

Das Zusammenspiel von Interleukin-11 und Transforming Growth Factor-Beta in der
Fibroseantwort auf humanen Fibroblastenzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Johanna Hunold
aus Leinefelde

Gießen, 2023

Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Abteilung Experimentelle Kardiologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Priv.-Dozent Dr. phil. nat. Christian Troidl

Gutachter: Prof. Dr. Eberhard Uhl

Tag der Disputation: 25.04.2024

In memoriam Dr. Friedbert Hunold (1958 – 1998)

„Und wenn ich Weissagung hätte und alle Geheimnisse wüsste und alle Erkenntnis,
wenn ich allen Glauben besäße, sodass ich Berge versetzte und hätte der Liebe nicht, so
wäre ich nichts.“ *1. Korinther 13,2*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	7
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen und Herzinsuffizienz	7
1.2 Pathomechanismen der Fibrose	8
1.3 Fibroblasten.....	10
1.4 Myofibroblasten	10
1.5 Transforming Growth Factor Beta.....	11
1.5.1 Signaltransduktion durch TGF- β	12
1.5.2 Funktionen von TGF- β	13
1.6 IL-11	14
1.6.1 Signaltransduktion durch IL-11	15
1.6.2 Hyper-IL-11 und <i>trans signalling</i>	16
1.6.3 Funktionen von IL-11	17
1.7 Zielsetzung	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.2 Methoden	27
2.2.1 Zellkultur	27
2.2.2 Transfektion der Zellen	28
2.2.3 Proteinextraktion	28
2.2.4 SDS-Gelelektrophorese	29
2.2.5 Western Blot.....	29
2.2.6 Immunfluoreszenz	30
2.2.7 RNA-Isolation	30
2.2.8 cDNA-Synthese.....	31
2.2.9 Quantitative Real Time PCR.....	32
2.2.10 Statistische Analyse	32

3 Ergebnisse.....	33
3.1 TGF- β -Stimulation humaner Fibroblastenzellen	33
3.2 Signaltransduktion durch IL-11, Hyper-IL-11 und TGF- β	34
3.3 Transkription von <i>TGFB1</i>	35
3.4 Einfluss von IL-11, Hyper-IL-11 und TGF- β auf Strukturproteine	36
3.4.1 Transkription von <i>ACTA2</i>	36
3.4.2 Proteinexpression von α -SMA	37
3.4.3 Expression der Fibronectin-mRNA	39
3.4.4 Validierung der α -SMA- und Fibronectin-Expression.....	40
3.4.5 Proteinexpression von Kollagen I.....	42
3.4.6 Transkription der Kollagen I-mRNA	45
3.4.6 <i>Knockdown</i> des IL-11-Rezeptors	46
3.5 Inhibition des JAK2/STAT3-Signalweges.....	49
3.6 Einfluss von TGF- β , IL-11 und Hyper-IL-11 auf matrizelluläre Proteine	50
3.6.1 Genexpression matrizellulärer Proteine	50
3.6.2 Proteinexpression matrizellulärer Proteine	52
4 Diskussion	54
4.1 TGF- β in humanen Fibroblasten	54
4.2 Gegenseitige Expressionsbeeinflussung von TGF- β und IL-11	56
4.3 Einfluss von TGF- β und IL-11 auf Strukturproteine	56
4.4 Einfluss von TGF- β und IL-11 auf matrizelluläre Proteine.....	61
4.5 Unterschiede zwischen IL-11 und Hyper-IL-11	62
4.6 Limitationen.....	64
4.7 IL-11 als Therapeutikum.....	64
4.8 Resümee und Ausblick	65
5 Zusammenfassung	67
5.1 Zusammenfassung.....	67

5.2 Abstract	68
6 Abbildungs- Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis.....	69
6.1 Abbildungsverzeichnis	69
6.2 Tabellenverzeichnis.....	69
6.3 Abkürzungsverzeichnis	70
7 Literaturverzeichnis	73
8 Ehrenwörtliche Erklärung.....	84
9 Danksagung	85

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen und Herzinsuffizienz

Kardiovaskuläre Erkrankungen machen weltweit etwa 31% aller Todesfälle aus und gehören als Teil der nicht-übertragbaren Erkrankungen (*non-communicable diseases*) zu den großen Herausforderungen des 21. Jahrhunderts (World Health Organization 2018). Zahlreiche Herz-Kreislauf-Erkrankungen münden in der chronischen Herzinsuffizienz, einer progredienten Erkrankung mit schlechter Prognose. Als Ursache dieser Erkrankung kommen Myokardverletzungen unterschiedlicher Ätiologie in Betracht, die zum kardialen Remodeling als pathophysiologischem Korrelat der Herzinsuffizienz führen. Daraus resultieren eine Reihe von molekularen, zellulären und interstitiellen Anpassungen, welche klinisch relevante Veränderungen in der Größe, Form und Funktion des Herzens zur Folge haben (Cohn et al. 2000). Auf zellulärer und interstitieller Ebene ist das Remodeling durch die Hypertrophie, Nekrose und Apoptose der Kardiomyozyten sowie eine myokardiale Fibrose charakterisiert (Liu et al. 2017). Die Symptome der Herzinsuffizienz werden anschließend durch die daraus resultierenden funktionellen oder strukturellen Störungen der ventrikulären Füllung und/oder Ejektion des Blutes verursacht, wodurch eine Minderversorgung der Organe resultiert. Der Körper versucht diesem Zustand durch Anpassungsvorgänge des Herzens, der Nieren und der Skelettmuskulatur zu begegnen. Die verschiedenen Beschwerden, die dabei klinisch imponieren sind auf die Dysfunktion des Herzens zurückzuführen und durch eine körperliche Leistungsminderung, Dyspnoe und vermehrte Flüssigkeitsretention durch die verminderte Nierendurchblutung gekennzeichnet (Yancy et al. 2013). Mithilfe der NYHA-Stadieneinteilung kann das individuelle Beschwerdebild in die Stadien NYHA I – IV eingeteilt werden. Die Mortalität steigt dabei abhängig vom Schweregrad der Erkrankung: Beträgt die 2-Jahres-Mortalität bei einem NYHA-Stadium I noch etwa 14,6%, so steigt sie auf etwa 53,3% im Stadium IV. Da die Krankheit insbesondere die ältere Bevölkerung betrifft und sowohl die Prävalenz als auch die Inzidenz mit steigendem Alter zunehmen, werden die Herausforderungen des Managements aufgrund der stetig alternden Bevölkerung in den nächsten Jahren größer werden (Störk et al. 2017).

1.2 Pathomechanismen der Fibrose

Charakteristischer Bestandteil des pathologischen Remodelings insuffizienter Herzen ist ein fibrotischer Gewebeumbau, der durch die übermäßige Ablagerung extrazellulärer Matrix gekennzeichnet ist (Liu et al. 2017). Im Verlauf kommt es dann zu einer zunehmenden Gewebsversteifung und einem daraus resultierenden Funktionsverlust des Organs (Distler et al. 2019). Fibrotische Vorgänge können neben dem Herzen auch eine Reihe anderer Organe betreffen und basieren dabei auf ähnlichen Prozessen. Beispiele für weitere Erkrankungen sind die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, Asthma bronchiale, Atherosklerose und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Distler et al. 2019). Diese Erkrankungen sind dabei insgesamt so häufig, dass mit einem Beitrag von etwa 45 % auf alle Todesfälle in der westlichen Welt durch eine Fibrose gerechnet wird (Bitterman und Henke 1991).

Ursächlich für fibrotische Veränderungen im Rahmen einer Herzinsuffizienz können eine Reihe von Erkrankungen sein. Den größten Anteil machen dabei die arterielle Hypertonie und die koronare Herzkrankheit aus (Lip et al. 2000). Dabei können fibrotische Veränderungen des Herzens anhand ihrer Pathophysiologie in zwei Subtypen unterteilt werden: in die Fibrose als narbiger Ersatz untergegangener Kardiomyozyten (Ersatzfibrose) und die interstitielle Fibrose. Eine Ersatzfibrose entsteht zumeist nach stattgefundenem Herzinfarkt, kann aber auch als Folge von einer Sarkoidose oder Myokarditiden auftreten. Der Verlust von Kardiomyozyten resultiert dabei in einer Bindegewebsvermehrung und der Entstehung einer fibrotischen Narbe, welche die Stelle des ursprünglichen Parenchyms einnimmt. Die interstitielle Fibrose kann wiederum in die reaktive interstitielle und die infiltrative interstitielle Fibrose unterteilt werden. Ursächlich für reaktive interstitielle Fibrosen sind beispielsweise die arterielle Hypertension, Diabetes mellitus, nicht-ischämische dilatative Kardiomyopathien oder eine Sarkoidose. Die infiltrative interstitielle Fibrose umfasst die Erkrankungen Morbus Fabry und die Amyloidose, wo es zu pathologischen Protein- beziehungsweise Lipidablagerungen kommt (Liu et al. 2017). Beide Arten der Fibrose führen im Verlauf zu einer weiteren Apoptose der Kardiomyozyten und einer daraus folgenden fortschreitenden Ersatzfibrose (Hashimura et al. 2017).

Pathophysiologisch bestehen während fibrotischer Prozesse Parallelen zum normalen Ablauf der Wundheilung: In beiden Fällen kommt es nach stattgefundener Verletzung zunächst zu einer Inflammationsphase, die durch die Einwanderung, Aktivierung und Akkumulierung von Leukozyten gekennzeichnet ist. Charakteristisch ist eine Gewichtung

auf die TH2-Helferzell-Makrophagen-Antwort. Durch diese Zellen werden pro-fibrotische Zytokine in großen Mengen ausgeschüttet und es kommt zur Differenzierung bestimmter Zelltypen zu Myofibroblasten (Distler et al. 2019). Diese sezernieren strukturgebende Proteine der extrazellulären Matrix in großem Maße. Außerdem nehmen sie durch die Sekretion matrizellulärer Proteine Einfluss auf regulatorische Funktionen des Extrazellularraums (Frangogiannis 2017). Myofibroblasten haben in physiologischen Prozessen die Aufgabe, eine Organintegrität wiederherzustellen und nach Vollendung durch Apoptose unterzugehen. Bei fibrotischen Prozessen ist dies jedoch gestört, sodass sie im Gewebe persistieren und es zur übermäßigen Akkumulation von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, insbesondere Typ-I-Kollagen, kommt (Abbildung 1). Strukturell wird Typ-I-Kollagen durch die Untereinheiten Alpha-1-Typ-I-Kollagen und Alpha-2-Typ-I-Kollagen geformt (Lazarides und Lukens 1971). Eine Fibrose kann demnach als verlängerte und pathologische Wundheilungsreaktion angesehen werden, welche in der Entstehung eines fibrotischen Areals mit deutlicher Funktionseinschränkung resultiert (Distler et al. 2019; Gurtner et al. 2008). Durch die erhöhte Gewebsversteifung ist letztendlich auch die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff vermindert, wodurch es zu einer weiteren Schädigung und vermehrter Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten als Mediatoren der Fibrose kommt. Dies mündet in der Entstehung eines *circulus vitiosus*, der bei betroffenen Individuen schlussendlich zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität führt (Györfi et al. 2018; Lokmic et al. 2012).

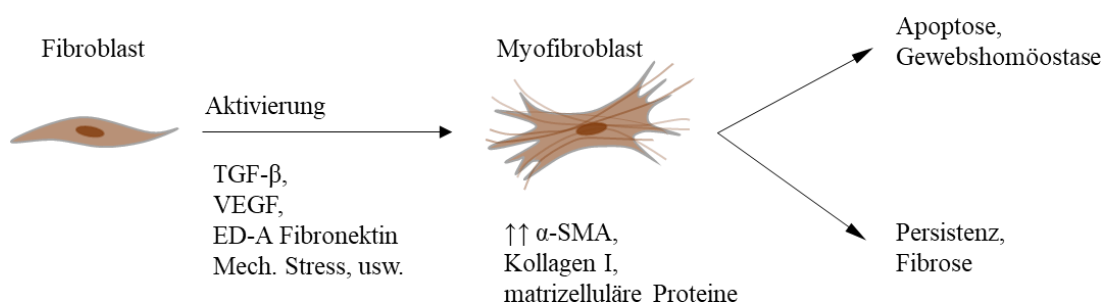


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Fibroblasten-Aktivierung. Abbildung nach (Distler et al. 2019).

1.3 Fibroblasten

Während fibrotischer Vorgänge spielen Fibroblasten und deren aktivierte Form beim Umbau des Bindegewebes eine entscheidende Rolle (Kendall und Feghali-Bostwick 2014). Da sich Fibroblasten innerhalb und zwischen den verschiedenen Organen und Gewebearten als heterogener Zelltyp präsentieren, wird eine Einteilung meist anhand morphologischer und funktioneller Kriterien (spindelförmiges Aussehen, Produzenten der EZM) sowie ihrer Lokalisation im Bindegewebe vorgenommen (Frangogiannis 2019; Lajiness und Conway 2014). Des Weiteren können Fibroblasten auch anhand verschiedener molekularer Marker differenziert werden. Dazu gehören unter anderem der Discoidin Domain Collagen Rezeptor 2, Fibroblast-Specific Protein 1, Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha, Periostin und Vimentin. Jedoch besteht bei keinem dieser Marker eine ausreichend hohe Sensitivität und/oder Spezifität, um verlässlich genutzt werden zu können (Lajiness und Conway 2014). Zu den physiologischen und pathologischen Vorgängen, bei denen Fibroblasten von Bedeutung sind, gehören die Gewebshomöostase des Bindegewebes, Krebsentstehung, Inflammation, Angiogenese und Wundheilung. Von Bedeutung für fibrotische Vorgänge sind insbesondere ihre Funktionen als Modulatoren der extrazellulären Matrix. Dabei sind sie sowohl für den Auf- und Abbau als auch für die Vernetzung der Zwischenzellsubstanz verantwortlich (Lajiness und Conway 2014). Die Degradation der extrazellulären Matrix vermitteln sie beispielsweise durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), gleichzeitig werden aber auch sogenannte Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) mit der Funktion als MMP-Inhibitoren produziert. Diese Vorgänge können durch verschiedene autokrine und parakrine Signalwege beeinflusst werden und eine Deregulation in einem fibrotischen Gewebeumbau münden. Insbesondere die Aktivierung und Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten spielt in diesem pathologischen Prozess eine wichtige Rolle (Kendall und Feghali-Bostwick 2014).

1.4 Myofibroblasten

Fibrotische Erkrankungen des Herzens haben die Ansammlung von Myofibroblasten als Gemeinsamkeit, welche als Schlüsselzellen des fibrotischen Gewebeumbaus gelten (Distler et al. 2019; Györfi et al. 2018; Frangogiannis 2019). Myofibroblasten sind

dadurch charakterisiert, dass sie kontraktile Eigenschaften durch die Expression von Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA) besitzen und große Mengen an Kollagenen sezernieren können (Biernacka et al. 2011; Cleutjens et al. 1995; Frangogiannis 2017). Außerdem nehmen sie über andere Mechanismen, wie beispielsweise der Vernetzung von Fibronectinfibrillen, Einfluss auf die Homöostase der extrazellulären Matrix (Torr et al. 2015). Der Zelltyp kann aus verschiedenen Vorläuferzellen hervorgehen: aus mesenchymalen, epithelialen oder endothelialen Zellen. Dies sind beispielsweise Fibrozyten, Fibroblasten und Perizyten (Frangogiannis 2019; Wynn 2008; Sun und Weber 2012; Crawford et al. 2012). Der genaue Beitrag der einzelnen Quellen zu Myofibroblasten-Populationen ist jedoch noch nicht endgültig geklärt (Davis und Molkentin 2014).

Zu den Stimuli, die eine Differenzierung zu Myofibroblasten bewirken, gehören sowohl mechanischer Stress als auch verschiedene Chemokine (Abbildung 1). Hier sind beispielsweise Transforming Growth Factor Beta (TGF- β), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Fibroblast Growth Factor (FGF) und ED-A Fibronectin zu nennen (Grande und López-Novoa 2009). Der TGF- β -Signalweg wurde dabei als einer der Haupt-Signalwege in der Fibroseinduktion identifiziert (Distler et al. 2019). Auch im physiologischen Granulationsgewebe kommen Myofibroblasten vor, jedoch treten sie dort nur vorübergehend auf und gehen durch Apoptose unter (Desmoulière et al. 1995; Darby et al. 1990). In pathologischen Verhältnissen kommt es zu einer Persistenz der Myofibroblasten. Dies führt zu einer übermäßigen Sekretion von Proteinen der extrazellulären Matrix und der Ausschüttung weiterer pro-fibrotischer Zytokine, sodass eine zunehmende Gewebsversteifung auftritt (Zhang et al. 1995; Cleutjens et al. 1995). Das damit herrschende extrazelluläre Milieu bewirkt wiederum epigenetische Veränderungen der Myofibroblasten, wodurch deren Aktivierung weiter gefestigt und unabhängiger von extrazellulären Stimuli wird (Distler et al. 2019).

1.5 Transforming Growth Factor Beta

Transforming Growth Factor Beta spielt eine zentrale Rolle in fibrotischen Prozessen über verschiedene Organe, Krankheiten und Individuen hinweg (Distler et al. 2019). Das Zytokin ist Teil der TGF- β -Superfamilie, wozu verschiedene strukturell verwandte Proteine mit unterschiedlichen Funktionen gehören. Im Einzelnen sind dies knochenmorphogenetische Proteine (BMPs), Aktivine, Inhibine, Wachstums-Differenzierungs-Faktoren

(GDFs), Myostatin und TGF- β 1-3 (Lafyatis 2014). TGF- β kommt in drei Isoformen vor, TGF- β 1-3. Insbesondere TGF- β 1 und 2 werden mit der Entstehung pathologischer Fibrosen in Verbindung gebracht und gelten als zentrale profibrotische Zytokine (Yu et al. 2003). Das in dieser Arbeit genutzte TGF- β 1 wird im Verlauf als TGF- β bezeichnet.

Verschiedene Zelltypen sind dazu in der Lage, TGF- β zu sezernieren. Dazu gehören Thrombozyten, Makrophagen, T-Zellen, Epithelzellen und Fibroblasten (Distler et al. 2019). Kommt es zu einer Aktivierung, so wird das Zytokin gemeinsam mit einer Prodomäne, dem Latency Associated Peptide, synthetisiert und bildet intramolekulare Cystein-Brücken aus. Über eine weitere Cystein-Brücke verbindet es sich zu einem TGF- β -Homodimer. Dieses liegt anschließend in der extrazellulären Matrix, verbunden mit dem Latent TGF- β Binding Protein (LTBP), in einer latenten Form vor (Schlunegger und Grütter 1992; Lafyatis 2014). Zur Aktivierung des Zytokins kommt es durch dessen proteolytische Spaltung, beispielsweise durch Plasmin, Thrombospondin-1, Matrix-Metalloproteinasen oder über Reaktive Sauerstoff-Spezies (Daniel et al. 2004; Lyons et al. 1990; Liu und Desai 2015). Mechanischer Stress kann ebenfalls zu einer Aktivierung von TGF- β führen, beispielsweise ausgelöst durch die Kontraktion von Myofibroblasten (Wipff et al. 2007). Das aktivierte, 112 Aminosäuren lange Peptid kann schließlich an seine Zielzellen binden (Derynck et al. 1985).

