriptionsfaktoren bezeichnet, die sowohl eine DNA-Bindungs-Domäne als auch eine oder mehrere Aktivierungsdomänen für Protein-Protein-Interaktionen enthalten. Sie sind in der Lage spezifische Sequenzabschnitte innerhalb des Promotors zu erkennen, daran zu binden und mit ihren Aktivierungsdomänen durch Proteinwechselwirkungen Einfluss auf die Stärke der Transkriptionsrate zu nehmen. Die spezifischen Erkennungssequenzen liegen häufig stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts in sogenannten *upstream-regulatory elements*. Neben ihrer Funktion als Aktivatoren der Transkription fungieren spezifische Transkriptionsfaktoren auch als Repressoren, die die Transkription von Genen drosseln können. Das An- und Abschalten verschiedener Gene durch die komplexe Interaktion von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren ist von entscheidender Bedeutung für das physiologische Gleichgewicht der Zelle (Watson et al., 2010).

Transkriptionsfaktoren gliedern sich anhand der Struktur ihrer DNA-Bindungsbereiche in verschiedene Transkriptionsfaktorfamilien. Transkriptionsfaktorbindestellen umfassen eine circa 6 bis 12 bp lange Sequenz, die spezifische Bindung der einzelnen Transkriptionsfaktoren wird jedoch meist von nur etwa 4 bis 6 Basenpaaren vermittelt. Veränderungen innerhalb der Transkriptionsfaktorbindestellensequenz können Einfluss auf die Stärke der Bindung und somit die Wirkung spezifischer Transkriptionsfaktoren haben (Maston et al., 2006). Schon die Variation einzelner Basenpaare, wie sie im Genom als Single-Nukleotid-Polymorphismen vorkommt, kann durch Entstehung einer alternativen Bindesequenz für Transkriptionsfaktoren die Expression eines Gens entscheidend beeinflussen und bei der Pathogenese von Erkrankungen eine Rolle spielen (De Gobbi et al., 2006). Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren ist abhängig von ihrer Konzentration, Phosphorylierung durch Kinasen, Komplexbildung mit anderen Transkriptionsfaktoren und der Interaktion mit weiteren Co-faktoren. Veränderungen

in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Genexpression maßgeblich mit weitreichenden Folgen für den Organismus.

1.5.2 Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression durch microRNAs

Die Entdeckung der sogenannten microRNAs im Jahre 1993 hat gezeigt, dass es Mechanismen in der Zelle gibt, die auch posttranskriptionell entscheidenden Einfluss auf die Expression eines Gens nehmen können. Die Erstbeschreibung einer microRNA-Sruktur und deren Wirkung auf ein Zielgen in C. elegans erfolgte durch Wightman und Kollegen (Wightman et al., 1993). Im Laufe der Jahre entwickelte sich ein regelrechter Boom in der Erforschung der Wirkungsweise dieser nur etwa 20 bis 22 Nukleotide umfassenden, kleinen RNA-Moleküle. Es wird vermutet, dass bis zu 50 % unserer Gene durch microRNAs reguliert werden.

1.5.2.1 Struktur und Biogenese von microRNAs

MicroRNAs sind nicht-kodierende kurze RNA-Moleküle, deren primäre Sequenzen in kodierenden oder nicht-kodierenden Regionen des Genoms liegen. Das ursprüngliche Transkript kann eine Länge von mehreren Kilobasen aufweisen und wird als primäre microRNA (pri-microRNA) bezeichnet. Durch intramolekulare Basenpaarungen formt ein Teil der pri-microRNA, wie es für einzelsträngige RNA typisch ist, eine große Haarnadelstruktur aus. Innerhalb dieser existieren weitere kleine „stem-loops“, die die spätere microRNA enthalten. Im nächsten Schritt werden die Teile der pri-microRNA an der Basis der Schleife durch den sogenannten Mikroprozessorkomplex, bestehend aus der RNase III (Drosha) und dem dsRNA-Bindeprotein DGCR8, abgespalten. Die zurückbleibende circa 60 bis 80 bp lange Haarnadelstruktur (pre-microRNA) wird durch das Protein Exportin 5 aus dem Zellkern ins Zytosol ausgeschleust. Im Zytosol schneidet das Protein Dicer mit Hilfe der Cofaktoren TRBP und PACT den oberen Pol der Haarnadel ab und hinterlässt ein ungefähr 22 bp langes, doppelsträngiges RNA-Molekül. In der Regel wird die RNA in dem Komplex aus Dicer, TRPB und PACT entwunden, einer der beiden Stränge wird degradiert und der andere Strang fungiert als reife microRNA (Kim et al., 2009). Es können jedoch auch beide Stränge als funktionelle microRNAs wirken (Tomari et al., 2004). Zuletzt wird die *mature microRNA* in einen Multienzymkomplex, den sogenannten RISC-Komplex, eingebaut, der Proteine der Argonaut-Familie enthält. Erst der Einbau in den RISC-Komplex befähigt die reife microRNA,

regulierend in die Expression eines Gens einzugreifen. Abbildung 8 liefert einen schematischen Überblick über die Biogenese und die Funktion von microRNAs.

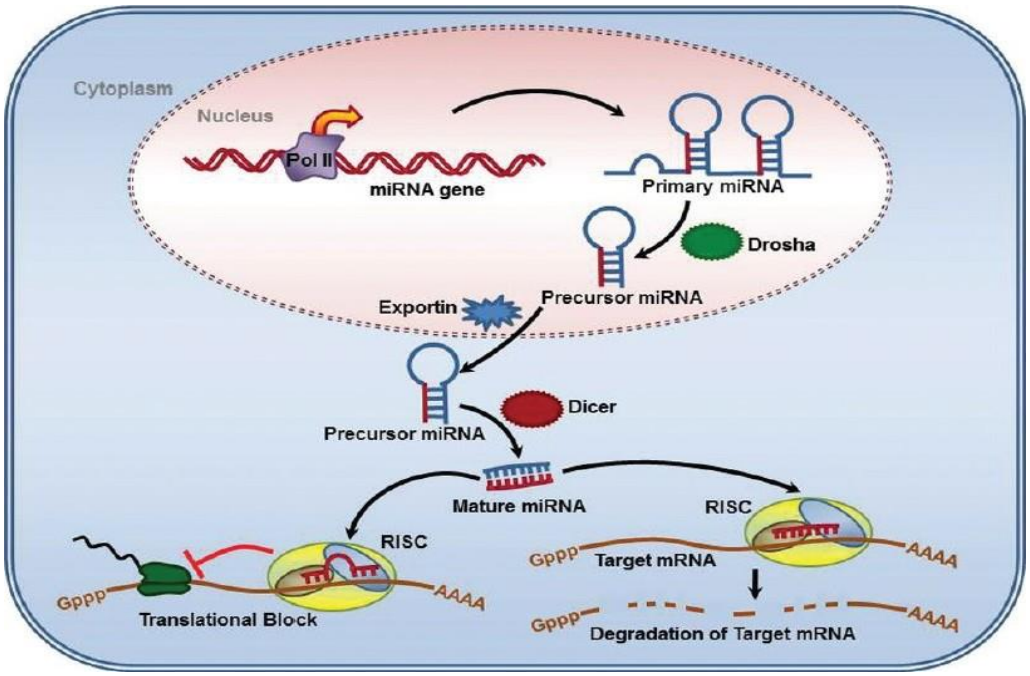


Abbildung 8 MicroRNA- Biogenese und Funktion. (Internetquelle 5)

1.5.2.2 Wirkungsweise der microRNAs

Für die Funktion des RISC-Komplexes erforderlich ist die Interaktion der microRNA mit der Ziel-mRNA. Die Bindung an die Ziel-mRNA erfolgt durch Basenpaarung im Bereich der Zielsequenz, die meist im 3´-UTR der mRNA zu liegen kommt. Die Sequenz der microRNA, die daran bindet, wird auch als „seed-sequenz“ bezeichnet und umfasst die Nukleotide 2 bis 8 am 5`-Ende (Brennecke et al., 2005). Wie microRNAs Einfluss auf die Expression eines Gens nehmen, wird stark diskutiert. Eine Hypothese besagt, dass microRNAs die Expression von Genen vorwiegend über eine Repression der Translation vermindern. Entscheidend für die Interaktion mit dem RISC-Komplex ist hierbei die 5´-Cap-Struktur der mRNA (Pillai et al., 2005)(Humphreys et al., 2005). Andere vertreten die Meinung, dass microRNAs den Abbau von mRNA-Molekülen befördern und so die zur Translation bereitstehende Menge an mRNA verringern.

1.6 Die Rolle von Transkriptionsfaktoren und microRNAs in der Pathogenese fibrosierender Erkrankungen

1.6.1 Transkriptionsfaktoren

Es verwundert nicht, dass Transkriptionsfaktoren in ihrer Funktion als Genregulatoren auch an der Pathogenese fibrosierender Erkrankungen beteiligt sind. Die ursächlichen Mechanismen der pathologischen übermäßigen Kollagenexpression sowie des Ungleichgewichts zwischen Kollagenauf- und –abbau sind noch nicht genau verstanden, jedoch ist eine Fehlregulation spezifischer Transkriptionsfaktoren von zentraler Bedeutung.

1.6.1.1 Regulation der exzessiven Kollagenexpression

Mittlerweile weiß man, dass an der Steuerung der übermäßigen Kollagenexpression dermaler Fibroblasten zahlreiche Transkriptionsfaktoren beteiligt sind.

1.6.1.1.1 Smad-Proteine

Die Transkriptionsfaktorfamilie der Smad-Proteine ist essentieller Bestandteil der TGF-β Signalkaskade. Man unterscheidet R-Smads (rezeptorregulierte Smads, Smad 2 und 3), das Co-Smad-Protein Smad 4 (fungiert als Co-Aktivator) und inhibitorische Smads (Smad 6 und 7). TGF-β gilt als das Schlüsselenzym kutaner Fibrose, da es die Kollagenproduktion mesenchymaler Zellen stimuliert. Aktives TGF-β bindet an der Zelloberfläche an den TGF-β-Rezeptor II, einen transmembranären Serin-Threonin-Kinase-Rezeptor, der nach Ligandenbindung einen Komplex mit dem ebenfalls zellmembranständigen TGF-β-Rezeptor I bildet. Nach Bindung von TGF-β kommt es zu einer Phosphorylierung des TGF-β-Rezeptors I durch die Kinase-Domäne des TGF-β-Rezeptors II (Wrana et al., 1994). Der aktivierte TGF-β-Rezeptor I phosphoryliert und aktiviert daraufhin die Smad-Proteine 2 und 3. Phospho-Smad 2 und 3 bilden einen Komplex mit dem Coaktivator Smad-4, der dann in den Zellkern transloziert und dort zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Expression TGF-β abhängiger Gene, unter anderem Kollagen, fördert (Derynck et al., 1998). Abbildung 9 zeigt eine vereinfachte Darstellung der TGF-β-Signalkaskade mit den wichtigsten Smad-Proteinen.

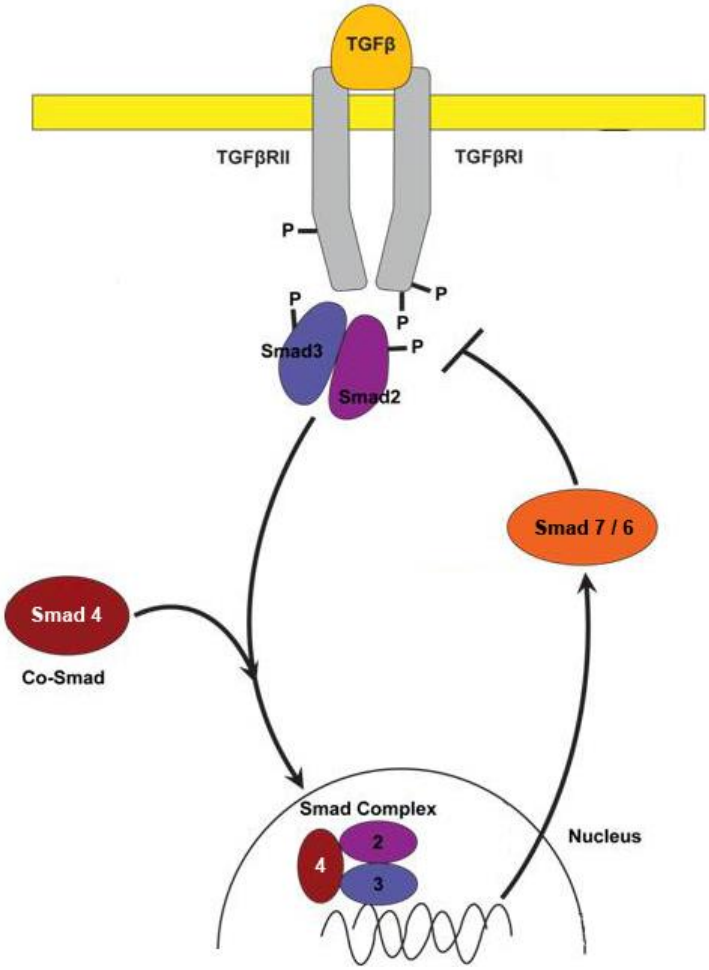


Abbildung 9 Vereinfachte Darstellung des Smad-abhängigen TGF-β-Signalwegs in der Zelle. (Internetquelle 6, modifiziert)

In systemischer Sklerodermie konnte eine verstärkte Phosphorylierung und DNA-Bindungskapazität der Smad-Proteine 2 und 3 nachgewiesen werden. Die gezielte Mutation des Smad-Bindeelements innerhalb des Col1A2-Promotors führte zu einer signifikanten Reduktion der Kollagenexpression in Sklerodermie-Fibroblasten (Jinnin, 2010). Auch in Keloiden beobachtete man eine verstärkte Proteinexpression der Smad-Proteine 2 und 3 (Tsujita-Kyutoku et al., 2005). Die gezielte Blockierung von Smad 2 mittels siRNA verringerte die Prokollagenproduktion von Keloid-Fibroblasten (Gao et al., 2006). Eine Fehlregulation der TGF-β-Smad-Signalkaskade wird als der zentrale Mechanismus in der Fibroseentstehung verstanden.

1.6.1.1.2 Der Transkriptionsfaktor Stat-3

Der IL-6-gp-130-JAK-Stat 3-Signalweg stellt eine weitere profibrotische Kaskade dar, die an der exzessiven Kollagenproduktion aktivierter Fibroblasten beteiligt ist. Im

Rahmen der klassischen Signalkaskade bindet das Zytokin Interleukin-6 an spezifische IL-6 -Rezeptoren der Zelloberfläche und bildet einen Komplex mit dem Oberflächenglykoprotein gp-130. Konformationsänderungen innerhalb des Proteins gp 130 führen zur Rekrutierung der Januskinasen 1 und 2 und anschließenden Phosphorylierung von gp-130. Phosphoryliertes gp-130 aktiviert dann den Transkriptionsfaktor STAT-3, der in den Zellkern wandert und neben vielen anderen Genen auch die Kollagenexpression beeinflusst (Scheller et al., 2006). Sowohl in Keloid-Fibroblasten als auch in Fibroblasten systemischer Sklerodermie-Patienten konnte eine verstärkt ablaufende IL-6-Signalkaskade mit gesteigerter Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT-3 und nachfolgend vermehrter Produktion extrazellulärer Matrixkomponenten nachgewiesen werden (Ghazizadeh et al., 2006)(Khan et al., 2012).

1.6.1.1.3 Der Transkriptionsfaktor SP-1

Der Col1A2-Promotor enthält Bindeelemente für weitere Transkriptionsfaktoren, unter anderem SP-1. In systemischer Sklerodermie konnte eine verstärkte Phosphorylierung des SP-1-Transkriptionsfaktors nachgewiesen werden. Die gezielte Inhibierung des Transkriptionsfaktors SP-1 mittels Mithramycin führte zu einer reduzierten Kollagenexpression von Fibroblasten (Jinnin, 2010). Die Behandlung von Keloid-Fibrolasten mit dem SP-1 Inhibitor WP631 führte ebenfalls zu einer verminderten Produktion extrazellulärer Matrixkomponenten (Mukhopadhyay et al., 2007).

1.6.1.1.4 Die AP-1-Transkriptionsfaktorfamilie

TGF-β reguliert die Kollagenexpression nicht nur über Smad-Proteine. Weitere Transkriptionsfaktoren, wie etwa die Mitglieder der AP-1-Transkriptionsfaktorfamilie, regulieren den Col1A2-Promotor TGF- β abhängig (Chung et al., 1996). Die Aktivierung der AP-1 Mitglieder erfolgt hierbei über MAPK-Kinasen wie etwa die c-Jun terminale-Kinase oder p38. Die Relevanz der AP-1 Transkriptionsfaktoren für die übermäßige Kollagenexpression von Keloid-Fibroblasten konnte durch spezifische Blockierung der Transkriptionsfaktoren mittels Oligodesoxynukleotiden (ODNs) nachgewiesen werden (Kim et al., 2005). Avouac und Kollegen fanden eine verstärkte Expression von AP-1-Transkriptionsfaktoren in systemischer

Sklerodermie. Auch hier führte die Blockierung von AP-1 zu einer verminderten Kollagenexpression dermaler Fibroblasten (Avouac et al., 2012).

1.6.1.1.5 Sonstige Faktoren in Systemischer Sklerodemie

Die intensive Forschung an der Regulation der Kollagenexpression in systemischer Sklerodermie bringt weitere Transkriptionsfaktoren ins Spiel. Zu nennen sind hier Ets-1, Fli-1 und c-MYB. Auch Coaktivatoren wie p300/CBP sowie c-Ski und SnoN scheinen Einfluss auf die verstärkte Produktion von Kollagen zu haben (Jinnin, 2010). Für Keloide und zirkumskripte Sklerodermie sind diese Transkriptionsfaktoren jedoch noch nicht beschrieben.

1.6.1.2 Regulation des Kollagenabbaus

Sowohl in sklerodermalen Läsionen als auch in Keloiden konnten erhöhte TIMP-1 Levels nachgewiesen werden (siehe Punkt 1.3.1 und 1.3.2.2). Ein Überschuss der TIMPs im Vergleich zu MMPs kann zu einer verstärkten Kollagenablagerung durch verminderten Kollagenabbau führen. TIMP-1 wurde als endogenes Zielgen der TGF-β/Smad-3 –Signalkaskade in dermalen Fibroblasten identifiziert (Verrecchia et al., 2001). Die verstärkte Expression von TIMP-1 in Keloiden und Sklerodermie kann durch eine fehlregulierte TGF-β Signalkaskade mit vermehrter Aktivierung des Transkriptionsfaktors Smad 3 erklärt werden.

1.6.2 MicroRNAs

Seit der Entdeckung der microRNAs als wichtige Genregulatoren wurde deren Einfluss in der Pathogenese fibrosierender Erkrankungen mit großem Aufwand untersucht. MicroRNAs spielen eine Rolle in Schlüsselprozessen der kutanen Fibrose. Man unterscheidet profibrotische microRNAs, deren verstärkte Expression die Fibroseentstehung fördert, von antifibrotischen microRNAs, deren verminderte Expression fibrosierende Prozesse vorantreibt.

1.6.2.1 Einfluss von microRNAs auf die Kollagenexpression

Es werden zahlreiche microRNAs diskutiert, die die verstärkte Expression von Kollagen in fibrosierenden Erkrankungen regulieren können. Hierbei unterscheidet man microRNAs, die die Kollagenproduktion direkt beeinflussen, indem sie an die Kollagen-mRNA binden, von microRNAs, die indirekt über die Kontrolle von Signalkaskaden wirken.

Als direkte Regulatoren der Kollagenexpression wurden in systemischer Sklerodermie die microRNA-29, -let-7a und -133a, in Keloiden und Sklerodermie die microRNA-7,-26 a,-129-5p,-133 und -196 a identifiziert (Babalola et al., 2013). All diese microRNAs regulieren die Kollagenproduktion in negativem Sinne. Dies bedeutet, dass eine Verminderung dieser microRNAs in fibrosierenden Erkrankungen zu einer vermehrten EZM-Synthese führt.

Anderen microRNAs wird eine Rolle in der Regulation der TGF-β-Signalkaskade zugeschrieben und sie üben so womöglich einen indirekten Einfluss auf die Kollagenproduktion aus. Die microRNA-145 ist beispielsweise in der systemischen Sklerodermie herunterreguliert. Zu den potentiellen Zielgenen der microRNA-145 zählt Smad 3. Eine daraus resultierende erhöhte Expression von Smad 3 kann somit die TGF-β-Wirkung innerhalb der Zelle intensivieren und die pathologische Kollagenakkumulation bedingen (Li et al., 2012). Die microRNA-21 wird in Sklerodermie-Fibroblasten durch TGF-β induziert, führt zu einer verminderten Expression des inhibitorischen Smad 7-Proteins und verstärkt dadurch ebenfalls die TGF-β-Signalkaskade (Zhu et al., 2013).

1.6.2.2 Einfluss von microRNAs auf den Kollagenabbau

Der Einfluss eines verminderten Abbaus von Kollagen durch Matrix-Metalloproteasen wird sowohl in der Pathogenese von Keloiden, als auch der Sklerodermie diskutiert. MicroRNAs können durch Regulation der Expression von Matrix-Metalloproteasen entscheidenden Einfluss auf den Kollagen-*turn-over* nehmen. In Fibroblasten systemischer Sklerodermie-Patienten konnte eine erhöhte microRNA-92-a-Expression festgestellt werden, die mit einer verminderten Produktion der Matrix-Metalloprotease 1 vergesellschaftet war (Sing et al., 2012). Für Keloide ist eine derartige Regulation noch nicht beschrieben.

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte untersucht werden, über welche Mechanismen die KGF-Expression in Keloid- bzw. Sklerodermie-Fibroblasten verstärkt wird. Da bei Canady und Kollegen die KGF-Expression bereits auf mRNA-Ebene erhöht war, sind mehrere Regulationsmechanismen denkbar. Zum einen könnte die Regulation auf transkriptioneller Ebene über den *KGF*-Promotor erfolgen. Dabei könnten Mutationen bzw. Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) innerhalb der Promotorregion die Stärke der *KGF*-Transkriptionsrate beeinflussen. Außerdem könnte eine Fehlregulation von Transkriptionsfaktoren, wie es schon für die Kollagenexpression in fibrosierenden Erkrankungen beschrieben ist, für die erhöhte Produktion von KGF verantwortlich sein. Ein weiterer denkbarer Ansatz wäre eine Promotor-unabhängige Regulation der KGF-Expression durch microRNAs. Die Abbildung 10, Abbildung 11 und Abbildung 12 stellen die drei verschiedenen Erklärungsansätze schematisch dar.

Hypothese 1: Mutation innerhalb des *KGF*-Promotors

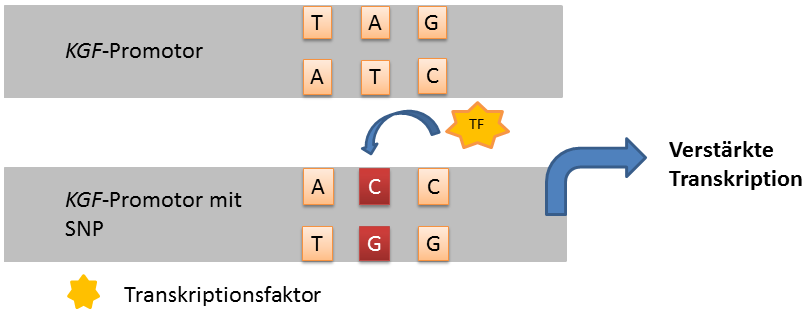


Abbildung 10 Stark vereinfachte Darstellung. Ein Single-Nukleotid-Polymorphismus innerhalb des *KGF*-Promotors könnte die DNA - Bindungskapazität von Transkriptionsfaktoren verändern und dadurch zu einer verstärkten Transkription des *KGF*-Gens führen.

Hypothese 2: Fehlregulation von Transkriptionsfaktoren

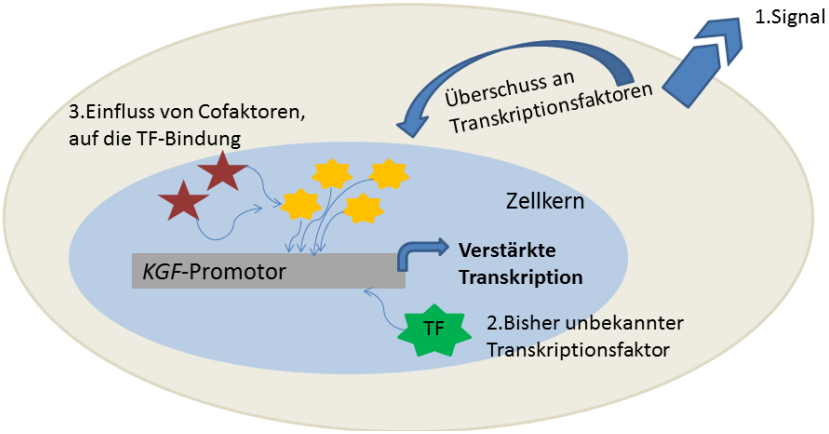


Abbildung 11 Eine Fehlregulation von Transkriptionsfaktoren kann auf mehrere Arten erfolgen. Dargestellt sind drei unterschiedliche Mechanismen: 1. Mittels Signaltransduktion können äußere Einflussfaktoren zu einem Überschuss bzw. erhöhter Aktivität von Transkriptionsfaktoren und damit zu einer verstärkten Ableserate führen. 2. Ein bisher unbekannter Transkriptionsfaktor könnte die Expression des *KGF*-Gens in den mit der Krankheit assoziierten Fibroblasten beeinflussen. 3. Eine weitere Möglichkeit wäre die Interaktion von Cofaktoren mit Transkriptionsfaktoren, was zu einer verstärkten Bindungsaffinität der Transkriptionsfaktoren und einer nachfolgenden erhöhten Transkriptionsrate führt.

Hypothese 3: Posttranskriptionelle Regulation von KGF durch microRNAs

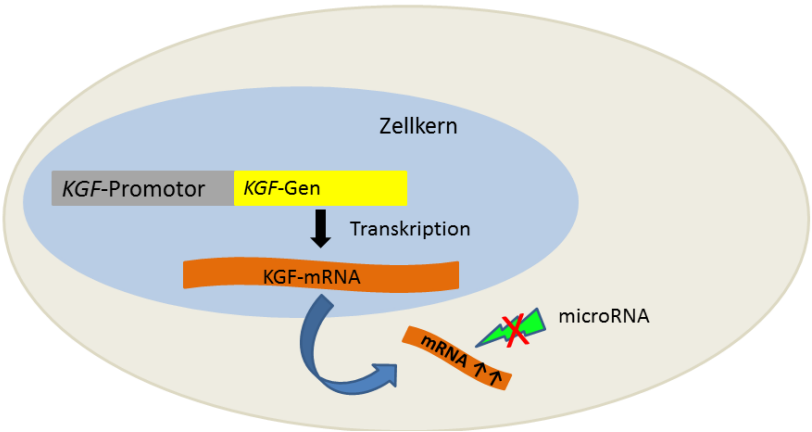


Abbildung 12 Eine mögliche Regulation der KGF-Überexpression durch microRNAs würde bedeuten, dass die Degradation der KGF-mRNA durch spezifische microRNAs unterbunden sein müsste. Dies kann durch eine verminderte Expression spezifischer microRNAs geschehen, oder durch eine gestörte Interaktion der microRNAs mit der KGF-mRNA.

Die Rolle von microRNAs in der Pathogenese fibrosierender Erkrankungen ist noch nicht ausreichend verstanden. Deshalb sollte in einem weiteren Teilaspekt der Dissertation eine Analyse ausgewählter microRNAs in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten erfolgen.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der *KGF*-Promotoranalysen

3.1.1 *In silico*-Analyse des *KGF*-Promotors auf Single-Nukleotid-Polymorphismen

Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe sowie eine *in silico*-Analyse aktueller Publikationen lieferten keine Hinweise auf krankheitsrelevante Single-Nukleotid-Polymorphismen innerhalb des *KGF*-Promotors. Die Suchanfragen bei der Literaturplattform Pubmed: „fgf-7 promoter snp“, „keloid snp“, „scleroderma snp“ und „fibrosis snp“ blieben ohne Treffer und Anhalt für eine genetisch festgelegte Basenvariation im Bereich des *KGF*-Promotors von erkrankten Personen.

3.1.2 Multiples Alignment sowie Untersuchung des *KGF*-Promotors auf Transkriptionsfaktorbindestellen

Für eine Fehlregulation von Transkriptionsfaktoren sprechen Experimente der Arbeitsgruppe, in denen Promotorbereiche aus gesunden Fibroblasten in Keloid- bzw. Sklerodermie-Fibroblasten aktiver waren als in Fibroblasten gesunder Spender.

Um dies zu untersuchen, mussten zunächst die Bereiche innerhalb des *KGF*-Promotors ausfindig gemacht werden, die für die Transkription des *KGF*-Gens eine Rolle spielen. Unter der Annahme, dass funktionell bedeutsame Elemente im Laufe der Evolution erhalten bleiben, wurde ein multiples Alignment des *KGF*-Promotors durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine speziesunabhängige starke Konservierung des *KGF*-Promotors. Wie aus Abbildung 13 hervorgeht, fand sich in allen untersuchten Spezies ein hochkonserviertes Transkriptionsfaktorfamilienbindestellen-Cluster in der Nähe des putativen Transkriptionsstarts, was erste Hinweise auf den Lokalisationsort regulatorisch wichtiger Bereiche lieferte.

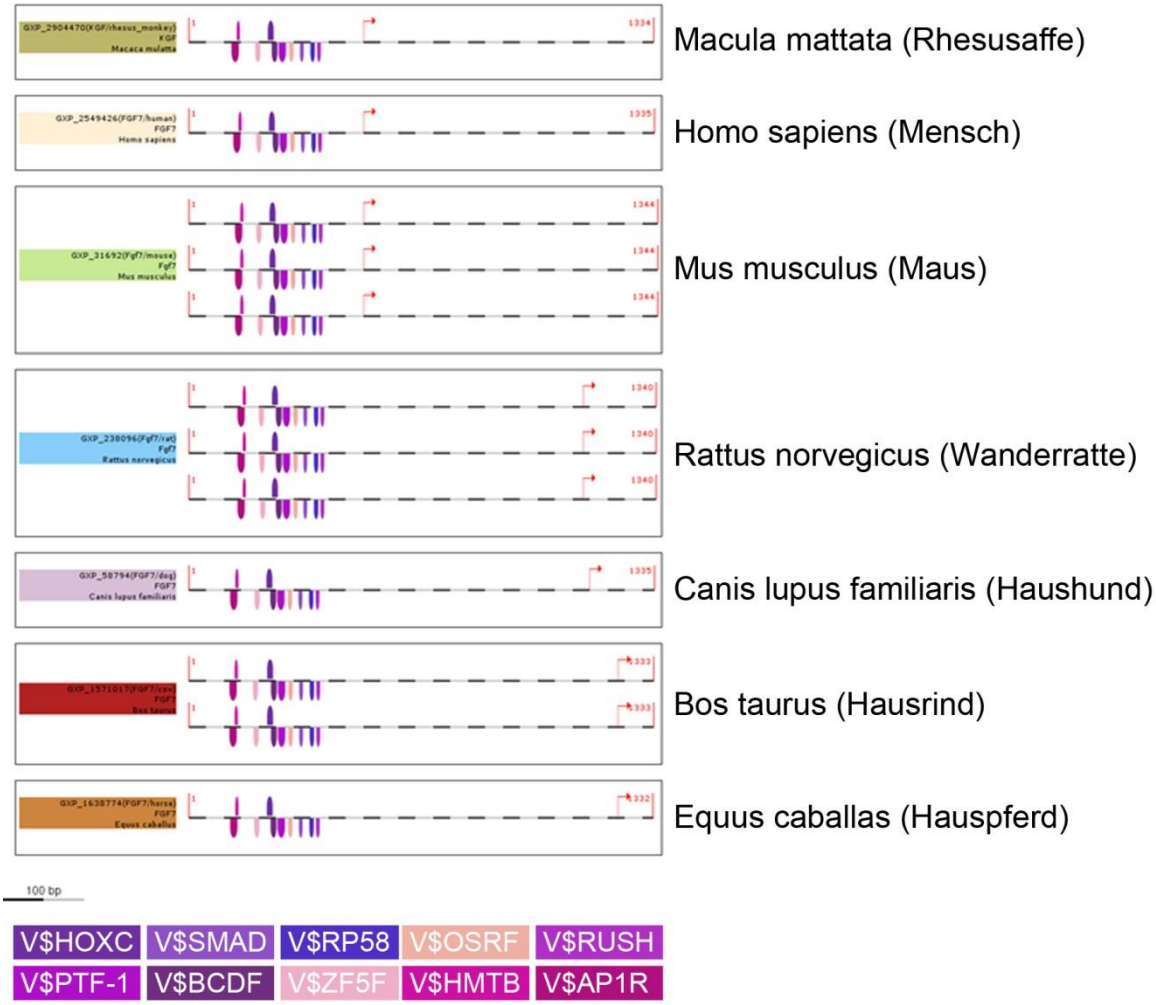


Abbildung 13 Ergebnis des multiplen Alignments des *KGF*-Promotors verschiedener Säugetierarten mit Hilfe der Genomatix-ELDORADO Analyse. Es fand sich ein innerhalb der untersuchten Spezies exakt konserviertes Cluster von 10 Transkriptionsfaktorfamilienbindestellen. Diese sind in unterschiedlichen Farben hervorgehoben.

Der identifizierte Bereich wurde dann mit Hilfe einer Datenbank im Internet noch einmal auf Transkriptionsfaktorbindestellen überprüft. Die Analyse mit Hilfe des Promo tool der Webseite http://alggen.lsi.upc.es ergab Bindestellen für eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren. Abbildung 14 zeigt eine Aufzählung der potentiellen humanen Transkriptionsfaktoren, die in diesem Bereich binden können.

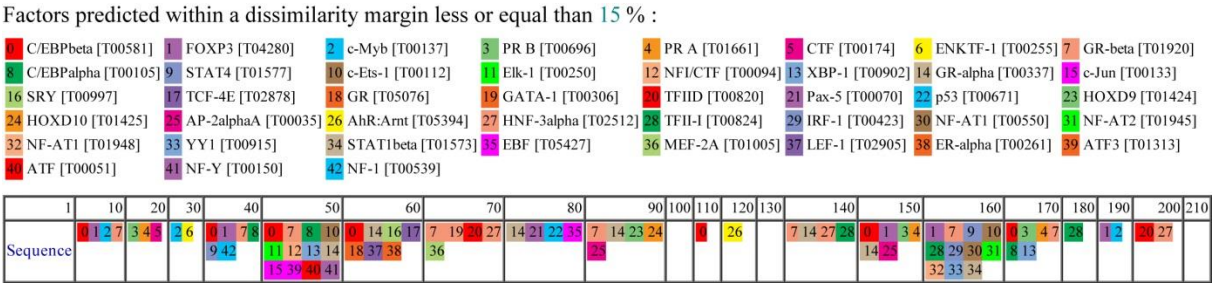


Abbildung 14 Potentielle humane Transkriptionsfaktoren, die innerhalb des Clusters binden können. Die Aufzählung erfolgt jeweils in Schritten von zehn Basenpaaren.

3.1.3 Reportergenanalysen

Zur Identifikation der funktionell bedeutsamen *KGF*-Promotorsequenz wurden Reportergenanalysen durchgeführt. Reportergenanalysen dienen der Messung von Promotoraktivitäten und funktionieren nach folgendem Prinzip: Ein Promotorbereich eines Gens (in unserem Fall *KGF*) wird in einem bakteriellen Vektor vor ein detektierbares Gen (= Reportergen) geschaltet. Die erzeugten Plasmide werden im nächsten Schritt mittels Transfektion in kultivierte Zellen eingebracht. Binden nun regulatorische Elemente in den Zellen an den Promotorbereich, wird das nachgeschaltete Reportergen transkribiert und dessen Expression kann durch verschiedene Methoden gemessen werden. Im Luciferase-Assay handelt es sich hierbei um das Enzym Luciferase, das nach Zugabe von Substrat zu einer Lichtreaktion führt. Für die Durchführung der Reportergen-Analysen verwendeten wir primäre dermale Fibroblasten gesunder sowie an Keloid- und systemischer bzw. zirkumskripter Sklerodermie erkrankter Spender. Die Arbeit mit primären Zellkulturen stellt hohe Ansprüche an den Wissenschaftler und gestaltet sich oftmals schwierig. In unserem Fall war das Zellwachstum der mit der Krankheit assoziierten Fibroblasten eingeschränkt. Um eine möglichst große n-Zahl an Wiederholungen zu generieren und damit eine höhere Aussagekraft der Luciferase-Assays zu erreichen, wurde die gemessene *KGF*-Promotoraktivität in mit der Krankheit assoziierten Fibroblasten zusammengefasst.

3.1.3.1 *KGF*-Promotorkonstrukte

KGF-Promotorbereiche wurden in Vektoren mit Luciferase-Gen, wie in Gliederungspunkt 5.2.2 beschrieben, kloniert und die Aktivität nach Transfektion der Plasmide in Luciferase-Assays (siehe Punkt 5.2.4) gemessen. Um das oben erwähnte TF-Bindestellen-Cluster nun als potentiell regulatorischen Bereich zu

identifizieren, wurden *KGF*-Promotorbereiche mit und ohne Cluster generiert und diese zusammen mit bereits vorhandenen Konstrukten (1,2 kb und 3 kb) im Luciferase-Assay getestet. Es konnten sechs *KGF*-Promotorkonstrukte erfolgreich hergestellt werden. Die Lage der verschiedenen *KGF*-Promotorbereiche in Bezug auf den Transkriptionsstart und ihre Größe sind in Abbildung 15 dargestellt.

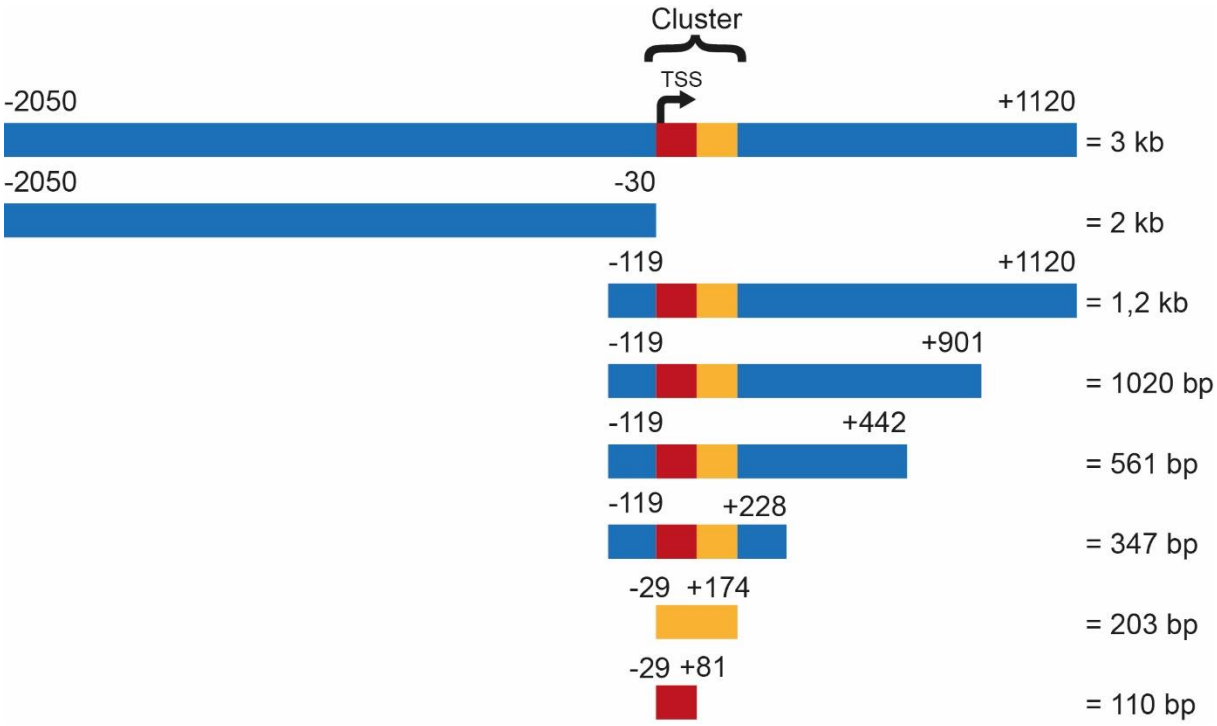


Abbildung 15 Lage der *KGF*-Promotorbereiche in Bezug auf den putativen Transkriptionsstart. Das durch die Genomatix-ELDORADO Analyse identifizierte Transkriptionsfaktorbindestellen-Cluster ist farblich hervorgehoben. Das 203 bp lange *KGF*-Promotorkonstrukt (gelb) enthält das gesamte Cluster. Der 110 bp lange *KGF*-Promotorbereich (rot) diente der weiteren Eingrenzung möglicher regulatorisch bedeutsamer Elemente.

Die Herstellung der verschiedenen *KGF*-Promotorkonstrukte wird ausführlich in Punkt 5.2.2 beschrieben. Zur Veranschaulichung sollen hier nur die Produkte des ersten und letzten Arbeitsschritts der jeweiligen Klonierungen bildlich dargestellt werden. Initial wurden die Promotorbereiche aus genomischer DNA gesunder Fibroblasten mittels PCR gewonnen. Abbildung 16 zeigt die PCR-Produkte der unterschiedlich langen *KGF*-Promotorabschnitte.

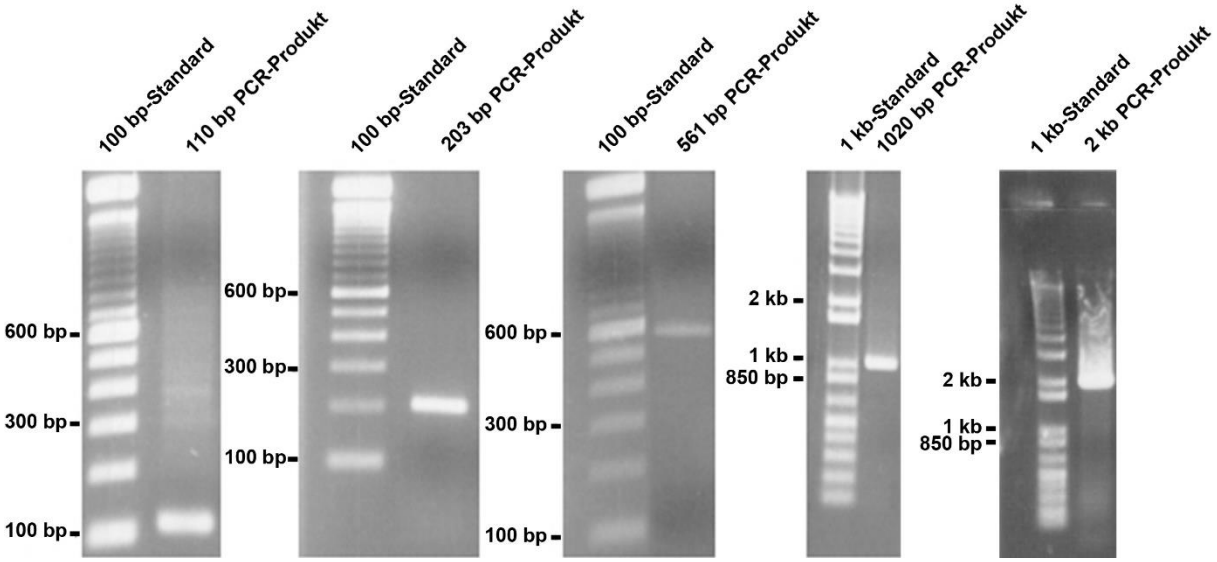


Abbildung 16 Dargestellt sind die PCR-Produkte der *KGF*-Promotorbereiche der Länge 110 bp, 203 bp, 561 bp, 1020 bp und 2 kb nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Visualisierung mit Ethidiumbromid. Das 347 bp lange *KGF*-Promotorkonstrukt entstand aus einem direkten Restriktionsverdau des 1,2 kb *KGF*-Promotorkonstrukts, weshalb hier kein PCR-Produkt existiert. Zur Bestimmung der exakten Größe der PCR-Produkte wurde stets ein DNA-Größenstandard (100 bp oder 1 kb) mitgeführt.

In Abbildung 17 sind die Fragmente des abschließenden Restriktionskontrollverdaus der erzeugten pGL4-*KGF*-Promotorplasmide, der als Nachweis für den korrekten Einbau der Promotorbereiche in den pGL4.10 (luc2) Vektor diente, dargestellt.

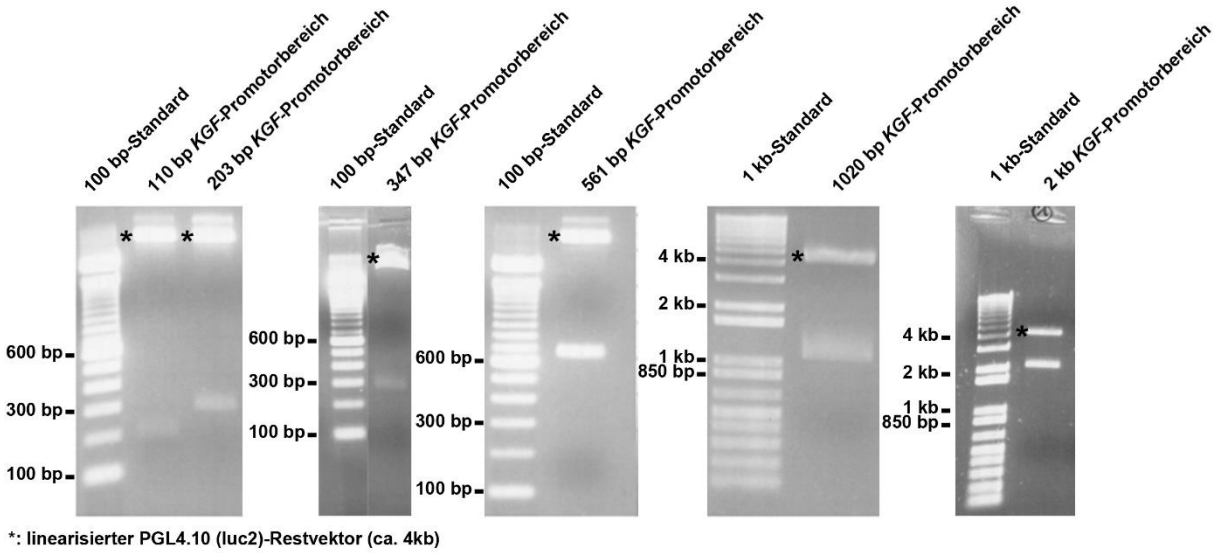
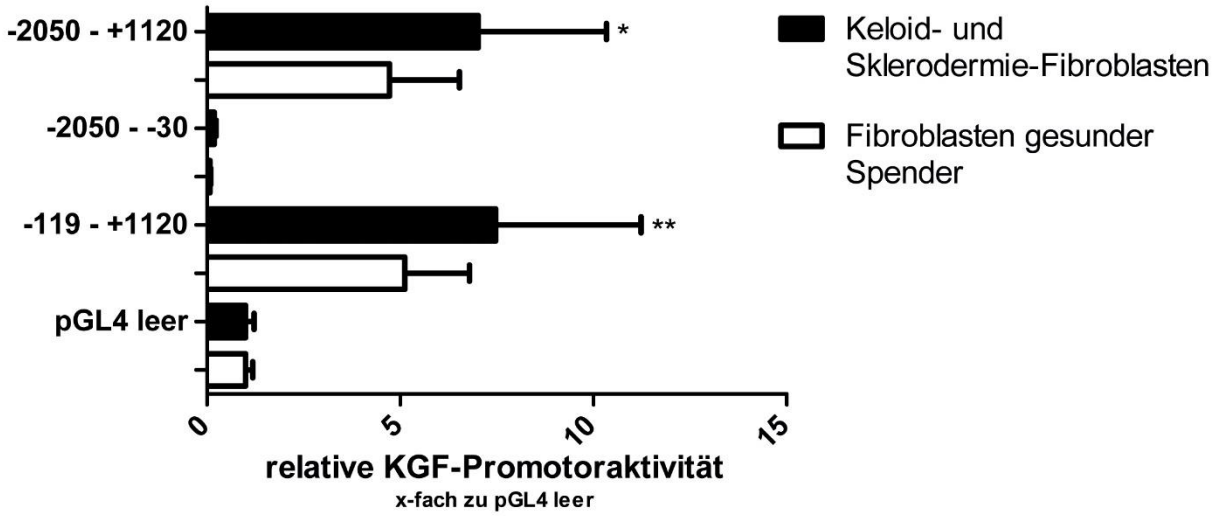


Abbildung 17 Es wurden sechs *KGF*-Promotorbereiche in den pGL4.10 (luc2)-Vektor kloniert. Dargestellt sind die Fragmente des abschließenden Restriktionskontrollverdaus nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Visualisierung mit Ethidiumbromid. Im Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen entstanden jeweils zwei Fragmente: 1. Insert mit *KGF*-Promotorbereich unterschiedlicher Länge 2. Linearisierter pGL4.10 (luc2)-Restvektor mit einer Länge von ca. 4 kb Die Umklonierung der *KGF*-Promotorbereiche aus dem pCR®II-TOPO®-Vektor in den pGL4.10 (luc2)-Vektor (siehe Punkt 5.2.2.7) führte zu einer Verlängerung der Inserts um ca. 100 bp, da ein Teil des pCR®II-TOPO®-Vektors mit überführt wurde. Dies trifft für die Promotorkonstrukte der Länge 110 bp, 203 bp, 561 bp, 1020 bp und 2 kb zu. Das 347 bp lange *KGF*-Promotorkonstrukt entstand aus direktem Verdau des 1,2 kb Konstrukts und konnte so direkt in den pGL4.10 (luc2)-Vektor kloniert werden.

3.1.3.2 Ergebnisse der Luciferase-Assays

Zur Messung der Promotoraktivität der unterschiedlichen *KGF*-Promotorkonstrukte wurden nach Transfektion der Fibroblasten Luciferase-Assays, wie in Punkt 5.2.4 beschrieben, durchgeführt. Zur Identifikation der regulatorisch bedeutsamen *KGF*-Promotorsequenz wurden zunächst folgende Promotorkonstrukte im Luciferase-Assay getestet und deren Aktivitäten in gesunden und mit der Krankheit assoziierten Fibroblasten vergleichend gegenübergestellt. Mit dem 3 kb *KGF*-Promotorkonstrukt wurde der gesamte *KGF*-Promotorbereich erfasst, das 1,2 kb und das 2 kb *KGF*-Promotorkonstrukt dienten einer ersten Eingrenzung des regulatorisch wichtigen Bereichs. Das 2 kb *KGF*-Promotorkonstrukt wurde so gewählt, dass es das identifizierte stark konservierte Transkriptionsfaktorbindestellen-Cluster nicht enthielt. Der genannte Bereich zeigte, wie erwartet, eine sehr geringe Aktivität, die sogar unterhalb der Aktivität der Leervektor-Kontrolle lag. Wir beobachteten außerdem eine differentielle Aktivität des 1,2 kb sowie 3 kb Stücks in gesunden und mit der Krankheit assoziierten Fibroblasten. Sowohl das 1,2 kb als auch das 3 kb *KGF*-

Promotorkonstrukt zeigte in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten eine signifikant erhöhte Promotoraktivität im Vergleich zur Aktivität in gesunden Fibroblasten (siehe Abbildung 18).



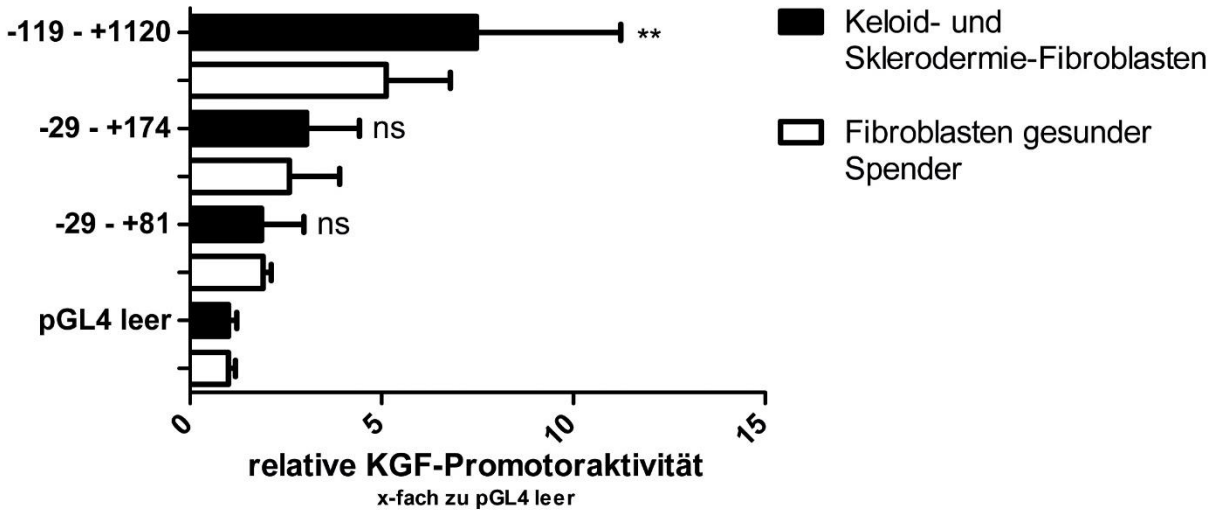
3 kb (Keloid-und Sklerodermie-Fibroblasten)	KF: n=3, ZF: n=2, SF: n=3
3 kb (Fibroblasten gesunder Spender)	NF: n=7
2 kb (Keloid-und Sklerodermie-Fibroblasten)	KF: n=2, SF: n=1
2 kb (Fibroblasten gesunder Spender)	NF: n=6
1,2 kb (Keloid-und Sklerodermie-Fibroblasten)	KF: n=4, ZF: n=3, SF: n=3
1,2 kb (Fibroblasten gesunder Spender)	NF: n=13

Abbildung 18 Die Promotoraktivität des 1,2 kb, 2 kb und 3 kb *KGF*-Promotorkonstrukts wurde mittels Luciferase-Assay (stets Testung im Doppelwell) bestimmt und ist in Bezug auf den pGL4-Leervektor (=1) dargestellt. Der ermittelte Wert wird als relative Promotoraktivität bezeichnet. Aus n Wiederholungen des Luciferase-Assays (siehe Tabelle) wurde für jedes Konstrukt der Mittelwert + Standardabweichung berechnet. Dargestellt ist die relative *KGF*-Promotoraktivität der einzelnen Konstrukte in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten im Vergleich zu Fibroblasten gesunder Spender. Das 2 kb *KGF*-Promotorkonstrukt zeigte sowohl in Fibroblasten gesunder Spender als auch in mit der Krankheit assoziierten Fibroblasten eine äußerst geringe Aktivität. Für das 1,2 kb und 3 kb *KGF*-Promotorkonstrukt konnte eine signifikant erhöhte Promotoraktivität in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten im Vergleich zur Aktivität in gesunden Fibroblasten festgestellt werden.

Wie aus Abbildung 15 hervorgeht, musste für die Auswahl eines Konstrukts ohne Cluster, wie wir es im Falle des 2 kb *KGF*-Promotorkonstrukts beabsichtigten, auf den putativen Transkriptionsstart verzichtet werden. Die geringe Aktivität des 2 kb *KGF*-Promotorplasmids kann auch auf das Fehlen des Transkriptionsstarts zurückzuführen sein. Eine Aussage über die Bedeutung des Clusters konnte hier noch nicht erfolgen.

Das 1,2 kb Konstrukt war in den unterschiedlichen Zelltypen ebenso aktiv wie das 3 kb *KGF*-Promotorkonstrukt. Daraus folgerten wir, dass sich der regulatorisch bedeutsame Abschnitt innerhalb dieser Sequenz befindet.

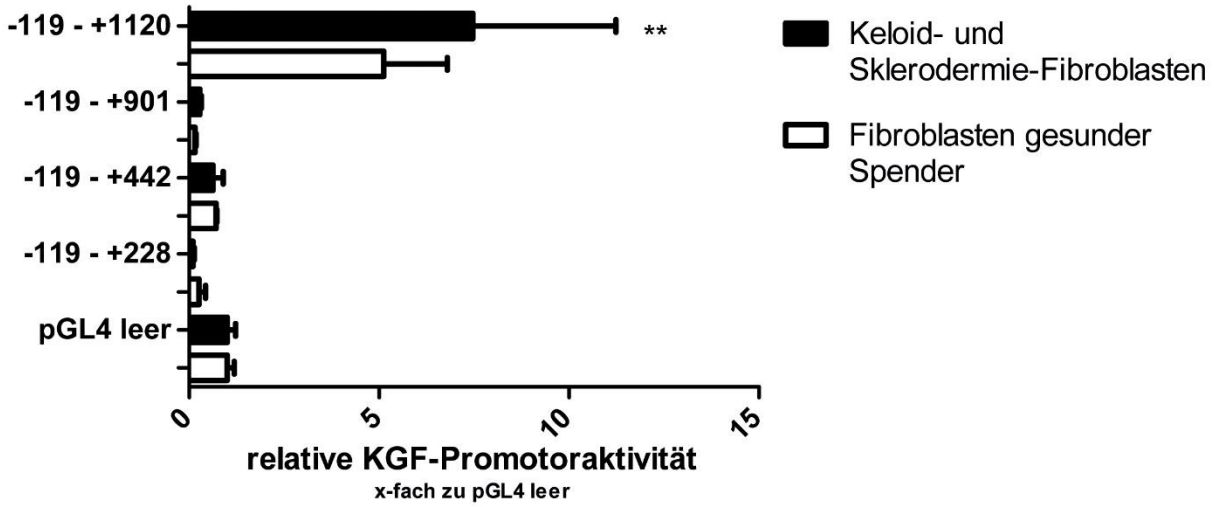
Um die potentielle Bedeutung des TF-Bindestellen-Clusters für die KGF-Expression zu bestimmen, wurden zwei weitere Konstrukte erzeugt und im Luciferase-Assay getestet. Das eine enthielt einen 203 bp langen *KGF*-Promotorbereich, der genau dem Cluster entspricht, während das zweite 110 bp *KGF*-Promotorkonstrukt zur weiteren Eingrenzung bei der Identifikation der bedeutsamen Transkriptionsfaktorbindestellen diente. Wie aus Abbildung 19 hervorgeht, waren beide Konstrukte im Luciferase-Assay aktiv. In der vergleichenden Darstellung mit dem 1,2 kb Stück wird jedoch deutlich, dass das Cluster eine um ca. 60 % geringere Aktivität als die des 1,2 kb Bereichs aufweist und somit nicht hauptverantwortlich für die Transkription des *KGF*-Gens ist. Zudem konnten wir keine signifikanten Unterschiede in der Promotoraktivität des Clusters zwischen gesunden und mit der Krankheit assoziierten Fibroblasten feststellen, wodurch wir zusätzlich eine Fehlregulation von Transkriptionsfaktoren innerhalb dieses Bereiches ausschließen konnten.



1,2 (Keloid-und Sklerodermie-Fibroblasten)	KF: n=4, ZF: n=3, SF: n=3
1,2 kb (Fibroblasten gesunder Spender)	NF: n=13
203 bp (Keloid-und Sklerodermie-Fibroblasten)	KF: n=1, ZF: n=1, SF: n=1
203 bp (Fibroblasten gesunder Spender)	NF: n=3
110 bp (Keloid-und Sklerodermie-Fibroblasten)	KF: n=1, ZF: n=1, SF: n=1
110 bp (Fibroblasten gesunder Spender)	NF: n=3

Abbildung 19 Die Promotoraktivität des 110 bp und 203 bp *KGF*-Promotorkonstrukts wurde mittels Luciferase- Assay bestimmt. Die Luciferase-Werte der Konstrukte wurden stets im Doppelwell bestimmt und auf den pGL4-Leervektor normalisiert (= relative Promotoraktivität). Aus n Wiederholungen des Luciferase-Assays (siehe Tabelle) wurde für jedes Konstrukt der Mittelwert +Standardabweichung berechnet. Dargestellt ist die relative Promotoraktivität des 203 bp und 110 bp *KGF*-Promotorkonstrukts im Vergleich zu dem 1,2 kb *KGF*-Promotorplasmid in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten sowie in Fibroblasten gesunder Spender. Sowohl das 203 bp als auch das 110 bp *KGF*-Promotorkonstrukt waren in gesunden und kranken Fibroblasten aktiv. Im Vergleich zu dem 1,2 kb *KGF*-Promotorkonstrukt aber zeigt das Cluster eine um ca. 60% geringere Aktivität. Eine Gegenüberstellung der beiden Konstrukte (203 bp und 110 bp) in gesunden und kranken Fibroblasten ergab keine signifikanten Unterschiede.

Daraufhin wurde der 1,2 kb lange Bereich in 200-300 bp Schritten verkürzt und die Konstrukte mit *KGF*-Promotorabschnitten der Länge 347 bp, 561 bp und 1021 bp im Luciferase-Assay getestet. Hier wurden sowohl in gesunden als auch in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten äußerst geringe Aktivitäten für alle neu generierten *KGF*-Promotorkonstrukte beobachtet (siehe Abbildung 20).



1,2 kb (Keloid-und Sklerodermie-Fibroblasten)	KF: n=4, ZF: n=3, SF: n=3
1,2 kb (Fibroblasten gesunder Spender)	NF: n=13
347 bp (Keloid-und Sklerodermie-Fibroblasten)	SF: n=1
347 bp (Fibroblasten gesunder Spender)	NF: n=2
561 bp (Keloid-und Sklerodermie-Fibroblasten)	SF: n=1
561 bp (Fibroblasten gesunder Spender)	NF: n=1
1021 bp (Keloid-und Sklerodermie-Fibroblasten)	SF: n=1
1021 bp (Fibroblasten gesunder Spender)	NF: n=1

Abbildung 20 Die Promotoraktivität der *KGF*-Promotorbereiche der Länge 347 bp, 561 bp und 1021 bp wurde mittels Luciferase-Assay bestimmt. Die Aktivität der Konstrukte wurden stets im Doppelwell bestimmt und auf den pGL4-Leervektor normalisiert (= relative Promotoraktivität). Aus n Wiederholungen des Luciferase-Assays (siehe Tabelle) wurde für jedes Konstrukt der Mittelwert + Standardabweichung berechnet. Dargestellt ist die relative Promotoraktivität des 347 bp, 561 bp und 1021 bp *KGF*-Promotorkonstrukts im Vergleich zu dem 1,2 kb *KGF*-Promotorplasmid in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten sowie in Fibroblasten gesunder Spender. Die durch die Verkürzung des 1,2 kb *KGF*-Promotorbereichs entstandenen Konstrukte (347 bp, 561 bp und 1021 bp) zeigten eine äußerst geringe Aktivität in gesunden und mit der Erkrankung assoziierter Fibroblasten.