1.5.1 Signaltransduktion durch TGF- β

Die Wirkung von TGF- β auf die entsprechenden Zielzellen wird durch die TGF- β -Rezeptoren 1 und 2 vermittelt. Diese Transmembranrezeptoren übermitteln ihre Signale als Serin/Threonin-Kinasen. Bindet TGF- β an TGF- β R2, so bildet sich mithilfe von TGF- β R1 ein stabiler Heterokomplex. Durch die folgende Transphosphorylierung von TGF- β R1 wird eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren erreicht (Biernacka et al. 2011; Wrana et al. 1992). Der Komplex aus TGF- β -Rezeptoren 1 und 2 und TGF- β kann durch Kofaktoren stabilisiert werden, beispielsweise durch Betaglycan (TGF- β -Rezeptor 3) oder Endoglin (Lafyatis 2014). Die folgende Signaltransduktion wird anschließend entweder SMAD-abhängig oder SMAD-unabhängig vermittelt. Beim SMAD-abhängigen Signalling werden SMAD2 und SMAD3 durch die Serin-Threonin-Kinase phosphoryliert. Die aktivierten Faktoren binden an SMAD4, werden in den Nukleus transloziert und wirken dort als Transkriptionsfaktoren. Dort vermitteln sie beispielsweise die Transkription von Kollagenen sowie von SMAD7, welches als negativer Feedback Inhibitor des TGF- β Signalweges fungiert (Leask 2007; Verrecchia et al. 2001). Die SMAD-

unabhängige Signaltransduktion von TGF- β sorgt zusätzlich für eine Regulierung der intrazellulären Signalweiterleitung. Hierzu gehören die drei bekannten MAPK-Signalwege: ERK, JNK und p38 sowie weitere intrazelluläre Moleküle, beispielsweise die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) oder Rho-GTPasen (Zhang 2009).

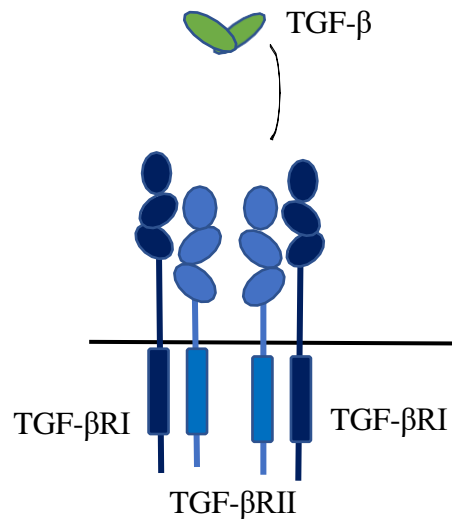


Abbildung 2: Schematische Darstellung des TGF- β -Rezeptors. Abbildung nach (Biernacka et al. 2011)

1.5.2 Funktionen von TGF- β

Im Organismus übernimmt TGF- β eine Reihe von Funktionen. Dazu gehören, neben der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase, die Vermittlung von Immun- und Entzündungsreaktionen, die EZM-Deposition sowie Zelldifferenzierungs- und -wachstumsvorgänge (Biernacka et al. 2011). Eine Deregulation der TGF- β -Signalkaskade, beispielsweise durch Infektionen, schweres Trauma oder chronische Schädigung, kann in einen fibrotischen Gewebeumbau münden (Lodyga und Hinz 2020). Fibrotische Prozesse und myokardiales Remodeling gehen dabei mit einer dauerhaften Erhöhung der TGF- β -Konzentration einher, wie im menschlichen Herzen und im Tierversuchsmodell gezeigt werden konnte (Frangiannis 2019). Aufgrund der oben beschriebenen, pleiotropen Funktionen des Zytokins in verschiedenen physiologischen Prozessen ist eine komplette Inhibition des TGF- β -Signalweges nicht möglich. Aus diesem Grund müssen andere Wege gefunden werden, um Teile des Signalweges zu inhibieren und dies therapeutisch zu nutzen (Leask 2007).

1.6 IL-11

Interleukin-11 ist Bestandteil der Interleukin-6-Zytokinfamilie, welche verschiedene strukturell miteinander verwandte Zytokine zusammenfasst. Dazu gehören Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-11 (IL-11), Ciliary Neutrophilic Factor (CNTF), Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Oncostatin M (OSM), Cardiotrophin 1 (CT-1), Cardiotrophin-like cytokine (CLC) und Interleukin-27 (IL-27). Gemeinsames Merkmal dieser Zytokinfamilie ist die Nutzung des GP130-Rezeptors zur Signaltransduktion. Dieser Rezeptorkomplex wird dabei entweder als Homodimer aus zwei GP130-Rezeptoren (nur bei IL-6 und IL-11) oder als Heterodimer aus einem GP130-Rezeptor und einem spezifischen Zytokinrezeptor gebildet (Rose-John 2018; Heinrich et al. 2003). Zusätzlich benötigen die Zytokine jeweils noch unterschiedliche, nicht-signalkompetente Beta-Rezeptoren. Diese sind, im Gegensatz zum ubiquitär vorkommenden GP130-Rezeptor, nur auf speziellen Zelltypen zu finden (Hibi et al. 1990). Die Signalweiterleitung nach Rezeptoraktivierung erfolgt anschließend überwiegend über den JAK-STAT-Signalweg (Wilks und Harpur 1994). Die Morphologie der Zytokine innerhalb der Zytokinfamilie ähnelt sich. Dabei weisen alle eine vier-helikale alpha-Helix Struktur mit einer *up-up-down-down* Topologie auf. Diese sind durch drei Verbindungsloops aneinandergesetzt (Heinrich et al. 2003). Die Wirkung auf die jeweiligen Zielzellen ist teilweise recht ähnlich, weist aber auch Unterschiede auf. Zu den Aufgaben gehören unter anderem die Vermittlung der akuten Phase-Reaktion, die Stimulation von B-Zellen und die T-Zell-Regulation, metabolische Aufgaben und neuronale Funktionen. Eine Dysregulation der Zytokine sorgt für die Entstehung und Aufrechterhaltung verschiedener Krankheiten, wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Osteoporose und Krebserkrankungen (Heinrich et al. 2003). Therapeutisch lässt sich eine Blockade bestimmter Zytokine der IL-6-Familie beispielsweise für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen nutzen. Dabei treten jedoch bakterielle Infektionen und metabolische Komplikationen als unerwünschte Nebenwirkungen auf (Rose-John 2018).

Das vier-helikale *bundle*-Protein IL-11 besteht aus 178 Aminosäuren (Garbers und Scheller 2013). Die Expression wird in unterschiedlichen Organsystemen auf einer Reihe von Zellen mesenchymlen Ursprungs beobachtet. Dazu gehören Zellen des Knochenmarks, der Lunge, der Haut, des Bindegewebes sowie der Reproduktionsorgane, des Immunsystems und des Herzens (Ancey et al. 2002; Putoczki und Ernst 2010; Du und Williams 1997). Außerdem kann es im Serum von gesunden Erwachsenen im

niedrigen picogramm-Bereich detektiert werden (Lokau et al. 2016b). Eine Induktion der Expression findet beispielsweise durch TGF- β und Interleukin-1 statt (Elias et al. 1994).

1.6.1 Signaltransduktion durch IL-11

Zur Signalweiterleitung benötigt IL-11 neben dem GP130-Rezeptor auch den Zytokin-spezifischen IL-11-Rezeptor-Alpha (IL-11R α). Dieser gehört, wie alle Rezeptoren der IL-6-Familie, zur Immunglobulin-Superfamilie (Garbers et al. 2012). Der extrazelluläre Part des IL-11-Rezeptors besteht aus einer N-Terminalen Immunglobulin-ähnlichen Domäne (D1) und zwei Fibronectin(III)-ähnlichen Domänen, welche als Zytokin-Bindestellen fungieren (Metcalf et al. 2020a). Bisher konnte das Vorkommen des Rezeptors auf unterschiedlichen Zelltypen nachgewiesen werden, wozu neben Endothelzellen, Osteoklasten, hämatopoetischen Zellen, Lymphozyten, B-Zellen und Makrophagen auch kardiale Fibroblasten und Myozyten gehören (Putoczki und Ernst 2010; Kimura et al. 2007). Mäuse sind bis zu diesem Zeitpunkt die einzigen bekannten Vertebraten, bei denen eine Duplikation des IL-11-Rezeptor-Gens nachgewiesen werden konnte (Robb et al. 1997). Das entsprechende Protein wird als IL-11R α 2 bezeichnet und unterscheidet sich in nur fünf Aminosäuren vom bis dahin bekannten IL-11R α 1 (Bilinski et al. 1996). Untersuchungen haben gezeigt, dass der *in vitro* exprimierte IL-11R α 2 Interleukin-11 mit hoher Affinität bindet, was darauf hindeutet, dass das Mausgenom einen zweiten funktionellen IL-11-Rezeptor besitzt (Bilinski et al. 1996; Robb et al. 1997).

Zur Signaltransduktion innerhalb der Zelle bindet IL-11 zunächst an den membranständigen IL-11R α und anschließend, gemeinsam mit einem weiteren IL-11R α -IL-11-Komplex, an zwei GP130-Rezeptoren. Durch das entstehende Hexamer wird GP130 an Tyrosinresten phosphoryliert und assoziiert mit Janus-Kinasen (Metcalf et al. 2020b; Corden et al. 2020; Heinrich et al. 2003). Diese wiederum sorgen zellintern für eine Aktivierung des Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT). Die Signaltransduktion verläuft dabei insbesondere über STAT3, aber auch STAT1 und STAT5 werden in geringerem Maße rekrutiert (Garbers et al. 2012). Im Anschluss werden diese als Dimere in den Nukleus transloziert und können dort als Transkriptionsfaktoren die Genexpression modulieren. Eine Reihe von Cofaktoren kann dies weiter modifizieren (Heinrich et al. 2003). Als negativer Feedback-Inhibitor der STAT-Aktivierung dient der SOCS-Signalweg, welcher durch STAT aktiviert wird und die Phosphorylierung des JAK-Signalweges verhindert (Heinrich et al. 2003). Neben dem beschriebenen STAT-Signalweg werden

ebenso der MAPK und PI3K-Signalweg in geringerem Maße zur Signaltransduktion rekrutiert (Heinrich et al. 2003).

1.6.2 Hyper-IL-11 und *trans signalling*

Neben der klassischen Signaltransduktion über den membranständigen IL-11-Rezeptor- α (*cis-signalling*) kann das Zytokin auch bereits an einen löslichen IL-11-Rezeptor (sIL-11-R α) gebunden die GP130-STAT3-Achse aktivieren. Diese Art der Signaltransduktion wird als *trans-signalling* bezeichnet. Dabei ist IL-11 in der Lage, eine Signaltransduktion in Zelltypen zu aktivieren, welche lediglich den ubiquitär vorkommenden GP130-Rezeptor und keinen membranständigen IL-11-Rezeptor aufweisen (Pflanz et al. 1999). Zur Untersuchung des *trans-signalling* können rekombinant hergestellte Hyperzytokine verwendet werden. Dabei wird das Zytokin durch ein Linkerpeptid kovalent an seinen löslichen Rezeptor gebunden. Die biologische Wirksamkeit des *trans-signalling* konnte bereits durch synthetisch hergestellte Hyperzytokine (Hyper-IL-11) bewiesen werden (Pflanz et al. 1999; Karow et al. 1996). *In vitro* kann die lösliche Form des IL-11-R α durch *ectodomain shedding* oder alternatives Spleißen generiert werden (Lokau et al. 2016a; Robb et al. 1996). *Ectodomain shedding* bezeichnet eine irreversible, post-translationale Modifizierung, bei welcher der membrangebundene Rezeptor durch limitierte Proteolyse geschnitten und freigesetzt wird (Lokau et al. 2016b). Bisher konnte gezeigt werden, verschiedene Proteinasen dazu in der Lage sind. Dazu gehören A Disintegrin and Metalloproteinase Domain-Containing Protein 10 (ADAMS10), Rhomboid-Like-Protease 2 (RHBDL2), Neutrophil Elastase (NE) und Proteinase 3 (PR3) (Lokau et al. 2016b; Koch et al. 2021). Ein Nachweis der Proteinolyse *in vivo* steht zum jetzigen Zeitpunkt noch aus (Lokau et al. 2016a). Auch ein *trans-signalling* im lebenden Organismus konnte bisher noch nicht sicher nachgewiesen werden, es gibt jedoch erste Hinweise darauf. So konnte der lösliche IL-11-Rezeptor in neun von 21 gesunden Individuen im Bereich von 20 pg/ml bis 4 ng/ml detektiert werden. Außerdem wurde eine Variante des löslichen IL-11-Rezeptors auf transkriptioneller Ebene im Mausmodell beschrieben (Robb et al. 1996; Lokau et al. 2016b). Eine selektive Blockierung des *trans-signalling* kann durch sGP130 erreicht werden (Lokau et al. 2016b). Dies bietet die Möglichkeit, unterschiedliche Wirkungsweisen zwischen klassischem- und *trans-signalling* genauer zu untersuchen. Bisher konnte in einem Tierversuch gezeigt werden, dass nur die Blockierung der klassischen Signaltransduktion eine Fertilität in Mäusen verhindert, während eine Blockierung des *trans-signalling* keine Auswirkungen hatte (Agthe et al. 2017).

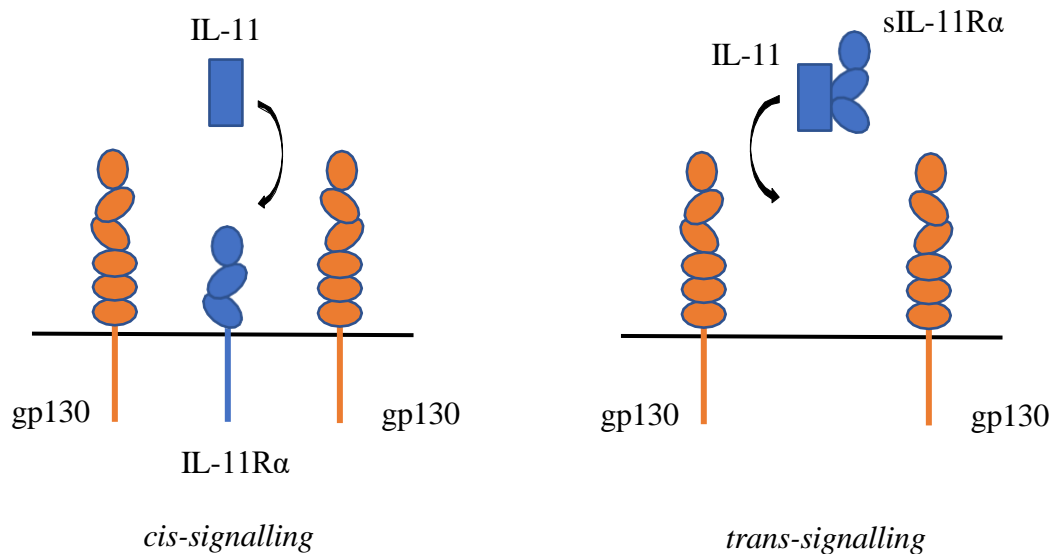


Abbildung 3: Schematische Darstellung des IL-11 cis- bzw. trans-signalling. Abbildung nach (Pflanz et al. 1999)

1.6.3 Funktionen von IL-11

IL-11 erfüllt im Organismus eine Reihe von Funktionen. So konnte eine anti-inflammatorische Rolle bei chronischen Entzündungen nachgewiesen werden (Obana et al. 2010). Therapeutisch kann IL-11 genutzt werden, um die Chemotherapie-assoziierte Thrombozytopenie zu behandeln, da es stimulierend auf die Megakaryozytenbildung wirkt (Du und Williams 1997). Sowohl in Tierversuchen als auch auf menschlichen Zellen wurde eine Rolle von IL-11 bei der Plazentation und Implantation nachgewiesen. Mäuse mit einem mutierten *Il-11Ra1* waren demnach infertil (Bilinski et al. 1998; Dimitriadis et al. 2002). Mutationen des IL-11-Rezeptors führen bei betroffenen Individuen zu kraniofazialen Anomalien, da IL-11 eine Rolle bei der Induktion der Osteoblastendifferenzierung spielt (Nieminen et al. 2011; Suga et al. 2004). Außerdem gibt es verschiedene Hinweise darauf, dass IL-11 im Herzen einer Fibrose entgegenwirkt und als protektiver Faktor nach Myokardinfarkt und in Ischämie-Reperfusionenmodellen fungiert (Obana et al. 2010; Kimura et al. 2007). Andere Modelle jedoch legen eine pro-fibrotische Wirkung von IL-11 nahe (Schafer et al. 2017).

1.7 Zielsetzung

Die Abmilderung fibrotischer Prozesse als Therapiebestandteil stellt ein erstrebenswertes Ziel in der Behandlung fibrotischer Erkrankungen dar. Eine Teilinhibition des pro-

fibrotischen Zytokins TGF- β stellt eine Möglichkeit dar, pathologischen Veränderungen mit verstärkter Gewebsversteifung medikamentös entgegenzusteuern. Interleukin-11 ist in dieser Hinsicht von besonderem Interesse. Vor allem der Einfluss auf den fibrotischen Gewebeumbau ist dabei für therapeutische Überlegungen von Relevanz. Diese Arbeit soll dazu dienen, die Basis grundlegender Prozesse des Zusammenspiels zwischen TGF- β und IL-11 zu charakterisieren. Humane Fibroblastenzellen, welche *in vivo* die Homöostase des Bindegewebes maßgeblich beeinflussen, dienen dabei als *in vitro*-Modell, um zugrundeliegende Mechanismen darzustellen. Besonderes Augenmerk soll dabei auf den Einfluss von TGF- β und IL-11 auf die Aktivierung und Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten liegen. Dafür soll die Expression relevanter strukturgebender Proteine (Kollagen I, α SMA, Fibronectin) sowie matrizellulärer Proteine (Periostin und Osteoglycin) der extrazellulären Matrix genauer betrachtet werden. Außerdem soll verglichen werden, ob sich das bereits an seinen löslichen Rezeptor gekoppelte Hyper-IL-11 in seiner Wirkung von IL-11 unterscheidet und inwiefern sich ein *knockdown* des *IL11RA* und eine Blockierung des JAK2/STAT3-Signalweges auf fibrotische Prozesse auswirkt. Somit kann ein weiterer Beitrag zu der Fragestellung geleistet werden, ob Interleukin-11 als mögliche Therapieoption in der Behandlung fibrotischer Prozesse zukünftig von Bedeutung sein könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Allgemeine Labormaterialien	
Produkt	Hersteller
96-Well-Platte	Greiner Bio-One, Deutschland
Aqua dest.	B. Braun, Deutschland
Cell Strainer	Falcon Corning, USA
Durapore 3M	3M, USA
Falcon-Röhrchen	Corning Science, USA
Glas-Pipetten	Greiner Bio-One, Deutschland
Multiplate-PCR Platten, 96-Wells, clear	Bio-Rad, USA
Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gel, 4-20%	Bio-Rad, USA
Kanülen, 27G	BD Microlance, Irland
Parafilm	PM-996, USA
Pipetten	Gilson, USA Eppendorf, Deutschland
Pipettenspitzen	Nerbe Plus, Deutschland Greiner Bio-One, Deutschland Biozym, Deutschland
PVDF-Membran	Thermo Fisher Scientific, USA
Zellschaber	Falcon Becton Dickinson Labware Europe, Frankreich

Tabelle 1: Allgemeine Labormaterialien

Geräte	
-80 ° Gefrierschrank	Thermo Electron Corporation, Hera freeze

Autoklav	HMC, Hiclive, HV-25
Eismaschine	Scottsman
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, USA
Fluoreszenzmikroskop	Keyence BZ-9000, Biorevo
Lichtmikroskop	Leice DMIL Microsystems, Deutschland
Magnetrührer	IKA-Labortechnik, Deutschland
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland
Mini Plate Spinner	Labnet, USA
Photospektrometer	SLT Spektra, Deutschland
Pipetboy	Integra
Real-Time PCR	Real Time System CFX96 BioRad, USA
Schüttler	Heidolph Titramax 100, Deutschland
Schwenker	Heidolph Polymas 2040
Spektralphotometer	NanoDrop, Thermo Scientific, USA
Thermoblock	Thermomixer comfort, Eppendorf, Deutschland
Thermocycler	Biometra T-Gradient Thermoblock
Vortexer	Janke und Kunkel IKA-Labortechnik, Deutschland
Waage	Sartorius, Deutschland
Wasserbad	Lauda 006T, Julabo Labortechnik, Deutschland
Western Blot Imaging	ChemiDoc MC, BioRad, USA
Zellkulturbank	HeraSafe, Heraeus, Deutschland
Zentrifuge	Rotina 420R, Hettich Zentrifugen

Tabelle 2: Geräte

Materialien und Medien für die Zellkultur	
Produkt	Hersteller
Neubauer-Zählkammer	Marienfeldt und Assistent
Collagen Solution	InSCREENex, Deutschland Cat. No. INS-SU-1017
DPBS w/o Calcium & Magnesium	PAN Biotech, Deutschland
huFib Medium	InSCREENex, Deutschland Cat. No. INS-ME-1001
Multi-well Platten (6- und 12-wells)	Greiner Bio-One, Deutschland
Opti-MEM	Gibco, USA
PureFection	Sigma Aldrich, USA
Serum-Free huFib Medium	InSCREENex, Deutschland Cat. No. INS-ME-1018
Trypsin rec. hum. /EDTA 0.2 % in PBS, w/o: Ca and Mg	PAN Biotech GmbH P10-041500, Germany
Zellkulturflaschen, verschiedene Größen	Greiner Bio-One, Deutschland
Zellkulturschale, 6 cm	Nunclon Surface, Dänemark

Tabelle 3: Materialien und Medien für die Zellkultur

Antikörper und Primer	
<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>
Western Blot	
Anti-Rabbit-IgG	Cell Signalling Technologies, #7074
α -SMA (Western Blot)	Cell Signalling Technologies, Cat. #19245
Kollagen-1	Rockland, 600-401-103-0.5
GAPDH-HRP	Cell Signalling Technologies, Cat. #3683
Osteoglycin	GeneTex, Cat. No.: GTX32769

Periostin	Santa Cruz, sc-398631
IL-11Ra	Abcam, ab125015
p44/42 MAPK (Erk1/2)	Cell Signalling Technologies, #4695
Phospho-STAT3	Cell Signalling Technologies, #9145
STAT3	Cell Signalling Technologies, #12640S
Immunfluoreszenz	
Alexa Fluor Goat Anti-Mouse	ab150113, Abcam
α -SMA	Sigma Aldrich, C6198
DAPI	Roth, 249-186-7
Fibronektin	Sigma Aldrich, F3648

Tabelle 4: Antikörper und Primer

Inhibitoren und Stimulantien	
Inhibitor/Stimulanz	Hersteller
Hyper-IL-11-Fc	Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Arbeitsgruppe: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller
IL-11Ra siRNA	Sigma-Aldrich, USA
Recombinant Human IL-11	Pepto-Tech, #200-11
Ruxolitinib (JAK1/2 inhibitor)	Selleckchem, USA
TGF- β	Pepto-Tech, USA

Tabelle 5: Inhibitoren und Stimulantien

Primer für die Real-Time PCR		
Gen	Forward Primer	Reverse Primer
COL1A1	GAAGGGACACAGAGGTTT-CAG	TAGCACCATCATTTCACGA
FN1	GGCAACTCTGTCAACGAAGG	CATTCGTTCCCCTCATCTCC
IL-11	CACAGCTGAGG-GACAAATTCC	CAGGTAGGACAGTAGGTCCGC
OGN	AAATGATGAAATGCCACGT	TGCGTAAAGATAGGCT-GATTCC
POSTN	TTCCGAAGCTCTTATGAAG-TACC	TTACTGTTATACTGTCACCGT-CAC
TGF- β 1	TTCTCAACACATCA-GAGCTCC	GTATCGCCAGGAATTGTTGC

Tabelle 6: Primer für die Real-Time PCR

Chemikalien und Reagenzien	
Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Aprotonin	Fluka, #10820, Switzerland
BSA Albumin, Fraktion V	Carl Roth, Deutschland
Chloroform	Fluka, United Kingdom
Clarity™ Western ECL Substrate, Cat. #170-5061	BioRad, USA
Clarity Max™ Western ECL Substrate, Cat. #1705062	BioRad, USA
DAPI, Dyhydrochloride	Calbiochem
DTT (1,4 Dithiotreitol)	Sigma-Aldrich, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol (99,8%)	Sigma-Aldrich, USA
Glycerol (99,9%)	Sigma-Aldrich, USA

HEPES	Sigma-Aldrich, USA
Leupeptin	Sigma-Aldrich, USA
Magermilchpulver	Carl Roth, Deutschland
Mowiol	Fluka, United Kingdom
Natriummolybdat	Sigma-Aldrich, USA
Natriumchlorid (99,5%)	Carl Roth, Deutschland
Normal Goat Serum 10%	7ymed
NP-40	Sigma Aldrich, USA
Penicillin/Streptomycin (5000 Units/ml Penicillin, 5000 µg/ml Streptomycin)	Gibco, USA
PFA	Carl Roth, Deutschland
PMSF (Phenylmethylsulfonyluorid)	Sigma-Aldrich, USA
Tris-Puffer (99.9%)	Carl Roth, Deutschland
Trypan Blue Solution (0.4%)	Sigma-Aldrich, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, USA

Tabelle 7: Chemikalien und Reagenzien

Kits	
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, Cat. No. 170-8891, USA
RC DC Protein Assay II	Bio-Rad, Cat. No. 5000122, USA
RNA Clean & Concentrator	Zymo Research, USA

Tabelle 8: Kits

Angesetzte Lösungen und Puffer	
Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Western Blot	
WCE-Puffer	0,2 ml 1M Hepes pH 7,8 0,9 ml 5M NaCl 4 ul 0,5M EDTA 0,1 ml 1M Na ₂ MoO ₄ 2,5 ml Glycerin Ad 10 ml H ₂ O
WCE-Plus Puffer	Zu 1 ml WCE-Puffer: 10 uL 100 mM DTT 5 ul Leupeptin 5 uL Aprotonin 5 ul PMSF
Ladepuffer	20 ml 1M Tris pH 6,8 \cong 100 mM 80 ml 10% SDS 4% \cong SDS 0,4 g Bromphenolblau \cong 0,2% 40 ml Glycerin 200 μ l Puffer + 50 μ l 1M DTT
Tris-Glycin SDS Laufpuffer, 5x	30,2 g Tris Base 188 g Glycin 100 ml 10% SDS Ad 2 Liter aqua bidest

Blocking Puffer	200 ml Waschpuffer 10 g Magermilchpulver
Waschpuffer	500ml 10x PBS 5ml Tween 20 Ad 5l Wasser
Stripping Puffer	10 ml Glycin 90 ml aqua dest. 1 ml 37% HCL
Immunfluoreszenz	
10x TBS-Puffer	5 L ddH ₂ O 121 g Tris Pufferan 400 g NaCl
Sekundärantikörper-Lösung	Alexa Fluor Goat Anti-Rabbit 1:200 in Antikörper Diluent 1% Goat Serum
Blocking Puffer	10 ml Goat Serum 0,5 g Albumin Fraktion V (FBS)
Mowiol	12 g Glycerol 4,8 g Mowiol 12 ml ddH ₂ O 24 ml Tris Puffer 0,2 M

Tabelle 9: Angesetzte Lösungen und Puffer

Software	
Software	Hersteller
Bio-Rad CFX Manager	Bio-Rad, USA
BioRender	Bio Render, Kanada
GraphPad Prism 9	GraphPad Software Inc, USA
Image Lab 6.0	Bio-Rad, USA
Microsoft Office	Microsoft, USA
ND-100 V3.81	Bio-Rad, USA
PerlPrimer	Marshall (2004)

Tabelle 10: Software

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Eine humane, präputiale Fibroblastenzelllinie (CI-huFIB, InSCREENEx) wurde bei einer Temperatur von 37° C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 95% in serumhaltigem huFib-Nährmedium mit 5% Penicillin/Streptomycin-Antibiotikum kultiviert (Lipps et al. 2018). Sobald eine Platte vollständige Konfluenz erreicht hatte, wurden die Zellen passagiert. Für diesen Vorgang wurden zunächst alle verwendeten Lösungen auf 37° C erwärmt. Das alte Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 ml DPBS gewaschen. Daraufhin wurden 5 ml Trypsin zu den Zellen hinzugegeben, um diese von der Platte zu lösen. Nach einer dreiminütigen Inkubationszeit bei 37° C und kurzer lichtmikroskopischer Kontrolle wurde die Reaktion mithilfe von serumhaltigem Medium gestoppt und der gesamte Inhalt in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Es erfolgte anschließend eine zehnminütige Zentrifugation bei 750 x g. Nach Abnahme des Überstands konnte das Zellpellet in 5 ml frischem Medium resuspendiert werden. Als Nächstes erfolgte die Zellzählung mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dafür wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau gemischt und die vier Quadrate der Zählkammer ausgezählt. Mithilfe der berechneten Zellzahl pro Milliliter konnten anschließend

zwischen 800.000 und 1.000.000 Zellen auf eine neue T75-Zellkulturflasche mit 10 ml Medium ausgesät werden. Alle zwei Tage fand ein Wechsel des Mediums statt.

Für die Versuchsreihen wurden 100.000 – 200.000 Zellen mit serum-freiem Medium auf kollagenbeschichteten 6- oder 12-*well* Platten ausgesät. Für die Beschichtung wurden die Platten mit geöffnetem Deckel für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter dem Abzug belassen. Um die Zellen zu stimulieren, wuchsen diese zunächst für 24 Stunden unter serumfreien Bedingungen in Multi-Well-Platten. Die Stimulationen erfolgten im Anschluss mit einer Konzentration von 10 ng/ml IL-11 oder TGF- β . Dafür wurde das alte Medium abgesaugt und durch frisches Medium mit den darin gelösten Stimulantien ersetzt. Um die Zellen zu ernten, wurden diese dreimalig mit 4° Celsius kaltem DPBS gewaschen und direkt Anschluss bis zur weiteren Analyse bei -80° Celsius eingefroren. Wurde mit einem Inhibitor gearbeitet, so wurden die Zellen ebenfalls in serum-freiem Medium ausgesät und zunächst für 8 Stunden mit dem Inhibitor inkubiert. Wahlweise konnten die Zellen dann im Anschluss stimuliert werden.

2.2.2 Transfektion der Zellen

Eine Transfektion bewirkt die Integration fremder DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. Um mittels dieser Methode eine siRNA einzubringen, nutzten wir pureFection als Transfektionsreagenz. Die siRNA wurde so verdünnt, dass sie als 25 μ M Vorrat vorlag. Zur Transfektion der Zellen wurden 150.000 Zellen pro *well* in einer 6-*well* Platte mit 1 ml HuFib Medium ausgesät. Nach einer Stunde wurden 100 μ l Opti-Mem-Medium, 2 μ L PureFection und 1,13 μ L der siRNA gemischt und für 10 s gevortext. Durch eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Induktion der Komplexbildung. Anschließend wurden 103,13 μ L der Lösung tropfenweise in jedes *well* gegeben. Nach 6 Stunden Inkubationszeit bei 37° Celsius und 5% CO₂-Gehalt konnte das Medium entfernt und durch frisches ersetzt werden. Auf diese Weise konnte die Zytotoxizität begrenzt werden. Anschließend erfolgte die Zellstimulation mit TGF- β und IL-11.

2.2.3 Proteinextraktion

Zur Herstellung des Gesamtproteinlysats wurde zu den Zellen 70 - 120 μ L WCE-Puffer Plus gegeben. Das Lysat wurde in 0,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und mit jeweils 10 μ L 10% NP-40 pro 40 μ L des Proteinlysats vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min inklusive mehrmaligem Vortexen wurde eine Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt. Diese wurde mit dem DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) nach

Herstellerangaben durchgeführt, welcher auf dem Prinzip eines modifizierten Lowry-Tests beruht.

2.2.4 SDS-Gelelektrophorese

Um die Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Hierfür wurden 15 µg Protein mit identischem Volumen an Ladepuffer gemischt und die Mischung für 5 Minuten bei 98° C erhitzt. Zur Vorbereitung der Elektrophoresekammer wurden die Mini PROTEAN TGX Stain-free Gele (BioRad) in die dafür vorgesehenen Halterungen eingespannt und die Kammer mit 1x Laufpuffer aufgefüllt. Anschließend konnten die Taschen der Gele mit Laufpuffer gespült werden. Die Proben wurden nach einer zweiminütigen Zentrifugation in die Gele aufgetragen. Die folgende Elektrophorese lief zunächst für 10 Minuten bei 80 V und daraufhin für 120 Minuten bei 120 V.

2.2.5 Western Blot

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels eines Western-Blots auf eine PVDF-Membran übertragen. Beim Western Blot wandern die Proteine mithilfe eines senkrecht stehenden elektrischen Feldes auf die Membran. Hierfür wurde diese zunächst für 30 s in Methanol aktiviert und anschließend für 5 Minuten im Blotpuffer äquilibriert. Um den Trans-Blot durchzuführen, wurde ein Sandwich bestehend aus *Cotton Pads*, Filterpapieren, einer PVDF Membran und dem Gel zusammengestellt und in eine dafür vorgesehene Halterung eingespannt. Der Western Blot lief anschließend für 60 Minuten bei 120 Volt. Nach Abschluss wurde die Membran für eine Stunde im Blocking-Puffer geblockt, um unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden. Danach konnten die Primär-Antikörper über Nacht auf einem Shaker bei 4° C inkubiert werden. Am nächsten Tag folgten zunächst zwei fünfzehn- und drei fünfminütige Waschschrte, mit Austausch des Waschpuffers zwischen den Durchgängen. Im Anschluss wurde der HRP-gekoppelte Sekundär-Antikörper auf die Membran gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Shaker belassen. Es erfolgten wiederholt zwei 15-minütige und drei fünfminütige Waschschrte mit Waschpuffer. Die Entwicklung der Membran erfolgte mithilfe des *Clarity™ Western ECL Substrate* oder des *Clarity Max™ Western ECL Substrate Kits*. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde gestript und anschließend geblockt, um das Auftragen weiterer Antikörper zu ermöglichen.

2.2.6 Immunfluoreszenz

Für die Darstellung der Zellen in der Immunfluoreszenz wurden diese auf Coverslips in einer 12 *well*-Platte ausgesät und stimuliert. Um die Zellen zu fixieren, wurden diese zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 15 Minuten in 4 % PFA bei Raumtemperatur belassen. Dieser Schritt erfolgte, wie auch alle folgenden Waschschrte, auf einem Orbitalschüttler. Nach einem erneuten Waschschrte mit PBS konnten die Coverslips in PBS bei 4°C aufbewahrt werden. Für die Durchführung der Färbung wurden die Coverslips zweimal mit 1x PBS für jeweils 10 Minuten gewaschen und anschließend mit 1x PBS und 0,2% Triton X für 15 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Es erfolgten drei weitere Waschschrte für jeweils 10 Minuten. Im Anschluss daran wurden die Coverslips mit 5% Goat Serum und 1% BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer geblockt, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Nach drei weiteren fünfminütigen Waschschrten mit 1x PBS folgte die Inkubation des Antikörpers. Diese fand, wie auch alle weiteren Inkubationen, in einer dunklen Kammer statt. Im Falle eines bereits konjugierten Antikörpers wurde dieser für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen. Die Inkubation unkonjugierter Antikörper erfolgte über Nacht bei 4° C. Als Nächstes wurden drei weitere Waschschrte für jeweils fünf Minuten und eine einstündige Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper durchgeführt. Nach drei weiteren fünfminütigen Waschschrten konnte der Coverslip auf einem Objektträger fixiert werden. Hierfür wurden jeweils ein Tropfen einer Mowiol- und DAPI-Lösung auf den Objektträger gegeben. Mowiol diente dabei als Einschlussmedium zur Herstellung der Dauerpräparate, DAPI zur Darstellung der Zellkerne. Zum Ausschluss unspezifischer Anfärbungen durch den Sekundärantikörper diente eine Negativkontrolle, auf die lediglich *Antibody Diluent* gegeben wurde. Die Präparate wurden über Nacht getrocknet und konnten anschließend unter dem Mikroskop betrachtet werden.

2.2.7 RNA-Isolation

Für die Isolierung der RNA aus den Zellen wurde das RNA Clean and Concentrator Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben verwendet. Grundlage dieses Verfahrens ist die *single step* Methode, die von Chomczynski und Sacchi etabliert wurde (Chomczynski und Sacchi 2006). Das in der Lösung enthaltene Guanidiniumthiocyanat lysiert die Zellen und sorgt für eine Inaktivierung von RNasen und anderen Enzymen durch Proteindenaturierung. In der Lösung sind zusätzlich Chloroform und Phenol enthalten. Durch Zentrifugation erfolgt eine Phasentrennung, bei der sich eine wässrige, eine organische und eine

Interphase ausbilden. Dabei ist die RNA in der oberen, wässrigen Phase zu finden, während die weiteren Bestandteile in den darunter liegenden Phasen verbleiben (Chomczynski und Sacchi 2006). Um diese Methode durchzuführen, wurde zunächst 1 ml TRIzol in jedes *Well* gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Lösung zuerst mit einer Pipette resuspendiert und in ein Eppendorf-Röhrchen mit einem Volumen von 2 ml überführt. Daraufhin wurden 200 µL Chloroform hinzugegeben und das Röhrchen wurde so lang geschüttelt, bis der Inhalt milchig erschien und anschließend für 3 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Phasentrennung erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4° C und 12.000 x g. Von der oberen, wässrigen Phase wurden in einem nächsten Schritt 400 µL vorsichtig abpipettiert, ohne dabei die anderen Phasen zu berühren. Dieser Überstand wurde anschließend in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und 400 µL 100-prozentiges Ethanol zugefügt. Nach kurzem Vortexen konnte die Lösung in eine dafür vorgesehene *Zymo-Spin IC* Säule pipettiert und für 50 s bei 16.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert werden. Der Überstand wurde anschließend entfernt. Um im Anschluss den DNA-Verdau durchzuführen, wurde die Säule mit 400 µL Ethanol gewaschen und 75 µL *DNA digestion* Puffer sowie 5 µL DNase I wurden hinzugegeben. Die Mischung wurde im Anschluss für 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Danach konnten 400 µL *RNA Preparation* Puffer hinzugegeben und eine 50-sekündige Zentrifugation bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Der Überstand wurde wiederum entfernt und 0,7 ml 80-prozentiges Ethanol beigemischt. Im Anschluss wurde die Säule bei 16.000 x g für 2:30 Minuten zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes konnte die Säule wiederholt zentrifugiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt werden. Anschließend wurden 25 µL DNase/RNase-freies Wasser hinzugegeben. Es erfolgte ein weiterer 50-sekündiger Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur und 16.000 x g. Mithilfe eines Photospektrometers wurde die RNA-Konzentration und -Qualität schließlich analysiert und die RNA bei -80° C eingefroren.

2.2.8 cDNA-Synthese

Um eine RT-PCR durchführen zu können, muss die isolierte RNA zunächst in eine cDNA umgeschrieben werden. Dafür wird eine reverse Transkriptase genutzt, die eine komplementäre DNA aus der vorhandenen RNA synthetisiert. Für diesen Prozess wurde das iScript

cDNA Synthese-Kit verwendet. Für die Transkription wurde zu 1 µL RNA eine Mischung aus 4 µL 5 x iScript Reaction Mix und 1 µL iScript Reverse Transkriptase

hinzugegeben. Diese Lösung wurde anschließend auf ein Volumen von 20 μL mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Danach wurden die Proben mithilfe des Biometra T Gradient Thermoblocks erhitzt. Dies erfolgte zunächst für fünf Minuten bei 25° C, um eine Primerhybridisierung zu erreichen. Anschließend wurden die Probengefäße für 30 Minuten bei 42° C erhitzt. Als letztes wurde der Thermoblock für 5 Minuten auf 95° C erwärmt. Dieser Schritt sorgte für eine Inaktivierung der reversen Transkriptase. Die hergestellte cDNA konnte dann bei -20° C aufbewahrt werden.