Aus diesen Ergebnissen folgerten wir, dass sich der regulatorisch bedeutsame Bereich des *KGF*-Promotors zwischen +901 bp und +1120 bp befindet und innerhalb dieses Abschnitts auch Bindestellen für Transkriptionsfaktoren vorhanden sind, die die differentielle Promotoraktivität in gesunden und mit der Krankheit assoziierter Fibroblasten vermitteln. Die von uns identifizierte 220 bp lange Sequenz liegt bereits im 5 `-UTR der KGF-mRNA.

3.1.4 Zusammenfassung der Reportergenanalysen

Die in den Vorversuchen zur Promotoraktivität beobachtete differentielle Aktivität einzelner *KGF*-Promotorbereiche in mit der Krankheit assoziierten und gesunden Fibroblasten konnte in den durchgeführten Experimenten bestätigt werden. Hierbei zeigten Fibroblasten von Keloid, zirkumskripter bzw. systemischer Sklerodermie-

Patienten eine um ca. 1,5 fach höhere *KGF*-Promotoraktivität des 1,2 kb bzw. des 3 kb Konstrukts als Fibroblasten gesunder Spender. Durch die erfolgreiche Klonierung mehrerer unterschiedlich langer *KGF*-Promotorkonstrukte konnte eine 220 bp lange Sequenz identifiziert werden, die für die Expression von KGF in Fibroblasten gesunder Spender entscheidend und zudem in mit der Krankheit assoziierter Fibroblasten für die Überexpression von KGF verantwortlich ist.

3.2 Einfluss der microRNA-155 auf die KGF-Expression

Parallel zu den Promotoranalysen wurde eine mögliche Regulation von KGF über die microRNA-155 erforscht. Pottier und Kollegen beschreiben den 3´UTR der KGF-mRNA als Angriffspunkt der microRNA-155 in Lungenfibroblasten. Sie konnten mittels Luciferase-Assays zeigen, dass die Transfektion von Fibroblasten mit der miR-155 zu einer Verringerung der KGF-mRNA führt (Pottier et al., 2009). Vor diesem Hintergrund untersuchten wir die miR-155-Expression in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten. Wir spekulierten, dass die Überexpression von KGF in Keloiden und Sklerodermie durch eine verminderte Expression der microRNA-155 induziert wird. Es wurde microRNA aus Fibroblasten, wie in Punkt 5.2.5.1 beschrieben, isoliert und die Expression der miR-155 durch Analyse im LightCycler gemessen. Abbildung 21 zeigt die relative miR-155-Expression in Keloid-, zirkumskripter Sklerodermie- und Sklerodermie-Fibroblasten. Sowohl im Falle der zirkumskripten Sklerodermie- als auch in Keloid-Fibroblasten konnte eine signifikante Verringerung der miR-155- Expression festgestellt werden, was unsere Vermutung bestätigte.

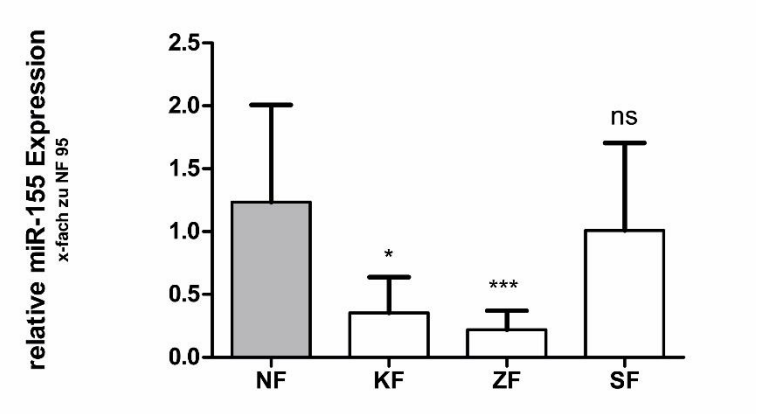


Abbildung 21 Die miR-155-Expression wurde mittels RT-PCR analysiert. Im Vergleich zu normalen Fibroblasten (NF) (n=7) war die miR-155-Expression in Keloid-Fibroblasten (KF) (n=2) und zirkumskripter Sklerodermie-Fibroblasten (ZF) (n=4) signifikant vermindert. Systemische Sklerodermie-Fibroblasten (SF) (n=2) zeigten keine verringerten miR-155-Levels.

Um zu zeigen, dass KGF ein miR-155-Zielgen ist, wurde die KGF-Expression der verschiedenen Fibroblasten mittels quantitativer Realtime PCR gemessen und mit deren miR-155-Expression korreliert. Hier konnten wir keine Korrelation zwischen der KGF-mRNA- und miR-155-Expression feststellen (siehe Abbildung 22)

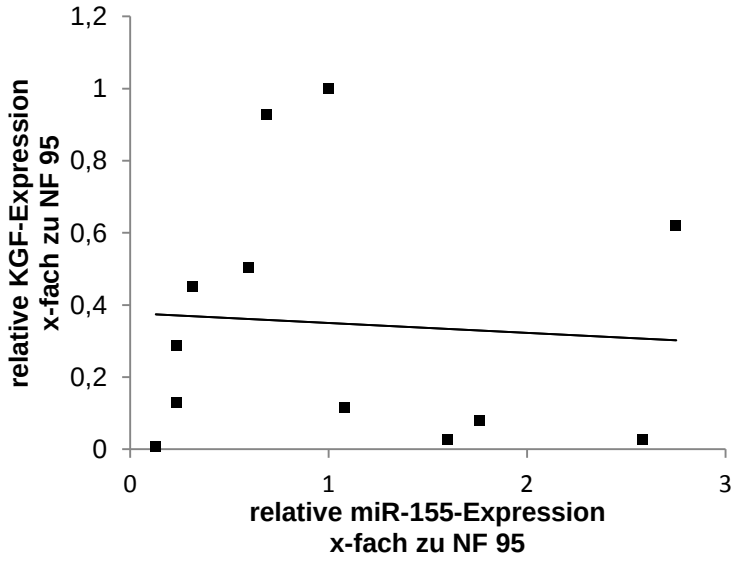


Abbildung 22 Wie auch die miR-155-Expression wurde die KGF-mRNA-Expression gesunder und mit der Krankheit assoziierter Fibroblasten durch RT-PCR-Analyse bestimmt. Um eine mögliche Regulation von KGF durch die miR-155 zu untersuchen, wurde die Expression der KGF-mRNA relativ zur miR-155-Expression aufgetragen. NF: n=6, KF: n=2, ZF: n=2, SF: n=2. Es zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen der KGF-mRNA-Expression (Y-Achse) und der miR-155-Expression (x-Achse) in dermalen Fibroblasten.

Darüber hinaus transfizierten wir Fibroblasten, die eine hohe KGF-Expression aufwiesen, mit der miR-155, Zellen mit geringer KGF-Expression mit der anti-miR-

155. Im Anschluss wurde die Expression der KGF-mRNA durch quantitative Real-time PCR bestimmt. Die Kontrolle der Transfektionseffizienz erfolgte durch Messung der miR-155 nach microRNA Isolation in getrennten Transfektionsexperimenten. Wie aus Abbildung 23 hervorgeht führte die Transfektion mit der miR-155 zu im Mittel 300-400-fach erhöhten miR-155-Levels. Ein Beweis für die Effizienz der anti-miR Transfektionen konnte aufgrund fehlender Primer nicht erfolgen.

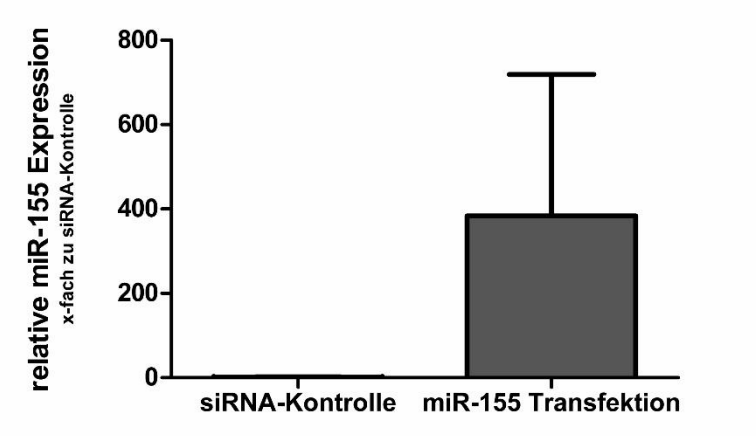


Abbildung 23 Die Kontrolle der Transfektionseffizienz erfolgte in zwei unabhängigen Versuchen (n=2). Es zeigte sich eine um im Mittel 400-fach erhöhte miR-155-Expression in den mit der miR-155 transfizierten Fibroblasten im Vergleich zu Fibroblasten, die mit einer siRNA-Kontrolle transfiziert wurden. Eine Kontrolle der anti-miR-155 Transfektion konnte aufgrund fehlender Primer nicht durchgeführt werden.

Wir beobachteten, dass die KGF-mRNA-Expression dermaler Fibroblasten weder durch die Transfektion der Zellen mit der miR-155 noch durch die Behandlung mit der anti-miR-155 im Vergleich zu einer siRNA-Kontrolle verändert war (siehe Abbildung 24). Es konnte damit gezeigt werden, dass KGF in Fibroblasten der Dermis kein Zielgen der miR-155 darstellt.

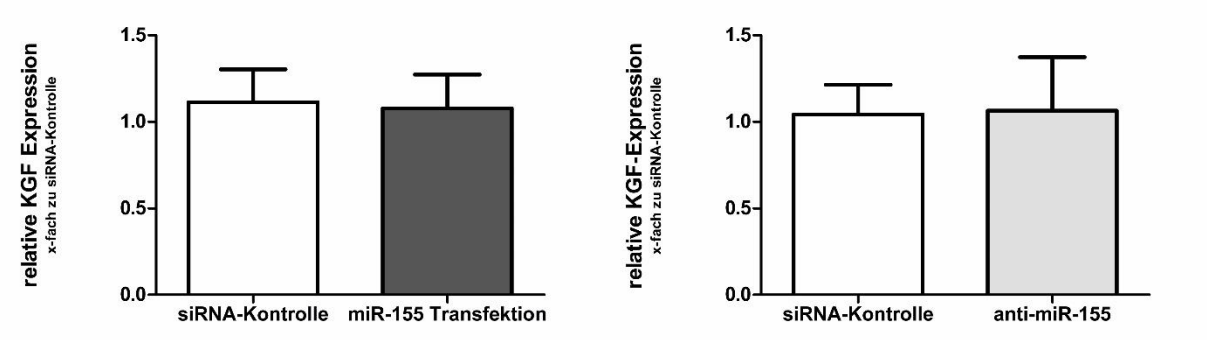


Abbildung 24 Die KGF-mRNA-Expression wurde nach Transfektion mit der miR-155 (n=2) bzw. anti-miR-155 (n=4) durch RT-PCR-Analyse untersucht. Sowohl im Falle der miR-155 Transfektion als auch für die anti-miR-155 Behandlung ist kein Unterschied der KGF-mRNA-Expression in Fibroblasten im Vergleich zu einer siRNA-Kontrolle feststellbar. Daraus folgern wir, dass KGF in dermalen Fibroblasten kein Zielgen der miR-155 darstellt.

3.3 MicroRNA-Analysen

Wie bereits für Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten in der Literatur beschrieben, sahen auch wir eine differentielle Expression einer microRNA (miR-155) in mit den Erkrankungen assoziierten Fibroblasten im Vergleich zu Fibroblasten gesunder Spender. In einem von der KGF-Überexpressionsanalyse abgekoppelten Teilprojekt untersuchten wir deshalb die Expression zusätzlicher microRNAs in Fibroblasten und Gewebeschnitten der Haut, um die Rolle von microRNAs in fibrosierenden Erkrankungen weiter zu verfolgen. Außerdem wollten wir eine mögliche Regulation anderer Zielgene durch die miR-155 untersuchen.

3.3.1 Regulation anderer Gene durch die microRNA-155

Da sowohl in zirkumskripter Sklerodermie- als auch in Keloid-Fibroblasten signifikant verminderte miR-155-Levels gemessen wurden, stellte sich die Frage, ob die Expression anderer Gene durch diese microRNA beeinflusst wird. In der Datenbank mirWALK der Universität Heidelberg finden sich Vorhersagen über mögliche microRNA Zielgene. Die cDNA Proben der in Punkt 3.2 beschriebenen Transfektionen wurden daraufhin auf weitere potentielle Zielgene der miR-155 untersucht. Hierbei wählten wir Gene, die eine mögliche Rolle in der Pathogenese fibrosierender Erkrankungen spielen könnten. Zu diesen gehören: Dicer, BMP-6, ß-Catenin, c-Jun und Integrin A_2. Die mRNA-Expression von Dicer, β-Catenin, c-Jun und Integrin A_2 zeigte keine Unterschiede zwischen den transfizierten Zellen und der siRNA-Kontrolle (siehe Abbildung 25). Daraus folgern wir, dass diese Gene in dermalen Fibroblasten nicht durch die miR-155 reguliert sind.

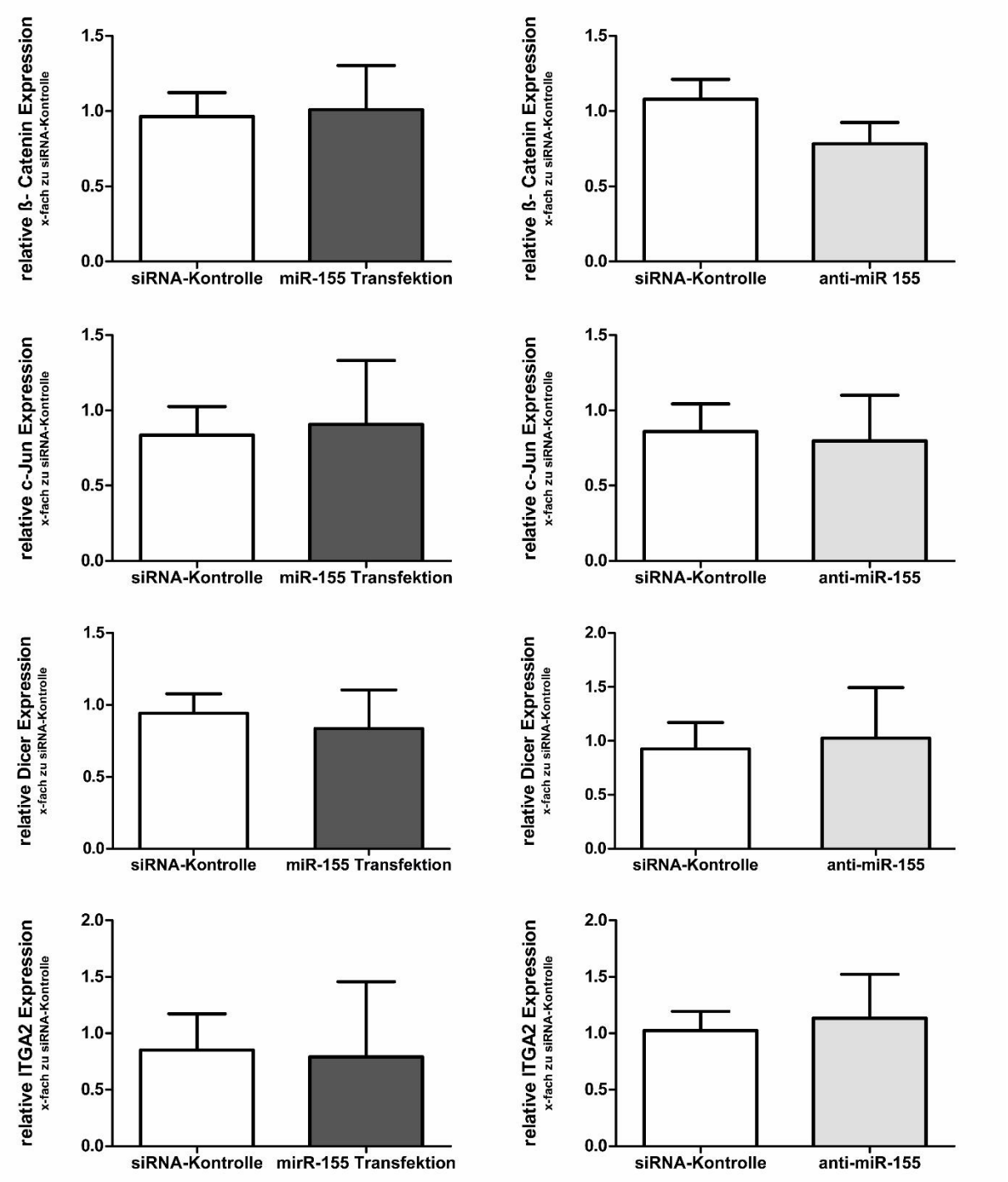


Abbildung 25 In den mit der miR-155 (n=2) bzw. anti-miR-155 (n=4) transfizierten Fibroblasten wurden weitere Zielgene der miR-155 untersucht. Diese wurden anhand der Heidelberger mirWALK-Datenbank ausgewählt. Hierbei handelt es sich um Dicer, ß-Catenin, c-Jun und Integrin A2. Die mRNA-Expression dieser Gene wurde wiederum mittels RT-PCR-Analyse bestimmt. Die mRNA-Expression der ausgewählten Gene zeigte keine Unterschiede zwischen den mit der miR-155 bzw. anti-miR-155 transfizierten Fibroblasten und der siRNA-Kontrollgruppe. Eine Regulation dieser Gene durch die miR-155 in dermalen Fibroblasten konnte daher ausgeschlossen werden.

Wie Abbildung 26 zeigt, konnten wir jedoch in mit der anti-miR-155 transfizierten Fibroblasten einen signifikanten Anstieg der BMP-6 mRNA-Expression beobachten.

Die mit der miR-155 behandelten Zellen wiesen aber keine, wie erwartet, verminderten BMP-6 Levels im Vergleich zur siRNA-Kontrolle auf.

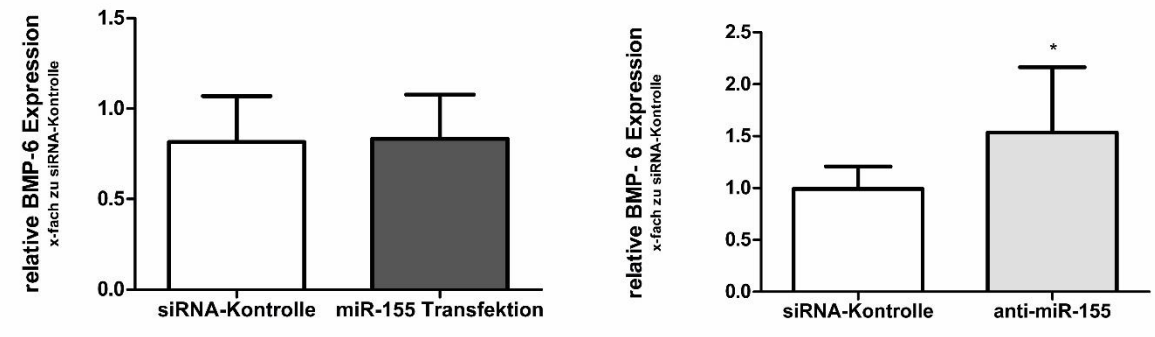


Abbildung 26 Die BMP-6-Expression war in mit anti-miR-155 behandelten Fibroblasten signifikant erhöht. Fibroblasten, die mit miR-155 transfiziert wurden, zeigten jedoch keine Unterschiede im Vergleich zur siRNA-Kontrollgruppe.

Um eine denkbare Regulation von BMP-6 durch die miR-155 weiterzuverfolgen, führten wir wiederum eine Korrelationsanalyse durch. Hier zeigte sich keine Korrelation zwischen der BMP-6-Expression und der miR-155-Expression in dermalen Fibroblasten, so dass wir dadurch eine Regulation von BMP-6 durch die miR-155 ausschließen konnten (siehe Abbildung 27)

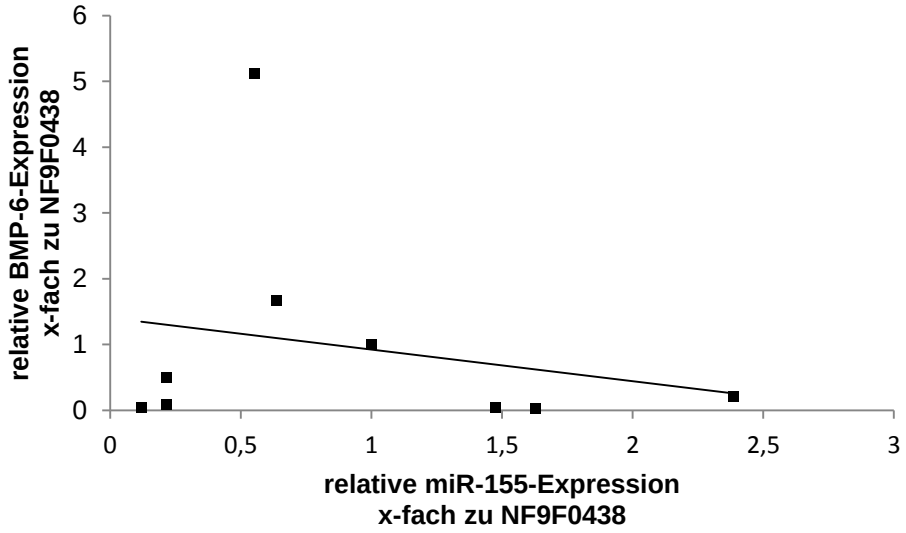


Abbildung 27 Es zeigte sich keine Korrelation zwischen der BMP-6-Expression (Y-Achse) und der miR-155-Expression (x-Achse). NF: n=3, KF: n=2, ZF: n=2, SF: n=2. Daraus folgern wir, dass BMP-6 nicht durch die miR-155 in dermalen Fibroblasten reguliert ist.

3.3.2 MicroRNA-155-Expression in formalin-fixiertem Parrafingewebe keloidaler und sklerodermaler Läsionen

Um die verminderte Expression der miR-155 *in vivo* zu bestätigen, wurde microRNA aus formalin-fixiertem Parrafingewebe extrahiert und auf die miR-155-Expression getestet. Wie Abbildung 28 zeigt, weichen die Messungen von den *in vitro* Ergebnissen ab. Es ist keine verminderte Expression der miR-155 in Hautproben von Keloid- und Sklerodermie-Patienten im Vergleich zu Hautschnitten gesunder Patienten zu beobachten.

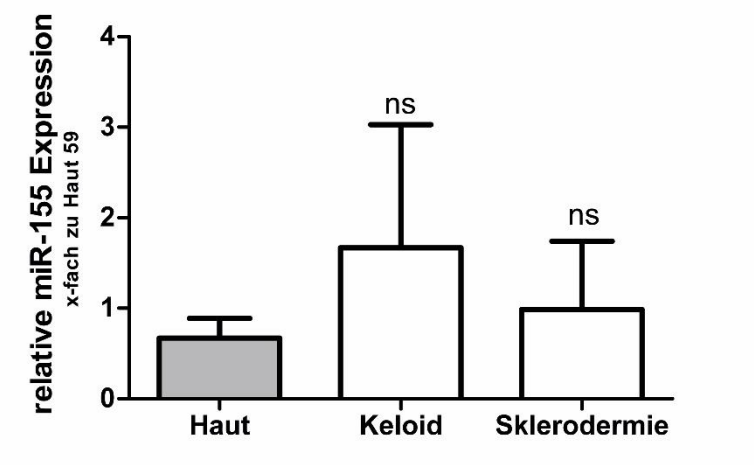


Abbildung 28 Die miR-155-Expression in FFPE-Gewebe von Keloid (n=5)- und Sklerodermie-Patienten (n=2) im Vergleich zu gesunden Spendern (n=3) zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassend ist zu sagen: Die Untersuchung von fünf möglichen miR-155 Zielgenen ergab keine Anhaltspunkte für eine Regulation der Gene durch die miR-155. Die beobachtete verminderte miR-155-Expression in mit der Krankheit assoziierter Fibroblasten konnte *in vivo* konnte nicht bestätigt werden.

3.3.3 Analyse der microRNA-21

Die zuvor weitgehend als „OnkomiR“ bekannte microRNA-21 wurde erstmalig im Kontext der Muskeldystrophie als regulatorisch im Bereich der fibrosierenden Erkrankungen erwähnt. Ardite und Kollegen beschreiben eine miR-21-Überexpression in Muskeldystrophie-Mausmodellen sowie in Muskelbiopsien von betroffenen Patienten, die mit einer erhöhten Kollagenproduktion und verstärkter Fibrose verbunden ist. Sie konnten außerdem folgenden Signalweg identifizieren: Ein Verlust des uPA regulierenden PAI-I führt zu erhöhten upA-Levels und zu einer konsekutiv verstärkten TGF-β_1 Aktivierung. TGF-β_1 induziert die miR-21-Expression

und eine damit verbundene verstärkte Kollagenproduktion (Ardite et al., 2012). Da TGF-β $_1$ in Keloid, zirkumskripter Sklerodermie und Sklerodermie ebenfalls als profibrotisches Zytokin bekannt ist, wurde die miR-21-Expression in Fibroblasten und Gewebeproben der Haut untersucht. Wie aus Abbildung 29 hervorgeht, konnten keine signifikanten Unterschiede in der miR-21-Expression im Vergleich gesunder zu mit der Krankheit assoziierter Fibroblasten festgestellt werden.

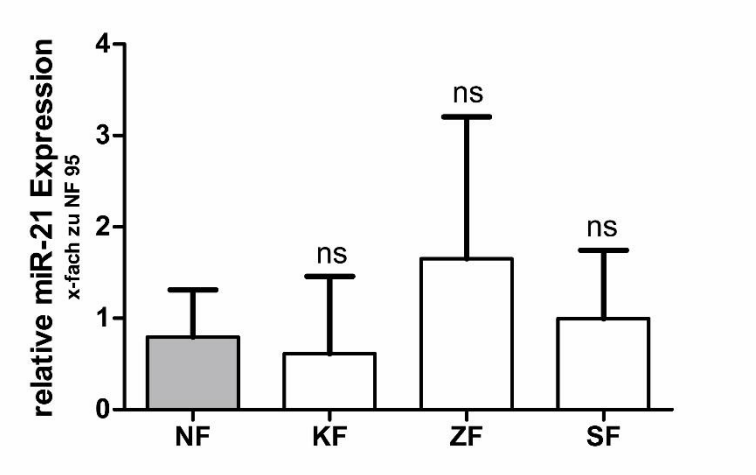


Abbildung 29 Die miR-21-Expression wurde mittels RT-PCR analysiert. Im Vergleich zu normalen Fibroblasten (NF) (n=6) konnten für die miR-21-Expression in Keloid-Fibroblasten (KF) (n=2), zirkumskripter Sklerodermie-Fibroblasten (ZF) (n=4) und systemische Sklerodermie-Fibroblasten (SF)(n=2) keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Wir untersuchten außerdem die mRNA-Expression weiterer Gene, die in dem von Ardite und Kollegen beschriebenen Signalweg aufgeführt wurden. Darunter TGF-β $_1$ und PAI-I. Hier zeigten sich weder für TGF-β $_1$ noch für PAI-I signifikant unterschiedliche Expressionslevels in mit der Krankheit assoziierten und gesunden Fibroblasten (siehe Abbildung 30).

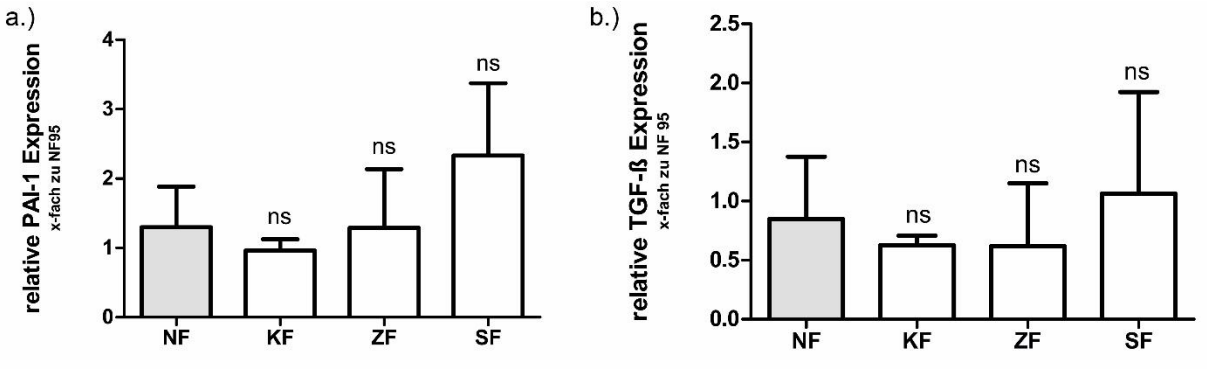


Abbildung 30 a.) Die PAI-I-Expression in normalen Fibroblasten (NF) (n=6) und Fibroblasten von Keloid (KF) (n=2)- und Sklerodermie- Patienten (ZF) (n=2), (SF) (n=2) wurde mit Hilfe der RT-PCR gemessen. Es konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede von mit der Krankheit assoziierten Fibroblasten im Vergleich zu Fibroblasten gesunder Spender festgestellt werden. b.) Die TGF-ß $_1$-Expression von gesunden Fibroblasten NF (n=6) im Vergleich zu mit der Krankheit assoziierten Fibroblasten KF (n=2), ZF (n=2), SF (n=2) ergab ebenso keine signifikanten Unterschiede.

Wie Abbildung 31 zeigt, konnten in der Untersuchung von FFPE-Gewebe interessanterweise signifikant höhere miR-21-Expressionslevels in Keloid- und Sklerodermie-Gewebe im Vergleich zu gesunden Hautproben festgestellt werden.

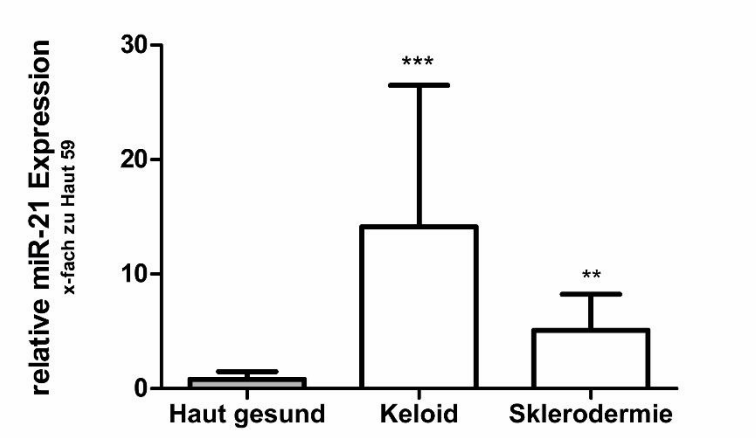


Abbildung 31 Die miR-21-Expression in FFPE-Gewebe von Keloid (n=5) - und Sklerodermie-Patienten (n=2) im Vergleich zu Hautproben gesunder Spender (n=3) war signifikant erhöht.

3.3.4 Analyse der microRNA-125b

Mit der Analyse der miR-125b-Expression in Fibroblasten wurde eine microRNA gewählt, die bis zu diesem Zeitpunkt im Bereich der fibrosierenden Erkrankungen nicht erwähnt wurde. Hier zeigte sich eine signifikante Überexpression der miR-125b in zirkumskripter Sklerodermie-Fibroblasten. Eine Tendenz zu erhöhten miR-125b-Levels konnte auch in Fibroblasten von systemischer Sklerodermie-Patienten

festgestellt werden. Keloid-Fibroblasten wiesen keine signifikanten Expressionsunterschiede zu normalen Fibroblasten auf (siehe Abbildung 32).

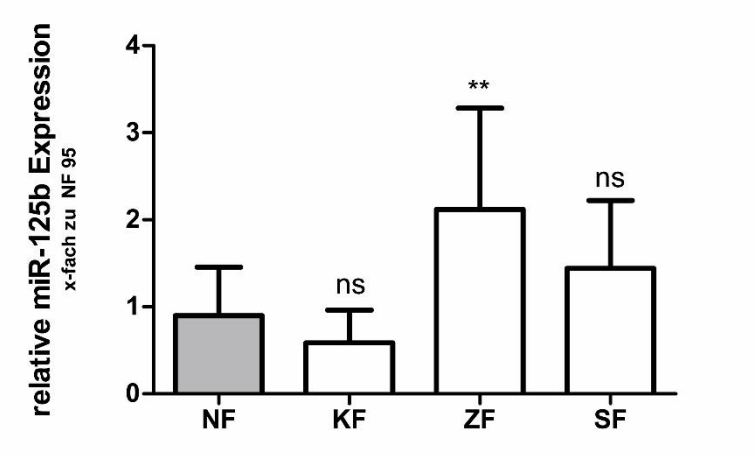


Abbildung 32 Die miR-125b-Expression wurde mittels RT-PCR analysiert. Im Vergleich zu normalen Fibroblasten (NF) (n=6) war die miR-125b-Expression in zirkumskripter Sklerodermie-Fibroblasten (ZF) (n=4) signifikant erhöht. Fibroblasten von systemischer Sklerodermie-Patienten (SF) (n=2) zeigten eine Tendenz zu erhöhten miR-125b-Levels. Für Keloid-Fibroblasten (KF) (n=2) konnten keine Expressionsunterschiede im Vergleich zu Fibroblasten gesunder Spender festgestellt werden.

Die miR-125b-Expressionsanalyse in Gewebeschnitten zeigte signifikant erhöhte Levels in Keloid-Gewebe im Vergleich zu gesunden Hautproben. Für sklerodermale Läsionen beobachteten wir ebenfalls eine tendenzielle Überexpression der miR-125b verglichen mit gesunder Haut (siehe Abbildung 33).

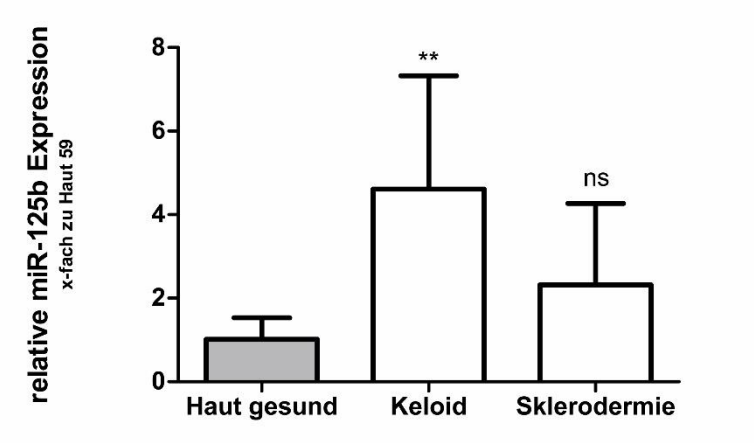


Abbildung 33 Die miR-125b-Expression in FFPE-Gewebe von Keloid (n=5)-Patienten verglichen mit der Expression in Hautproben gesunder Spender (n=3) war signifikant erhöht. Sklerodermale Läsionen (n=2) zeigten ebenfalls eine tendenzielle Überexpression im Vergleich zu gesunden Hautproben.

Kappelmann und Kollegen beschrieben eine Regulation der c-Jun-Protein-Expression durch die miR-125b (Kappelmann et al., 2013). Es wurde eine verstärkte

Expression der miR-125b in zirkumskripter Sklerodermie-Fibroblasten festgestellt. Keloidale Läsionen wiesen eine erhöhte miR-125b-Expression im Vergleich zu gesunden Hautproben auf und auch in sklerodermalen Läsionen konnte eine Tendenz zu einer Überexpression festgestellt werden. Deshalb untersuchten wir zunächst die c-Jun-mRNA-Expression in dermalen Fibroblasten gesunder und mit der Krankheit assoziierter Fibroblasten. Wie Abbildung 34 zeigt, fanden sich jedoch keine signifikanten Expressionsunterschiede der c-Jun-mRNA in mit der Krankheit assoziierter Fibroblasten im Vergleich zu Fibroblasten gesunder Spender.

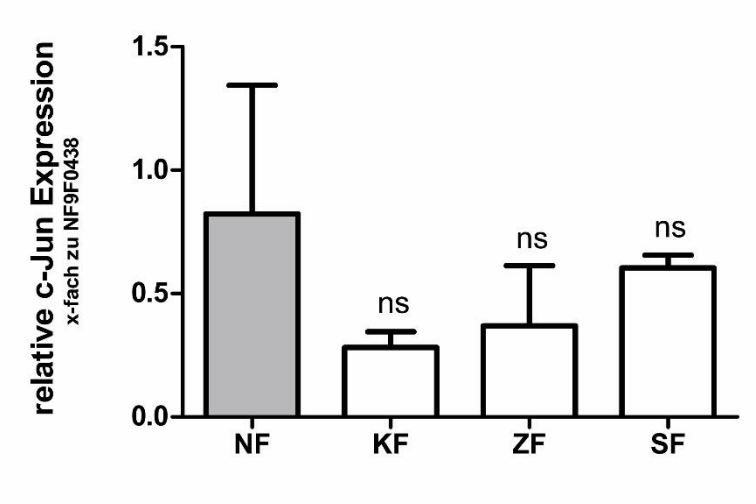


Abbildung 34 Es konnte keine signifikanten Veränderungen der c-Jun-mRNA-Expression in mit der Krankheit assoziierter Fibroblasten (KF: n=2, ZF: n= 2, SF: n= 2) im Vergleich zu gesunden Fibroblasten NF(n=6) festgestellt werden.

3.3.5 Analyse der microRNA-196a

Die Entscheidung, miR-196a-Expressionsanalysen durchzuführen, fiel wiederum durch Hinweise aus der Literatur. Honda und Kollegen beschrieben bereits die verminderte Expression der miR-196a in der systemischen Sklerodermie (Honda et al., 2012). Kashiyama und Kollegen stellten verminderte miR 196a-Levels in Keloid-Fibroblasten fest (Kashiyama et al., 2012). Wir führten unsere microRNA-Expressionsanalysen in dermalen Fibroblasten durch, die sich in hoher Passagenanzahl befanden, da auch die KGF-Überexpression über einen langen Zeitraum stabil in der Zellkultur zu beobachten war. Mit der Analyse der miR-196a sollte untersucht werden, ob die Passagenanzahl einen Einfluss auf die microRNA-Expression hat. In systemischer Sklerodermie-Fibroblasten konnte eine signifikante Verminderung der miR-196a im Vergleich zu gesunden Fibroblasten nachgewiesen

werden. Für Keloid- und zirkumskripte Sklerodermie-Fibroblasten konnte eine Tendenz zu einer verminderten Expression festgestellt werden (siehe Abbildung 35).

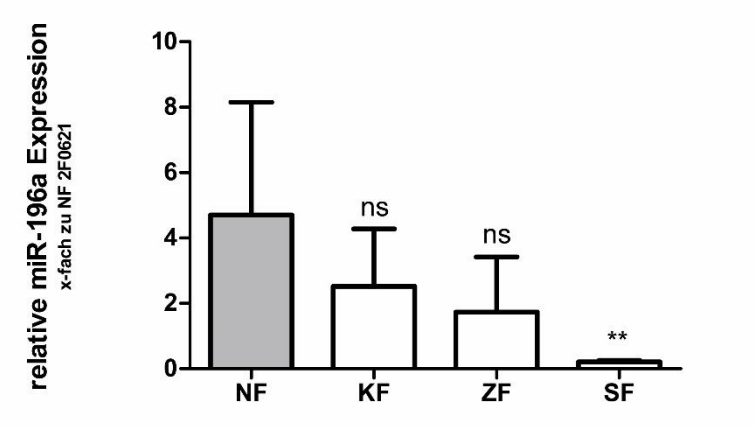


Abbildung 35 Die miR-196a-Expression wurde mittels RT-PCR analysiert. Im Vergleich zu normalen Fibroblasten (NF) (n=3) zeigten Sklerodermie-Fibroblasten (SF)(n=2) eine signifikant verminderte miR-196a-Expression. Keloid (KF)(n=2) - und zirkumskripte Sklerodermie-Fibroblasten(ZF)(n=4) zeigten eine Tendenz zu einer verminderten miR-196a-Expression im Vergleich zu gesunden Fibroblasten.

Die Untersuchung der miR-196a in Gewebeproben wies jedoch keine verminderte Expression der miR-196a in sklerodermalen Läsionen im Vergleich zu gesunden Hautproben auf. Auch keloidale Narben zeigten keine Veränderungen der miR-196a-Expression verglichen mit gesunder Haut (siehe Abbildung 36).

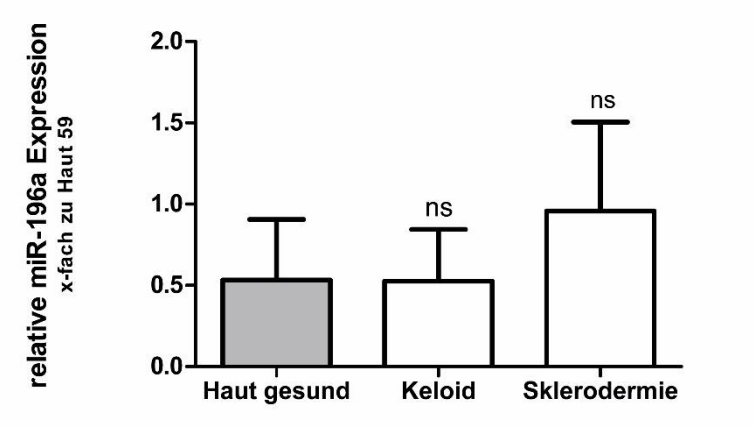


Abbildung 36 Die miR-196a-Expression in FFPE-Gewebe von Keloid-(n=5) und Sklerodermie-(n=2) Patienten wies keine Unterschiede verglichen mit Hautproben gesunder Spender (n=3) auf.

4 Diskussion

4.1 Regulation der Überexpression des Keratinozytenwachsumsfaktors

Fibrosierende Erkrankungen der Haut, wie das Keloid, die zirkumskripte und systemische Sklerodermie, zeichnen sich durch eine vermehrte Synthese extrazellulärer Matrix durch aktivierte Fibroblasten aus. Eine entscheidende Rolle in der Pathogenese fibrosierender Erkrankungen scheinen epithelial-mesenchymale Wechselwirkungen zwischen Keratinozyten der Epidermis und Fibroblasten der Dermis zu spielen, die die pathologische Fibroblastenaktivierung bedingen. Canady und Kollegen konnten in diesem Zusammenhang eine doppelt parakrine Wirkschleife identifizieren, die ihren Ausgangspunkt in der übermäßigen Produktion des Keratinozytenwachstumsfaktors durch Fibroblasten der Dermis findet. KGF stimuliert die Keratinozyten der Epidermis zur Sekretion von Oncostatin M, welches im Gegenzug die Kollagenexpression der Fibroblasten anregt.

Im Rahmen dieser Arbeit galt es herauszufinden, wie die verstärkte Produktion von KGF zu Stande kommt. Wir untersuchten drei denkbare zelluläre Kontrollmechanismen, die die bereits auf mRNA-Ebene erhöhte KGF-Expression in dermalen Fibroblasten erkrankter Personen erklären können.

4.1.1 Fehlender Nachweis von Single-Nukleotid-Polymorphismen innerhalb des *KGF*-Promotors

Zunächst konnten genetisch festgelegte Basenvariationen in Form von Single-Nukleotid-Polymorphismen innerhalb des *KGF*-Promotors durch eine *in silico* Analyse ausgeschlossen werden.

4.1.2 Keine Regulation von KGF durch die microRNA-155 in dermalen Fibroblasten

Außerdem untersuchten wir eine mögliche Regulation des Keratinozytenwachstumsfaktors durch microRNAs. Im Speziellen interessierten wir uns für die microRNA-155, da KGF in Fibroblasten fibrotischen Lungengewebes bereits als Zielgen der microRNA-155 identifiziert werden konnte. Im Jahre 2009 präsentierten Pottier und Kollegen eine funktionelle miR-155 Bindungsstelle im 3´-UTR der KGF mRNA. Zusätzlich zeigten sie, dass die Interleukin-1 induzierte KGF-Expression durch eine Überexpression der miR-155 gemindert wird. Als dritten Punkt

konnten sie in einem Bleomycin-Mausmodell der Lungenfibrose erhöhte miR-155-Levels nachweisen, die mit dem Ausmaß der Fibrose korrelierten (Pottier et al., 2009). Diese Beobachtung kann man sich dadurch erklären, dass KGF anders als in der Haut in der Lunge eher antifibrotische Effekte zugeschrieben werden (Sakamoto et al., 2011). Eine erhöhte miR-155-Expression resultiert somit in erniedrigten KGF-Levels, die schließlich zur verstärkten Fibroseentwicklung in der Lunge führen.

Aufgrund dieser Beobachtungen in der Lunge spekulierten wir, dass die beobachtete Überexpression von KGF in Sklerodermie- und Keloid-Fibroblasten auf verminderte miR-155-Levels zurückzuführen sei. Wie erwartet fand sich auch eine signifikant verringerte miR-155-Expression in Keloid- und zirkumskripter Sklerodermie-Fibroblasten. Hinweise auf eine Regulation des Keratinozyten-wachstumsfaktors durch die miR-155 in dermalen Fibroblasten ergaben sich jedoch in weiterführenden Untersuchungen nicht. Die Behandlung der Fibroblasten mit miR-155 bzw. anti-mir-155 hatte keinerlei signifikante Auswirkung auf die KGF-Expression. Diese Ergebnisse ließen die Schlussfolgerung zu, dass es in der Haut noch andere Regulationsmechanismen für die KGF-Expression geben musste. Auch die gegensätzliche Wirkungsweise von KGF in der Pathogenese der dermalen und pulmonalen Fibrose unterstreicht, dass KGF in unterschiedlichen Geweben wohl auf unterschiedliche Weise reguliert wird.

4.1.3 Fehlregulation von Transkriptionsfaktoren als Ursache der KGF-Überexpression

Daher galt es in weiterführenden Untersuchungen, den Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die KGF-Expression näher zu beleuchten. Voruntersuchungen des *KGF*-Promotors in gesunden und mit der Krankheit assoziierten Fibroblasten ließen uns vermuten, dass die verstärkte KGF-Expression durch eine Fehlregulation von Transkriptionsfaktoren verursacht wird.

4.1.3.1 Identifizierung einer regulatorisch bedeutsamen 220 bp langen *KGF*-Promotorsequenz

Auf der Suche nach den bedeutenden regulatorischen Elementen innerhalb des *KGF*-Promotors erzeugten wir *KGF*-Promotorkonstrukte unterschiedlicher Länge und testeten deren Aktivität in Luciferase-Assays. Hier waren die Konstrukte der Länge 3 kb und 1,2 kb sowohl in gesunden als auch mit der Krankheit assoziierten

Fibroblasten am stärksten aktiv. Außerdem stellten wir fest, dass die Promotoraktivität der Konstrukte in Fibroblasten erkrankter Personen im Vergleich zu gesunden Fibroblasten signifikant erhöht war, was unsere Hypothese einer Fehlregulation von Transkriptionsfaktoren in der Erkrankung bestätigte. Da das 1,2 kb -Konstrukt in beiden Zelltypen die höchste Luciferaseaktivität zeigte, konnten wir den für die Transkription des *KGF*-Gens relevanten Bereich zunächst auf diese 1,2 kb lange Sequenz eingrenzen. Die signifikant erhöhte Promotoraktivität des 1,2 kb *KGF*-Promotorkonstrukts in Fibroblasten erkrankter Personen ließ uns ebenso folgern, dass sich in diesem Bereich regulatorische Elemente befinden, die für die differentielle Promotoraktivität verantwortlich sind.

Wir identifizierten innerhalb des 1,2 kb Konstrukts ein hochkonserviertes Transkriptionsfaktorbindestellen-Cluster im Bereich des putativen Transkriptionsstarts, das wir ebenfalls in Reportergenanalysen untersuchten. Dieses Cluster im Bereich -29 bp - +174 bp war sowohl in gesunden als auch in mit der Krankheit assoziierten Fibroblasten aktiv, jedoch erreichte die Promotoraktivität nicht die Stärke des 1,2 kb Konstrukts und es konnten keine Unterschiede zwischen den Zelltypen festgestellt werden. Die gleichen Ergebnisse erzielten wir mit einem etwas kürzeren *KGF*-Promotorkonstrukt von -29 bp - +81bp. Wir vermuten daher, dass es sich bei dem Bereich von -29 bp - +81 bp um den sogenannten Kernpromotor handelt, der eine basale Transkriptionsrate des *KGF*-Gens vermittelt. Dies bestätigen die Ergebnisse von Finch und Kollegen aus dem Jahr 1995, die bei der Untersuchung des *KGF*-Promotors auf relevante regulatorische Elemente eine Sequenz identifizieren konnten, die den von uns beschriebenen Bereich zwischen -29 bp - +81 bp einschließt (Finch et al., 1995). Zusätzlich befinden sich innerhalb des von uns vermuteten Kernpromotors eine TATA-Box (+34 bp - +39 bp), die die Bindung der RNA-Polymerase II an die DNA vermittelt, sowie eine Konsensussequenz des DPE-Elements (+22 bp - +26 bp), das ebenfalls durch Bindung von allgemeinen Transkriptionsfaktoren die Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie steuern kann.

Auf der Suche nach regulatorischen Sequenzen innerhalb des 1,2 kb *KGF*-Promotorkonstrukts, die die Expression von KGF nun entscheidend verstärken, erzeugten wir zusätzliche Konstrukte. Ein 347 bp langes *KGF*-Promotorkonstrukt,

das den Bereich zwischen -29 bp - +81 bp enthielt und gleichzeitig innerhalb der von Finch und Kollegen beschriebenen Sequenz lag, zeigte in unseren Experimenten eine äußerst niedrige Aktivität. Dies steht in klarem Gegensatz zu den von Finch und Kollegen publizierten Daten. Jedoch waren auch weitere Konstrukte der Länge 561 bp und 1020 bp, die ebenfalls den von uns sowie den von Finch und Kollegen beschriebenen Kernpromotorbereich umfassten, wie das 347 bp Konstrukt in Fibroblasten gesunder Spender und mit der Krankheit assoziierten Fibroblasten kaum aktiv. Die geringe Promotoraktivität der drei *KGF*-Promotorkonstrukte der Länge 347 bp, 561 bp und 1020 bp könnte sich dadurch erklären lassen, dass diese zusätzliche Elemente enthalten, die die basale Transkriptionsrate des *KGF*-Gens in dermalen Fibroblasten drosseln. Der Bereich, der die Transkription des *KGF*-Gens entscheidend beeinflusst, konnte durch diese Ergebnisse auf die Sequenz von + 901 bp - +1120 bp eingegrenzt werden (siehe Abbildung 37).

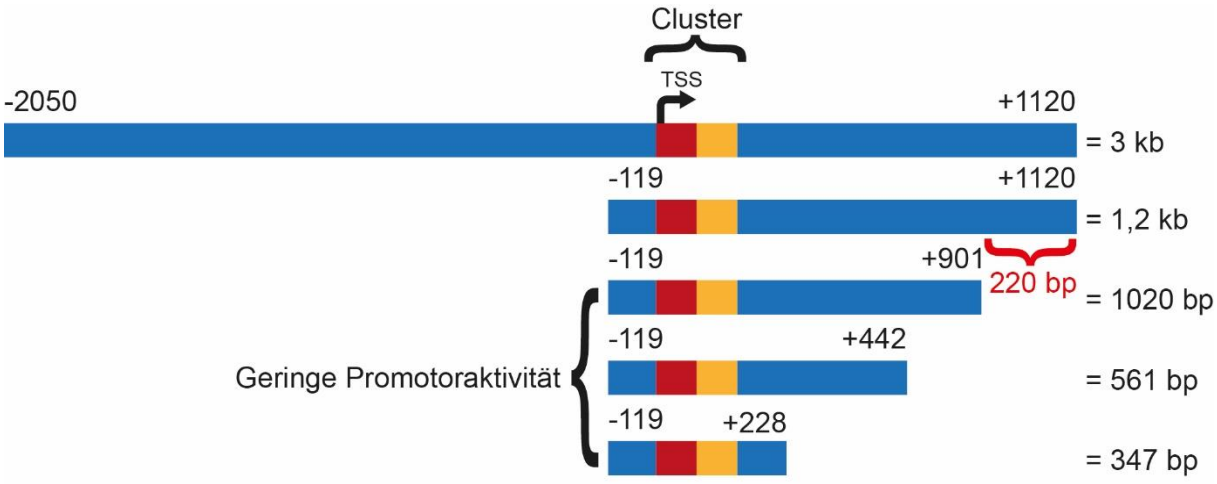


Abbildung 37 Darstellung der *KGF*-Promotorkonstrukte. Die Lokalisation der identifizierten 220 bp langen Sequenz innerhalb des *KGF*-Promotors ist mit rot markiert.

Wir vermuten, dass sich in dieser Region Bindestellen für Aktivatoren befinden, die die Transkription des *KGF*-Gens befördern und zusätzlich in den mit der Krankheit assoziierten Fibroblasten die verstärkte Expression von KGF verursachen. Hierbei ist es möglich, dass es sich innerhalb der unterschiedlichen Zelltypen um ein und denselben Aktivator handelt. Denkbar ist jedoch auch, dass in den mit der Krankheit assoziierten Fibroblasten die verstärkte KGF-Expression durch unterschiedliche *trans*-Elemente verstärkt wird.

Die identifizierte Sequenz befindet sich im 5´-UTR der KGF-mRNA und liegt innerhalb des zweiten Exons. Der 5´-UTR einer mRNA ist der Abschnitt, der zwar transkribiert, jedoch nicht translatiert wird. Es ist bekannt, dass sich regulatorische Sequenzen eines Gens vorwiegend stromaufwärts des sogenannten Kernpromotors befinden. Der 5´-UTR einer mRNA erfüllt vorwiegend Funktionen bei der Kontrolle der Translation eines Gens. Es existieren jedoch auch Gene, deren Transkription durch Aktivatoren-/Silencer-Regionen im Bereich des 5´-UTR gesteuert wird und somit die regulatorische Relevanz des von uns beschriebenen KGF-Promotorelements bekräftigen. So entdeckten Hay und Kollegen ein Androgen-response-Element im 5´-UTR des Androgenrezeptors, das die Transkription des Rezeptors vermindert (Hay et al., 2014). Die $\alpha_2\delta$-Untereinheit des spannungsabhängigen Calcium-Kanals wird durch Bindung des Sp_1-Transkriptionsfaktors im 5´-UTR des $\alpha_2\delta$-Promotors reguliert (Martínez-Hernández et al., 2013). Birben und Kollegen fanden eine 10 bp lange Sequenz im 5´-UTR des AMCase-Genpromotors in an Asthma erkrankten Kindern, die die Transkription des AMCase-Gens auf einen Interleukin-4-Stimulus verstärkte (Birben et al., 2011).

4.1.3.2 Der Transkriptionsfaktor c-Jun als potentieller Regulator der KGF-Überexpression in fibrosierenden Erkrankungen der Haut

Um nun die Bedeutung der identifizierten Sequenz des *KGF*-Promotors zu bestätigen, untersuchten wir diese auf Transkriptionsfaktorbindestellen. Unser vorrangiges Interesse galt stets der Aufdeckung der für die KGF-Überexpression in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten verantwortlichen Vorgänge. Deshalb lag unser Hauptaugenmerk nun auf Transkriptionsfaktoren, die bereits im Kontext der kutanen Fibrose beschrieben sind. Die Analyse der Sequenz mittels der Genomatix-ELDORADO-Software ergab Bindestellen für 40 unterschiedliche Transkriptionsfaktorfamilien, wovon zwei für uns relevant erschienen (siehe Abbildung 38). Sowohl die Rolle der ETS- als auch der AP1R-Transkriptionsfaktorfamilie wird in der Pathogenese fibrosierender Erkrankungen diskutiert (siehe Punkt 1.6.4 und 1.6.5).

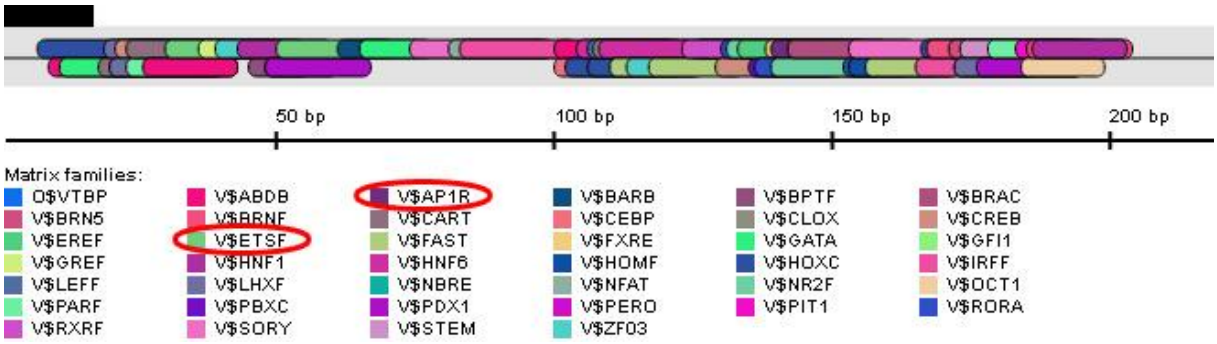


Abbildung 38 Analyse der identifizierten 220 bp langen *KGF*-Promotorsequenz auf Transkriptionsfaktorbindestellen mittels der Genomatix-ELDORADO-Software. Hervorgehoben ist die ETS- sowie AP1R-Transkriptionsfaktorfamilie.

Beide Transkriptionsfaktorfamilien bestehen aus mehr als zwanzig Mitgliedern. Um nun die möglichen Bindungspartner an *cis*-Elementen im Bereich +901 bp - +1120 bp näher aufzuschlüsseln, führten wir eine Analyse der Sequenz auf Bindestellen einzelner Transkriptionsfaktoren mit Hilfe des Promo tools der Webseite http://alggen.lsi.upc.es/ durch. Wie aus Abbildung 39 hervorgeht, fand sich hier interessanterweise eine DNA-Bindestelle für den Transkriptionsfaktor c-Jun.

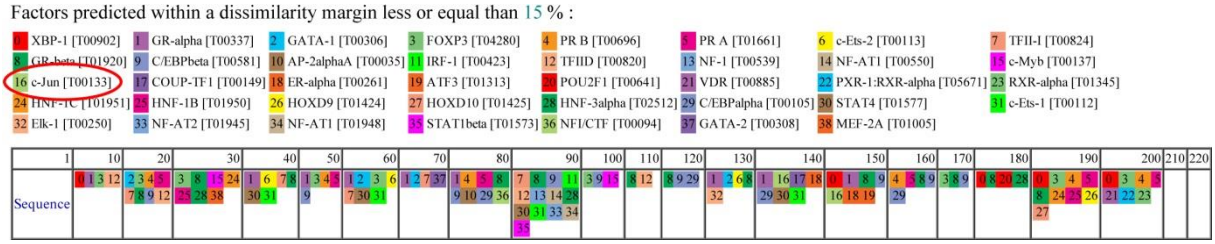


Abbildung 39 Die Analyse der 220 bp langen *KGF*-Promotorsequenz auf Bindestellen einzelner Transkriptionsfaktoren ergab interessanterweise ein cis-Element für den Transkriptionsfaktor c-Jun.

C-jun spielt eine Rolle in den Vorgängen des Zellwachstums und der Zellproliferation sowie der Apoptose durch die Regulation wichtiger Zellzyklusproteine wie p53 oder Cyclin D (Shaulian and Karin, 2001). c-Jun wird daher eine Beteiligung an der Onkogenese verschiedener Tumorarten zugeschrieben. In Tumorzellen des malignen Melanoms, Plattenepithelkarzinoms, Nasopharynx-Karzinoms und Glioblastoms konnten erhöhte c-Jun –Levels nachgewiesen werden (Kappelmann et al., 2014). c-Jun ist jedoch nicht nur als Onkogen bekannt. In der Literatur wird c-Jun als wichtiger Regulator der KGF-Expression in Fibroblasten der Haut genannt.

Maas und Szabowski untersuchten epithelial-mesenchymale Interaktionen in organotypischen Kokulturen von dermalen Keratinozyten und Fibroblasten. Sie

konnten eine doppelt parakrine Wirkschleife zwischen den beiden Zelltypen identifizieren: Die Keratinozyten der Epidermis produzieren Interleukin-1, das in Fibroblasten der Dermis zu einer erhöhten KGF-und GM-CSF-Produktion und Sekretion führt. KGF stimuliert im Gegenzug dann die Keratinozytenproliferation (Maas-Szabowski et al., 2000). Die große physiologische Relevanz dieser *in vitro* Ergebnisse wird dadurch bekräftigt, dass die gegenseitige Stimulation von Keratinozyten und Fibroblasten durch lösliche Faktoren wie IL-1 und KGF auch während der Reepithelialisierungsphase der Wundheilung beschrieben ist (Werner et al., 1994). Um nun die Regulation der Interleukin-1 induzierten KGF-Expression in Fibroblasten näher zu untersuchen, verwendeten Szabowski und Kollegen c-jun und B-Jun defiziente Mausfibroblasten in den oben beschriebenen Hautäquivalenten. C-Jun defiziente Fibroblasten wiesen verminderte, B-Jun defiziente Fibroblasten erhöhte KGF-Levels auf. Dies wiederum beeinflusste die Proliferation und Differenzierung der darüber liegenden Keratinozyten. KGF wurde hier zum ersten Mal als endogenes Zielgen der Transkriptionsfaktoren c-Jun und B-Jun beschrieben (Szabowski et al., 2000).

Da die kutane Fibrosierung als eine übermäßig ablaufende Form der Wundheilung verstanden wird, können oben genannte Beobachtungen auch auf die Ergebnisse dieser Dissertation wie folgt übertragen werden. Fibrosierende Erkrankungen wie Keloid, zirkumskripte Sklerodermie und systemische Sklerodermie weisen erhöhte Levels des Keratinozytenwachstumsfaktors KGF auf. Hierfür verantwortlich sind aktivierte Fibroblasten der Dermis, deren exzessive Transkription des *KGF*-Gens möglicherweise über eine verstärkte Expression oder Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun und dessen Bindung an den *KGF*-Promotor bedingt ist (siehe Abbildung 40).

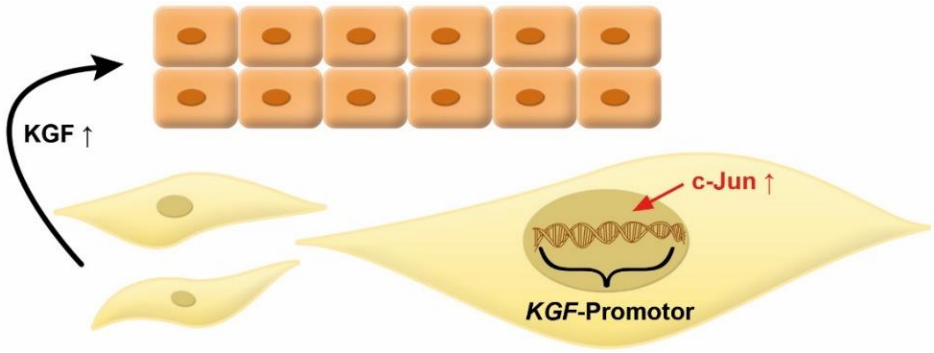


Abbildung 40 Die erhöhte KGF-Expression in Fibroblasten fibrosierender Erkrankungen wird möglicherweise über eine vermehrte Expression bzw. Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun verursacht.