2.2.9 Quantitative Real Time PCR

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde eine Real-Time Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Die Polymerase-Kettenreaktion dient der exponentiellen Amplifizierung von DNA-Sequenzen (Mullis und Faloona 1987). Dafür wird die DNA zunächst erhitzt, sodass sich die Doppelstrangstruktur auflöst. Im Anschluss können sich spezifische Primer an die zu untersuchende DNA-Sequenz binden. Mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) können die Genabschnitte schließlich *in vitro* synthetisiert werden. In einer Reihe von Zyklen wächst die neu generierte DNA dabei exponentiell und kann mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs quantifiziert werden. Für die Quantifizierung wurde der Farbstoff *SYBR Green* genutzt, welcher mit der DNA interkaliert. Da sich die Stärke der Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte verhält, kann über Fluoreszenzmessungen eine Quantifizierung vorgenommen werden (Kubista et al. 2006). Die Menge der Ziel-mRNA wurde anschließend gegen ein Housekeeping-Gen normalisiert. Mithilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode erfolgte im Anschluss die relative Quantifizierung der Genexpression (Kenneth J. Livak und Thomas D. Schmittgen 2001).

2.2.10 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurde GraphPad Prism 9 verwendet. Zunächst wurden die gewonnenen Daten auf Normalverteilung geprüft und anschließend die Gruppenunterschiede mithilfe des student's t-Tests analysiert. Werte unterhalb $p = 0,05$ wurden dabei als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 TGF- β -Stimulation humaner Fibroblastenzellen

Das Zytokin TGF- β sorgt für profunde Veränderungen in der Genexpression humaner Zellen. Um diese unter besonderer Berücksichtigung fibrotischer Parameter auf Fibroblastenzellen darzustellen, wurde in einem Vorversuch zu dieser Arbeit ein Microarray nach 24-stündiger Stimulation der Zellen mit TGF- β durchgeführt (Abbildung). Dabei zeigten die Fibroblastenzellen deutlich erhöhte Marker einer Aktivierung, erkennbar an der Transkriptionssteigerung von α -SMA und Alpha-1-Typ-I-Kollagen (*ACTA2*: $\log_2(2,07)$ -fache Änderung, $p = 0,23$, $n = 3$; *COL1A1*: $\log_2(0,92)$ -fache Änderung, $p = 0,53$, $n = 3$). Fibronectin, ebenfalls ein strukturgebendes Protein der extrazellulären Matrix, wurde ebenso erhöht exprimiert (*FN1*: $\log_2(0,55)$ -fache Änderung, $p = 0,68$, $n = 3$). Auch die Transkription der matrizellulären Proteine Periostin und Osteoglycin wurde moduliert. Dabei ließ sich eine Genexpressionserhöhung von Periostin detektieren, die Osteoglycin-Expression wurde stark vermindert (*POSTN*: $\log_2(0,49)$ -fache Änderung, $p = 0,71$, $n = 3$; *OGN*: $\log_2(-3,36)$ -fache Änderung, $p = 0,1$, $n = 3$).

Von besonderem Interesse war dabei außerdem, dass neben den oben beschriebenen Transkriptionsänderungen der matrizellulären und strukturgebenden Proteine eine sehr deutliche und signifikante Transkriptionssteigerung von Interleukin-11 beobachtet werden konnte (*IL11*: $\log_2(5,44)$ -fache Änderung, $p = 0,02$, $n = 3$).

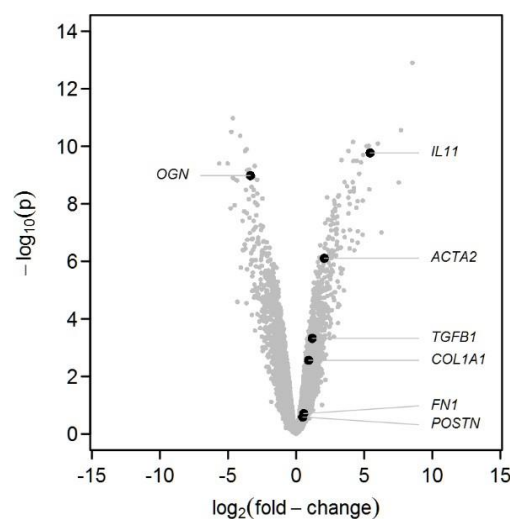


Abbildung 4: Volcano Plot nach Stimulation mit TGF- β . Die Zellen wurden für 24 h mit 10 ng/ml TGF- β stimuliert. Das Histogramm zeigt die Verteilung der identifizierten Gene nach fold-change und p-Wert. Ausgewählte Gene wurden gekennzeichnet. $n = 3$.

Um das Zusammenspiel zwischen IL-11 und TGF- β in der Fibroseantwort humaner Fibroblastenzellen näher zu charakterisieren, dienen die folgenden Untersuchungen. Dafür wurde neben IL-11 auch das bereits an seinen Rezeptor gekoppelte Zytokin Hyper-IL-11 verwendet.

3.2 Signaltransduktion durch IL-11, Hyper-IL-11 und TGF- β

Zur Prüfung der Funktionalität von IL-11 und Hyper-IL-11 wurde zunächst eine Analyse der Signaltransduktion in den Fibroblastenzellen vorgenommen. In vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass IL-11 über den STAT3- bzw. ERK-Signalweg transduziert (vgl. Kapitel 1.6.1).

Es zeigte sich, dass eine Behandlung mit IL-11 bereits nach 10 Minuten zu einer Phosphorylierung von STAT3 führte, die auch nach 15 und 30 Minuten festgestellt werden konnte. Nach 60 Minuten ließ sich keine STAT3-Phosphorylierung mehr detektieren. Die Aktivierung von STAT3 durch das bereits an seinen Rezeptor gekoppelte Hyper-IL-11 zeigte eine weitestgehend identische Kinetik, jedoch waren zu allen Zeitpunkten der Aktivierung höhere Mengen an phosphoryliertem STAT3 nachweisbar. TGF- β führte zu keinem Zeitpunkt zu einer Aktivierung von STAT3, auch der ERK-Signalweg wurde von keinem der untersuchten Zytokine bedient.

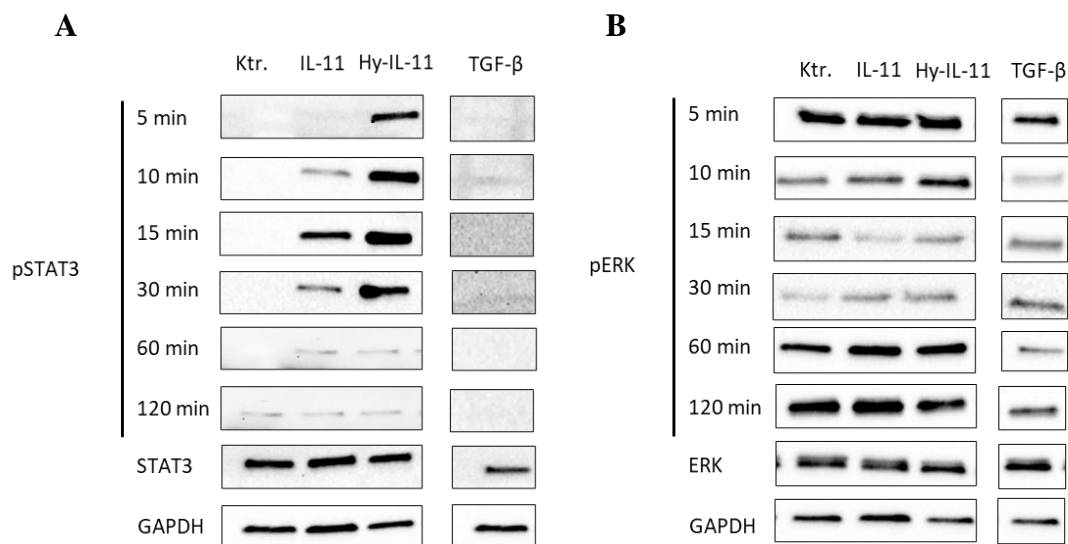


Abbildung 5: Induktion von pSTAT3 und pERK zu verschiedenen Zeitpunkten. Humane Fibroblastenzellen wurden für Zeitspannen zwischen 5 und 120 min mit 10 ng/ml IL-11 oder TGF- β stimuliert. Anschließend wurden die Zelllysate für die Immunoblotanalysen von A) pSTAT3 und STAT3 sowie B) pERK und ERK verwendet. GAPDH diente als Ladekontrolle. Zur vergleichenden Analyse wurde eine unstimulierte Kontrolle verwendet. $n = 3$.

3.3 Transkription von *TGFB1*

Mithilfe des Microarrays konnte bereits gezeigt werden, dass TGF- β zu einer deutlichen Erhöhung der *IL11*-Transkription in den humanen Fibroblastenzellen führt (Abbildung 4: Volcano Plot nach Stimulation mit TGF- β). Um die wechselseitige Wirkung der beiden Zytokine untereinander näher zu beleuchten, wurden die Zellen mit TGF- β , IL-11 und Hyper-IL-11 stimuliert und die TGF- β -mRNA anschließend mittels einer qRT-PCR analysiert (Abbildung A - C). Hierbei zeigte sich, dass IL-11 und Hyper-IL-11 für eine Reduktion der TGF- β -mRNA auf das etwa 0,9- bzw. 0,8-fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sorgten (IL-11: $0,8867 \pm 0,04726$ -fache Änderung, $p = 0,0534$; Hyper-IL-11: $0,8 \pm 0,96$ -fache Änderung, $p = 0,0695$, $n = 3$). Eine Stimulation mit TGF- β bewirkte hingegen eine leichte Erhöhung der *TGFB1*-Transkripte auf das etwa 1,2-fache ($1,263 \pm 0,2610$ -fache Änderung, $p = 0,2227$, $n = 3$, Abb. 3 A). In der Gegenüberstellung der Zytokine untereinander zeigte Hyper-IL-11 eine signifikante Transkriptionsreduktion des untersuchten Zieles im Vergleich zur TGF- β -Stimulation ($p = 0,0448$, $n = 3$).

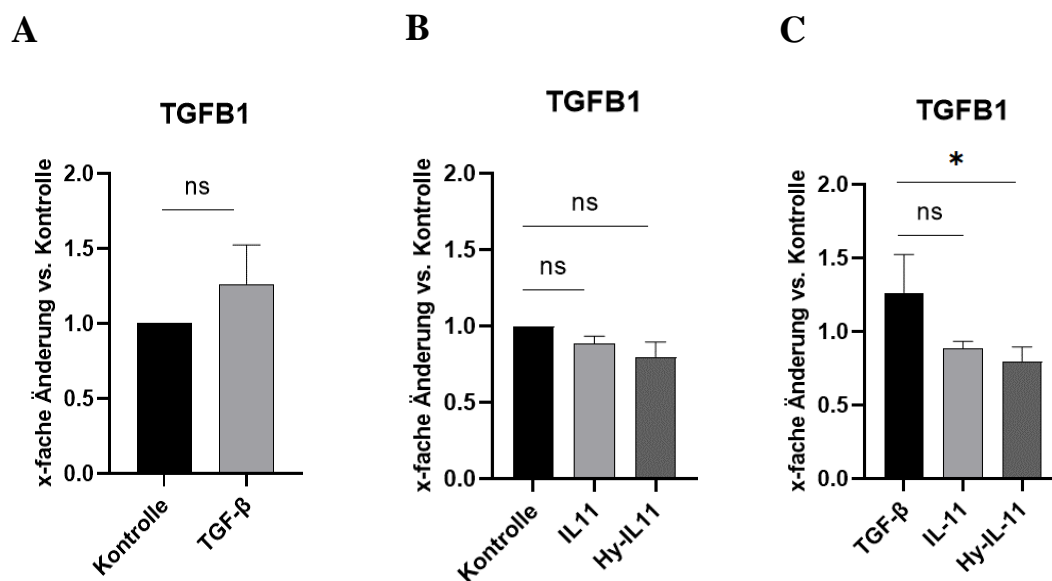


Abbildung 6: *TGFB1*-Expression. Humane Fibroblastenzellen wurden für 48 h mit 10 ng/ml TGF- β (A und C) und 10 ng/ml IL-11 bzw. Hy-IL-11 (B und C) stimuliert. Anschließend wurden die Lysate für die qRT-PCR von *TGFB1* verwendet. Zur statistischen Analyse wurde ein t-Test verwendet. Signifikanzen sind als * $p < 0,05$ angegeben. $n = 3$.

3.4 Einfluss von IL-11, Hyper-IL-11 und TGF- β auf Strukturproteine

Kommt es zu einer Aktivierung und Transdifferenzierung von Fibroblasten, so lässt sich eine deutliche Sekretionserhöhung der Strukturproteine Kollagen I und α -SMA feststellen. Im Mechanismus der Aktivierung kommt TGF- β eine bedeutsame Rolle zu. Neben Kollagen I und α -SMA stellt Fibronectin einen wichtigen strukturellen Bestandteil der extrazellulären Matrix dar (Kapitel 1.4). Im Folgenden sollen die Expressionsänderungen der genannten Proteine unter Stimulation mit TGF- β , IL-11 und Hyper-IL-11 näher beschrieben werden.

3.4.1 Transkription von *ACTA2*

Mithilfe einer qRT-PCR-Analyse wurde die Expressionsänderung von *ACTA2* in humanen Fibroblasten quantifiziert. Es zeigte sich, dass durch die Behandlung mit TGF- β die Expression von *ACTA2* signifikant anstieg (Abbildung 7 A). Die Erhöhung betrug dabei das etwa 5,35-Fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($5,350 \pm 0,5386$ -fache Änderung, $p = 0,0051$, $n = 3$). Auch in den weiteren Bedingungen wurde die Expression von *ACTA2* signifikant verändert (Abbildung 7 B + C). Dabei sorgte IL-11 für eine Verminderung auf das 0,86-Fache, Hyper-IL-11 auf das etwa 0,54-Fache (IL-11: $0,8633 \pm 0,03786$ -fache Änderung, $p = 0,0246$, $n = 3$; Hy-IL-11: $0,54 \pm 0,03$ -fache Änderung, $p = 0,0011$, $n = 3$). Bei der parallelen Stimulation mit IL-11 und TGF- β wurde die *ACTA2*-Expression um das etwa 4,9-Fache nach oben reguliert ($4,857 \pm 0,4619$ -fache Änderung, $p = 0,0047$, $n = 3$). Der Unterschied zu einer einfachen TGF- β -Stimulation, welche eine Erhöhung um das etwa 5,35-Fache bewirkte, blieb jedoch nicht signifikant. Eine Kostimulation mit Hyper-IL-11 und TGF- β hingegen bewirkte einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur alleinigen TGF- β -Stimulation (Abbildung 7 C). Dort betrug die Konzentrationserhöhung nur noch das etwa 3,7-Fache im Vergleich zur Kontrolle (TGF- β + hy-IL-11: $3,66 \pm 0,56$ -fache Änderung, $n = 3$; Kostimulation vs. TGF- β : $p = 0,0196097$).

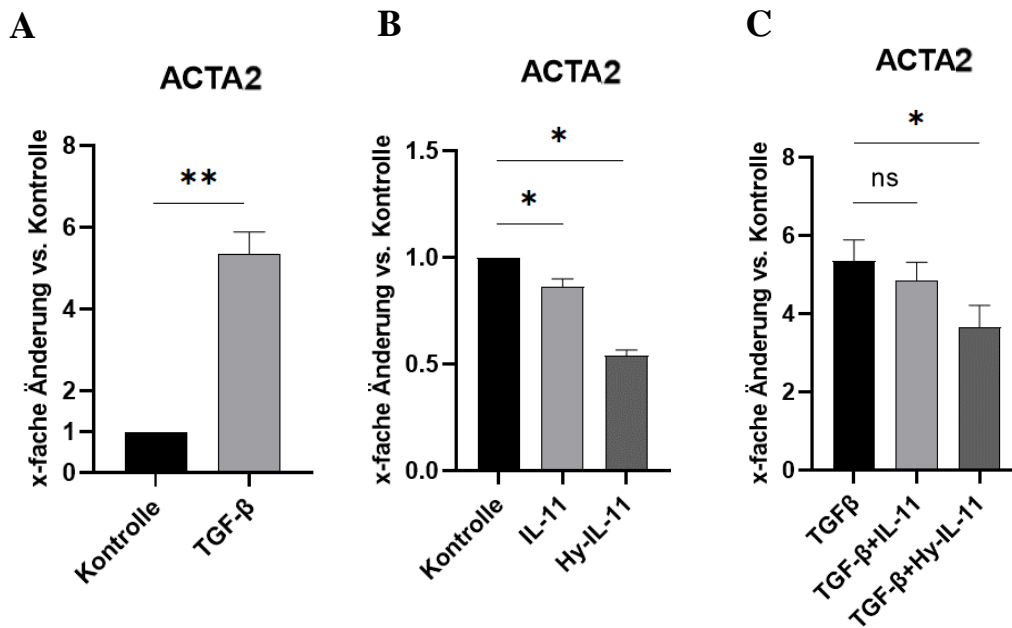


Abbildung 7: Expressionsänderung von ACTA2. Humane Fibroblastenzellen wurden für 48 h mit 10 ng/ml TGF- β (A), 10 ng/ml IL-11 und Hy-IL-11 (B), 10 ng/ml TGF- β + 10 ng/ml IL-11 oder Hy-IL-11 (C) stimuliert. Anschließend wurden die Lysate mittels qRT-PCR quantifiziert. Zur vergleichenden Analyse diente eine unstimulierte Kontrolle. Zur statistischen Analyse wurde ein t-Test verwendet. Signifikanzen sind als * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ angegeben. $n = 3$.

3.4.2 Proteinexpression von α -SMA

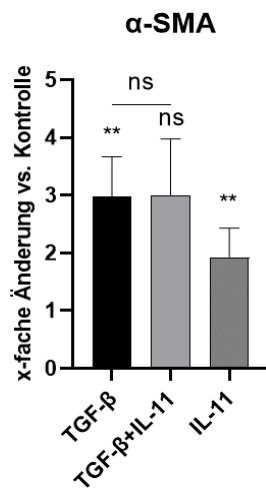
ACTA2 ist das kodierende Gen für das α -SMA Protein. Um Änderungen in der Proteinexpression darzustellen, wurden die Zellen zunächst für 24 Stunden mit IL-11 und TGF- β stimuliert und der Proteinüberstand anschließend mithilfe eines Western Blots analysiert (Abbildung 8). Das kontraktile Protein α -SMA wurde dabei durch TGF- β signifikant nach oben reguliert, die Proteinmenge stieg um das etwa 3-Fache an ($2,976 \pm 0,6916$ -fache Änderung, $p = 0,0031$, $n = 5$). IL-11 erhöhte die Quantität im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls signifikant auf das etwa 2-Fache ($1,933 \pm 0,499$, $p = 0,006$, $n = 5$). Die Expressionsänderung durch die Kostimulation war sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch zur TGF- β -Stimulation nicht signifikant ($2,993 \pm 0,9850$ -fache Änderung, $p = 0,0727$; TGF- β vs. Kostimulation: $p = 0,9780$, $n = 3$).

Zusätzlich wurde eine Stimulationszeit von 48 Stunden analysiert (Abbildung C + D). Durch TGF- β zeigte sich zunächst eine etwa 2,5-fache, signifikante Erhöhung der Proteinexpression ($2,547 \pm 1,524$ -fache Änderung $p = 0,0313$, $n = 5$). Durch IL-11 und die Kostimulation wurde eine Reduktion der α -SMA-Proteinmenge im Vergleich zur

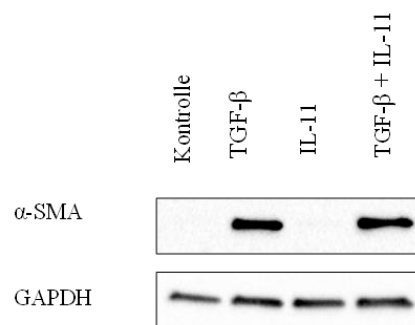
Stimulation mit TGF- β erreicht, diese blieb jedoch nicht signifikant. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sorgten diese Bedingungen ebenfalls für eine leichte Erhöhung der Proteinmenge (Kostimulation: $2,166 \pm 0,8967$ -fache Änderung, $p = 0,0625$, $n=5$; IL-11: $1,339 \pm 0,3124$ -fache Änderung, $p = 0,0625$, $n = 5$).

Eine weitere Versuchsreihe umfasste die 48-stündige Stimulation mit TGF- β und Hyper-IL-11 (Abbildung E + F). Es ergab sich ein Anstieg der α -SMA-Proteinmenge durch TGF- β und die Kostimulation um das etwa 15- bzw. 16-Fache (TGF- β : $15,07 \pm 5,369$ -fache Änderung, $p = 0,0135$, $n = 4$; Kostimulation: $16,27 \pm 8,186$ -fache Änderung, $p = 0,0335$, $n = 4$). Untereinander war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar ($p = 0,8143$). Hyper-IL-11 hingegen regulierte die Proteinexpression signifikant auf das etwa 0,7-Fache nach unten ($0,6859 \pm 0,1734$ -fache Änderung, $p = 0,0362$, $n = 4$).

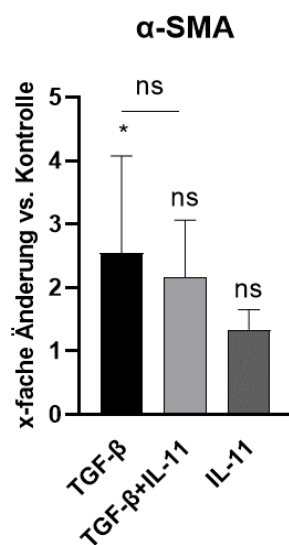
A



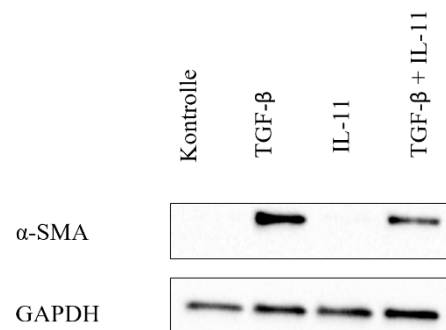
B



C



D



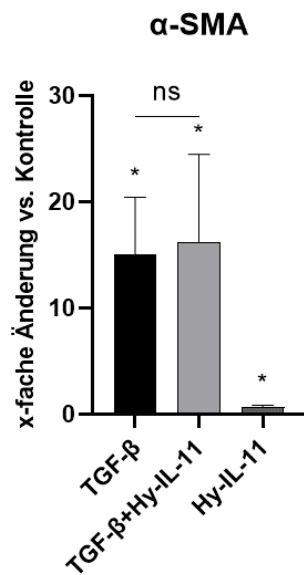
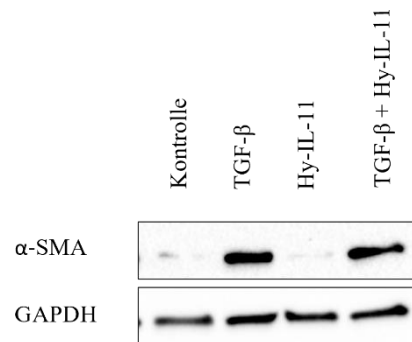
E**F**

Abbildung 8: α -SMA-Proteinexpression. Humane Fibroblastenzellen wurden für 24 bzw. 48 h stimuliert. Für die Immunoblotanalysen von α -SMA wurden Zellysate verwendet und GAPDH als Ladekontrolle genutzt. Zum Vergleich diente eine unstimulierte Kontrolle. Zur statistischen Analyse wurde ein t-Test verwendet. Signifikanzen sind als * $p < 0,05$ angegeben. $n = 4$.

A: Stimulation für 24 h mit 10 ng/ml TGF- β , 10 ng/ml IL-11 und 10 ng/ml TGF- β + 10 ng/ml IL-11, mit repräsentativem Western Blot (B),

C: Stimulation für 48 h mit 10 ng/ml TGF- β , 10 ng/ml IL-11 und 10 ng/ml TGF- β + 10 ng/ml IL-11, mit repräsentativem Western Blot (D).

E: Stimulation mit 10 ng/ml TGF- β , 10 ng/ml Hyper-IL-11 oder 10 ng/ml TGF- β + 10 ng/ml Hyper-IL-11, mit repräsentativem Western Blot (F).

3.4.3 Expression der Fibronectin-mRNA

Mithilfe einer qRT-PCR-Analyse konnte die Expressionsänderung der Fibronectin-mRNA untersucht werden. Dabei zeigte die die Fibronectin-Expression eine signifikante Erhöhung der mRNA-Menge durch die Stimulation mit TGF- β und durch die Kostimulation von TGF- β und IL-11 (Abbildung 99Abbildung 9). TGF- β regulierte das untersuchte Ziel um das etwa 2-Fache nach oben, in der Kostimulation war eine Erhöhung auf das etwa 3,6-Fache zu beobachten (TGF- β : $2,033 \pm 0,5217$ -fache Änderung, $p = 0,0314$, $n = 3$; Kostimulation: $3,6 \pm 0,325$ -fache Änderung, $p = 0,0129$, $n = 3$). Wurde mit Hyper-IL-11 und TGF- β gleichzeitig stimuliert, so zeigte sich eine etwa 1,6-fache Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle ($1,610 \pm 0,2536$ -fache Änderung, $p = 0,0531$, $n = 3$). IL-11 und Hyper-IL-11 zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Fibronectin-Expression (IL-11: $1,017 \pm 0,0351$ -fache Änderung, $p = 0,4975$, $n = 3$; Hyper-IL-11: $0,7767 \pm 0,1002$ -fache Änderung, $p = 0,0610$, $n = 3$).

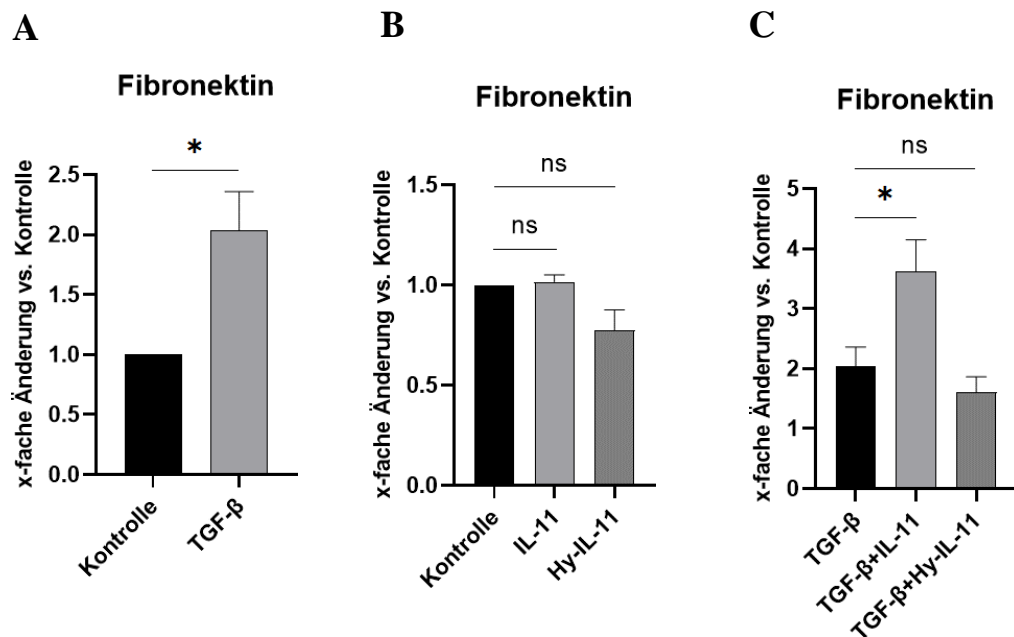
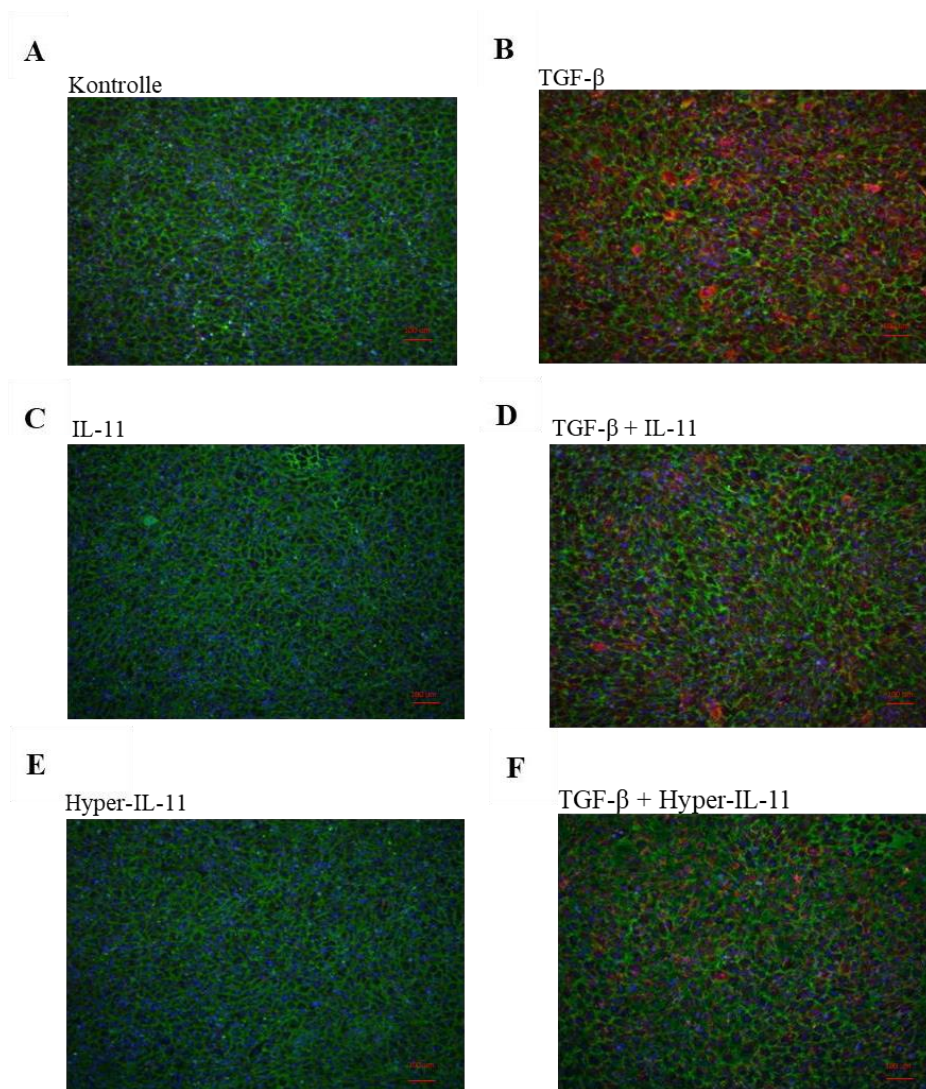


Abbildung 9: Fibronectin-Genexpression. Humane Fibroblastenzellen wurden mit 10 ng/ml TGF-β, 10 ng/ml IL-11, 10 ng/ml TGF-β + 10 ng/ml IL-11, 10 ng/ml hy-IL-11 und 10 ng/ml TGF-β + 10 ng/ml hy-IL-11 stimuliert. Anschließend wurden die Lysate für die qPCR von Fibronectin verwendet. Zur vergleichenden Analyse diente eine unstimulierte Kontrolle. Zur statistischen Analyse wurde ein t-Test verwendet. Signifikanzen sind als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$ angegeben. $n = 3$.

3.4.4 Validierung der α-SMA- und Fibronectin-Expression

Zur Validierung der α-SMA und Fibronectin-Expression nach Stimulation mit TGF-β und IL-11 wurden die gefärbten humanen Fibroblastenzellen auf Objektträger fixiert, mittels Immunfluoreszenz gefärbt und in verschiedenen Vergrößerungen betrachtet. Anschließend wurde der prozentuale Anteil α-SMA-positiver Zellen berechnet und die Fibronectin-Expression quantifiziert (Abbildung). Es zeigte sich, dass die Expression von α-SMA durch IL-11 und Hyper-IL-11 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht verändert wurde. TGF-β hingegen sorgte für einen Anstieg des prozentualen Anteils auf etwa 1,5 % ($1,475 \pm 0,58$ %, $p < 0,0001$, $n = 6$). Durch die Kostimulation von TGF-β und IL-11 konnte diese Teilmenge auf etwa 1,3 % reduziert werden ($1,284 \pm 0,3762$ %, $p < 0,0001$, $n = 6$). Eine signifikante Änderung im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit TGF-β ergab eine Kostimulation mit TGF-β und Hyper-IL-11. Der prozentuale Anteil α-SMA-positiver Zellen konnte dabei auf etwa 0,8 % gesenkt werden ($0,8237 \pm 0,5310$ %, $n = 3$).

Die Expressionsänderung von Fibronectin wurde ebenfalls betrachtet. Es ergaben sich insgesamt keine signifikanten Änderungen hinsichtlich einer Expressionserhöhung oder -verminderung im Vergleich der Behandlungen mit der Kontrolle oder zwischen den Gruppen (TGF- β : $1,14 \pm 0,178$ -fache Änderung, $p = 0,306$; IL-11: $0,955 \pm 0,08376$ -fache Änderung, $p = 0,452$; TGF- β + IL-11: $1,04 \pm 0,182$ -fache Änderung, $p = 0,738$; Hy-IL-11: $1,029 \pm 0,052$ -fache Änderung, $p = 0,436$; TGF- β + Hy-IL-11: $1,037 \pm 0,387$ -fache Änderung, $p = 0,884$; TGF- β vs. TGF- β + IL-11: $p = 0,534$; TGF- β vs. TGF- β + Hy-IL-11: $p = 0,697$)



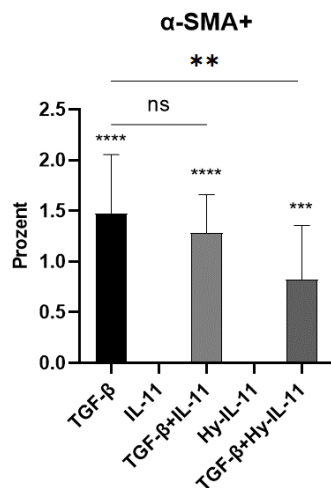
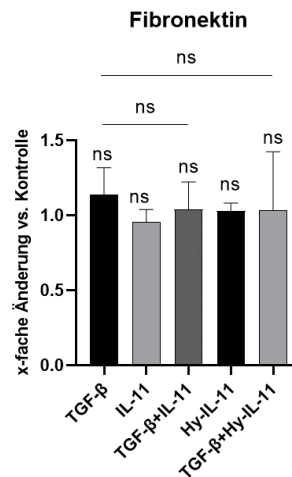
G**H**

Abbildung 10: α-SMA- und Fibronectin-Expression in der Immunfluoreszenz. Humane Fibroblastenzellen wurden auf Cover-slips ausgesät und für 48 h mit 10 ng/ml TGF-β (B), 10 ng/ml IL-11 (C), 10 ng/ml TGF-β + 10 ng/ml IL-11 (D), 10 ng/ml hy-IL-11 (E) sowie 10 ng/ml TGF-β + 10 ng/ml Hyper-IL-11 (F) stimuliert. Nach anschließender Fixierung wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) sowie Antikörpern gegen Fibronectin (grün) und α-SMA (rot) eingefärbt. 10-fache Vergrößerung. G: Quantitative Analyse des prozentualen Anteils α-SMA-positiver Zellen. H: Quantitative Analyse der Fibronectin-Expression.

Zum Vergleich diente eine unstimulierte Kontrolle (A). Zur statistischen Analyse wurde ein t-Test verwendet. Signifikanzen sind als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$ angegeben. $n = 4$.

3.4.5 Proteinexpression von Kollagen I

Um die Expressionsänderung von Kollagen I darzustellen, wurden Western-Blot Analysen durchgeführt (Abbildung). Dabei wurden Kollagen 1A1 und Kollagen 1A2 gesondert betrachtet.

Hierfür wurden die Fibroblasten für 24 Stunden mit TGF-β und/oder IL-11 stimuliert (Abbildung A - C). Es zeigte sich, dass das Strukturprotein Kollagen 1A1 sowohl durch TGF-β als auch durch die Kostimulation signifikant nach oben reguliert wurde (TGF-β: $3,696 \pm 1,879$ -fache Änderung $p = 0,0327$, $n = 5$; Kostimulation: $2,399 \pm 0,3377$ -fache Änderung $p = 0,0189$, $n = 3$). Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen war jedoch nicht signifikant ($p = 0,2946$). IL-11 regulierte die Kollagen 1A1-Expression ebenfalls leicht nach oben, dies blieb aber nicht signifikant ($1,277 \pm 0,2702$ -fache Änderung, $p = 0,0834$, $n = 5$). Bei Betrachtung von Kollagen 1A2 sorgte jede der drei unterschiedlichen Behandlungen für eine signifikante Steigerung der Proteinexpression. Nach Behandlung mit TGF-β betrug diese das etwa 5-Fache ($5,083 \pm 2,634$ -fache Änderung

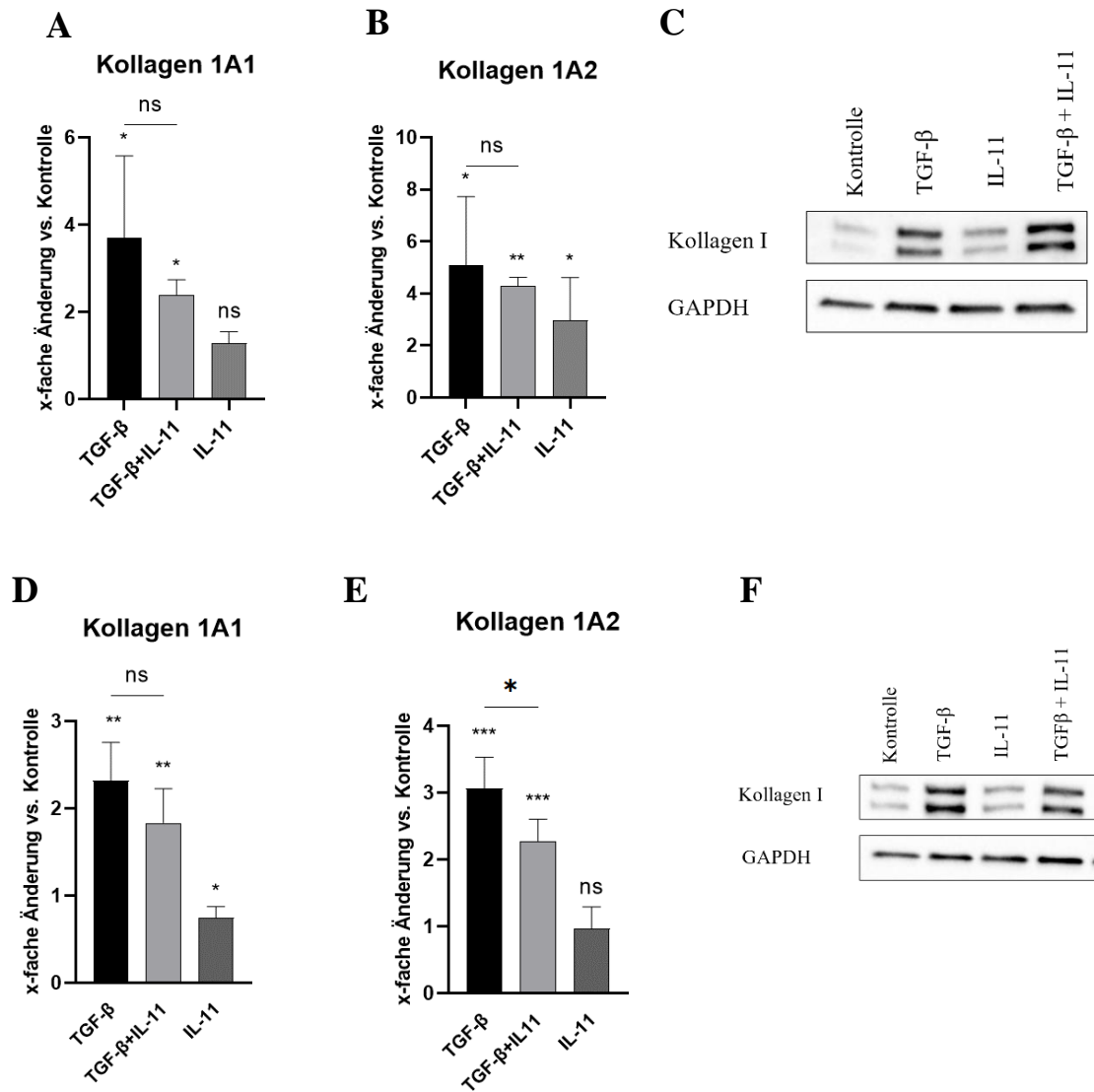
$p = 0,0257$, $n = 5$), durch die Kostimulation das etwa 4-Fache ($4,306 \pm 0,3190$ -fache Änderung $p = 0,0031$, $n = 3$) und durch IL-11 das etwa 3-Fache im Vergleich zur Kontrolle ($2,976 \pm 1,648$ -fache Änderung $p = 0,0324$, $n = 5$). Untereinander unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant (TGF- β vs. Kostimulation: $p = 0,6398$).