Canady und Kollegen beobachteten eine über viele Zellkulturpassagen hinweg dauerhaft erhöhte KGF-mRNA und – Protein Expression in mit der Krankheit assoziierter Fibroblasten und erhöhte KGF-Protein-Serumlevels in erkrankten Personen. Sie vermuten, dass betroffene Personen KGF in all ihren mesenchymalen Zellen überexprimieren und erst weitere sekundäre Stimuli wie Gewebstrauma oder autoimmune Reaktionen die Entstehung kutaner Fibrosierung fördern.

Die von uns beobachtete verstärkte *KGF*-Promotoraktivität in Fibroblasten einer Monozellkultur bestätigt die Hypothese einer genetischen Ursache der KGF-Überexpression. Mit der Identifizierung von c-Jun als möglichem fehlregulierten Transkriptionsfaktor können wir einen Beitrag zur Entschlüsselung der erhöhten KGF-Expression in fibrosierenden Erkrankungen leisten. Die von Szabowski und Kollegen beschriebene parakrine Stimulierung von Fibroblasten der Dermis und Keratinozyten der Epidermis liefert eine zusätzliche Erklärung, wie die Aktivierung von Fibroblasten beispielsweise nach Gewebstrauma ablaufen könnte. Eine verstärkte Interleukin-1 Produktion durch Keratinozyten oder eingewanderte Immunzellen vermittelt über c-Jun eine zusätzliche KGF-Expression, was wiederum Auswirkungen auf die Fibroblastenaktivität und deren EZM-Produktion haben könnte. Szabowski und Kollegen untersuchten vorwiegend die Auswirkung der KGF-Sekretion auf die Keratinozyten der Epidermis. Hier wäre interessant, ob ferner eine verstärkte Kollagenproduktion durch Fibroblasten der Dermis beobachtet werden konnte, wie es im Einklang mit den von Canady und Kollegen publizierten Daten zu erwarten gewesen wäre.

4.1.3.3 Möglichkeiten der Fehlregulation von c-Jun in fibrosierenden Erkrankungen

Für die Fehlregulation von c-Jun in fibrosierenden Erkrankungen finden sich in der Literatur zwei mögliche Mechanismen.

4.1.3.3.1 c-Jun Überexpression

Eine verstärkte Wirkung des Transkriptionsfaktors c-Jun auf die KGF-Expression kann durch eine Überexpression von c-Jun verursacht werden. Diese Hypothese wird durch Avouac und Kollegen bekräftigt, die eine verstärkte mRNA- und Proteinexpression des Transkriptionsfaktors c-Jun in systemischer Sklerodermie-Fibroblasten beobachteten (Avouac et al., 2012). Ebenso konnte durch immunhistochemische Verfahren in Gewebsproben aktiver Keloide eine verstärkte c-Jun-Expression nachgewiesen werden (Teofoli et al., 1999). Wir untersuchten die mRNA-Expression von c-Jun in Keloid-, zirkumskripter Sklerodermie und systemischer Sklerodermie-Fibroblasten im Rahmen der microRNA-Analysen. Auch wenn hier keine erhöhten mRNA-Levels festgestellt werden konnten, widerlegt dies jedoch nicht unsere Hypothese. C-Jun-Protein könnte durch verminderte Degradation im Zytosol in höheren Levels vorhanden sein oder durch eine erhöhte Phosphorylierungsrate über die c-Jun-N-terminale Kinase verstärkt aktiviert werden und dadurch die Transkription von KGF befördern. Die Vermutung einer veränderten c- Jun-Protein-Expression in unseren Fibroblasten wird durch Daten von Song und Kollegen bekräftigt. Sie beobachteten eine negative Regulation von c- Jun-Protein durch die miR-155 in dermalen Fibroblasten (Song et al., 2012). Die von uns beschriebene signifikant verminderte Expression der miR-155 in Keloid- und zirkumskripte Sklerodermie-Fibroblasten könnte also eine verstärkte c-Jun-Protein-Expression zur Folge haben.

4.1.3.3.2 Verstärkte Aktivierung von c-Jun über die c-Jun-N-terminale Kinase nach TGF-β-Stimulus

C-Jun wird durch unterschiedliche äußere Zellstimuli reguliert, so zum Beispiel auch durch TGF-β_1 und PDGF, beide Schlüsselenzyme der kutanen Fibrose. Reich und Kollegen beschreiben eine TGF-β_1 abhängige Phosphorylierung von c-Jun über die c-Jun-N-terminale Kinase in systemische Sklerodermie-Fibroblasten (Reich et al., 2012). Eine Aktivierung der JNK durch TGF-β_1 konnte auch in Keloid-Fibroblasten

nachgewiesen werden (Liang et al., 2013). Denkbar wäre also auch eine verstärkte Phosphorylierung von c-Jun durch die JNK über einen TGF β_1 Stimulus und eine dadurch vermehrte Bindung von aktiviertem c-Jun an den *KGF*-Promotor. Im Rahmen der microRNA-Analysen untersuchten wir die TGF-β_1-Expression in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten. Im Gegensatz zu vielen publizierten Studien fanden wir interessanterweise keine erhöhten TGF-β_1-mRNA Levels in mit der Krankheit assoziierten Fibroblasten.

Wie kann man sich also nun eine TGF-β_1 abhängige Aktivierung der c-Jun-N-terminalen Kinase in unseren Zellen vorstellen? Es gibt einige Studien, die ebenso wie wir keine gesteigerte TGF- β_1-Sekretion in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten feststellen konnten (Ihn et al., 2001)(Needleman et al., 1990)(Funayama et al., 2003). TGF- β gilt jedoch als eines der wichtigsten profibrotischen Zytokine in fibrosierenden Erkrankungen der Haut, was die Vermutung nahelegte, dass es Veränderungen in der TGF β Signalkaskade geben muss, die eine verstärkte Wirkung von TGF- β trotz fehlender Überexpression vermitteln. Asano und Kollegen spekulierten, dass eine verminderte Wirkung der inhibitorischen Smad-Proteine eine verstärkt ablaufende TGF- β Signalkaskade in Sklerodermie-Fibroblasten verursachen könnte. Das inhibitorische Smad 7-Protein bindet an den aktivierten TGF-β Rezeptor Typ 1 und verhindert die Phosphorylierung der Smad-Proteine 2 und 3. Durch Komplexierung mit den sogenannten Smurf-Proteinen 1 und 2 führt Smad 7 zusätzlich zu einer Degradation des Rezeptors und beendet dadurch die Signalkaskade. Asano und Kollegen fanden nicht nur eine erhöhte Anzahl an TGF-β_1 Rezeptoren auf der Fibroblastenoberfläche, was für ein verstärktes autokrines Signaling spricht, sie konnten auch zeigen, dass der Smad 7-Smurf Komplex in Sklerodermie-Fibroblasten in seiner Wirkung eingeschränkt war (Asano et al., 2004). Diese Ergebnisse passen sehr gut zu der Annahme, dass auch in unseren Zellen trotz nicht erhöhter TGF-β_1-mRNA Levels eine intensivierte TGF-β Signalkaskade ablaufen kann. Die veränderte autokrine TGF-β-Signalkaskade mit verstärkter JNK und nachfolgender c-Jun Aktivierung kann in Fibroblasten einer Monozellkultur für die erhöhte Expression von KGF verantwortlich sein.

4.1.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend können wir folgenden Erklärungsansatz für Regulation des Keratinozytenwachstumsfaktors in fibrosierenden Erkrankungen der Haut liefern: Die erhöhte KGF-Expression in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten wird möglicherweise über die Bindung des Transkriptionsfaktors c-Jun an den *KGF*-Promotor vermittelt. C-Jun kann zum einen vermehrt exprimiert, zum anderen über die c-Jun N-terminale Kinase verstärkt aktiviert sein. Die vermehrte Phosphorylierung von c-Jun durch die JNK wird mutmaßlich durch eine verstärkte autokrine TGF β-Signalwirkung in aktivierten dermalen Fibroblasten in fibrosierenden Hauterkrankungen verursacht. Mit der Identifizierung des Transkriptionsfaktors c-Jun als möglichen Regulator der KGF-Überexpression können wir eine potentielle Zielstruktur zukünftiger Therapiestrategien präsentieren.

Um unsere Hypothese zu bestätigen, müssen nun weitere Untersuchungen vorgenommen werden. So ist die c-Jun-Protein-Expression in den mit der Erkrankung assoziierten Fibroblasten im Vergleich mit gesunden Fibroblasten zu überprüfen. Außerdem kann mit Hilfe von elektrophoretic mobility shift assays und Mutagenese-Experimenten die potentielle AP-1- Bindestelle im Bereich von +901 bp - 1020 bp des *KGF*-Promotors auf die Bindung von c-Jun-Protein analysiert werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse der microRNA-Analysen

4.2.1 Fehlregulation der microRNA-155 in mit der Krankheit assoziierter Fibroblasten

Um eine mögliche Regulation des Keratinozytenwachstumsfaktors durch die miR-155 zu eruieren, untersuchten wir die miR-155-Expression in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten und fanden interessanterweise signifikant verminderte miR-155-Levels im Vergleich zur Expression in Fibroblasten gesunder Spender. Die miR-155 zählt zu einer der bereits am intensivsten erforschten microRNAs. Eine veränderte Expression in dermalen Fibroblasten fibrosierender Erkrankungen wurde jedoch bisher nicht beschrieben. Die Rolle von microRNAs in fibrosierenden Erkrankungen ist noch nicht hinreichend verstanden, so dass wir unserer Beobachtung weiter nachgingen. Wir untersuchten potentielle Zielgene der miR-155 und konnten für die bereits validierten Zielgene BMP-6, Integrin A2, Dicer, c-Jun und β-Catenin keine relevanten Veränderungen der mRNA-Levels nach Behandlung der

Fibroblasten mit miR-155 bzw. anti-miR-155 feststellen, so dass wir eine Regulation dieser Gene auf mRNA-Ebene in dermalen Fibroblasten ausschließen. Jedoch konnten wir in Abschnitt 4.1.3.3.1 herausarbeiten, dass die c-Jun-Proteinexpression womöglich durch die miR-155 reguliert wird. Dies muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Die zusätzliche Untersuchung der miR-155 in Gewebeproben von Keloid- und Sklerodermie-Patienten zeigte keine Verminderung der miR-155. Hier konnte eher eine erhöhte Expression in Vergleich zu gesunden Hautproben festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass in Gewebeproben neben Fibroblasten auch zusätzliche Zellen, wie Keratinozyten der Epidermis und Zellen des Immunsystems enthalten sind, die das Expressionsmuster der microRNA-155 beeinflussen. In Gewebeproben von Keloid- und Sklerodermie-Patienten finden sich vermehrt inflammatorische Infiltrate, bestehend aus B/T-Lymphozyten, Plasmazellen, Mastzellen und Makrophagen (Bagabir et al., 2012)(Fleischmajer et al., 1977). All diese Zelltypen weisen in aktiviertem Zustand erhöhte Expressionslevels der miR-155 auf (Montagner et al., 2013). Die in dieser Arbeit beobachtete vermehrte miR-155-Expression in Keloid-und Sklerodermie-Gewebe kann also durch eine erhöhte Anzahl an Immunzellen, die eine erhöhte miR-155-Expression aufweisen, erklärt werden. Um eine mögliche verminderte Expression der miR-155 von Fibroblasten in Gewebeproben im Speziellen nachweisen zu können, müssten in der Folge in-situ-Hybridisierungen durchgeführt werden. Welche Rolle die miR-155 in dermalen Fibroblasten fibrosierender Erkrankungen spielt, gilt es zusätzlich durch weitere Untersuchung potentieller Zielgene herauszufinden.

Ein interessanter Aspekt wäre hierbei die mögliche Regulation des Smad-2 Proteins in dermalen Fibroblasten durch die miR-155. Smad-2 konnte in Makrophagen als Zielstruktur der microRNA-155 nachgewiesen werden (Louafi et al., 2010). Als intrazellulärer Vermittler in der TGF-β-Signalkaskade kann ein verändertes Expressionsprofil von Smad-2 Protein die TGF-β vermittelten Effekte verstärken bzw. abschwächen. In unserem Fall würde eine verminderte microRNA-155-Expression zu erhöhten Smad-2 Levels führen und damit die TGF-β-Signalwirkung innerhalb der Zelle intensivieren. Eine konstitutiv aktivierte TGF-β Signalkaskade in dermalen Fibroblasten gilt als Schlüsselprozess in der Entstehung kutaner Fibrose. Wie schon

in Punkt 1.6.1.1.1 beschrieben, finden sich erhöhte Expressionslevels von Smad-2 in Keloid- und systemischer Sklerodermie-Fibroblasten. Mit der Entdeckung der verminderten miR-155-Expression in mit der Krankheit assoziierter Fibroblasten liefern wir einen Anstoß für eine mögliche Regulation des Smad 2-Proteins durch die miR-155 in dermalen Fibroblasten.

4.2.2 Die Rolle der microRNA-21 in fibrosierenden Hauterkrankungen

Die beobachtete Fehlregulation der miR-155 in mit der Krankheit assoziierten Fibroblasten und die Hinweise einer potentiellen Beteiligung von microRNAs an der Pathogenese fibrosierender Erkrankungen in der Literatur ließ uns die Expression weiterer microRNAs in dermalen Fibroblasten und Gewebeproben untersuchen. Hierzu zählte die bis dato vorwiegend als „OnkomiR“ bekannte microRNA-21. Ardite und Kollegen beschrieben jedoch im Jahre 2012 zum ersten Mal eine vermehrte Expression der miR-21 in Muskeldystrophie –Mausmodellen und Gewebeproben erkrankter Personen, womit die microRNA-21 auch für die Pathogenese fibrosierender Erkrankungen relevant erschien. Sie fanden eine TGF-β_1 getriggerte miR-21-Überexpression, die zu einer vermehrten Kollagenablagerung und Fibrosierung in betroffenem Muskelgewebe führte (Ardite et al., 2012). Die Beteiligung von TGF- β_{-1} an der kutanen Fibrose ist bislang unbestritten, weshalb wir die Expression der miR-21 in dermalen Fibroblasten und Gewebeproben gesunder wie erkrankter Spender untersuchten. Wir fanden keine signifikant erhöhten miR-21-Levels in mit der Krankheit assoziierter Fibroblasten im Vergleich zu gesunden Fibroblasten. Jedoch zeigte sich interessanterweise eine Überexpression der miR-21 in Keloid- und Sklerodermie-Gewebeproben. Während der schriftlichen Ausarbeitung dieser Dissertation veröffentlichten auch Wang bzw. Zhu und Kollegen Expressionsanalysen der miR-21 in Keloid- bzw. Sklerodermie-Fibroblasten. Es zeigte sich eine erhöhte miR-21-Expression in Korrelation mit einer verstärkten TGF-β_1-Expression in Keloid-Fibroblasten (Wang et al., 2013). Zhu und Kollegen wiesen ebenso eine Überexpression der miR-21 in Sklerodermie-Fibroblasten und Gewebeproben erkrankter Personen nach. Die miR-21-Expression schien auch hier TGF-β_1 abhängig zu sein. Außerdem identifizierten sie das inhibitorische Smad-7-Protein als direktes Zielgen der miR-21, was eine verstärkt ablaufende TGF- β Signalkaskade bewirken könnte (Zhu et al., 2012).

Im Falle der Gewebeproben liegen also im Vergleich mit den Literaturdaten einheitliche Ergebnisse vor, Unterschiede bestehen jedoch in den Analysen der primären Zellkultur. Zunächst ist anzumerken, dass wir im Gegensatz zu Wang und Kollegen keine erhöhten TGF-β_1 Levels in Fibroblasten erkrankter Personen fanden, was eine mögliche Erklärung für die abweichenden miR-21-Expressionslevels sein könnte. Würde man jedoch ein wie in Punkt 4.1.3.3.2 beschriebenes verstärktes autokrines *TGF-β signaling* voraussetzen, müsste auch die Expression der miR-21 erhöht sein. Möglicherweise liegen jedoch grundlegende Unterschiede in den untersuchten Zellpopulationen vor. Herkunft, Alter der Patienten und unterschiedliche Exzisionsorte spielen möglicherweise eine größere Rolle als bisher gedacht. Die widersprüchlichen Ergebnisse der TGF-β_1-Expression von Fibroblasten erkrankter Personen in der Literatur können ein Hinweis auf bisher unbedachte Faktoren sein.

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die unterschiedlichen miR-21-Expressionslevels könnte die Anzahl der Zellkulturpassagen und damit das Zellalter sein. Wang ebenso wie Zhu und Kollegen untersuchten die miR-21-Expression in frisch isolierten Fibroblasten in Passage drei bis acht. Die von uns verwendeten Fibroblasten befanden sich jedoch in weit höherer Passagenanzahl. Wir entschieden uns aber ganz bewusst, Expressionsunterschiede von microRNAs in einer Langzeitzellkultur zu untersuchen, da die von Canady und Kollegen beobachtete signifikant erhöhte KGF-Expression in fibrosierenden Erkrankungen auch über einen langen Zeitraum stabil in Zellkultur zu beobachten war. Es scheint also, dass die miR-21-Überexpression ein in frühen Passagen der Zellkultur zu beobachtendes Phänomen ist, welches jedoch über die Zeit abnimmt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Zellen in niedriger Passagenzahl noch unter dem Einfluss von „in vivo“ Faktoren (Zytokine, Wachstumsfaktoren) aus der Zellumgebung stehen, der im Verlauf in der Monozellkultur langsam verloren geht.

Unsere Beobachtung einer signifikant erhöhten Expression der miR-21 in Keloid- und Sklerodermie-Gewebe ebenso wie die Daten aus der Literatur sprechen für eine wichtige Rolle der miR-21 in der Pathogenese fibrosierender Erkrankungen. Jedoch ist im Falle unserer Gewebeproben wieder herauszufinden, welcher Zelltyp für die erhöhte Expression verantwortlich ist, denn die microRNA-21 wird auch in Keratinozyten exprimiert und es konnten erhöhte Expressionslevels der microRNA-

21 während der Wundheilung nachgewiesen werden (Yang et al., 2011). So kann die beobachtete miR-21-Überexpression in Keloid- und Sklerodermie-Gewebe auch durch eine verstärkte Expression der miR-21 in den Keratinozyten der Epidermis verursacht sein. Dies kann wiederum nur mittels in-situ-Hybridisierung überprüft werden.

4.2.3 Fehlregulation der microRNA-125b in der Sklerodermie

Mit der Analyse der mir-125b untersuchten wir eine microRNA, deren Rolle bisher vorwiegend in der Pathogenese von Tumorerkrankungen diskutiert wurde. Zirkumskripte Sklerodermie-Fibroblasten wiesen signifikant erhöhte miR-125b Levels auf und auch bei Fibroblasten von systemischer Sklerodermie-Patienten tendierten die Werte zu einer erhöhten miR-125b-Expression. Dies konnte ebenso in Sklerodermie-Gewebe festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu beobachten Li und Kollegen in Microarray-Analysen von Gewebeproben an Sklerodermie erkrankter Personen eine verminderte Expression der miR-125b (Li et al., 2012). Die abweichenden Ergebnisse lassen sich möglicherweise durch die unterschiedlich angewendeten Methoden erklären. Wir untersuchten die miR-125b-Expression mittels PCR. Hierbei binden Primer an eine definierte Basenabfolge der microRNA und vermitteln die Bindung der RNA-Polymerase, die daraufhin mit der Synthese eines Komplementärstrangs beginnt. Die Expressionsanalyse von microRNAs mit Hilfe von Microarrays basiert auf der Bindung der microRNA an spezifische komplementäre Sonden auf einem Trägermaterial. Die Basenabfolge der microRNA, die für die Bindung der Primer im Rahmen der PCR verantwortlich ist und die Sequenz, die die Hybridisierung der microRNA mit dem Sondenmaterial des Microarrays vermittelt, kann voneinander abweichen. Single-Nukleotid-Polymorphismen innerhalb der für die Erfassung der microRNA in der jeweiligen Methode entscheidenden Sequenz können zu Veränderungen in der Primer- bzw. Sondenhybridisierung führen und die Expressionsanalyse verfälschen. Dies bedeutet, dass beispielsweise eine Mutation der microRNA in einem Bereich, der für die Hybridisierung der microRNA mit der Sonde des Microarrays entscheidend ist, dazu führt, dass die microRNA nicht erfasst wird. Diese Mutation kann jedoch für die Bindung der PCR-Primer völlig unbedeutend sein, was zu gegensätzlichen Ergebnissen, wie wir sie hier beobachten, führen kann. Um mögliche SNPs innerhalb der microRNA-125b zu untersuchen, müsste man eine Sequenzierung der microRNA

vornehmen. Jedoch muss an dieser Stelle auch auf die Fehleranfälligkeit der Sequenzierungsmethode hingewiesen werden.

Kappelmann und Kollegen identifizierten c-Jun als Zielgen der miR-125b auf Proteinebene. Da wir eine erhöhte Expression der miR-125b in Sklerodermie-Fibroblasten und Sklerodermie-Gewebe beobachten konnten, untersuchten wir zunächst die c-Jun-mRNA-Expression und fanden hier keine Unterschiede in Fibroblasten gesunder Spender im Vergleich zu Fibroblasten erkrankter Personen. Um eine mögliche Regulation von c-Jun durch die miR-125b weiter zu verfolgen, müsste man die c-Jun-Proteinexpression analysieren.

Die microRNA-125b scheint also in der Sklerodermie fehlreguliert zu sein. Für Keloide konnte eine derartige Beobachtung nicht gemacht werden. Über welche Mechanismen die microRNA-125b in die Pathogenese sklerodermaler Läsionen eingreift, ist bisher unklar. Hier müssen weitere Experimente für Klarheit sorgen.

4.2.4 Die Rolle der microRNA-196a

Eine veränderte Regulation der miR-196a in fibrosierenden Hauterkrankungen wurde sowohl in der Pathogenese von Keloiden als auch systemischer Sklerodermie beschrieben. So konnten in Sklerodermie-Fibroblasten signifikant verringerte miR-196a-Levels festgestellt werden, die mit einer verstärkten Expression von α_1 (I)-und α_2(I)-Kollagen verbunden waren. Die veränderte miR-196a-Expression schien TGF-β vermittelt abzulaufen, da mit TGF-β behandelte Fibroblasten gesunder Spender verringerte miR-196a-Werte aufwiesen. Sowohl in-situ Hybridisierung- als auch PCR-Analysen von Sklerodermie-Gewebe ergaben ebenfalls eine signifikant verminderte miR-196a-Expression (Honda et al., 2012). Auch Kashiyama und Kollegen beobachteten signifikant verminderte miR-196a-Werte in Keloid-Fibroblasten im Vergleich zu gesunden Fibroblasten. Auch sie konnten zeigen, dass die mir-196a die Expression von Kollagen in deren Fall Typ I und III regulierte.

Wir untersuchten microRNAs in einer Langzeitzellkultur und stellten in unseren Experimenten fest, dass eine höhere Passagenanzahl Einfluss auf die Expression von microRNAs haben kann. Auch Kashiyama und Kollegen beschreiben Veränderungen in der Expression der microRNAs miR-142-3p und miR-196a in Abhängigkeit von der Passagenanzahl (Kashiyama et al., 2012). Interessant für uns

war daher zu testen, ob auch unsere Zellen noch ähnliche wie in der Literatur beschriebene miR-196a-Levels aufweisen. Wir konnten die signifikant verminderte Expression der miR-196a in Sklerodermie-Fibroblasten bestätigen. In Keloid-Fibroblasten ist noch eine Tendenz zu verringerten Expressionslevels zu erkennen. Es scheint also, dass die Expression der miR-196a dauerhaft in mit der Krankheit assoziierter Fibroblasten verändert ist und hier einen Teil zur vermehrten Kollagenproduktion aktivierter Fibroblasten beiträgt. Unsere Ergebnisse der Gewebeproben können jedoch die in der Zellkultur erhobenen Daten nicht erklären. Weder für Keloid- noch für Sklerodermie-Gewebe sind signifikante Veränderungen der miR-196a-Expression feststellbar. Hier kann nun jedoch wieder der Einfluss zusätzlicher Zelltypen eine Rolle spielen. Um die Expression der miR-196a in Fibroblasten der verwendeten Gewebeproben genauer zu untersuchen, müsste auch hier eine in-situ-Hybridisierung durchgeführt werden.

4.2.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend ist zu sagen, dass wir mit der Entdeckung der veränderten Expression der miR-155 und miR-125b in fibrosierenden Hauterkrankungen weitere fehlregulierte microRNAs im Kontext der kutanen Fibrose identifizieren konnten. Durch welche Mechanismen diese microRNAs-Einfluss auf die verstärkte Kollagenexpression in mit der Krankheit assoziierter Fibroblasten nehmen, ist Gegenstand weiterführender Untersuchungen. Die Expressionsanalyse der miR-21, 125b und 196a und deren Vergleich mit in der Literatur publizierten Daten verdeutlicht jedoch auch, dass bei der Untersuchung von microRNAs in primären Zellen und Gewebeproben viele unterschiedliche Faktoren die Expressionsanalyse beeinflussen können. Die Bedeutung von microRNAs in der Pathogenese fibrosierender Erkrankungen der Haut wird vielfach diskutiert und sie bietet die Chance völlig neuer Therapieansätze, jedoch müssen die Fallstricke bei der Datenerhebung bedacht und überprüft werden. Es gilt die unterschiedlich angewandten Methoden wie etwa Microarray und PCR-Analyse auf ihre Fehleranfälligkeit und Messgenauigkeit hin zu beurteilen.

Wir konnten zudem die spannende Beobachtung machen, dass es anscheinend microRNAs gibt, die sich in einer Langzeitzellkultur stabil verhalten, wohingegen Veränderungen anderer nur in früher Passagenzahl zu beobachten sind. Diese

Dynamik gilt es zu beachten und weiterzuverfolgen. Eine konstitutiv veränderte microRNA-Expression wie die der miR-196a spricht für eine genetische Ursache der Regulation. Im Falle der microRNA-21 könnten epithelial-mesenchymale Stimuli, die in der Monokultur nicht mehr vorhanden sind, für die veränderte Expression der microRNA in Langzeitzellkultur verantwortlich sein.

Der Einfluss von microRNAs in der Pathogenese fibrosierender Erkrankungen wird aufgrund der sich bietenden neuen therapeutischen Interventionsmöglichkeiten weiterhin intensiv erforscht werden. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten zum einen neue an der Pathogenese kutaner Fibrosierung möglicherweise beteiligte microRNAs identifiziert werden, zum anderen weisen wir daraufhin, dass die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden sowie die Passagenzahl primärer Zellen wichtige Einflussfaktoren in der Expressionsanalyse darstellen und berücksichtig werden müssen.

5 Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Allgemeine Materialien

Behrens,Hamburg	Agar
Biozym scientific GmbH, Oldendorf	Biozym LE Agarose
Braun, Frankfurt am Main	Aqua injectabile
Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe	Ethanol
Corning Incorporated, New York, USA	Zellkulturflaschen T25,T75,T175,6-Well-Platten
Engelbrecht GmbH, Edermünde	Deckgläser
Eppendorf. Hamburg	Combitips Plus 10ml, Combitips advanced 1.0 ml
Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel	Wasserbad GFL 1083
Gilson, Middleton, USA	DIAMOND® Standard Tips – ECOPACK™ D 1000, D 200, D 10
GraphPad Software Inc., San Diego, USA	GraphPad Prism 4.03 Software
Greiner Bio-One GmbH, Solingen	PS-Schraubverschlussröhrchen (6-10ml, 11-20ml)
Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA	Lipofectamine PLUS™ Reagent, Lipofectamine™ Reagent LTX, SuperScript™II Reverse Transcriptase Kit, TrackIt™1 kb ,100 bp DNA Ladder, TOPO® TA Cloning® Kit
Lynnon Corporation, Quebec, Kanada	DNAMan-Software
Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig	Glas-Objektträger
Merck KGaA, Darmstadt	2-Propanol
New England Biolabs, Ipswich, USA	Restriktionsendonukleasen mit Puffern (NEBbuffer 1 , 2, 3, 4), T4 DNA Ligase, T4 DNA Ligase Puffer, DH-10ß kompetente E.coli-Zellen, Soc-Medium
Omega Bio-TEK, Norcross, USA	E.Z.N.A.® MicroElute® Total RNA Kit
PAA Laboratories Inc., Dartmouth, USA	Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), Phosphate buffered saline (PBS),

	Penicillin/Streptomycin, Trypsin
PAN Biotech GmbH, Aidenbach	Fötales Kälberserum (FKS)
Promega, Madison, USA	Dual-Luciferase® Reporter Assay System, PGL4.10(luc2)vector, pRL-TK-Vektor
Qiagen, Hilden	HiSpeed™Plasmid MIDI Kit, HiPerFect Transfektionsreagenz, miRNeasy® FFPE Kit, miRNeasy®Mini Kit, miScript Reverse Transcription Kit, miScript SYBR®Green PCR Kit, QIAEX II Gel extraction Kit, QIAquick®Gel Extraction Kit
Roche Diagnostics, Mannheim	Ethidiumbromid, dN6 Primer, dNTP Mix, LightCycler® Kapillaren, LightCycler® 480 SYBR Green I Master, LightCycler® 480 Multiwell Plate (96), RNAse A, Taq®-DNA Polymerase
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	Ampicillin, Bromphenolblau, DTT, Oligonukleotide alle nicht aufgeführten Chemikalien in p.a. Qualität

5.1.2 Geräte

Brutschränke:	
Heraeus instruments GmbH, Osterode	Inkubator Heraeus 6000, Heracell 240 i C02 Inkubator, Heraeus B 6060
Gelelektrophoreseapparatur:	
BioRad, München	Wide Mini Sub® Cell GT
Heiz- und Kühlblöcke:	
Eppendorf, Hamburg	Thermomixer 5436
Biozym Scientific GmbH, Oldendorf	Thermomixer (Mixing-Block MB-102)
Light Cycler:	
Roche Diagnostics, Mannheim	Roche LightCycler® 480 II, LightCycler® Instrument II
Luminometer:	
Berthold, München	Luminometer Lumat LB 9507, Luminometer Lumat LB 9501

Mikroskop:	
Carl Zeiss AG, Jena	Mikroskop AxioVert 200
Pipetten:	
Eppendorf, Hamburg	Multipette Stream und Multipette plus
Middleton, USA	Gilson PIPETMAN Classic™ P10, P200,P1000
PCR-Gerät:	
MJ Research, Waltham, USA	Peltier Thermal Cycler PTC-200
Spannungsgeräte:	
BioRad, München	PowerPac Basic, PowerSupply 200/2.0
Sterilwerkbänke:	
Heraeus instruments GmbH, Osterode	Sterilbank LaminAir HBB 2472 S, Lamin Air HBB 2448
Waagen:	
Sartorius, Göttingen	R 160P,L2200S
Zentrifugen:	
Eppendorf, Hamburg	Centrifuge 5415 R, 5415D, 5810 R; MiniSpin Plus
Heraeus instruments GmbH, Osterode	Megafuge 1.0
Savant, New York	Speedvac Concentrator SC 110
Sonstige Geräte:	
Bachofer, Reutlingen	UV-Transilluminator IL 350 K, 254nm
bioSan, Riga, Lettland	Mini Rocker Shaker MR-1
Bühler,Edmund,Tübingen	Schüttler SM25
Heidolph, Kehlheim	Vortexer REAX top
MWG Biotech, Ebersberg	Geldokumentationssystem 2001i

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	Nanodrop® ND-1000-UV/Vis Spektralphotometer
Scotsman Vernon Hills, USA	Eismaschine

5.1.3 Bakterienstämme

Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA	One Shot® TOP10 chemically competent *E. coli*- Zellen
New England Biolabs, Ipswich, USA	NEB 10-beta *Competent E.coli* - Zellen(High Efficiency)

5.1.4 Primäre Zellen

Humane dermale Fibroblasten gesunder Spender (Chambrex)	9F0889,2F0621,9F0438
Humane Fibroblasten selbst isoliert	NF 95-106
Dermale Fibroblasten isoliert aus Keloiden	K00C01/3a,K00C02/3a
Dermale Fibroblasten isoliert aus zirkumskripter Sklerodermie	Z00C06B/1b,Z00C06B/2a,Z11C14Ɛa,Z11 M06/2a,
Dermale Fibroblasten isoliert aus systemischer Sklerodermie	S 83,S00T03/1a

5.1.5 Humane Gewebeproben

Die Gewebeproben für die unterschiedlichen microRNA-Analysen in Keloid- und Sklerodermie-Gewebe, sowie in Proben gesunder Spender wurden aus der Gewebebank des Institutes für Pathologie und aus der Sammlung des Instituts für Dermatologie bezogen. Hierbei handelte es sich um Formalin-fixierte Paraffinschnitte der verschiedenen Gewebsarten.