In einem nächsten Schritt wurden die Fibroblasten für 48 Stunden stimuliert (Abbildung D – I). Dabei zeigte die Analyse des Strukturproteins Kollagen 1A1 eine signifikante Erhöhung der Proteinexpression durch TGF- β . Der Anstieg betrug das etwa 2-Fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($2,318 \pm 0,4383$ -fache Änderung, $p = 0,0025$, $n = 5$). In der Kostimulation mit TGF- β und IL-11 verringerte sich diese Änderung auf das etwa 1,8-Fache, was jedoch im Vergleich zur TGF- β -Stimulation nicht signifikant war ($1,836 \pm 0,3893$, $p = 0,0086$, $p = 0,1034$, $n = 5$). Das Zytokin IL-11 bewirkte eine signifikante Verringerung der Kollagen 1A1-Expression auf das ca. 0,7-Fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($0,7476 \pm 0,1250$ -fache Änderung, $p = 0,0107$, $n = 5$).

Bei Betrachtung von Kollagen 1A2 zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Proteinmenge nach Stimulation mit TGF- β auf das etwa 3-Fache im Vergleich zur Kontrolle ($3,068 \pm 0,4648$ -fache Änderung, $p = 0,0001$, $n = 5$). In der Kostimulation verringerte sich diese Änderung signifikant auf das etwa 2-Fache ($2,278 \pm 0,3251$, $p = 0,011$, $n = 5$). Verglichen mit der alleinigen TGF- β -Stimulation war dies ebenfalls signifikant ($p = 0,011$, $n = 5$). Eine Behandlung mit IL-11 bewirkte eine Verringerung auf das ca. 0,9-Fache der Kollagen 1A2-Expression im Vergleich zur Kontrolle ($0,9673 \pm 0,3253$ -fache Änderung, $p = 0,8333$, $n = 5$).

Des Weiteren wurde eine Versuchsreihe mit Hyper-IL-11 und 48-stündiger Zellstimulation durchgeführt. Auch hier wurden Kollagen 1A1 und Kollagen 1A2 getrennt betrachtet. Die Stimulation mit Hyper-IL-11 bewirkte dabei kaum eine Expressionsänderung von Kollagen 1A1 im Vergleich zur Kontrolle ($1,101 \pm 0,18$ -fache Änderung, $p = 0,35$, $n = 4$). Durch TGF- β kam es jedoch zu einem Anstieg der Proteinmenge auf das etwa 3,5-Fache ($3,461 \pm 1,362$ -fache Änderung, $p = 0,0364$, $n = 4$). Auch in der Kostimulation ließ sich eine vermehrte Konzentration von Kollagen 1A1 im Zelllysate finden, diese war um das etwa 3-Fache erhöht ($2,963 \pm 1,16$ -fache Änderung, $p = 0,0427$, $n = 4$). Im Vergleich untereinander gab es zwischen diesen beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,7887$, $n = 4$).

Kollagen 1A2 wurde sowohl von TGF- β als auch von der Kostimulation um das etwa 5-Fache signifikant nach oben reguliert (TGF- β : $5,337 \pm 2,127$ -fache Veränderung, $p = 0,0266$, $n = 4$; Kostimulation $5,348 \pm 2,106$ -fache Veränderung, $p = 0,0258$, $n = 4$). Hyper-IL-11 hingegen bewirkte keine signifikante Veränderung der Kollagen 1A1-Menge ($1,043 \pm 0,6063$ -fache Veränderung, $p = 0,8970$).



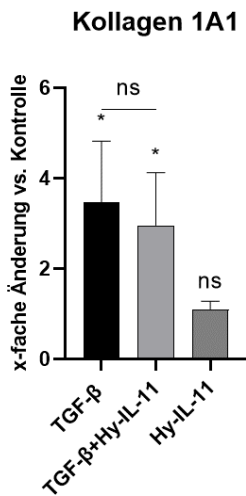
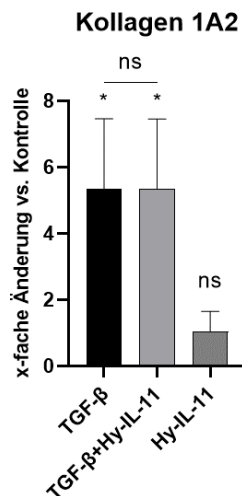
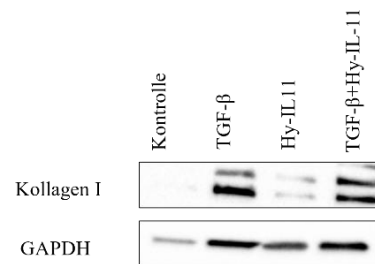
G**H****I**

Abbildung 11: Proteinexpression von Kollagen I. Humane Fibroblastenzellen wurden für 24 h (A-C) bzw. 48 h (D-I) mit TGF-β, IL-11 und Hyper-IL-11 stimuliert und das Proteinlysate anschließend mittels Western Blot analysiert. Zum Vergleich diente eine unstimulierte Kontrolle. Zur statistischen Analyse wurde ein t-Test verwendet und Signifikanzen als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ angegeben. $n = 5$.

A + B: 24-stündige Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β, 10 ng/ml IL-11 und 10 ng/ml TGF-β + 10 ng/ml IL-11, $n=5$; C: repräsentativer Western Blot

D + E: 48-stündige Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β, 10 ng/ml IL-11 und 10 ng/ml TGF-β + 10 ng/ml IL-11, $n=5$; F: repräsentativer Western Blot

G + H: 48-stündige Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β, 10 ng/ml Hyper-IL-11 oder 10 ng/ml TGF-β + 10 ng/ml Hyper-IL-11; I: repräsentativer Western Blot

3.4.6 Transkription der Kollagen I-mRNA

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass TGF-β für eine deutliche Transkriptions- und Translationserhöhung von Kollagen I sorgt (Kapitel 3.1 und 3.4.4), wurden die Effekte von IL-11 und Hyper-IL-11 auf die Transkription des Proteins untersucht (Abbildung). Es zeigte sich eine Verringerung der mRNA-Menge von Kollagen 1A1 in den untersuchten Proben nach Stimulation mit IL-11 und Hyper-IL-11. Hyper-IL-11 bewirkte dabei eine signifikante Änderung auf das etwa 0,6-Fache im Vergleich zur Kontrolle ($0,5866 \pm 0,04665$ -fache Änderung, $p = 0,0042$, $n = 3$). IL-11 bewirkte eine Verringerung auf das etwa 0,9-Fache ($0,8616 \pm 0,1363$ -fache Änderung, $p = 0,2206$, $n = 3$).

Auch Kollagen 1A2 wurde durch die Stimulationen mit IL-11 und Hyper-IL-11 vermindert exprimiert. IL-11 sorgte für eine Regulation auf das etwa 0,9-Fache, Hyper-IL-11 auf das etwa 0,6-Fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (IL-11: $0,9084 \pm$

0,1411-fache Änderung, $p = 0,377$, $n = 3$; hy-IL-11: $0,5945 \pm 0,06042$ -fache Änderung, $n = 3$). Die Verminderung von Kollagen 1A2 durch Hyper-IL-11 war im Vergleich zur Kontrolle signifikant ($p = 0,0073$).

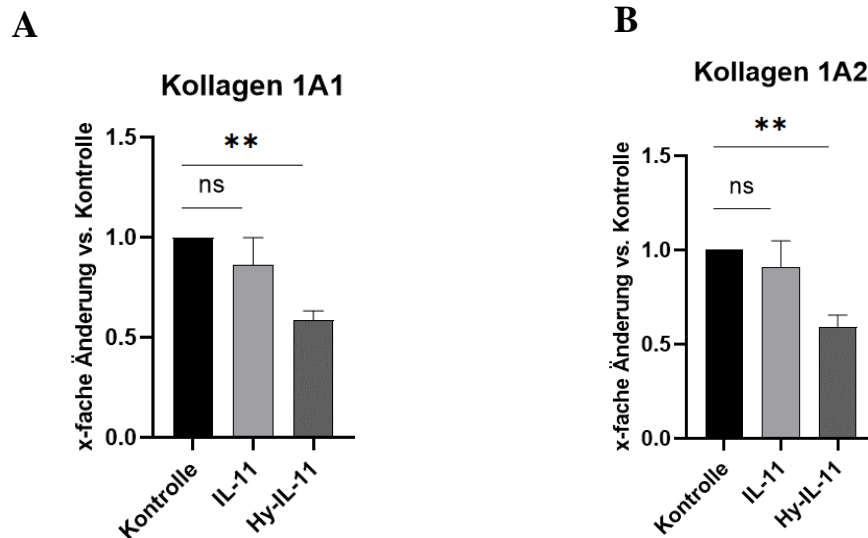


Abbildung 12: Genexpression von Kollagen I. Humane Fibroblastenzellen wurden für 48 h mit 10 ng/ml IL-11 und 10 ng/ml hy-IL-11 stimuliert. Anschließend wurden die Lyse für die qRT-PCR von Kollagen I verwendet. Zum Vergleich diente eine unstimulierte Kontrolle. Zur statistischen Analyse wurde ein t-Test verwendet. Signifikanzen sind als * $p < 0,05$ und ** $p < 0,001$ angegeben. $n = 3$.

3.4.6 Knockdown des IL-11-Rezeptors

Um zu validieren, dass die beobachteten Effekte auf die Strukturproteine Kollagen I und α -SMA durch IL-11 vermittelt werden, wurde ein *knockdown*-Versuch des *IL11RA* durchgeführt (Abbildung). Nach der Transfektion mithilfe der siRNA ergab sich eine signifikant verringerte Menge des IL-11R α in den behandelten Zellen ($0,659 \pm 0,0626$ -fache Änderung, $p = 0,011$, $n=3$).

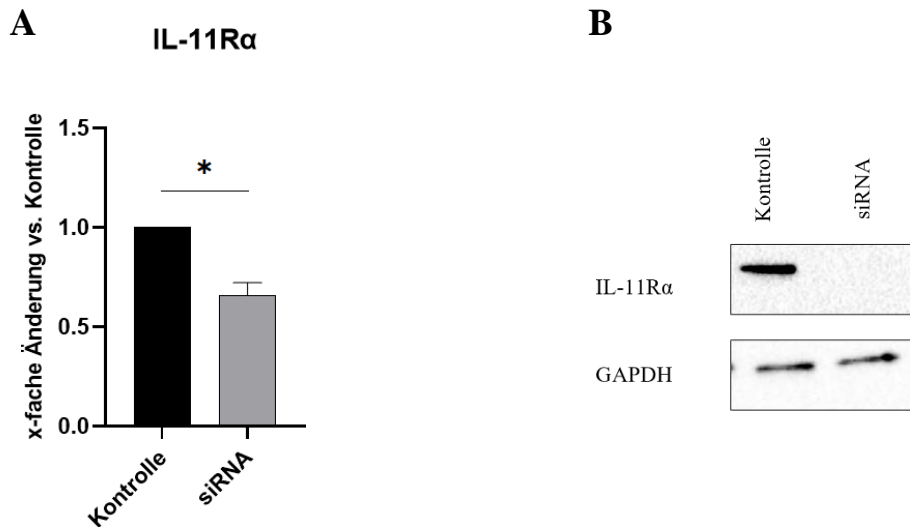


Abbildung 13: Knockdown des *IL11RA* durch eine siRNA. Humane Fibroblastenzellen wurden zunächst für 6 h mit der *IL-11Ra*-siRNA transfiziert und anschließend die Zellen für 48 h inkubiert. Für die Immunoblotanalysen vom *IL-11Ra* wurden Zelllysate verwendet und GAPDH als Ladekontrolle genutzt. Zur vergleichenden Analyse diente eine unstimulierte Kontrolle. Zur statistischen Analyse wurde ein t-Test verwendet, Signifikanzen sind als * $p < 0,05$ angegeben. $n = 3$. Dargestellt sind die Quantifizierung der Proteinmenge (A) und ein repräsentativer Western Blot (B).

Ergänzend wurden die transfizierten Zellen für 48 Stunden mit TGF- β stimuliert und der Proteinüberstand im Western Blot analysiert (Abbildung). Dabei zeigte sich eine Erhöhung der α -SMA-Proteinmenge in den transfizierten Fibroblasten (Abbildung A + B). Der Anstieg der α -SMA-Proteinmenge nach TGF- β -Stimulation transfizierter Zellen war etwa das 4,4-Fache im Vergleich zur Kontrolle. Die alleinige TGF- β -Stimulation der nicht-transfizierten Zellen sorgte für eine etwa α -SMA-Erhöhung um das etwa 4-Fache. Im Vergleich der Bedingungen untereinander ließ sich keine Signifikanz feststellen (TGF- β : $4,004 \pm 1,926$ -fache Änderung, $n = 3$; TGF- β + siRNA: $4,397 \pm 2,069$ -fache Änderung, $n = 3$; TGF- β vs. TGF- β + siRNA: $p = 0,8213$).

Eine ebensolche Erhöhung ließ sich auch bei Kollagen 1A1 und Kollagen 1A2 feststellen (Abbildung C - E). Hier war durch eine Vorbehandlung mit der siRNA die Proteinmenge um etwa 0,1 (Kollagen 1A1) und etwa 0,3 (Kollagen 1A2) höher als nach alleiniger TGF- β -Stimulation (Kollagen 1A1, TGF- β : $2,564 \pm 1,255$ -fache Änderung, TGF- β + siRNA: $2,668 \pm 1,334$ -fache Änderung, TGF- β vs. TGF- β + siRNA: $p = 0,9264$, $n = 3$; Kollagen 1A2, TGF- β : $2,441 \pm 0,5063$ -fache Änderung, TGF- β + siRNA: $2,704 \pm 0,7302$ -fache Änderung, TGF- β vs. TGF- β + siRNA: $p = 0,6355$).

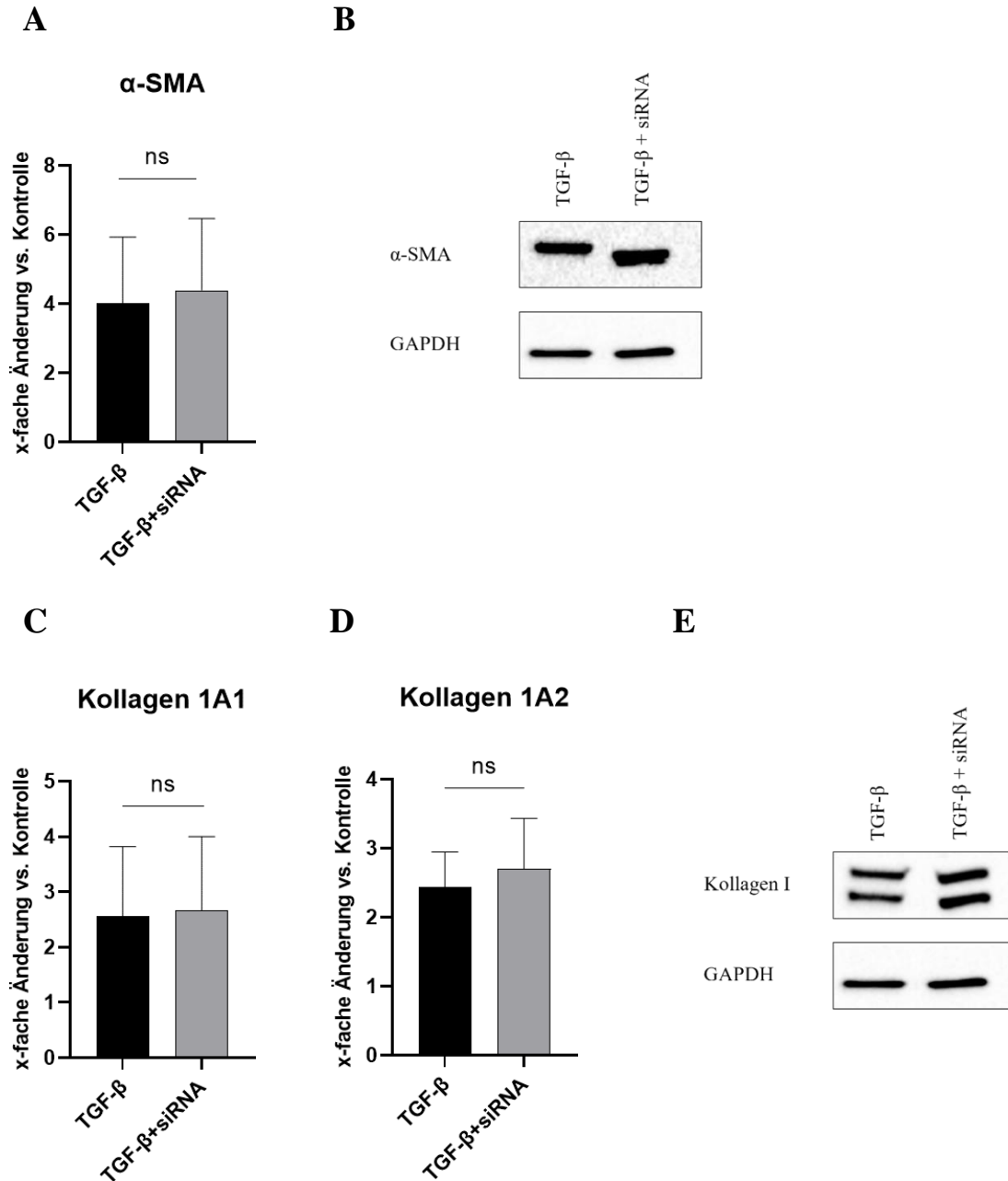


Abbildung 14: TGF-β-Stimulation nach IL-11Rα-knockdown. Humane Fibroblastenzellen wurden zunächst für 6 h mit der IL-11Rα-siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 48 h inkubiert. Für die Immunoblotanalysen von Kollagen I und α-SMA wurden Zelllysate verwendet und GAPDH als Ladekontrolle genutzt. Zur vergleichenden Analyse diente eine unstimulierte Kontrolle. Zur statistischen Analyse wurde ein t-Test verwendet. Werte ab $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen. $n = 3$.
 A: Quantifizierung der α-SMA-Proteinexpression und repräsentativer Western Blot (B)
 C + D: Quantifizierung der Kollagen I-Proteinexpression und repräsentativer Western Blot (E).