5.1.6 Vektoren

5.1.6.1 pCR™II-TOPO®-Vektor

Durch den pCR®II-TOPO® -Vektor (Life Technologies, Carlsbad, USA) ist eine direkte Ligation von PCR- Produkten in den gegebenen Vektor durchführbar. Der bereits linearisiert vorliegende Vektor besitzt zu beiden Enden freie 3’ Thymidin Überhänge, sowie die kovalent gebundene Topoisomerase I des Vaccinia-Virus. Die direkte Ligation von Vektor und PCR-Amplifikat wird dadurch möglich, dass die für die PCR eingesetzte DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* eine nicht Matrizen-

abhängige terminale Transferase Aktivität besitzt und bei der Reaktion an das 3' Ende aller entstehenden PCR- Produkte ein einzelnes Deoxyadenosin ergänzt. Kommt es nun zu einer Anlagerung der komplementären Basen Adenosin und Thymin am jeweiligen 3`Ende des Vektors bzw. des PCR-Amplifikats, wird die Bindung der Topoisomerase I gelöst und die dabei entstehende Energie für die Ligation von PCR-Produkt und Vektor genutzt. Abbildung 41 zeigt die Vektorkarte des pCR®II-TOPO® -Vektors.

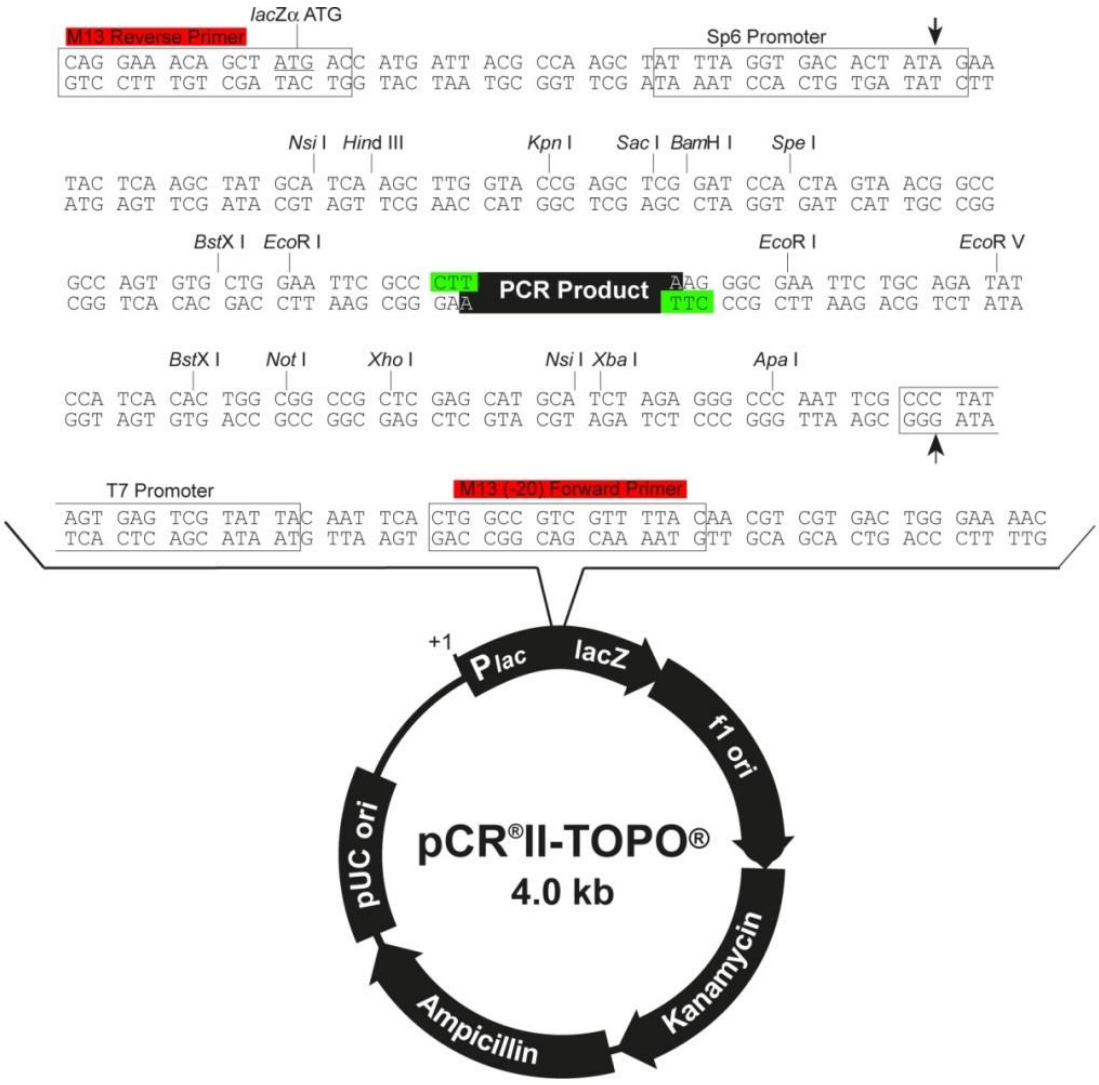


Abbildung 41 Dargestellt ist der pCR®II-TOPO®-Vektor mit PCR-Produkt-Insert. Die Anlagerung des PCR-Amplifikats erfolgt an den mit Grün hervorgehobenen 3´-Thymidin-Überhängen. Angezeigt sind außerdem die Schnittstellen unterschiedlicher Restriktionsendonukleasen. Die Freisetzung des Inserts aus dem pCR®II-TOPO®-Vektor war essentiell für die Umklonierung der *KGF*-Promotorkonstrukte in den pGL4.10(luc2)-Vektor (siehe Punkt 5.2.2.7). Mit Rot hervorgehoben sind die Ansatzstellen der Sequenzierungsprimer M13 forward/reverse. Die im Rahmen der TOPO-Klonierung durchgeführte Sequenzierung (siehe Punkt 5.2.2.6) diente der Überprüfung des eingebauten PCR-Produkts auf unerwünschte Mutationen. (Internetquelle 7, modifiziert)

5.1.6.2 pGL4.10 (luc2)-Vektor

Der im Luciferase-Assay eingesetzte pGL4.10 (luc2)-Vektor (Promega, Madison,USA) diente als Träger der unterschiedlichen *KGF*-Promotorkonstrukte und ermöglichte die Messung der *KGF*-Promotoraktivität nach Transfektion in primäre Zellen.

Folgende Eigenschaften des Vektors waren hierfür nötig:

- Der pGL4.10 (luc2)-Vektor kodiert für das luc 2 Luciferasegen des amerikanischen Leuchtkäfers Photinus pyralis.
- Die „multiple cloning site“ des Vektors, die Schnittstellen für mehrere Restriktionsenzyme enthält und sich vor dem Luciferase-Gen befindet, bietet die Möglichkeit der Eröffnung des Vektors und des Einbringen von zuvor entsprechend verdauter Promotorbereiche.
- Die selektionierte Vermehrung der unterschiedlichen Plasmide in Bakterien wird durch eine vom Vektor vermittelte Ampicillinresistenz erreicht.

In Abbildung 42 ist die Vektorkarte des pGL4.10(luc2)-Vektors zu sehen.

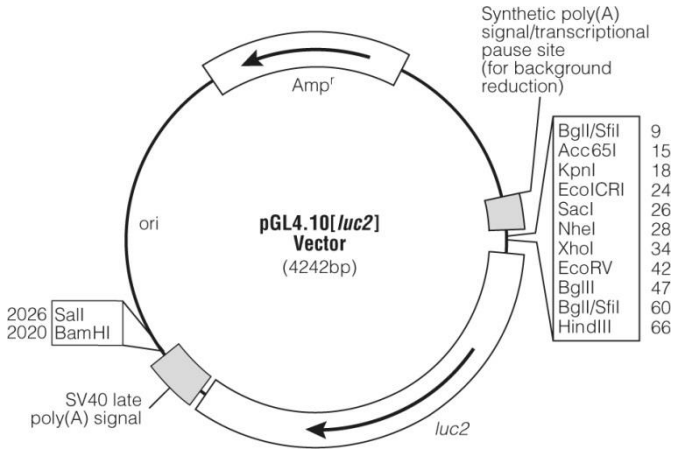


Abbildung 42 Vektorkarte des pGL4.10(luc2)-Vektors. Der Vektor kann durch 11 verschiedene Restriktionsenzyme an der „multiple cloning site“ eröffnet werden und ermöglicht dadurch das Einbringen von Fremd-DNA. Die Restriktionsendonukleasen werden in der Box namentlich aufgeführt. Der Vektor kodiert für das Luciferase-Gen luc 2, sowie für ein Ampicillinresistenzgen (Amp´). (Internetquelle 8)

5.1.6.3 pRL-TK-Vektor

Der ebenfalls von der Firma Promega bezogene pRL-TK Vektor wurde im Luciferase-Assay zur Kontrolle der Transfektionseffizienz eingesetzt. Er verfügt über ein modifiziertes Luciferase-Gen der Oktokorallenart Renilla reniformis unter der

Kontrolle eines HSVTK (Herpes simplex Virus-Thymidinkinase)-Promotors. Der pRL-TK-Vektor wurde stets mit dem eigentlichen Reportergen-Plasmid kotransfiziert.

5.1.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (München) synthetisiert. Es wurde eine 100 µM Stammlösung der Oligonukleotide durch Lösen in ddH_2O hergestellt und bei -20 °C gelagert. Für den Einsatz in der RT-PCR oder qRT-PCR (quantitative Real-Time PCR) wurden die entsprechenden Primer auf eine Konzentration von 20 µM verdünnt.

5.1.7.1 Primer für Expressionsanalysen

Name	Sequenz	Messtemperatur
β-Catenin 1 for	5‘- GGGTCCTCTGTGAACTTGCTCAGGAC-3‘	82 °C
β -Catenin 1 rev	5‘-CTGGATAGTCAGCACCAGGGTGGTG-3‘	
BMP-6 for	5‘-AAGGCTGGCTGGAATTTGACATCACG-3‘	88 °C
BMP-6 rev	5‘-GGTAGAGCGATTACGACTCTGTTGTC-3‘	
Dicer 4802 for	5‘-GCCCTGTGCCCTACTCGGGA-3‘	80 °C
Dicer 5179 rev	5‘-GTGCTGCCGCGGGTCTTCAT-3‘	
FGF-7 /KGF for	5‘-AAACAGCGTCACAGCAACTG-3‘	76 °C
FGF-7/KGF rev	5‘-GTAGTGCTCCGGGTGTTCAT-3‘	
Integrin A2 1361 for	5‘-GACCATTGTCCAGAAGACATCTCATGGC-3‘	80 °C
Integrin A2 1776 rev	5‘-TACCAAGAGCACGTCTGTAATGGTGTCT-3‘	
Jun 801 for	5‘-CGCGCGCGAGTCGACAAGTA-3‘	88 °C
Jun 991 rev	5‘-GGGCTGCGCGCACAAGTTTC-3‘	
Q2TVT4 for 63	5‘-TCTTGCAATGAACGAGGAAGG-3‘	76 °C
Q2TVT4 rev 285	5‘-TGCCATAGGAAGAAAGTGGGC-3‘	
TGF- β1 for	5‘-AGGCCTTCGAGAAGATCCCT	85 °C
TGF- β1 rev	5‘-GAGATGATCGCCTTCCCGTT	
PAI-I for	5‘-CGAACCGCCAATCGCAAGGC	86 °C
PAI-I rev	5‘-CCCCGAAGTCTGAGGCCAGGT	

5.1.7.2 Primer für PCR

Name	Sequenz
FGF-7 Promotor for	5‘-CAAGAGCAACAAACGGTTGC-3‘
FGF-7 Promotor 2021 rev	5‘-AGCGAGAATAAAAGGAGGCTT-3‘
FGF-7 Prom. Cluster 1 for	5‘-GTTGTATTCAACTAACAGCTC-3‘
FGF-7 Prom. Cluster 1 rev	5‘-TGCTTGTGTGTGTGTGTG-3‘
FGF-7 Prom. Cluster 2 for	5‘-CACACGCGCTCACACAC-3‘
FGF-7 Prom. Cluster 2 rev	5-‘TATTTCTCAGCTGAAAAGTTC-3‘
FGF-7 Prom. 561 rev	5‘-GTCAGGATTGCTCTGGAG-3‘
FGF-7 Prom. 1020 rev	5‘-AGTTCGTAGTAAGTTCAGTTG-3‘

5.1.8 MicroRNA–Primer für Expressionsanalysen, sowie microRNA und Small interfering RNA für Transfektionen

Die Primer für die microRNA-Expressionsanalysen, microRNA Mimic bzw. microRNA Inhibitor und Kontroll-siRNA für die durchgeführten Transfektionen wurden von der Firma Quiagen (Hilden) bezogen. Die Primer wurden in einer Konzentration von 20µM eingesetzt und dementsprechend verdünnt.

Name	Sequenz
Hs_miR-21_2	Keine Angaben des Herstellers
Hs_miR-125b_1	Keine Angaben des Herstellers
Hs_miR-155_2	Keine Angaben des Herstellers
Hs_miR-196a-1	Keine Angaben des Herstellers
Hs_RNU6-2_11 miScript Primer Assay	Keine Angaben des Herstellers
Negative Control siRNA (20 nmol)	5´-UUCUCCGAACGUGUCACG UdT dT -3´
Anti-hsa-miR-155-5p miScript miRNA Inhibitor	Keine Angaben des Herstellers
Syn-hsa-miR-155-5p miScript miRNA Mimic	Keine Angaben des Herstellers

5.1.9 Medien

Luria Bertani Medium zur Anzucht von E.coli	10 g/l Trypton,5 g/l Hefeextrakt,10 g/l NaCl Substanzen wurden in ddH_2O gelöst und autoklaviert Für Platten: +15 g/l Agar Zur Selektion: +100 µg/ml Ampicillin
Fibroblastenmedium	DMEM Zusätze: 10% FKS,1% Penicillin/Streptomycin (P/S)

5.1.10 Antibiotikum

Ampicillin-Stammlösung (500x) 50 mg/ml in ddH_2O (Lagerung bei -20 °C)

5.1.11 Puffer und Lösungen

Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Auftrennung)	
TAE (50x)-Puffer	2 M Tris/Acetat pH 8,0 50 mM EDTA
DNA-Agarosegel (0,5- 2%)	0,5-2 g Agarose, gelöst in 100ml TAE (1x)
DNA-Gel-Ladepuffer (4x)	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 40% Saccharose
Ethidiumbromidlösung	0,04% Ethidiumbromid in ddH2O
Lösungen für die Plasmidisolation	
Lösung I	50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA

	RNase A
Lösung II	0,2 M NaOH 1% SDS
Lösung III	60 ml KOAc (5 M) 11,5 ml Eisessig 28,5 ml H2O
Sonstige:	
RNAse A Lösung	10 mM Tris/HCl pH 7,0 10 mg/ml RNAse A

5.2 Methoden

5.2.1 Kultivierung von humanen Fibroblasten

Die verwendeten Fibroblasten wurden in 10 ml DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5% $C0_2$ kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend durch die Inkubation mit 1-1,5 ml einer Trypsin/EDTA Lösung (0,05 bzw. 0,02%) von der Zellkulturflasche gelöst. Die flottierenden Zellen wurden dann in DMEM aufgenommen und für 4 min bei 1200 U/min pelletiert. Das überstehende Medium wurde abgesaugt , die Zellen in DMEM mit FKS resuspendiert, je nach Zellzahl 1:2 bis 1:4 mit Medium verdünnt und in neue Zellkulturflaschen ausgesäht. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte jeden vierten Tag.

5.2.2 Herstellung der *KGF*-Promotor-Plasmide

5.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion wurde erstmals von Kleppe und Kollegen im Jahr 1971 beschrieben (Kleppe et al., 1971). Sie dient der Vervielfältigung genau definierter DNA- Fragmente mit Hilfe einer DNA-Polymerase. Zur Abgrenzung des spezifisch zu amplifizierenden DNA-Abschnitts werden Primer benötigt. Sie werden so gewählt, dass die DNA-Synthese an beiden Strängen gegenläufig erfolgt und genau der DNA-Bereich amplifiziert wird, der zwischen den Primern liegt. Der Ablauf der Polymerasekettenreaktion gliedert sich in drei Reaktionsschritte, welche zyklisch wiederholt werden. Während der Denaturierung wird die DNA-Doppelhelix auf über 90 C erhitzt. Dadurch werden die zwischen den komplementären Nukleinbasen bestehenden Wasserstoffbrückenbindungen gelöst und es kommt zur Trennung der beiden Stränge. In der drauffolgenden Annealing-Phase erfolgt die Anlagerung der

Primer an die jeweils komplementären DNA-Einzelstränge. Die hierfür gewählte Temperatur variiert je nach Primerpaar und muss experimentell bestimmt werden. Während der Elongation lagert sich die DNA-Polymerase an die Primer an und synthetisiert in Gegenwart der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) einen zum Matrizenstrang komplementären Strang. Die Synthese erfolgt immer in 5´- 3´ Richtung und beginnt damit stets am 3´-OH Ende der Primer. Die Temperatur dieses Reaktionsschritts entspricht dem Temperaturoptimum der verwendeten DNA-Polymerase, die Zeit variiert je nach Länge des zu amplifizierenden Produkts. In Abbildung 43 ist das Prinzip der Polymerasekettenreaktion vereinfacht dargestellt.

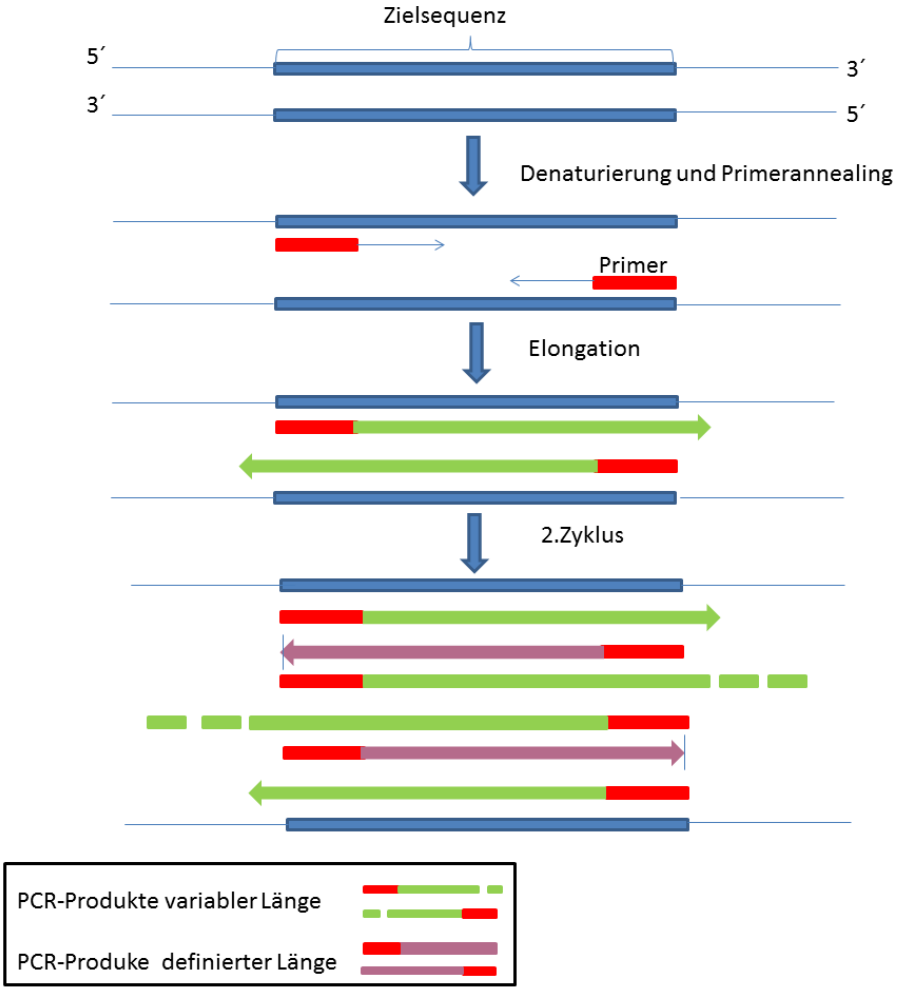


Abbildung 43 Prinzip der Polymerasekettenreaktion: Im ersten PCR-Zyklus entstehen nur PCR-Produkte mit variabler Länge. Bereits im zweiten Zyklus synthetisiert die Polymerase Fragmente von spezifischer Länge, die der Zielsequenz entsprechen. Diese kurzen PCR-Produkte erfahren in den darauffolgenden Zyklen eine exponentielle Vervielfältigung, während die Anzahl der langen Produkte nur linear zunimmt.

Mit Hilfe der PCR wurden die unterschiedlichen *KGF*-Promotorbereiche aus genomischer DNA humaner Fibroblasten bzw. aus bereits vorhandenen *KGF*-Promotor-Plasmiden amplifiziert. Die Wahl der forward und reverse Primer richtete sich nach der spezifischen Sequenz der herzustellenden Konstrukte, jedoch wurde soweit möglich auf wichtige Kriterien für die Erstellung von PCR-Primerpaaren geachtet, wie zum Beispiel ein hoher G/C –Gehalt. Mit Hilfe des Primer designing tools des National Center for Biotechnology Information wurde eine unerwünschte Dimerisierung des gewählten Primerpaars ausgeschlossen. Die Anwendung diente außerdem dazu, Primer mit ähnlicher Schmelztemperatur zu generieren, um eine spezifische Hybridisierung beider Primer zu gewährleisten. Die Spezifität des Primer-Annealing wurde zusätzlich durch Primerlängen von 16 bis 21 bp erhöht.

Das PCR-Reaktionsvolumen von 50 µl enthielt folgende Komponenten: 5 µl 10 x PCR-Puffer (mit $MgCl_2$), 0,5 µl Primer forward, 0,5 µl Primer reverse, 1 µl dNTPs, 0,5 µl Taq®-DNA Polymerase, 10 ng Template DNA und 41,5 µl H_20.

Die Reaktion erfolgte in einem Peltier Thermal Cycler PTC-200 mit beheizbarem Deckel. Das Standardprogramm der Amplifikation begann mit einer initialen Denaturierung (95 °C, 5-8 min), gefolgt von 40 bis 45 Zyklen bestehend aus Denaturierung (95°, 30 sek), Annealing (50 °C-59 °C, 30 sek) und Elongation (72 °C, 50 sek-2 min). Abschließend erfolgte die finale Elongation (72°, 5 min). Sowohl die Annealingtemperatur als auch die Elongationszeit wurden je nach verwendeten Primern modifiziert. Hierbei spielte zum einen die Schmelztemperatur der Primer als auch die Größe des zu erwartenden PCR-Produkts eine Rolle. Die Vervielfältigung erfolgte meist in 40 bis 45 Zyklen. Nach Vollendung der Amplifikation wurden die Proben auf 4 °C herabgekühlt und jeweils 10-20 µl PCR-Produkt gelelektrophoretisch (siehe Punkt 5.2.2.2) aufgetrennt.

5.2.2.2 Gelelektrophorese

Die Größe der erhaltenen PCR-Produkte wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Die Methode beruht darauf, dass geladene Moleküle verschiedener Größe in einem Spannungsfeld durch ein Gel aus Agarose wandern. Das Gel wirkt hierbei als eine Art Sieb. Kleinere negativ geladene Teilchen bewegen sich schneller in Richtung Anode als Größere. Je nach Länge des zu erwartenden DNA-Amplifikats wurden Gele mit unterschiedlichem Agarosegehalt verwendet. 1,8 % - 3 %ige

Agarosegele dienten zur Auftrennung von DNA-Stücken zwischen 100 bp - 200 bp. Für größere Fragmente (500 bp - 12 kb) wurden 0,8- 1,5 % ige Gele verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und in die dafür vorgesehenen Gelschlitten gegossen. Nach Aushärtung der Gele wurden die Proben mit 1/10 Probenpuffer versetzt und anschließend aufgetragen. Um die Größe der Fragmente abschätzen zu können, wurden DNA- Größenstandards (100 bp oder 1 kb) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 10 Volt pro Zentimeter Gellänge. Um die Banden im Anschluss sichtbar zu machen, wurden die Gele für ca. 10 bis 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (0,04 %) inkubiert. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der durch seine interkalierende Eigenschaft in der Molekularbiologie zum Nachweis von Nukleinsäuren eingesetzt wird. Ethidiumbromid lagert sich zwischen die DNA-Basen der Doppelhelix und verändert dabei sein Anregungsspektrum. Die Bestrahlung der Gele mit UV-Licht führt zu einer starken Fluoreszenz des Farbstoffs und zur Visualisierung der DNA-Banden, welche hell aufleuchten.

5.2.2.3 Ligation des PCR-Produkts in den pCR®II-TOPO®-Vektor

Sofern mittels Gelelektrophorese das PCR-Produkt der gewünschten Länge nachgewiesen werden konnte, erfolgte im Anschluss die Ligation des *KGF*-Promotorbereichs in den pCR®II-TOPO®-Vektor mit Hilfe des TOPO® TA Cloning® Kits. Hierbei macht man sich folgende Tatsache zu Nutze. Innerhalb der PCR fügt die Taq®-DNA Polymerase templateunabhängig ein einzelnes Desoxyadenosin an das 3´-Ende des PCR-Amplifikats. Der von der Firma Life technologies bezogene pCR®II-TOPO®-Vektor liegt als linearisiertes Plasmid vor, welches an den 3´-Enden sowohl Desoxythymidin-Überhänge als auch eine kovalent gebundene Topoisomerase I besitzt. Das am 3´Ende des Inserts befindliche Adenosin kann sich nun an den T-Überhang des Vektors anlagern und die Topoisomerase führt zur endgültigen Ligation von Vektor und Insert.

Für die Ligation wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

1 µl frisches PCR-Produkt, 1 µl pCR®II-TOPO®-Vektor, 3 µl Wasser und 1 µl Salzlösung. Die Komponenten wurden vermischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in *E.coli* transformiert.

5.2.2.4 Transformation und Kultivierung von E.coli

Die Transformation der TOPO® -Plasmide erfolgte in One shot chemically competent *E.coli* (TOPO® TA Cloning® Kit) und diente der Vervielfältigung der Plasmid-DNA. Zu Beginn wurden 50 µl *E.coli*-Zellen in gefrorenem Zustand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis aufgetaut. Danach wurden 1 bis 5 µl TOPO®-Ligationsansatz mit der darin enthaltenen Plasmid-DNA hinzugegeben, vorsichtig gemischt und die Suspension 30 min auf Eis inkubiert. Der nachfolgende 30 sekündige Hitzeschock bei 42 °C diente dazu, die bakterielle Zellmembran durchlässig zu machen und damit die Aufnahme der TOPO®-Plasmide ins Zellinnere zu gewährleisten. Im Anschluss daran wurden die Proben 5 min auf Eis abgekühlt, danach 250 µl auf Raumtemperatur erwärmtes SOC-Medium addiert und die Bakterienkultur für eine Stunde im Heizblock bei 37° und 350 U/min geschüttelt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 4000 U/min wurde der Überstand zum Großteil verworfen und das Zellpellet in etwa 100-200 µl Restmedium resuspendiert. Für die Anzucht von *E.coli* auf festem Nährboden wurden ca. 100 µl der Bakteriensuspension mit einem sterilen Trigalsky Spatel auf Agar ausplattiert. Wie in Abbildung 41 ersichtlich enthält der pCR®II-TOPO®-Vektor ein Resistenzgen für Ampicillin. Um eine Selektion der Bakterien, welche ein TOPO®-Plasmid aufgenommen hatten, zu erreichen, wurde die Lösung zur Herstellung von Agarnährböden mit 100 µl Ampicillin versetzt. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37° im Brutschrank. Am Tag darauf wurden einzelne Kolonien mit einer sterilen Spitze von der Agarplatte gepickt und in ein Flüssigmedium eingebracht, welches wiederrum Ampicillin als Selektionsantibiotikum enthielt. Die Inkubation der Flüssigkultur erfolgte über Nacht (15 -16 h) im Bakterienschüttler (250 U/min) bei 37 °C. Bei einer Trübung des Mediums wurde davon ausgegangen, dass sich genügend Bakterien für die anschließende Plasmidisolierung gebildet hatten.

5.2.2.5 Plasmidisolierungen aus E.coli und Restriktionsverdau

Um das Ergebnis der TOPO®-Klonierung zu überprüfen, mussten die in den Bakterien vermehrten Plasmide durch geeignete Präparationsverfahren wieder aus den Zellen isoliert werden. Die Mini- und Midi-Präparation nutzen hierfür das von Birnboim und Doly entwickelte Prinzip der alkalischen Lyse, das in den einzelnen Reaktionsschritten näher erläutert wird (Birnboim and Doly, 1979).

5.2.2.5.1 Mini-Präparation

Das Mini-Präparations-Verfahren diente der Erzeugung kleiner Plasmid-Mengen, die im Anschluss mittels geeignetem Restriktionsverdau getestet wurden und somit der Erfolg oder Misserfolg der TOPO®-Klonierung sichtbar gemacht werden konnte. Hierfür wurde 1 ml der getrübten *E.coli* -Flüssigkultur 3-4 min bei 4000 U/min zentrifugiert und das so erhaltene Pellet mit 100 µl Solution I resuspendiert. Es folgte die 5 minütige Inkubation der Probe auf Eis. Solution I wirkt als neutraler Puffer und enthält eine RNase, die dazu dient störende RNA zu degradieren. Um die Bakterien nun vollständig zu lysieren und den Zellinhalt freizusetzen, wurden 200 µl stark alkalische Solution II zugegeben und das Ganze vorsichtig durchmischt. In diesem Schritt kommt es sowohl zu einer Denaturierung von Proteinen durch das in Solution II enthaltene SDS als auch zu einer Zerstörung der chromosomalen bakteriellen DNA infolge des alkalischen Milieus. Die superhelikale Plasmid DNA wird jedoch nicht degradiert. Dies ist für die spätere Abtrennung der Plasmid-DNA von Proteinen, chromosomaler DNA und anderen zellulären Bestandteilen enorm wichtig. Nach Zugabe von 150 µl Solution III wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Das in Solution III enthaltene Kaliumacetat reagiert mit SDS zu Kaliumdodecylsulfat, das mit denaturierten Proteinen, chromosomaler DNA und bakteriellen Zellabbauprodukten wasserunlösliche Komplexe bildet. Dies ermöglichte in der darauffolgenden Zentrifugation (5 min bei 13000 U/min) die Abtrennung der Plasmide von unerwünschtem bakteriellem Zellmaterial. Die sich im Überstand befindlichen Plasmide wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µl 100 % igem Ethanol gefällt. Dazu wurde der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Plasmid-DNA-Pellet für 10 min in einer Speedvac- Zentrifuge getrocknet. Um die gewonnenen TOPO®-Plasmide schließlich wieder in Lösung zu bringen, wurden 10 µl H_20 addiert und der Ansatz 20 min im Heizblock bei 37 °C geschüttelt.