3.5 Inhibition des JAK2/STAT3-Signalweges

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte von IL-11 auf TGF- β und die Myofibroblasten-Transdifferenzierung über den JAK2/STAT3-Signalweg vermittelt werden, wurde eine Inhibition dieser Signalkaskade mithilfe von Ruxolitinib durchgeführt (Abbildung). Es zeigte sich, dass Ruxolitinib für eine verlässliche Inhibition des Signalwegs sorgte (Abbildung A). Als Folge dieser Signalwegsinhibition wurde eine veränderte Transkription von TGF- β sichtbar (Abbildung B). Konkret bedeutete dies, dass die alleinige Stimulation mit IL-11 zu einer leichten Reduktion der TGF- β -Transkription sorgte. Dieser Effekt war jedoch in der Stimulation mit IL-11 und gleichzeitiger Inhibition durch Ruxolitinib aufgehoben (IL-11: $0,82 \pm 0,11$ -fache Änderung, IL-11 + Ruxolitinib $1,01 \pm 0,25$ -fache Änderung, $n = 5$). Auch die IL-11-vermittelte Transkriptionsreduktion von ACTA wurde durch Ruxolitinib aufgehoben (IL-11: $0,878 \pm 0,146$ -fache Änderung, $n = 5$; IL-11 + Ruxolitinib: $0,997 \pm 0,229$ -fache Änderung, $n = 5$). Beide Änderungen erreichten jedoch keine statistische Signifikanz (ACTA: $p = 0,356$, TGFB1: $p = 0,15$).

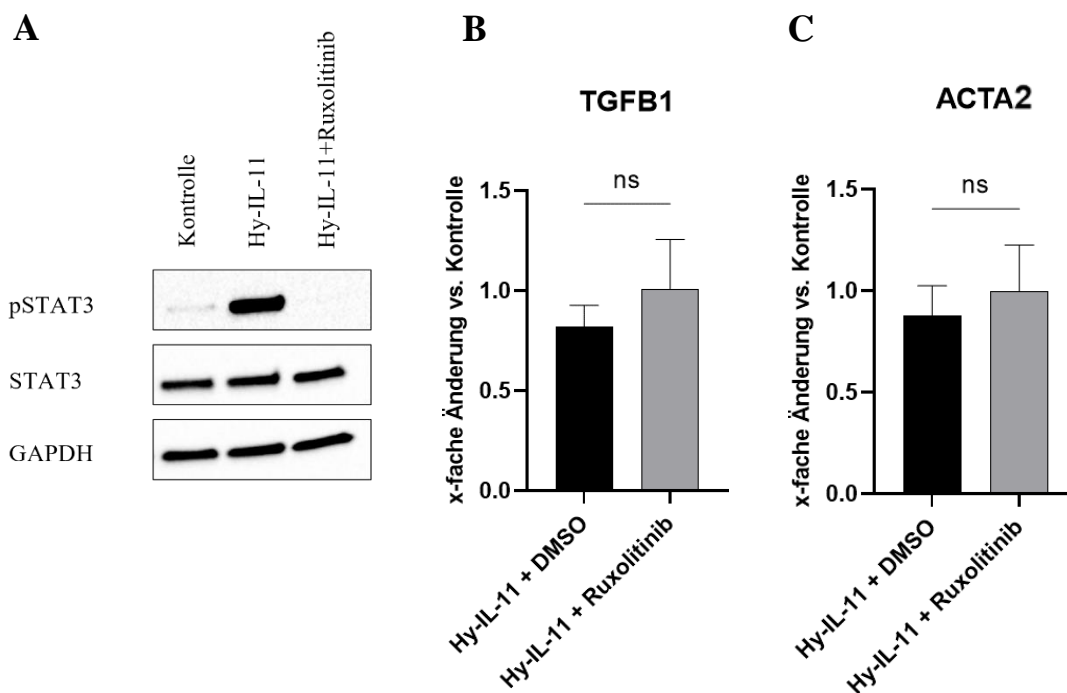


Abbildung 15: STAT3-knockout durch Ruxolitinib. Die Fibroblasten wurden nach einer 8-stündigen Ruxolitinib-Vorbehandlung für 48 h mit IL-11 inkubiert und im Anschluss die mRNA-Mengen von TGFB1 (B) und ACTA (C) durch eine qRT-PCR quantifiziert. Die Wirksamkeit von Ruxolitinib wurde zuvor im Western Blot bestätigt (A).

3.6 Einfluss von TGF- β , IL-11 und Hyper-IL-11 auf matrizelluläre Proteine

Neben der Expression von Strukturproteinen nehmen Fibroblasten über die Sekretion matrizellulärer Proteine Einfluss auf die Gewebshomöostase des Bindegewebes (Kapitel 1.4). Die hier untersuchten Proteine Periostin und Osteoglycin wurden auf Transkriptions- und Translationsebene nach Stimulationen mit TGF- β , IL-11 und Hyper-IL-11 analysiert.

3.6.1 Genexpression matrizellulärer Proteine

Die Genexpression von Periostin wurde mit Hilfe einer qRT-PCR analysiert (Abbildung 6 A – C). Nach der Stimulation mit TGF- β und in der Kostimulation mit IL-11 und TGF- β ergab sich eine signifikante Steigerung der Periostin-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei TGF- β betrug diese das etwa 2,7-Fache ($2,72 \pm 0,29$ -fache Änderung, $p = 0,0005$, $n = 3$), bei der parallelen Stimulation mit IL-11 und TGF- β betrug die Änderung das etwa 3-Fache ($3,03 \pm 0,53$ -fache Änderung, $p = 0,0026$, $n = 3$). Im Vergleich dazu war die Erhöhung durch die Kostimulation mit Hyper-IL-11 etwas geringer, sie betrug das etwa 2,4-Fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($2,44 \pm 0,3617$ -fache Änderung, $p = 0,204$, $n = 3$). Die Expression nach Stimulation mit IL-11 allein veränderte sich kaum ($0,99 \pm 0,09$, $p = 0,8522$, $n = 3$), Hyper-IL-11 verringerte die mRNA-Menge auf das etwa 0,7-Fache ($0,6733 \pm 0,1872$ -fache Änderung, $p = 0,0942$, $n = 3$).

Alle durchgeführten Behandlungen ergaben eine signifikante Verringerung der mRNA-Abundanz von Osteoglycin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 6 D – F). Am wenigsten war diese bei IL-11 ausgeprägt, hier betrug sie nur das etwa 0,7-Fache im Vergleich zur Kontrolle ($0,7067 \pm 0,06429$ -fache Änderung, $p = 0,0156$, $n = 3$). Im Vergleich untereinander blieb der Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungen nicht signifikant (TGF- β vs. IL-11-Kostimulation: $p = 0,5185$, TGF- β vs. Hy-IL-11-Kostimulation $p = 0,3739$).

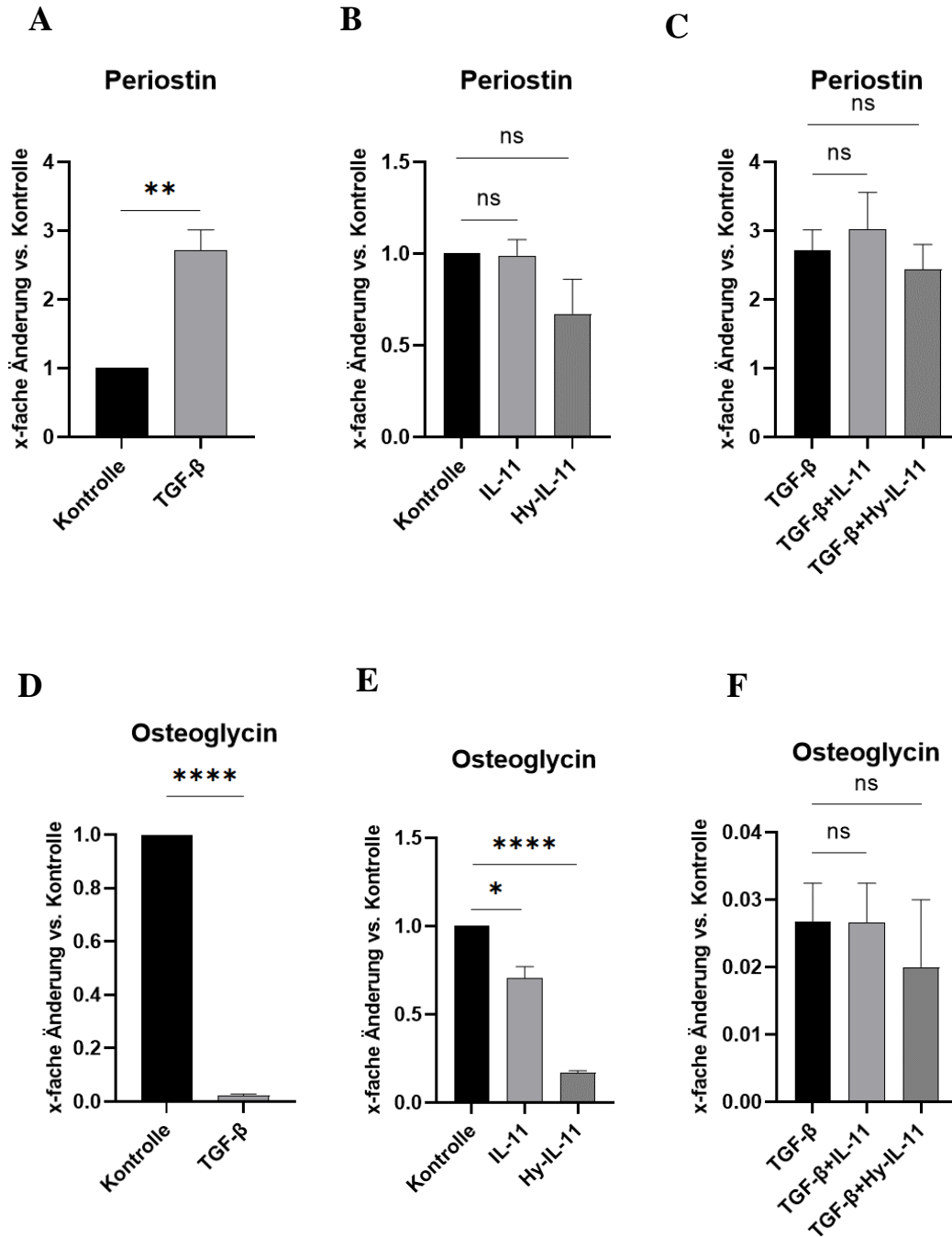


Abbildung 16: Genexpressionsänderung matrizellulärer Proteine. Humane Fibroblastenzellen wurden mit 10 ng/ml TGF-β, 10 ng/ml IL-11, 10 ng/ml TGF-β + 10 ng/ml IL-11, 10 ng/ml hy-IL-11 und 10 ng/ml TGF-β + 10 ng/ml hy-IL-11 stimuliert. Anschließend wurden die Lysate für die qPCR von Periostin (A - C) und Osteoglycin (D - F) verwendet. Zur vergleichenden Analyse diente eine unstimulierte Kontrolle. Zur statistischen Analyse wurde ein t-Test verwendet. Signifikanzen sind als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$ angegeben. $n = 3$.

3.6.2 Proteinexpression matrizellulärer Proteine

Ergänzend wurden Periostin und Osteoglycin im Western Blot untersucht (Abbildung 7). Es folgt die Beschreibung der Behandlungen mit IL-11 und TGF- β (Abbildung 7 A – C), im Verlauf dann die Versuchsreihen mit TGF- β und Hy-IL-11 (Abbildung 7 D – F).

Bei der Betrachtung von Periostin ergaben sich insgesamt keine signifikanten Veränderungen der Proteinquantität durch IL-11 oder TGF- β . Dies galt sowohl im Vergleich der Konditionen untereinander als auch mit der Kontrolle. Im Detail stieg die Expression um das knapp 2-Fache durch die TGF- β -Stimulation ($1,961 \pm 1,478$ -fache Änderung, $p = 0,2844$, $n = 4$). Die Kostimulation sorgte ebenfalls für eine lediglich geringe Änderung im Vergleich zur Kontrolle ($1,058 \pm 0,3761$ -fache Änderung, $p = 0,7775$, $n = 4$). Nach Stimulation mit IL-11 verringerte sich die Proteinmenge des untersuchten Targets auf das etwa 0,8-Fache ($0,8319 \pm 0,5763$ -fache Änderung, $p = 0,2063$, $n = 4$).

Osteoglycin zeigte eine signifikante Verringerung der Proteinmenge als Reaktion auf die Stimulation mit TGF- β (Abbildung B). Diese betrug das etwa 0,03-Fache in Relation zur Kontrolle ($0,02935 \pm 0,01716$ -fache Änderung, $p < 0,0001$, $n = 4$). Auch in der Kostimulation wurde das untersuchte Ziel signifikant nach unten reguliert. Hier betrug die Änderung das etwa 0,02-Fache im Vergleich zur Kontrolle ($0,02465 \pm 0,01526$ -Änderung, $p < 0,0001$, $n = 4$). Im Vergleich untereinander gab es hier keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,6966$, $n = 4$). IL-11 zeigte keine signifikante Regulation verglichen mit der Kontrolle ($0,7078 \pm 0,1877$ -fache Änderung, $p = 0,0527$, $n = 4$).

In einem zweiten Schritt wurden die Zellen mit TGF- β und Hy-IL-11 behandelt. Dabei ergab sich eine Änderung der Osteoglycin-Abundanz auf das 0,02-Fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durch TGF- β -Stimulation ($0,02187 \pm 0,01112$ -fache Änderung, $p < 0,0001$, $n = 4$). Auch in der Kostimulation mit hy-IL-11 und TGF- β wurde eine deutliche Reduktion erreicht. Diese betrug das etwa 0,018-Fache ($0,01873 \pm 0,009837$ -fache Änderung, $p < 0,0001$, $n = 4$). Die Reduktion durch Hy-IL-11 war weniger stark ausgeprägt, sie betrug das etwa 0,11-Fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($0,1152 \pm 0,04747$ -fache Änderung, $p < 0,0001$, $n = 4$).

Bei Betrachtung von Periostin zeigten alle drei Behandlungen eine leichte Erhöhung der Proteinmenge, insgesamt ergaben sich aber keine signifikanten Änderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle oder in den Gruppen untereinander (TGF- β : $1,302 \pm 0,3998$ -fache Änderung, $p = 0,2275$, $n = 4$; Kostimulation: $1,356 \pm 0,6348$ -fache Änderung, $p = 0,3440$, $n = 4$; Hy-IL-11: $1,772 \pm 0,6451$ -fache Änderung, $p = 0,0963$, $n = 4$; Kostimulation und TGF- β : $p = 0,8917$).

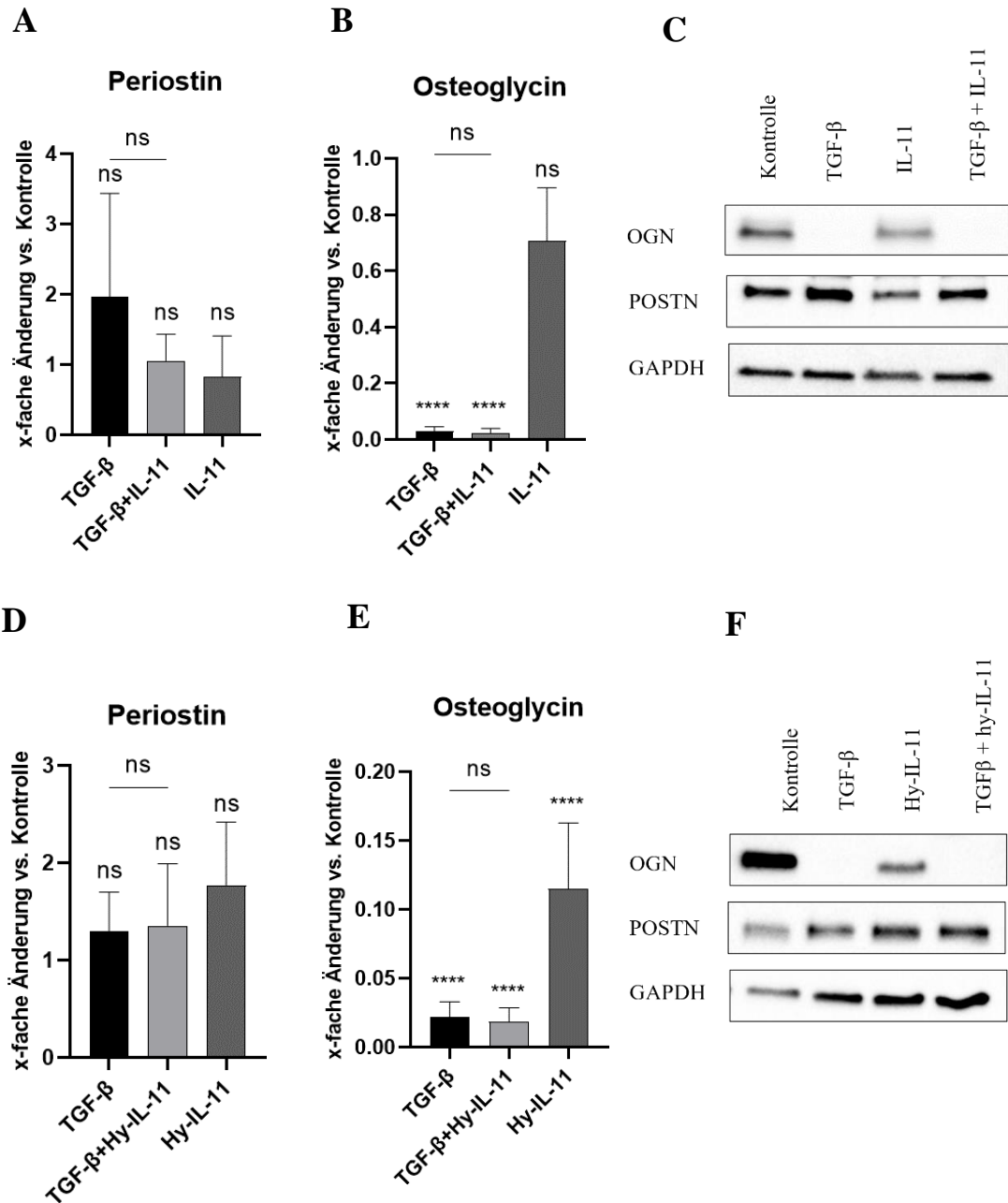


Abbildung 17: Proteinexpression von Periostin und Osteoglycin. Humane Fibroblastenzellen wurden für 48 h mit 10 ng/ml TGF- β , 10 ng/ml Hyper-IL-11 oder IL-11 stimuliert. Für die Immunoblotanalysen von Periostin (A, C, D, F) und Osteoglycin (B, C, E, F) wurden Zellysate verwendet und GAPDH als Ladekontrolle genutzt. Zur vergleichenden Analyse diente eine unstimulierte Kontrolle. Zur statistischen Analyse wurde ein t-Test verwendet. Signifikanzen sind als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$ angegeben. $n = 4$.