5.2.2.5.2 Restriktionsverdau der gewonnenen Plasmide

Um den Einbau der *KGF*-Promotorbereiche in den pCR®II-TOPO®-Vektor zu überprüfen, wurden die im Mini-Präparationsverfahren gewonnenen TOPO®-Plasmide mittels geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und die erhaltenen Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf ihre Größe überprüft. Die Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme erfolgte in einem Reaktionsvolumen

von 10 µl. 1 µl Plasmid-DNA (ca. 0,5 µg) wurde mit 5 U des entsprechenden Enzyms, 1 µl des vom Hersteller empfohlenen 10x Reaktionspuffer sowie der benötigten Menge H_20 versetzt und für ca. 75 min bei optimaler Reaktionstemperatur verdaut.

5.2.2.5.3 Midi-Präparation

Zeigte die Testung der im Mini-Präparationsverfahren isolierten Plasmide im Restriktionsverdau ein positives Klonierungsresultat, wurden für sich anschließende Experimente größere Mengen gereinigter Plasmid-DNA benötigt. Hierfür diente die sogenannte Midi-Präparation. Es wurden 50ml steriles LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit Selektionsantibiotikum (Ampicillin) versetzt, mit 100 µl Bakteriensuspension aus einer „positiven“ Flüssigkultur angeimpft und über Nacht im Bakterienschüttler bei 37 °C herangezogen. Die Isolierung und Aufreinigung der TOPO®-Plasmide erfolgte mit dem HiSpeed™ Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen (Hilden). Zunächst wurden 50 ml der Übernachtkultur bei 4000 g für 10 min pelletiert und das Zellpellet anschließend mit 6 ml Puffer P1 resuspendiert. Die Lyse der Bakterien wurde durch Zugabe von 6 ml Puffer P2 erreicht. Der Ansatz wurde hierfür gründlich durchmischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Fällung von Proteinen und chromosomaler DNA wurden dann 6 ml Puffer P3 addiert und wiederrum gut gemixt. Die zehnminütige Inkubation erfolgte in dem dafür vorgesehenen Gefäß („Qiafilter Cartridge“, siehe Abbildung 44). Im nächsten Schritt wurde die Suspension mit Druck über den am Boden des Reaktionsgefäßes befindlichen Filter abgepresst und in ein zuvor mit 4 ml Puffer QBT gespültes Filtergefäß („HiSpeed Midi Tip“, siehe Abbildung 44) überführt. Hierbei erfolgte die Abtrennung unnötiger bakterieller Zellbestandteile, die im Filter des „Quiafilter Cartridge“ verblieben. Der Puffer QBT sorgt für optimale Salz- und pH-Bedingungen, die die spezifische Bindung der in der abgepressten Lösung enthaltenen TOPO®-Plasmide an die Filtermembran des „HiSpeed Midi Tips“ bewirkt. Die im Filter enthaltenen Plasmide wurden dann mit 20 ml Puffer QC gewaschen, mit 5 ml Puffer QF eluiert und mit 3,5 ml Isopropanol gefällt. Die Inkubationszeit für die Fällung betrug 5 min. Um eine weitere Aufreinigung der Plasmid-DNA zu erreichen, erfolgte die spezifische Bindung der Plasmide an die Silika-Membran des „QIAprecipitator“-Filters (siehe Abbildung 44). Die Plasmid-DNA wurde dann mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen und die Membran anschließend getrocknet. Die Eluation der Plasmide

wurde mit 800 µl H_20 durchgeführt und das erhaltene Produkt bei 4 °C gelagert. Im Anschluss an jede Midi-Präparation erfolgte wiederrum ein Restriktionsverdau der Plasmide, um noch einmal den Einbau des gewünschten Inserts zu überprüfen.

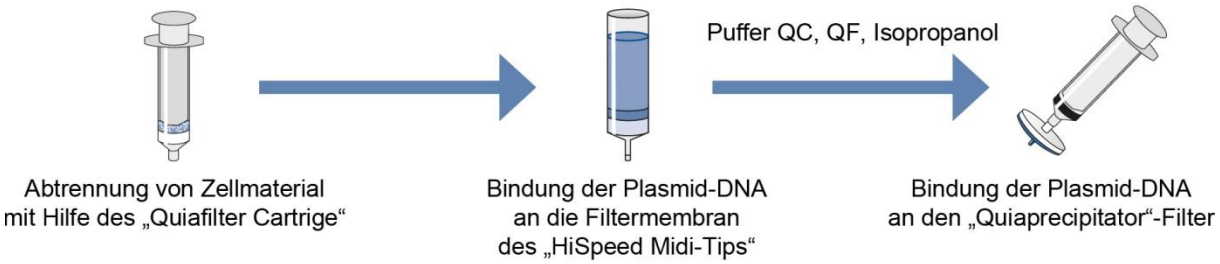


Abbildung 44 Stark vereinfachte Darstellung der HiSpeed Midi-Präparation. Die Abbildungen der speziellen Reaktionsgefäße dienen dem besseren Verständnis der einzelnen Reaktionsschritte. (Internetquelle 9, modifiziert)

5.2.2.6 Sequenzierung der erzeugten TOPO®-Plasmide

Nach Midi-Präparationsverfahren und Restriktionsverdau der TOPO®-Plasmide wurden diese, bei erfolgreichem Einbau der *KGF*-Promotorbereiche, von der Firma Entelechon sequenziert. Die Sequenzierung diente dem Nachweis der spezifischen Inserts im pCR®II-TOPO®-Vektor, sowie der Überprüfung der *KGF*-Promotorbereiche auf unerwünschte Mutationen. Wie aus der Vektorkarte zu entnehmen, wurden hierfür das M13-Primerpaar genutzt (siehe Abbildung 41). Die ermittelte Sequenz wurde mit Hilfe der DNA-Man-Software (Lynnon Corporation, Quebec, Kanada) mit der gewünschten *KGF*-Promotorsequenz verglichen. Bei Übereinstimmung der spezifischen Basensequenzen konnte mit der Umklonierung des Inserts in den pGL4.10 (luc2)Vektor begonnen werden.

5.2.2.7 Umklonierung in den pGL4.10 (luc2) Vektor

Zur Messung der *KGF*-Promotoraktivität in Luciferase-Reportergen-Assays mussten die *KGF*-Promotorbereiche in den pGL4.10 (luc2)Vektor umkloniert werden.

5.2.2.7.1 Restriktionsverdau von Zielvektor und TOPO®-*KGF*-Promotor-Plasmide

Hierfür wurden die erzeugten TOPO®-*KGF*-Promotor-Plasmide und der Ziel-Vektor mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. In einem Reaktionsvolumen von 50 µl wurden jeweils 2-5 µg TOPO®-Plasmid sowie pGL4.10 (luc2)-Vektor eingesetzt. Die Enzymmenge betrug stets 5 U. Es wurden 5 µl 10x Reaktionspuffer verwendet und eine entsprechende Menge H_20 bis zum Erreichen des

Reaktionsvolumens addiert. Der Verdau erfolgte über 75 min bei optimaler Reaktionstemperatur. Im Anschluss daran wurden die Produkte des Enzymverdaus gelelektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten DNA-Banden (eröffneter pGL4.10 (luc2)- Vektor sowie *KGF*-Promotor-Insert) durch Gelextraktion bzw. Glasmilchextraktion isoliert und gereinigt.

5.2.2.7.2 Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Die Isolation des pGL4.10 (luc2)-Vektors sowie der *KGF*-Promotorbereiche aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick® bzw. Qiaex II Gel Extraction Kit der Firma Quiagen (Hilden). Beide Systeme beruhen auf dem gleichen Prinzip: Spezielle hochkonzentrierte Salzlösungen brechen Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Agarosepolymers auf und die eingelagerte DNA geht in Lösung. Die hohe Salzkonzentration der Pufferlösungen sowie ein pH-Wert von < 7,5 führen zur Adsorption der DNA an spezielle Silikapartikel (Qiaex II) bzw. an eine Silikamembran im Falle des QIAquick® Gel Extraction Kits. Durch Zentrifugation und Reinigung der DNA mit geeigneten Waschlösungen werden unerwünschte Agarose- und Pufferbestandteile entfernt. Die Eluation der DNA gelingt durch Zugabe von Lösungen geringer Salzkonzentration, wie zum Beispiel Wasser.

Im Falle des QIAquick® Gel Extraction Kits wurde wie folgt vorgegangen. Die DNA-Banden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und anschließend gewogen. Pro Gelvolumen (100 mg ≙ 100 µl) wurden drei Volumeneinheiten Puffer QG zugegeben und der Ansatz 10 min bei 50 °C inkubiert. Nachdem sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte, wurde eine Volumeneinheit Isopropanol hinzugefügt, die Probe auf das QIAquick –Säulchen gegeben und anschließend 1 min bei 13200 U/min zentrifugiert. Der Unterstand wurde verworfen und die an die Silikamembran gebundene DNA mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Es folgte die einminütige Zentrifugation bei 13200 U/min zur Entfernung des Waschpuffers. Zuletzt wurde die Probe erneut 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert und die DNA mit 20 µl Wasser eluiert.

Für die Extraktion mit Hilfe des Qiaex II Kits wurden die DNA-Banden ebenfalls ausgeschnitten und gewogen. Die Zugabe des Puffers QX1 erfolgte wie oben bereits erwähnt im 3: 1 Verhältnis, jedoch wurden für DNA-Fragmente < 100 bp sechs Volumeneinheiten Puffer benötigt. Nach 30 sekündigem Vortexen wurde die QIAEX

II Suspension nach folgendem Schema zugegeben: Bei kleiner 2 µg DNA erfolgte die Zugabe von 10 µl QIAEX II Suspension, bei 2-10 µg DNA wurden 30 µl QIAEX II Suspension zugegeben und für je weitere 10 µg DNA wurden zusätzlich 30 µl QIAEX II Suspension benötigt. Die Abschätzung erfolgte anhand der im Verdau eingesetzten Menge sowie anhand der Bandenstärke im Agarosegel. Die Probe wurde ebenfalls 10 min bei 50 °C inkubiert und alle zwei Minuten gut durchmischt, um die QIAEX II Suspension in Lösung zu halten und die Bindung der DNA an die Silikapartikel zu gewährleisten. Diese wurden im Anschluss durch eine 30 sekündige Zentrifugation pelletiert und der Überstand verworfen. Für die Reinigung der DNA wurde das Pellet in 500 µl Puffer QXI resuspendiert und anschließend 30 sek bei 13200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und ein weiterer Waschschritt mit 500 µl Puffer PE folgte. Das erhaltene Pellet wurde für 10-15 min luftgetrocknet und mit 20 µl Wasser resuspendiert. Die folgende Inkubationszeit richtete sich nach der Größe der DNA-Fragmente. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde der Ansatz stets für fünf Minuten inkubiert, im Anschluss zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der gewonnenen DNA erfolgte bei 4° C.

5.2.2.7.3 Ligation der *KGF*-Promotorbereiche in den pGL4.10 (luc2) Vektor

Nach der Isolation von Zielvektor und Insert aus dem Agarosegel wurden die DNA-Fragmente wiederrum gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dies diente zum einen der Überprüfung der Gelextraktion zum anderen wurde die für die Ligation benötigte Menge an pGL4.10 (luc2) Vektor und *KGF*-Promotorbereich abgeschätzt. Der Ligationsansatz von 20 µl enthielt: 2 µl T4 DNA Ligase Puffer, 1 µl T4 DNA Ligase, Vektor und Insert im Verhältnis 1: 5 bzw. 1: 6, sowie eine entsprechende Menge H_20.Die Ligation erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 16 °C.

Alle nun folgenden Schritte wurden analog zur obig beschriebenen TOPO®-Klonierung durchgeführt. Unterschiede bei der Generierung der pGL4-*KGF*-Promotor-Plasmide werden nun kurz aufgeführt. Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte in DH 10 beta kompetente *E.coli* der Firma NEB (Ipswich, USA). Nach Transformation in *E.coli*, Isolation durch das Mini-Präparationsverfahren und positivem Klonierungsergebnis im Restriktionsverdau wurden die pGL4 -*KGF*-Promotor-Plasmide im Midi-Präparationsverfahren vermehrt und dann ebenfalls durch Sequenzierung auf unerwünschte Mutationen untersucht. Für die

Sequenzierung des Inserts im pGL4.10 (luc2)-Vektor wurden jeweils die reverse Primer der *KGF*-Promotorbereiche benötigt. Die so generierten pGL4-*KGF*-Promotor-Plasmide wurden dann im Rahmen der Luciferase-Reportergen-Assays zunächst mittels Transfektion in humane Fibroblasten eingebracht.

5.2.3 Transfektion humaner Zellen mit Plasmiden

Im Rahmen der Dissertation wurden humane Fibroblasten mit verschiedenen *KGF*-Promotorplasmiden transfiziert. Die hier angewandte sogenannte Lipofektion nutzt folgendes Prinzip. Negativ geladene Plasmid-DNA bindet an kationische Lipidvesikel, die eine Fusionierung mit der Zellmembran und somit die Aufnahme der DNA in die Zellen ermöglichen. Als Transfektionsreagenz wurde das Lipofectamine™ Reagent LTX der Firma Life technologies (Carlsbad, USA) verwendet. Zusätzlich erfolgte die Kotransfektion eines Renilla Luciferase-Plasmids (pR-LTK), um die Transfektionseffizienz im anschließenden Luciferase-Assay zu kontrollieren. Für die transiente Transfektion wurden die Zellen mit 2 ml Medium in 6-Well Platten ausgesäht (100.000 Zellen pro Well), am darauffolgenden Tag mit frischem Medium versorgt und anschließend transfiziert.

Es wurde stets folgender Reaktionsanatz verwendet:

- Mastermix pro Doppelwell: 5 µl Lipofectamine™ Reagent LTX + 35 µl DMEM ohne FKS
- Probenansatz pro Doppelwell: 1 µg DNA ,1 µl pRLTK,6 µl Lipofectamin plus, ad 34 µl DMEM ohne FKS.

Beide Ansätze wurden 10 min lang inkubiert und anschließend zu gleichen Teilen gemischt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 min wurden pro Well jeweils 40 µl Transfektionsgemisch zugegeben.

5.2.4 Luciferase-Reportergen Assay

Die Messung der *KGF*-Promotoraktivität erfolgte mit Hilfe des Dual-Luciferase® Reporter Assay System der Firma Promega (Madison, USA). Hierfür wurden ausgewählte *KGF*- Promotorbereiche vor das Luciferase-Gen des pGL4.10 (luc2)-Vektors kloniert und die erzeugten Plasmide in Fibroblasten transfiziert. Bei diesem Testsystem verhält sich die Expression des Luciferase-Gens (= Reportergen) proportional zum Aktivierungspotenzial des klonierten Promotorbereichs. Um das

Expressionsprodukt nachzuweisen, macht man sich folgende Eigenschaft des Enzyms Luciferase zu Nutze. In Gegenwart von ATP, Mg^{2+} und O_2 katalysiert das Enzym die oxidative Decarboxylierung des zugesetzten Substrats Luciferin. Die dabei auftretenden Lichtemissionen können im Luminometer gemessen werden (siehe Abbildung 45).

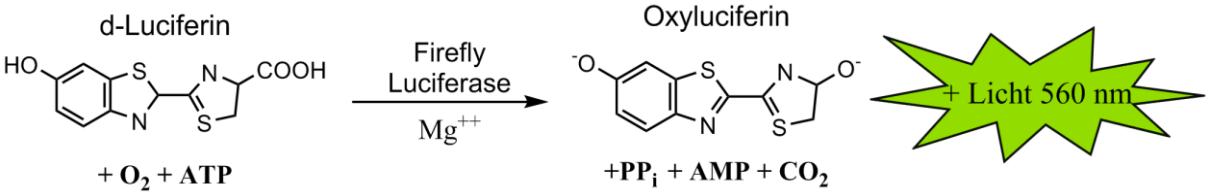


Abbildung 45 Das Enzym Luciferase katalysiert die Reaktion von d-Luciferin zu Oxyluciferin unter Anwesenheit von ATP und O_2. Hierbei entsteht Energie, die in Form von Licht im Spektralbereich von 560nm freigesetzt wird und im Luminometer vermessen werden kann.

Um unterschiedliche Transfektionseffizienzen in einzelnen Versuchsansätzen zu berücksichtigen, werden die Zellen mit einem weiteren Plasmid, das das Luciferase-Gen der Renilla reniforis enthält, kotransfiziert. Die Chemilumineszenz der *Renilla* Luziferase kann ebenfalls im Luminometer erfasst werden. Die Normalisierung der im Assay erhaltenen Werte erfolgt dann in Abhängigkeit der Transfektionseffizienz gemessen an der Renillaaktivität.

Zur Durchführung des Dual-Luciferase® Reporter Assay wurden die Zellen auf einer 6-Well Platte ausgesäht (100 000 Zellen pro Well), wie in Punkt 5.2.3 beschrieben mit den jeweiligen Reportergen-Plasmiden transfiziert und 48 Stunden inkubiert. Das Kulturmedium wurde einmalig nach 24 Stunden gewechselt. Zum Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgegossen und die Zellen mit entionisiertem Wasser gespült. Nach der Zugabe von 300 µl Luciferase-Lysispuffer wurden die Zellen 20 min unter leichtem Schütteln lysiert. Anschließend wurden 50 µl Lysat mit Hilfe der im Kit enthaltenen Substanzen im Luminometer vermessen.

5.2.5 RNA-Analytik

5.2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA und microRNA aus eukaryotischen Zellen

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Fibroblasten wurde das E.Z.N.A.® MicroElute® Total RNA Kit der Firma Omega Bio-Tek (Norcross, USA) verwendet. Die Extraktion von microRNA wurde mit Hilfe des miRNeasy® Mini Kit der Firma

Quiagen (Hilden) durchgeführt. Um das für die RNA bzw. microRNA-Extraktion benötigte Zellpellet zu erhalten, wurden ca. 1x 10^6 konfluent wachsende Zellen mit 5ml PBS gewaschen, anschließend mit einer Trypsin/EDTA Lösung (0,1 % bzw. 0,04 %) von der Oberfläche der Kulturflasche gelöst und 4 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Beide Kit-Systeme nutzen die spezifische Bindung von RNA bzw. microRNA an spezielle Membranen bei der Zentrifugation. Bei der Isolation von RNA bzw. microRNA ist außerdem auf die gezielte Zerstörung von RNAsen zu achten. Im miRNeasy® Mini Kit ist dies durch das im Lysis-Reagenz enthaltene Guanidin-Thiocyanat gewährleistet. Im Falle des E.Z.N.A.® MicroElute® Total RNA Kit musste dem Lysispuffer zu diesem Zwecke Mercaptoethanol zugesetzt werden. Zunächst soll nun die Isolation von Gesamt-RNA beschrieben werden.

Alle im Folgenden genannten Arbeiten wurden unter dem Abzug durchgeführt. Zu Beginn wurde Mercaptoethanol mit RTK-Lysispuffer im Verhältnis 1: 500 verdünnt und das Zellpellet mit 350 µl der hergestellten Lösung homogenisiert. Nach der Zugabe von 350 µl 70 % igem Ethanol zur Fällung der RNA wurde das Lysat kurz gevortext, in das dafür vorgesehene Säulchengefäß überführt und 1 min bei 10000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde die an die Membran gebundene RNA in mehreren Waschschritten gereinigt. Hierfür wurden 500 µl Waschpuffer 1 zugegeben, die Probe 1 min bei 10000 U/min zentrifugiert und der Unterstand verworfen. Gleiches wurde zweimal mit Waschpuffer 2 durchgeführt und das Säulchen dann für 2 min bei 13200 U/min zentrifugiert. Die Gesamt-RNA wurde schließlich mit 40 µl DEPC- Wasser eluiert und bei -20 °C gelagert.

Bei der Extraktion von microRNA wurde folgendermaßen vorgegangen. Die Zellen wurden für fünf Minuten mit 700 µl Qiazol-Lysisreagenz lysiert, anschließend 140 µl Chloroform addiert und das Lysat 15 sekundenlang gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 3 min erfolgte die Zentrifugation bei 12000 U/min und 4 °C. Die Zugabe von Chloroform führt hierbei zu einer Phasentrennung der Probe und das unterschiedliche Lösungsverhalten der einzelnen Zellbestandteile bewirkt, dass diese leicht voneinander separiert werden können. Die in der oberen Phase gelöste microRNA wurde abpipettiert, mit 100 % igem Ethanol gefällt und auf das dafür vorgesehene Säulchen gegeben. Die darauffolgende Zentrifugation wurde 30 sekundenlang bei 8000 U/min durchgeführt und der Unterstand verworfen. Auch hier

folgten dann drei Waschschritte mit zunächst 700 µl RWT-Puffer und dann 500 µl RPE-Puffer (wurde wiederholt). Zentrifugiert wurde dabei jeweils 30 Sekunden bei 8000 U/min. Im Falle der microRNA erfolgte die Eluation schließlich mit 30 µl RNase freiem Wasser. Vor der reversen Transkription wurde die Konzentration aller mRNA-Proben im Nanodrop® Spektralphotometer der Firma Pequlab (Erlangen) vermessen.

5.2.5.2 Extraktion von microRNA aus formalin-fixiertem Parrafingewebe

Die Isolierung von microRNA aus formalin fixiertem Parrafingewebe erfolgte mit Hilfe des miRNeasy® FFPE Kits der Firma Quiagen (Hilden). Pro Parrafinblöckchen wurden je nach Größe der vorliegenden Gewebeprobe etwa 3 bis 5 Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt und diese in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Entfernung des Paraffins erfolgte durch Zugabe von 1 ml Xylol. Nach kurzem Vortexen sowie der 2 minütigen Zentrifugation der Suspension konnte der Überstand verworfen und das gewonnene Pellet in 1 ml Ethanol resuspendiert werden. Die Zugabe von Ethanol diente der kompletten Entfernung von Xylol aus der Probe. Hierfür wurde die Suspension erneut gevortext, zweimalig bei 13 200 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die Proben von Ethanolrückstanden zu befreien, wurden diese mit offenem Deckel für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte je nach Anzahl der verwendeten Schnitte die Zugabe von 150 µl bzw. 240 µl Puffer PKD. Um nun störende Proteine aus der Suspension zu entfernen, wurden 10 µl Proteinase K zugegeben und die Proben 15 min bei 56 °C sowie anschließend 15 min bei 80 °C inkubiert. Nach einer 3 minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Proben 15 min bei 13200 U/min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Pellet blieben unlösbare Gewebebestandteile sowie quervernetze DNA zurück. Der nun folgende DNAse-Verdau dient der Entfernung von DNA aus der Lösung. Hierfür wurden 16 µl bzw. bei der Extraktion von microRNA aus mehr als 2 Gewebeschnitten 25 µl DNase , Booster Puffer sowie 10 µl DNase I Lösung addiert und die Proben 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 320 µl Puffer RBC bzw. 500 µl für > 2 Gewebeschnitte wurden 1120 µl bzw. 1750 µl Ethanol addiert, um eine Fällung der RNA zu erreichen. Im Anschluss wurde das Lysat in 700 µl Schritten in die gegebenen MiniElute Säulchen überführt und bei jedem Schritt 15 sek bei 10000 U/min zentrifugiert. Die nun an die Silikamembran der Säulchen gebundene

microRNA wurde dann zweimal mit 500 µl Puffer RPE gewaschen und dabei einmal 15 sek und im Anschluss 2 min bei 10000 U/min zentrifugiert. Nach einer weiteren fünfminütigen Zentrifugation bei 13200 U/min erfolgte die Eluation der microRNA mit 25 µl H_20 durch einminütige Zentrifugation bei 13200 U/min. Die gewonnene microRNA wurde bei -20 °C gelagert. Für die sich anschließende reverse Transkription der microRNA in cDNA wurde die Konzentration der Proben im Nanodrop® Spektralphotometer (Pequlab, Erlangen) vermessen.

5.2.5.3 Reverse Transkription

Die Umwandlung von mRNA bzw. microRNA in cDNA für Expressionsanalysen wurde mit dem SuperScript™II Reverse Transcriptase Kit der Firma Life technologies (Carlsbad,USA) sowie im Falle von microRNA mit dem miScript Reverse-Transkriptase-Kit der Firma Quiagen (Hilden) durchgeführt. Für die Transkription wurden pro Reaktionsgefäß jeweils 500 ng Gesamt-RNA bzw. 1 µg microRNA eingesetzt. Gesamt-RNA wurde nach folgendem Schema umgeschrieben.

Der Reaktionsansatz von 20 µl enthielt neben 500 ng mRNA, 4 µl First Strand Buffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl dNTPs (10 µM), 1 µl dN6Primer sowie die entsprechende Menge H_20. Um störende RNA zu degradieren, wurden die Proben zunächst 5 min bei 70 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl SuperScript™II Reverse Transcriptase pro Reaktionsgefäß erfolgte die reverse Transkription im Heizblock bei 37° C für 60 min. Die anschließende Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde durch zehnminütige Inkubation bei 70 °C erreicht. Letztlich wurde 1 µl RNAse A hinzugesetzt und der Ansatz 20-30 min bei 37 °C verdaut. Die Transkription von microRNA in cDNA lief wie folgt ab. Es wurde ebenfalls in einem Reaktionsansatz von 20 µl umgeschrieben, der folgende Substanzen beinhaltete: 4 µl miScript RT Buffer, 1 µl miScript Reverse Transcriptase Mix, 1 µg micro-RNA, entsprechende Menge H_20. Die Proben wurden dann für eine Stunde bei 37°inkubiert und anschließend eine fünfminütige Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase bei 95° C durchgeführt. Die in beiden Fällen gewonnene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

5.2.5.4 Transfektion von Fibroblasten mit kleinen RNA-Molekülen

Die Transfektion der Fibroblasten mit microRNA sowie siRNA erfolgte mit Hilfe des HiPerFect Transfektionsreagenz der Firma Qiagen (Hilden). Hierfür wurden 200 000 Zellen pro Well einer 6 –Well Platte in 2,3 ml Medium ausgesäht und noch im

flottierenden Zustand transfiziert. Der Transfektionsansatz pro Well enthielt folgende Substanzen: 5,4 µl microRNA/siRNA, 94,6 µl DMEM ohne FKS und 18 µl HiPerfect Reagenz. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich unter vorsichtigem Schwenken tropfenweise zu den flottierenden Zellen gegeben. Die Zellernte erfolgte nach 24 h durch Abtrypsinieren, Waschen und Pelletieren (4 min bei 4 U/min) der Fibroblasten. Um die Wirkung der eingebrachten micro- bzw. siRNA zu untersuchen wurde im Anschluss RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expression von KGF und weiteren Proteinen im Light Cycler bestimmt.

5.2.5.5 Quantitative Real-Time PCR (qRT- PCR)

mRNA- und microRNA-Expressionsanalysen wurden mit der quantitativen Real-Time PCR durchgeführt, die eine Quantifizierung der PCR-Produkte mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen ermöglicht. Hierfür werden Fluoreszenzfarbstoffe (z. B SYBR-Green) genutzt, deren Fluoreszenz durch die Anlagerung an doppelsträngige DNA zunimmt. Die quantitative Erfassung der Ziel-DNA erfolgt dann in Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzstärke. Verwendet wurden hierbei das LightCycler® II System für microRNA-, bzw. das LightCycler® 480 System von Roche Diagnostics (Mannheim) für RNA-Analysen. Der Nachweis spezifischer microRNA und RNA erfolgte im Anschluss an die reverse Transkription jeweils in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Im Falle der microRNA bestand der Reaktionsansatz aus folgenden Komponenten: 10 µl PCR-Mix, 2 µl Primer universal, 2 µl spezifischer microRNA Primer, 5 µl H_20 und 1 µl cDNA (10ng). Für die Analyse der RNA enthielt der Ansatz: 0,5 µl Primer forward, 0,5 µl Primer reverse, 10 µl Light-Cycler® 480 SYBR Green I Master, 8 µl H_20 und 1 µl cDNA.

Die Reaktion erfolgte im LightCycler® II (microRNA-Expressionsanalyse) bei folgendem Programm:

Initiale Denaturierung	95 °C	15 min
Denaturierung	94 °C	15 sek
Primer Annealing	58 °C	30 sek
Elongation	70 °C	30 sek
Messtemperatur	65°	

Die Reaktion wurde im LightCycler® 480 (mRNA-Expressionsanalyse) bei folgendem Programm durchgeführt.

Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	10 sek
Primer-Annealing	60 °C	10 sek
Elongation	72 °C	20 sek
Messtemperatur	76° - 88 °C	

Als Referenz für die Quantifizierung dienten die Haushaltsgene ß-Actin (RNA-Analyse) und U_6 (microRNA-Analyse), welche bei jedem Lauf mitgeführt wurden. Die Analyse erfolgte mit der zugehörigen Software nach Angaben des Herstellers.

5.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Graph Pad Prism Software(San Diego, USA). Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. Soweit es das Zellwachstum der primären humanen Fibroblasten zuließ, wurden alle Experimente in mindestens zwei unabhängigen Versuchen wiederholt. Beim statistischen Vergleich zweier Gruppen wurde bei $n < 5$ der Mann-Whitney-Test herangezogen. Bei $n > 5$ und Normalverteilung der Daten wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Hierbei gilt: *: $p < 0{,}05$, **: $p < 0.01$, ***:$p < 0{,}001$, ns: nicht signifikant.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
ANA	Antinukleäre Antikörper
ACA	Anti-Zentromer-Antikörper
AP-1	Activator-Protein 1
AP1R	Activator-Protein 1 Related factors
AWMF	*Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.*
bp	Basenpaare
BMP	Bone Morphogenic Protein
BRE	B-Recognition Element
CCL2	CC-Chemokin-Ligand 2
CD	Cluster of Differantiation
cDNA	Complementary DANN
Col	Kollagen Typ
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DCE	Downstream-Core Element
DPE	Downstream-Promoter Element
ddH_20	Bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco´s modified egale medium
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendinitrioltetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAP	Fibroblasten aktivierendes Protein
FFPE	Formalin-Fixed Parrafin Embedded
FGF	Fibroblast Growth Factor
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
gp	Glykoprotein
h	Stunden
HLA	Human Leukocyte Antigen
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule 1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ITGA2	Integrin α 2
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase

kb	Kilobasenpaare
KF	Keloid-Fibroblasten
KGF	Keratinocyte Growth Factor
KGFR	KGF-Rezeptor
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
m	Meter
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
min	Minuten
miR	microRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMPs	Matrix-metalloproteases
mRNA	Messenger RNA
MTE	Motif Ten Element
µ	Mikro (10^{-6})
NF	Normale humane dermale Fibroblasten
nm	Nanometer
ODNs	Oligodesoxynukleotide
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PUVA	Psoralen plus UV-A
RNA	Ribonukleinsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time PCR
SCF	Stem Cell Factor
sek	Sekunden
SF	Systemische Sklerodermie-Fibroblasten
siRNA	Small interference RNA
Smad-Protein	Sma and Mad related protein
SNP	Single-Nukleotid-Polymorphismus
SP-1	Specificity Protein 1
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TF	Transkriptionsfaktor
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TIMPs	Tissue inhibitors of metalloproteases
U	Umdrehungen bzw. Unit
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
°C	Grad Celsius

7 Literaturverzeichnis

Abraira, V.E., Ginty, D.D., 2013. The Sensory Neurons of Touch. Neuron 79, 618–639. doi:10.1016/j.neuron.2013.07.051

Allanore, Y., Dieude, P., Boileau, C., 2010. Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage. Rheumatology 49, 203–210. doi:10.1093/rheumatology/kep368

Ardite, E., Perdiguero, E., Vidal, B., Gutarra, S., Serrano, A.L., Muñoz-Cánoves, P., 2012. PAI-1–regulated miR-21 defines a novel age-associated fibrogenic pathway in muscular dystrophy. J. Cell Biol. 196, 163–175. doi:10.1083/jcb.201105013

Asano, Y., Ihn, H., Yamane, K., Kubo, M., Tamaki, K., 2004. Impaired Smad7-Smurf-mediated negative regulation of TGF-β signaling in scleroderma fibroblasts. J. Clin. Invest. 113, 253–264. doi:10.1172/JCI200416269

Avouac, J., Palumbo, K., Tomcik, M., Zerr, P., Dees, C., Horn, A., Maurer, B., Akhmetshina, A., Beyer, C., Sadowski, A., Schneider, H., Shiozawa, S., Distler, O., Schett, G., Allanore, Y., Distler, J.H.W., 2012. Inhibition of activator protein 1 signaling abrogates transforming growth factor β-mediated activation of fibroblasts and prevents experimental fibrosis. Arthritis Rheum. 64, 1642–1652. doi:10.1002/art.33501

Babalola, O., Mamalis, A., Lev-Tov, H., Jagdeo, J., 2013. The role of microRNAs in skin fibrosis. Arch. Dermatol. Res. 305, 763–776. doi:10.1007/s00403-013-1410-1

Bagabir, R., Byers, R. j., Chaudhry, I. h., Müller, W., Paus, R., Bayat, A., 2012. Site-specific immunophenotyping of keloid disease demonstrates immune upregulation and the presence of lymphoid aggregates. Br. J. Dermatol. 167, 1053–1066. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.11190.x

Bhattacharyya, S., Wei, J., Varga, J., 2011. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. Nat. Rev. Rheumatol. 8, 42–54. doi:10.1038/nrrheum.2011.149

Birben, E., Sackesen, C., Kazani, S., Tincer, G., Karaaslan, C., Durgunsu, B., Gürsel, I., Wechsler, M.E., Israel, E., Kalayci, Ö., 2011. The effects of an insertion in the 5′UTR of the AMCase on gene expression and pulmonary functions. Respir. Med. 105, 1160–1169. doi:10.1016/j.rmed.2011.03.017

Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7, 1513–1523.

Boilly, B., Vercoutter-Edouart, A.S., Hondermarck, H., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., 2000. FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. Cytokine Growth Factor Rev. 11, 295–302.

Brauchle, M., Angermeyer, K., Hübner, G., Werner, S., 1994. Large induction of keratinocyte growth factor expression by serum growth factors and pro-inflammatory cytokines in cultured fibroblasts. Oncogene 9, 3199–3204.

Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolff, H.H., Burgdorf, W.H.C., Landthaler, M., 2005. Dermatologie und Venerologie, 5. Aufl. ed. Springer.

Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., Cohen, S.M., 2005. Principles of microRNA-target recognition. PLoS Biol. 3, e85. doi:10.1371/journal.pbio.0030085

Brown, J.J., Ollier, W.E.R., Thomson, W., Bayat, A., 2008. Positive association of HLA-DRB1*15 with keloid disease in Caucasians. Int. J. Immunogenet. 35, 303–307. doi:10.1111/j.1744-313X.2008.00780.x

Canady, J., Arndt, S., Karrer, S., Bosserhoff, A.K., 2013. Increased KGF expression promotes fibroblast activation in a double paracrine manner resulting in cutaneous fibrosis. J. Invest. Dermatol. 133, 647–657. doi:10.1038/jid.2012.389

Chedid, M., Rubin, J.S., Csaky, K.G., Aaronson, S.A., 1994. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1. J. Biol. Chem. 269, 10753–10757.

Chodon, T., Sugihara, T., Igawa, H.H., Funayama, E., Furukawa, H., 2000. Keloid-derived fibroblasts are refractory to Fas-mediated apoptosis and neutralization of autocrine transforming growth factor-beta1 can abrogate this resistance. Am. J. Pathol. 157, 1661–1669.

Chung, K.-Y., Agarwal, A., Uitto, J., Mauviel, A., 1996. An AP-1 Binding Sequence Is Essential for Regulation of the Human 2(I) Collagen (COL1A2) Promoter Activity by Transforming Growth Factor-. J. Biol. Chem. 271, 3272–3278. doi:10.1074/jbc.271.6.3272

Chung, L., Lin, J., Furst, D.E., Fiorentino, D., 2006. Systemic and localized scleroderma. Clin. Dermatol. 24, 374–392. doi:10.1016/j.clindermatol.2006.07.004

De Gobbi, M., Viprakasit, V., Hughes, J.R., Fisher, C., Buckle, V.J., Ayyub, H., Gibbons, R.J., Vernimmen, D., Yoshinaga, Y., de Jong, P., Cheng, J.-F., Rubin, E.M., Wood, W.G., Bowden, D., Higgs, D.R., 2006. A regulatory SNP causes a human genetic disease by creating a new transcriptional promoter. Science 312, 1215–1217. doi:10.1126/science.1126431

Derynck, R., Zhang, Y., Feng, X.-H., 1998. Transcriptional Activators of TGF-β Responses: Smads. Cell 95, 737–740. doi:10.1016/S0092-8674(00)81696-7

Fett, N., Werth, V.P., 2011a. Update on morphea: Part I. Epidemiology, clinical presentation, and pathogenesis. J. Am. Acad. Dermatol. 64, 217–228. doi:10.1016/j.jaad.2010.05.045

Fett, N., Werth, V.P., 2011b. Update on morphea: Part II. Outcome measures and treatment. J. Am. Acad. Dermatol. 64, 231–242. doi:10.1016/j.jaad.2010.05.046

Finch, P.W., Lengel, C., Chedid, M., 1995. Cloning and characterization of the promoter region of the human keratinocyte growth factor gene. J. Biol. Chem. 270, 11230–11237. doi:10.1074/jbc.270.19.11230

Finch, P.W., Rubin, J.S., Miki, T., Ron, D., Aaronson, S.A., 1989. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. Science 245, 752–755.

Fleischmajer, R., Perlish, J.S., Reeves, J.R.T., 1977. Cellular infiltrates in scleroderma skin. Arthritis Rheum. 20, 975–984. doi:10.1002/art.1780200410

Funayama, E., Chodon, T., Oyama, A., Sugihara, T., 2003. Keratinocytes Promote Proliferation and Inhibit Apoptosis of the Underlying Fibroblasts: An Important Role in the Pathogenesis of Keloid. J. Invest. Dermatol. 121, 1326–1331. doi:10.1111/j.1523-1747.2003.12572.x

Gao, Z., Wang, Z., Shi, Y., Lin, Z., Jiang, H., Hou, T., Wang, Q., Yuan, X., Zhao, Y., Wu, H., Jin, Y., 2006. Modulation of collagen synthesis in keloid fibroblasts by silencing Smad2 with siRNA. Plast. Reconstr. Surg. 118, 1328–1337. doi:10.1097/01.prs.0000239537.77870.2c

Gauglitz, G.G., Korting, H.C., Pavicic, T., Ruzicka, T., Jeschke, M.G., 2011. Hypertrophic Scarring and Keloids: Pathomechanisms and Current and Emerging Treatment Strategies. Mol. Med. 17, 113–125. doi:10.2119/molmed.2009.00153

Gershenzon, N.I., Ioshikhes, I.P., 2005. Synergy of human Pol II core promoter elements revealed by statistical sequence analysis. Bioinformatics 21, 1295–1300. doi:10.1093/bioinformatics/bti172

Ghazizadeh, M., Tosa, M., Shimizu, H., Hyakusoku, H., Kawanami, O., 2006. Functional Implications of the IL-6 Signaling Pathway in Keloid Pathogenesis. J. Invest. Dermatol. 127, 98–105. doi:10.1038/sj.jid.5700564

Hay, C.W., Watt, K., Hunter, I., Lavery, D.N., MacKenzie, A., McEwan, I.J., 2014. Negative Regulation of the Androgen Receptor Gene Through a Primate-Specific Androgen Response Element Present in the 5' UTR. Horm. Cancer. doi:10.1007/s12672-014-0185-y

Honda, N., Jinnin, M., Kajihara, I., Makino, T., Makino, K., Masuguchi, S., Fukushima, S., Okamoto, Y., Hasegawa, M., Fujimoto, M., Ihn, H., 2012. TGF-β–Mediated Downregulation of MicroRNA-196a Contributes to the Constitutive Upregulated Type I Collagen Expression in Scleroderma Dermal Fibroblasts. J. Immunol. 188, 3323–3331. doi:10.4049/jimmunol.1100876

Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I.K., Preiss, T., 2005. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 16961–16966. doi:10.1073/pnas.0506482102

Hwa, C., Bauer, E.A., Cohen, D.E., 2011. Skin biology. Dermatol. Ther. 24, 464–470. doi:10.1111/j.1529-8019.2012.01460.x

Ihn, H., Yamane, K., Kubo, M., Tamaki, K., 2001. Blockade of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor beta receptors. Arthritis Rheum. 44, 474–480. doi:10.1002/1529-0131(200102)44:2<474::AID-ANR67>3.0.CO;2-#

Jelaska, A., Korn, J.H., 2000. Role of apoptosis and transforming growth factor β1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 43, 2230–2239. doi:10.1002/1529-0131(200010)43:10<2230::AID-ANR10>3.0.CO;2-8

Jinnin, M., 2010. Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis. J. Dermatol. 37, 11–25. doi:10.1111/j.1346-8138.2009.00738.x

Kadonaga, J.T., 2012. Perspectives on the RNA Polymerase II Core Promoter. Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. 1, 40–51. doi:10.1002/wdev.21

Kappelmann, M., Bosserhoff, A., Kuphal, S., 2014. AP-1/c-Jun transcription factors: Regulation and function in malignant melanoma. Eur. J. Cell Biol., Special issue Melanoma Research 93, 76–81. doi:10.1016/j.ejcb.2013.10.003

Kappelmann, M., Kuphal, S., Meister, G., Vardimon, L., Bosserhoff, A.-K., 2013. MicroRNA miR-125b controls melanoma progression by direct regulation of c-Jun protein expression. Oncogene 32, 2984–2991. doi:10.1038/onc.2012.307

Kashiyama, K., Mitsutake, N., Matsuse, M., Ogi, T., Saenko, V.A., Ujifuku, K., Utani, A., Hirano, A., Yamashita, S., 2012. miR-196a Downregulation Increases the Expression of Type I and III Collagens in Keloid Fibroblasts. J. Invest. Dermatol. 132, 1597–1604. doi:10.1038/jid.2012.22

Khan, K., Xu, S., Nihtyanova, S., Derrett-Smith, E., Abraham, D., Denton, C.P., Ong, V.H., 2012. Clinical and pathological significance of interleukin 6

overexpression in systemic sclerosis. Ann. Rheum. Dis. 71, 1235–1242. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200955

Kim, C.W., Suh, S.I., Sung, S.H., Lee, I.K., Lee, K.S., 2005. A transcriptional factor decoy against AP-1 suppresses TGF-β1-induced type I collagen gene expression in cultured keloid fibroblasts. J. Dermatol. Sci. 37, 49–51. doi:10.1016/j.jdermsci.2004.09.008

Kim, V.N., Han, J., Siomi, M.C., 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10, 126–139. doi:10.1038/nrm2632

Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., Khorana, H.G., 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. J. Mol. Biol. 56, 341–361.

Krieg, T., Takehara, K., 2009. Skin disease: a cardinal feature of systemic sclerosis. Rheumatology 48, iii14–iii18. doi:10.1093/rheumatology/kep108

Kuroda, K., Shinkai, H., 1997. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. Arch. Dermatol. Res. 289, 567–572.

Kurzinski, K., Torok, K.S., 2011. Cytokine profiles in localized scleroderma and relationship to clinical features. Cytokine 55, 157–164. doi:10.1016/j.cyto.2011.04.001

Leitenberger JJ, Cayce RL, Haley RW, Adams-Huet B, Bergstresser PR, Jacobe HT, 2009. Distinct autoimmune syndromes in morphea: A review of 245 adult and pediatric cases. Arch. Dermatol. 145, 545–550. doi:10.1001/archdermatol.2009.79

Liang, C.-J., Yen, Y.-H., Hung, L.-Y., Wang, S.-H., Pu, C.-M., Chien, H.-F., Tsai, J.-S., Lee, C.-W., Yen, F.-L., Chen, Y.-L., 2013. Thalidomide inhibits fibronectin production in TGF-β1-treated normal and keloid fibroblasts via inhibition of the p38/Smad3 pathway. Biochem. Pharmacol. 85, 1594–1602. doi:10.1016/j.bcp.2013.02.038

Li, H., Yang, R., Fan, X., Gu, T., Zhao, Z., Chang, D., Wang, W., Wang, C., 2012. MicroRNA array analysis of microRNAs related to systemic scleroderma. Rheumatol. Int. 32, 307–313. doi:10.1007/s00296-010-1615-y

Louafi, F., Martinez-Nunez, R.T., Sanchez-Elsner, T., 2010. MicroRNA-155 Targets SMAD2 and Modulates the Response of Macrophages to Transforming Growth Factor-? J. Biol. Chem. 285, 41328–41336. doi:10.1074/jbc.M110.146852

Lüllmann-Rauch, R., 2011. Taschenlehrbuch Histologie. Georg Thieme Verlag.

Lu, W.-S., Wang, J.-F., Yang, S., Xiao, F.-L., Quan, C., Cheng, H., Wang, P.-G., Zhang, A.-P., Cai, L.-Q., Zhang, X.-J., 2008. Association of HLA-DQA1 and DQB1 alleles with keloids in Chinese Hans. J. Dermatol. Sci. 52, 108–117. doi:10.1016/j.jdermsci.2008.04.010

Maas-Szabowski, N., Stark, H.-J., Fusenig, N.E., 2000. Keratinocyte Growth Regulation in Defined Organotypic Cultures Through IL-1-Induced Keratinocyte Growth Factor Expression in Resting Fibroblasts. J. Invest. Dermatol. 114, 1075–1084. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00987.x

Marchese, C., Chedid, M., Dirsch, O.R., Csaky, K.G., Santanelli, F., Latini, C., LaRochelle, W.J., Torrisi, M.R., Aaronson, S.A., 1995. Modulation of keratinocyte growth factor and its receptor in reepithelializing human skin. J. Exp. Med. 182, 1369–1376.

Martínez-Hernández, E., González-Ramírez, R., Sandoval, A., Cisneros, B., Delgado-Lezama, R., Felix, R., 2013. Isolation and characterization of the 5´-upstream region of the human voltage-gated Ca2+ channel α2δ-1 auxiliary subunit gene: promoter analysis and regulation by transcription factor Sp1. Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol. 465, 819–828. doi:10.1007/s00424-012-1194-8

Maston, G.A., Evans, S.K., Green, M.R., 2006. Transcriptional regulatory elements in the human genome. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 7, 29–59. doi:10.1146/annurev.genom.7.080505.115623

Mierau, R., Moinzadeh, P., Riemekasten, G., Melchers, I., Meurer, M., Reichenberger, F., Buslau, M., Worm, M., Blank, N., Hein, R., Muller-Ladner, U., Kuhn, A., Sunderkotter, C., Juche, A., Pfeiffer, C., Fiehn, C., Sticherling, M., Lehmann, P., Stadler, R., Schulze-Lohoff, E., Seitz, C., Foeldvari, I., Krieg, T., Genth, E., Hunzelmann, N., 2011. Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German network for systemic scleroderma: correlation with characteristic clinical features. Arthritis Res. Ther. 13, R172. doi:10.1186/ar3495

Moll, I., 2010. Dermatologie. Thieme, Stuttgart.

Montagner, S., Orlandi, E.M., Merante, S., Monticelli, S., 2013. The role of miRNAs in mast cells and other innate immune cells. Immunol. Rev. 253, 12–24. doi:10.1111/imr.12042

Mukhopadhyay, A., Khoo, A., Cheong, H.H., Chan, S.Y., Aalami, O., Lim, I.J., Phan, T.T., 2007. Targeting of Sp1 transcription factor: a novel therapeutic approach for Keloids, an in vitro analysis. Exp. Dermatol. 16, 1023–1031. doi:10.1111/j.1600-0625.2007.00627.x

Needleman, B.W., Choi, J., Burrows-Mezu, A., Fontana, J.A., 1990. Secretion and binding of transforming growth factor beta by scleroderma and normal dermal fibroblasts. Arthritis Rheum. 33, 650–656.

Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G., Goldfarb, M., 1996. Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family. J. Biol. Chem. 271, 15292–15297. doi:10.1074/jbc.271.25.15292

Passos, C., Werneck, C., Onofre, G., Pagani, E., Filgueira, A., Silva, L.-C., 2003. Comparative biochemistry of human skin: glycosaminoglycans from different body sites in normal subjects and in patients with localized scleroderma. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 17, 14–19. doi:10.1046/j.1468-3083.2003.00576.x

Peterson, L.S., Nelson, A.M., Su, W.P., Mason, T., O'Fallon, W.M., Gabriel, S.E., 1997. The epidemiology of morphea (localized scleroderma) in Olmsted County 1960-1993. J. Rheumatol. 24, 73–80.

Pierce, G.F., Yanagihara, D., Klopchin, K., Danilenko, D.M., Hsu, E., Kenney, W.C., Morris, C.F., 1994. Stimulation of all epithelial elements during skin regeneration by keratinocyte growth factor. J. Exp. Med. 179, 831–840.

Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., Filipowicz, W., 2005. Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells. Science 309, 1573–1576. doi:10.1126/science.1115079

Pottier, N., Maurin, T., Chevalier, B., Puissegur, M.-P., Lebrigand, K., Robbe-Sermesant, K., Bertero, T., Lino Cardenas, C.L., Courcot, E., Rios, G., Fourre, S., Lo-Guidice, J.-M., Marcet, B., Cardinaud, B., Barbry, P., Mari, B., 2009. Identification of Keratinocyte Growth Factor as a Target of microRNA-155 in

Lung Fibroblasts: Implication in Epithelial-Mesenchymal Interactions. PLoS ONE 4. doi:10.1371/journal.pone.0006718

Profyris, C., Tziotzios, C., Do Vale, I., 2012. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics: Part I. The molecular basis of scar formation. J. Am. Acad. Dermatol. 66, 1–10. doi:10.1016/j.jaad.2011.05.055

Reich, N., Tomcik, M., Zerr, P., Lang, V., Dees, C., Avouac, J., Palumbo, K., Horn, A., Akhmetshina, A., Beyer, C., Xie, W., Bennett, B.L., Distler, O., Schett, G., Distler, J.H.W., 2012. Jun N-terminal kinase as a potential molecular target for prevention and treatment of dermal fibrosis. Ann. Rheum. Dis. 71, 737–745. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200412

Roeder, R.G., 1996. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. Trends Biochem. Sci. 21, 327–335.

Sakamoto, S., Yazawa, T., Baba, Y., Sato, H., Kanegae, Y., Hirai, T., Saito, I., Goto, T., Kurahashi, K., 2011. Keratinocyte Growth Factor Gene Transduction Ameliorates Pulmonary Fibrosis Induced by Bleomycin in Mice. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 45, 489–497. doi:10.1165/rcmb.2010-0092OC

Santucci, M., Borgognoni, L., Reali, U.M., Gabbiani, G., 2001. Keloids and hypertrophic scars of Caucasians show distinctive morphologic and immunophenotypic profiles. Virchows Arch. Int. J. Pathol. 438, 457–463.

Scheller, J., Grötzinger, J., Rose-John, S., 2006. Updating interleukin-6 classic- and trans-signaling. Signal Transduct. 6, 240–259. doi:10.1002/sita.200600086

Seifert, O., Mrowietz, U., 2009. Keloid scarring: bench and bedside. Arch. Dermatol. Res. 301, 259–272. doi:10.1007/s00403-009-0952-8

Shaulian, E., Karin, M., 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. Oncogene 20, 2390–2400. doi:10.1038/sj.onc.1204383

Sing, T., Jinnin, M., Yamane, K., Honda, N., Makino, K., Kajihara, I., Makino, T., Sakai, K., Masuguchi, S., Fukushima, S., Ihn, H., 2012. microRNA-92a expression in the sera and dermal fibroblasts increases in patients with scleroderma. Rheumatology 51, 1550–1556. doi:10.1093/rheumatology/kes120

Sinnathurai, P., Schrieber, L., 2013. Treatment of Raynaud phenomenon in systemic sclerosis. Intern. Med. J. 43, 476–483. doi:10.1111/imj.12082

Sinno, H., Prakash, S., 2013. Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review. Plast. Surg. Int. 2013. doi:10.1155/2013/146764

Smale, S.T., Kadonaga, J.T., 2003. The Rna Polymerase Ii Core Promoter. Annu. Rev. Biochem. 72, 449–479. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161520

Song, J., Liu, P., Yang, Z., Li, L., Su, H., Lu, N., Peng, Z., 2012. MiR-155 negatively regulates c-Jun expression at the post-transcriptional level in human dermal fibroblasts in vitro: implications in UVA irradiation-induced photoaging. Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. 29, 331–340. doi:10.1159/000338488

Staiano-Coico, L., Krueger, J.G., Rubin, J.S., D'limi, S., Vallat, V.P., Valentino, L., Fahey, T., 3rd, Hawes, A., Kingston, G., Madden, M.R., 1993. Human keratinocyte growth factor effects in a porcine model of epidermal wound healing. J. Exp. Med. 178, 865–878.

Steiling, H., Werner, S., 2003. Fibroblast growth factors: key players in epithelial morphogenesis, repair and cytoprotection. Curr. Opin. Biotechnol. 14, 533–537. doi:10.1016/j.copbio.2003.08.003

Szabowski, A., Maas-Szabowski, N., Andrecht, S., Kolbus, A., Schorpp-Kistner, M., Fusenig, N.E., Angel, P., 2000. c-Jun and JunB Antagonistically Control Cytokine-Regulated Mesenchymal–Epidermal Interaction in Skin. Cell 103, 745–755. doi:10.1016/S0092-8674(00)00178-1

Takehara, K., Sato, S., 2005. Localized scleroderma is an autoimmune disorder. Rheumatology 44, 274–279. doi:10.1093/rheumatology/keh487

Teofoli, P., Barduagni, S., Ribuffo, M., Campanella, A., De Pita', O., Puddu, P., 1999. Expression of Bcl-2, p53, c-jun and c-fos protooncogenes in keloids and hypertrophic scars. J. Dermatol. Sci. 22, 31–37.

Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., Zamore, P.D., 2004. A protein sensor for siRNA asymmetry. Science 306, 1377–1380. doi:10.1126/science.1102755

Tomimura, S., Ogawa, F., Iwata, Y., Komura, K., Hara, T., Muroi, E., Takenaka, M., Shimizu, K., Hasegawa, M., Fujimoto, M., Sato, S., 2008. Autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with localized scleroderma. J. Dermatol. Sci. 52, 47–54. doi:10.1016/j.jdermsci.2008.04.013

Tsujita-Kyutoku, M., Uehara, N., Matsuoka, Y., Kyutoku, S., Ogawa, Y., Tsubura, A., 2005. Comparison of Transforming Growth Factor-β/Smad Signaling between Normal Dermal Fibroblasts and Fibroblasts derived from Central and Peripheral Areas of Keloid Lesions. In Vivo 19, 959–963.

Ulrich, D., Ulrich, F., Unglaub, F., Piatkowski, A., Pallua, N., 2010. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with different types of scars and keloids. J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg. JPRAS 63, 1015–1021. doi:10.1016/j.bjps.2009.04.021

Verhaegen, P.D.H.M., van Zuijlen, P.P.M., Pennings, N.M., van Marle, J., Niessen, F.B., van der Horst, C.M.A.M., Middelkoop, E., 2009. Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis. Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc. 17, 649–656. doi:10.1111/j.1524-475X.2009.00533.x

Verrecchia, F., Chu, M.-L., Mauviel, A., 2001. Identification of Novel TGF-β/Smad Gene Targets in Dermal Fibroblasts using a Combined cDNA Microarray/Promoter Transactivation Approach. J. Biol. Chem. 276, 17058–17062. doi:10.1074/jbc.M100754200

Wang, X., Liu, Y., Chen, X., Zhang, M., Xiao, Z., 2013. Impact of MiR-21 on the expression of FasL in the presence of TGF-β1. Aesthetic Surg. J. Am. Soc. Aesthetic Plast. Surg. 33, 1186–1198. doi:10.1177/1090820X13511969

Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R., 2010. Watson Molekularbiologie - Das molekulare Grundwissen der Biologie, Auflage: 6., aktualisierte Auflage. ed. Pearson Studium, München.

Werner, S., 1998. Keratinocyte Growth Factor: A Unique Player in Epithelial Repair Processes. Cytokine Growth Factor Rev. 9, 153–165. doi:10.1016/S1359-6101(98)00010-0

Werner, S., Grose, R., 2003. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. Physiol. Rev. 83, 835–870.

Werner, S., Peters, K.G., Longaker, M.T., Fuller-Pace, F., Banda, M.J., Williams, L.T., 1992. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 6896–6900.

Werner, S., Smola, H., Liao, X., Longaker, M.T., Krieg, T., Hofschneider, P.H., Williams, L.T., 1994. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. Science 266, 819–822.

Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G., 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell 75, 855–862. doi:10.1016/0092-8674(93)90530-4

Wolfram, D., Tzankov, A., Pülzl, P., Piza-Katzer, H., 2009. Hypertrophic scars and keloids--a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management. Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg. Al 35, 171–181. doi:10.1111/j.1524-4725.2008.34406.x

Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., Massagué, J., 1994. Mechanism of activation of the TGF-β receptor. Nature 370, 341–347. doi:10.1038/370341a0

Yang, X., Wang, J., Guo, S.-L., Fan, K.-J., Li, J., Wang, Y.-L., Teng, Y., Yang, X., 2011. miR-21 Promotes Keratinocyte Migration and Re-epithelialization During Wound Healing. Int. J. Biol. Sci. 7, 685–690.

Zhu, H., Li, Y., Qu, S., Luo, H., Zhou, Y., Wang, Y., Zhao, H., You, Y., Xiao, X., Zuo, X., 2012. MicroRNA expression abnormalities in limited cutaneous scleroderma and diffuse cutaneous scleroderma. J. Clin. Immunol. 32, 514–522. doi:10.1007/s10875-011-9647-y

Zhu, H., Luo, H., Li, Y., Zhou, Y., Jiang, Y., Chai, J., Xiao, X., You, Y., Zuo, X., 2013. MicroRNA-21 in scleroderma fibrosis and its function in TGF-β-regulated fibrosis-related genes expression. J. Clin. Immunol. 33, 1100–1109. doi:10.1007/s10875-013-9896-z

Zwischenberger, B.A., Jacobe, H.T., 2011. A systematic review of morphea treatments and therapeutic algorithm. J. Am. Acad. Dermatol. 65, 925–941. doi:10.1016/j.jaad.2010.09.006

Internetquellen:

1. http://skincare.dermis.net/content/e01aufbau/e660/e662/index_ger.html (abgerufen am 25.05.2015)

2. http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=32582 (abgerufen am 25.05.2015)

3.http://www.globalskinatlas.com/imagedetail.cfm?topLevelID=938&imageID=2223&did=458 (abgerufen am 25.05.2015)

4. http://www.journalmed.de/aktuellview.php?id=685 (abgerufen am 25.05.2015)

5.http://www.pvri.info/content/microrna-biogenesis-and-rna-induced-gene-silencing-0#.VGZeDclARKo (abgerufen am 25.05.2015)

6. http://www.pancreapedia.org/pathways/tgfbeta-smad (abgerufen am 25.05.2015)

7. https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/vectors/pcriitopo_map.pdf (abgerufen am 25.05.2015)

8.https://www.promega.de/~/media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/a/pgl4%2010%20vector.pdf (abgerufen am 25.05.2015)

9. https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=5a63b6b2-7fd7-4fbf-b3cd-e50d8270fea1&lang=en, HighSpeed Plasmid Purification Handbook May 2012. (abgerufen am 25.05.2015)

8 Danksagung

Mein großer Dank gilt zunächst Prof. Dr. Anja Boßerhoff, die mir ein äußerst interessantes und vielseitiges Dissertationsthema gestellt hat. Frau Boßerhoff bot mir die Möglichkeit, ein halbes Jahr lang in einer großen wissenschaftlich sehr erfolgreichen Arbeitsgruppe tätig zu sein und mir dort unter hervorragender Betreuung eine Vielzahl an molekularen Methoden anzueignen. Die wöchentlich stattfindenden Besprechungen während meiner Datenerhebung boten ausreichend Platz für Rückfragen, Erklärungen und die weitere Planung meines Projekts. Auch in der Zeit der graphischen Darstellung meiner Ergebnisse und schriftlichen Ausarbeitung meiner Dissertation konnte ich auf ihre kompetente Unterstützung bauen. Durch regen Kontakt konnten wir anfallende Probleme oder Fragen schnell klären, was mir meine Arbeit enorm erleichtert hat. Die Erfahrungen, die ich während meiner Promotion sammeln konnte, werden mir sicherlich in Zukunft in meiner Tätigkeit als Ärztin von großem Vorteil und Nutzen sein.

Ganz außerordentlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Betreuerin Frau Dr. Johanna Canady, die mir zu jeder Tages- und auch Nachtzeit mit Rat und Tat zu Seite stand und mir eine wunderbare, lehrreiche und angenehme Zeit in der AG Boßerhoff bereitet hat. Vielen herzlichen Dank, liebe Johanna, für die tolle Einarbeitung in den Laboralltag, dein stetes Bemühen um mein Projekt trotz vielfältiger anderer Aufgaben und deine aufbauenden und stärkenden Worte.

Des Weiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern der gesamten AG Boßerhoff, die mich schnell als vollwertiges Mitglied der Arbeitsgruppe akzeptiert haben und ich mich dadurch problemlos in das bestehende Team integrieren konnte. Alle waren stets darum bemüht, meine Fragen zu beantworten und mich tatkräftig zu unterstützen. Hervorzuheben sind hier besonders meine Labormitstreiterinnen Katharina Limm und Susanne Wallner. Die Zeit in der AG Boßerhoff war nicht nur äußerst lehrreich. Ich habe hier auch neue Freundschaften knüpfen können und möchte mich ganz herzlichst für die vielen schönen, lustigen und albernen Pausen im „Kämmerchen“ oder auf der Sonnenterrasse bedanken. Liebe Lena, Mona, Kathi, Susanne, Miriam, Corinna und Melli, ihr seid ein tolles Team und ich wünsche euch für die Zukunft alles Gute.

Zu guter Letzt will ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Ihr hattet stets ein offenes Ohr für mich und fandet immer die richtigen aufbauende Worte, wenn ich manchmal an mir und meinem Projekt gezweifelt habe.

Meinem Freund Dominik möchte ich hier gesondert danken, der mir in schweren Phasen immer wieder neue Kraft und Vertrauen in mich selbst gegeben hat.

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Christiane Schellenberger, geboren am 06.01.1988 in Amberg, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Regensburg, Juni 2015 ……

Christiane Schellenberger