4 Diskussion

Fibrotische Vorgänge innerhalb des Herzens werden maßgeblich durch Fibroblasten bestimmt. Dabei spielen durch TGF- β -vermittelte Mechanismen eine zentrale Rolle. Kürzlich veröffentlichte Studienergebnisse machen das Zytokin IL-11 ebenfalls zu einem interessanten Ziel in der Fibroseforschung (Obana et al. 2010; Cook und Schafer 2020). Gegenstand dieser Arbeit war es, einen weiteren Beitrag in der Aufklärung über die Rolle von IL-11 in fibrotischen Vorgängen zu leisten und die zugrundeliegenden Mechanismen des Zusammenspiels zwischen IL-11 und TGF- β genauer zu beleuchten. Hierfür wurde eine humane Fibroblastenzelllinie als *in vitro* Modell eingesetzt und pro- bzw. anti-fibrotische Prozesse untersucht. Es stellte sich heraus, dass TGF- β für eine verlässliche Aktivierung der Fibroblasten sorgte und diese mit einer fibrotischen Signalantwort reagierten. Außerdem zeigte sich, dass TGF- β und IL-11 sich gegenseitig in ihrer Expression beeinflussten und IL-11 dabei die *TGFBI*-Genexpression verminderte. Ebenso wurden Quantitäten verschiedener Proteinen der extrazellulären Matrix durch TGF- β und IL-11 moduliert, wobei IL-11 vor allem die Transkription von Strukturproteinen supprimierte. Ein *trans-signalling* durch Hyper-IL-11 wies weitestgehend identische Effekte auf, war jedoch in seiner anti-fibrotischen Wirkung insbesondere auf transkriptioneller Ebene potenter. Die gewonnenen Erkenntnisse geben somit weitere wertvolle Hinweise auf eine TGF- β -antagonisierende und anti-fibrotische Rolle von IL-11.

4.1 TGF- β in humanen Fibroblasten

Charakteristische Gewebemerkmale fibrotischer Herzen sind die erhöhte Anzahl α -SMA-positiver Myofibroblasten sowie verstärkte Kollagen-Ablagerungen im Extrazellulärraum (Nagaraju et al. 2019; Querejeta et al. 2004). Dass das Zytokin TGF- β einen maßgeblichen Beitrag zu diesen pathologischen Veränderungen leistet, konnte bereits mithilfe von Tiermodellen *in vivo* gezeigt werden (Schafer et al. 2017; Desmoulière et al. 1993; Khalil et al. 2017). Dabei sorgt das Zytokin für eine Aktivierung und Transdifferenzierung von Fibroblasten zu α -SMA-positiven Myofibroblasten. Diese Transdifferenzierung, erkennbar an erhöhter Expression des Myofibroblasten-Markers α -SMA, konnte ebenfalls *in vitro* auf primären, kardialen Fibroblasten nach TGF- β -Stimulation nachgewiesen werden (Schafer et al. 2017; Cho et al. 2018). Mithilfe des Zellmodells ließ sich nach TGF- β -Stimulation analog dazu ebenfalls ein deutlicher α -SMA-Anstieg auf

transkriptioneller- und Proteinebene in humanen Fibroblasten darstellen (vgl. Abbildung 7 und 8). Dies ist als klarer Hinweis darauf zu werten, dass sich die verwendete Zelllinie ähnlich zu primären kardialen Fibroblasten verhält, womit sich die angesprochenen Vorgänge modellieren lassen. Die Stimulation mit TGF- β sorgte dabei für einen Anstieg von α -SMA nach Zeitspannen von 24 und 48 Stunden. Dies entspricht bereits erhobenen Daten vorheriger Arbeitsgruppen (Petrov et al. 2002). Lediglich das Ausmaß der Erhöhung war etwas geringer ausgeprägt als in vorherigen Versuchen (Breton et al. 2018). Ein möglicher Grund dafür ist, dass sich während beginnender Transdifferenzierungsvorgänge zunächst sogenannte „Proto-Myofibroblasten“ ohne α -SMA-Expression präsentieren (Tomasek et al. 2002). Passend dazu war die Expressionserhöhung auf transkriptioneller Ebene stärker zu beobachten als auf Proteinebene. Transdifferenzierte Myofibroblasten sind außerdem durch eine erhöhte Sekretion von Proteinen der extrazellulären Matrix, insbesondere Kollagen I, gekennzeichnet (Distler et al. 2019). In unseren Versuchen ließ sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Kollagen I-Proteinmenge nach 24- und 48-stündiger TGF- β -Stimulation feststellen. Dies wurde in der Vergangenheit bereits auf primären kardialen Fibroblasten beschrieben (Petrov et al. 2002; Schafer et al. 2017). Somit ließen sich die veröffentlichten Daten aus primären kardialen Fibroblasten und Tiermodellen hinsichtlich einer Fibroblasten-Aktivierung durch TGF- β verlässlich replizieren. Die Arbeit mit immortalisierten Zellen als tierversuchsfreie Möglichkeit, biologische Prozesse abzubilden, bietet dabei eine Reihe von Vorteilen. Besonders hilfreich ist dabei die nahezu unbegrenzte Zellverfügbarkeit und -homogenität innerhalb und zwischen verschiedenen Passagen. Da sich *in vivo*-Untersuchungen an Fibroblasten aufgrund eines fehlenden biologischen Markers ohnehin als problematisch gestalten, können durch die saubere Fibroblasten-Population der Zelllinie konsistente und reproduzierbare Ergebnisse über die beteiligten Zytokine und Signalwege gewonnen werden (Travers et al. 2016; Lajiness und Conway 2014). Dafür besteht die Möglichkeit einer transienten oder dauerhaften genetischen Manipulation (Transfektion) der Zellen, um die Funktion und Regulation multipler Proteine und Gene zu untersuchen (Kim und Eberwine 2010). Somit bildet die verwendete Zelllinie eine gute Grundlage, um Untersuchungen hinsichtlich fibrotischer Vorgänge in Zusammenhang mit IL-11 durchzuführen.

4.2 Gegenseitige Expressionsbeeinflussung von TGF- β und IL-11

Die Behandlung der Fibroblasten mit TGF- β sorgte für eine deutliche Aktivierung der *IL11*-Gentranskription und damit für eine erhöhte Menge an IL-11 mRNA. Damit ließen sich die Ergebnisse anderer Studien aus primären kardialen Fibroblasten und weiteren Zellmodellen validieren (Yashiro et al. 2006; Schafer et al. 2017; Elias et al. 1994). Über den Mechanismus des beobachteten Effekts ist die Studienlage jedoch noch unklar. Bereits veröffentlichte Daten zeigen einerseits, dass die Proteinkinase C bei der erhöhten IL-11-Expression durch TGF- β eine Rolle spielt (Yashiro et al. 2006). Auf der anderen Seite wurde die erhöhte IL-11-Produktion jedoch ebenfalls als PKC-unabhängig beschrieben (Elias et al. 1994).

Bisher war nicht bekannt, welchen Einfluss IL-11 auf die Transkription von *TGFBI* nimmt und ob somit eine IL-11 vermittelte Rückkopplung auf den aktivierten TGF- β -Signalweg stattfindet. Unsere Ergebnisse deuten nun klar darauf hin, dass IL-11 für eine Suppression der TGF- β -mRNA sorgt (vgl. Abbildung). Dieser Zusammenhang wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben und kann als klarer Hinweis darauf gewertet werden, dass IL-11 im Sinne einer negativen Feedback Regulation auf die Expression von *TGFBI* wirkt.

4.3 Einfluss von TGF- β und IL-11 auf Strukturproteine

Durch eine Stimulation mit TGF- β wurde die Expression der Strukturproteine α -SMA und Kollagen I auf mRNA- und Proteinebene deutlich nach oben reguliert (vgl. Kapitel 4.1). Durch die 24-stündige Behandlung mit Interleukin-11 kam es ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der α -SMA- und Kollagen I-Proteinmengen. Verglichen zur Stimulation mit TGF- β waren diese jedoch deutlich geringer ausgeprägt. Eine solche Konzentrationserhöhung nach 24-stündiger Stimulation wurde bereits von Schafer *et al.* auf primären kardialen Fibroblasten beschrieben. Im Gegensatz zu unseren Daten war die Ausprägung der Erhöhung dort jedoch ähnlich stark wie nach einer Stimulation mit TGF- β (Schafer et al. 2017). Im zeitlichen Verlauf präsentierte sich bei uns jedoch anschließend ein Rückgang der Expressionserhöhung: war die α -SMA-Proteinkonzentration nach 24-stündiger Stimulation signifikant erhöht, so ließ sich nach 48-stündiger Stimulation kein signifikanter Anstieg mehr feststellen. Auch die Expression von Kollagen I zeigte eine ähnliche Kinetik. Nach 48 Stunden ließ sich eine, im Vergleich zur Kontrolle teils signifikante, Expressionsminderung feststellen. Da eine positive Korrelation zwischen der

Menge α -SMA-positiver Myofibroblasten und der Kollagen-Expression besteht, waren ähnliche zeitliche Verläufe der beiden Proteine im Vergleich miteinander erwartbar (Petrov et al. 2002). Auf transkriptioneller Ebene zeigte sich eine noch stärkere Suppression der Kollagen I- und α -SMA-Konzentrationen nach 48-stündiger Stimulation mit IL-11 (vgl. Abbildung 7 und Abbildung 2). Dies steht in Konflikt mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Schafer *et al.* Diese stellten die Hypothese auf, dass IL-11 ein wichtiger pro-fibrotischer Faktor *downstream* von TGF- β sei, dessen Wirkung sich hauptsächlich über post-transkriptionelle Modulationen entfalte. Diese Hypothese stützt sich auf Ergebnisse, in denen IL-11 für eine deutliche Konzentrationserhöhung fibrotischer Proteine sorgt, während sich auf mRNA-Ebene kaum Veränderungen finden (Schafer et al. 2017). Die hier vorgestellten Daten hingegen zeigen anschaulich, dass IL-11 für eine verringerte Expression von *ACTA2* sorgt und sowohl die Kollagen I-mRNA-, als auch Proteinexpression nach unten reguliert. Somit konnten wir erstmals *in vitro* zeigen, dass IL-11 für einen Rückgang fibrotischer Genexpression in humanen Fibroblastenzellen sorgt.

Diese Ergebnisse stehen wiederum im Einklang mit bereits veröffentlichten Ergebnissen aus Tiermodellen, die eine kardioprotektive Rolle von IL-11 über den JAK2/STAT3-Signalweg nahelegen. So konnte in einem murinen Modell gezeigt werden, dass ein schädliches kardiales Remodeling und eine damit einhergehende Fibrose nach Myokardinfarkt durch die intravenöse Gabe von IL-11 abgeschwächt werden kann. Interleukin-11 bewirkte dabei zusätzlich eine verminderte Apoptose in Infarkt-Randgebieten und sorgte für eine höhere Kapillardichte in diesen Arealen. Durch eine kardial-spezifische Ablation von STAT3 konnte dieser Effekt aufgehoben werden, was eine Vermittlung über die Aktivierung dieses Signalweges nahelegt (Obana et al. 2010). Auch in einem Ischämie/Reperusionsmodell sorgte eine intravenöse Gabe von IL-11 vor der Koronararterienligatur für eine reduzierte Infarktgröße. Es konnte gezeigt werden, dass durch IL-11 vermittelte zytoprotektive Eigenschaften hier ebenfalls STAT3-abhängig sind (Kimura et al. 2007). Auch wenn diese Studien auf eine protektive Rolle des STAT3-Signalweges hindeuten, wird die Rolle von STAT3 bei fibrotischen Veränderungen aktuell kontrovers diskutiert. In der Lunge und Niere konnte gezeigt werden, dass eine STAT3-Aktivierung mit einer Fibrose dieser Organe assoziiert ist. In der Leber sorgt aktiviertes STAT3 ebenfalls für eine überschießende Fibrose durch eine verstärkte TGF- β -Produktion (Yu et al. 2015; Tang et al. 2015; Pedroza et al. 2016; Prêle et al. 2012). Es scheint, dass eine STAT3-Aktivierung einen gegensätzlichen Effekt je nach Gewebeart und Organ haben könnte. Unsere *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse zeigen eine deutliche STAT3-Aktivierung

durch IL-11 und reihen sich in die veröffentlichten Arbeiten aus Tiermodellen ein, die IL-11-vermittelte, positive Auswirkungen dieses Signalweges auf die Organisation der extrazellulären Matrix, die myokardiale Vaskularisation und den Schutz vor ischämischer Verletzung nach Myokardinfarkt nahelegen (Obana et al. 2010; Kimura et al. 2007).

Es existieren jedoch auch widersprüchliche Erkenntnisse hinsichtlich der protektiven Rolle von IL-11 und der Aktivierung von STAT3. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit stellt lediglich eine vernachlässigbar geringe STAT3-Aktivierung durch IL-11 in humanen kardialen Fibroblasten fest. Stattdessen werden eine nicht-kanonische Signalweiterleitung über den ERK-Signalweg und damit verbundene post-translationale Modifizierungen hin zu einer erhöhten Fibroseneigung beschrieben (Schafer et al. 2017). Die während dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen Gegensätzliches hinsichtlich der Signalübermittlung und Proteinexpression. Interleukin-11 sorgte nach kurzer Zeit für eine deutliche Aktivierung von STAT3 und regulierte fibrotische Parameter nach unten. Eine ERK-Aktivierung ließ sich nicht reproduzieren (vgl. Abbildung 5).

Im Zusammenspiel von TGF- β und IL-11 zeigten sich ebenfalls anti-fibrotische Effekte durch Interleukin-11. Neben der Suppression der TGF- β -mRNA durch die Stimulation mit IL-11 zeigte sich in der 48-stündigen Kostimulation von IL-11 und TGF- β eine Verringerung der α -SMA-Gen- und Proteinexpression im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit TGF- β (vgl. Abb. 6 – 8). Ähnliches ließ sich für Kollagen I beobachten. Auch hier bewirkte die Kostimulation eine Reduktion der Genexpression und Proteinquantität im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit TGF- β (vgl. Abb. 11 – 12). Dies legt eine Interaktion zwischen TGF- β und IL-11 nahe, bei der IL-11 die Expression von TGF- β nach unten reguliert und zusätzlich in einer Kostimulation die Expression pro-fibrotischer Proteine durch TGF- β supprimiert.

In einem Modell mit HUVEC-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Kostimulation mit TGF- β und IL-11 die Transkription von *TGFBI* verringert und einer endothelial-mesenchymalen Transition entgegenwirkt (Allanki et al. 2021). Bisher war jedoch nicht bekannt, welche Folgen bei einer Blockierung des JAK/STAT-Signalweges während einer gleichzeitigen Stimulation mit TGF- β und IL-11 auftreten. Mithilfe einer Inhibition der JAK2-Signalkaskade und gleichzeitiger Stimulation konnte eine Expressionserhöhung von *ACTA2* und *TGFBI* im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (vgl. Abb. 15). Dies legt nahe, dass IL-11 über eine JAK2/STAT3-Aktivierung eine hemmende Wirkung auf den TGF- β -Signalweg hat. Dass die Expressionsänderung der untersuchten

Gene dabei nicht größer war könnte daran liegen, dass der protektive Einfluss des JAK2/STAT3-Signalweges sich weniger auf einzelne Gene sondern vielmehr auf ein komplexes genetisches Programm bezieht.

Einen möglichen Mechanismus der TGF- β -Inhibition durch STAT3 stellt dabei das Zusammenspiel mit SMAD3 dar. Diese direkte Interaktion bewirkte in vorherigen Untersuchungen eine Reduktion der Smad3-Smad4-Komplexe und dadurch eine verminderte Gentranskription durch TGF- β (Wang et al. 2016). Auf Endothelzellen wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen einer Signalübermittlung durch TGF- β und STAT3 nachgewiesen. Dort verstärkte die Suppression der STAT3-Expression die endothelial-mesenchymale Transition über den TGF- β /ALK5/Smad4-Signalweg (Becerra et al. 2017). Eine weitere mögliche Verbindung zwischen STAT3 und TGF- β stellt SMAD7 dar. Konstitutiv aktives STAT3 sorgte in einem *in vitro*-Modell für eine verstärkte SMAD7-Aktivierung, welche wiederum inhibierend auf TGF- β einwirkte (Jenkins et al. 2005). Neben diesen Ergebnissen gibt es jedoch auch Daten, die auf einen synergistischen Effekt zwischen einer STAT3-Aktivierung und verstärkter Signalübermittlung durch TGF- β hinweisen (Xu et al. 2014; O'Reilly et al. 2014). Ein solcher Zusammenhang, der in einer verstärkten Fibroseantwort mündet, wurde in Leberzellen, der Niere, der Lunge und in dermalen Fibroblasten beobachtet (Yu et al. 2015; Tang et al. 2015; Prêle et al. 2012; O'Reilly et al. 2014; Pedroza et al. 2016). Dies deutet darauf hin, dass das Zusammenspiel zwischen TGF- β und IL-11, ähnlich wie bereits bei STAT3 beobachtet, gewebeabhängig ist.

Um unsere Hypothese zu verifizieren, dass IL-11 im Sinne eines negativen Feedback-Inhibitors der TGF- β -Signalweiterleitung agiert, untersuchten wir das Verhalten der Fibroblasten nach Behandlung mit einer IL-11-R α -siRNA unter Stimulation mit TGF- β . Nach dem Rezeptor-*knockdown* zeigte sich in den behandelten Zellen eine leichte Konzentrationserhöhung von α -SMA und Kollagen I (vgl. Abb. 13). Als Kontrolle dienten Zellen, die ausschließlich mit TGF- β stimuliert worden waren. Diese Ergebnisse weisen klar darauf hin, dass Interleukin-11 über den IL-11R α und einer darauffolgenden JAK2/STAT3-Signalweiterleitung für eine Reduktion der TGF- β -vermittelten Fibroseantwort sorgt.

Dass ein *IL11RA-knockdown* den negativen Feedback-Mechanismus von IL-11 auf TGF- β hemmt, konnte bereits aus einem ähnlichen Versuch auf HUVEC-Zellen abgeleitet werden (Allanki et al. 2021). Die vorliegenden Daten zeigen, dass sich diese Ergebnisse auf humane Fibroblasten ausweiten lassen. Dass die beobachteten

Gruppenunterschiede nicht stärker ausgeprägt waren, könnte daran liegen, dass kein ausreichender Rezeptor-*knockdown* erzielt werden konnte und weiterhin Effekte von IL-11 beobachtbar waren. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Wirksamkeit von IL-11 auf dieser Zelllinie nicht hinreichend ist, da Teile des Signalweges oder der IL-11R α in nicht adäquater Quantität exprimiert sein könnten.

Diese beschriebenen Ergebnisse stehen in Konflikt mit bereits publizierten Daten auf murinen Fibroblastenzellen (Schafer et al. 2017). Dort wurde eine Verringerung von α -SMA in der Immunfärbung nach einer Behandlung mit TGF- β während eines *Il11Ra1-knockdowns* beobachtet. Eine mögliche Erklärung für diese gegensätzlichen Beobachtungen könnte der Zeitrahmen der Stimulation sein. Die Arbeitsgruppe um Schafer *et al.* verwendete eine Stimulationszeit von 24 Stunden, während in dieser Arbeit der Anstieg fibrotischer Parameter erst nach 48 Stunden beobachtet werden konnte. Eine weitere Limitation stellt das Vorkommen zweier verschiedener *Il11Ra1*-Genloci in Mäusen dar. Es bleibt unklar, inwiefern der *knockout* beider kodierender Regionen des IL-11-Rezeptors die Ergebnisse verändern könnte. Die Ergebnisse der *Il11Ra1-knockout*-Versuche konnte die oben genannte Arbeitsgruppe mithilfe von Mäusen mit einer genetischen Deletion von *Il11* validieren (Ng et al. 2021). Diese genetisch veränderten Mäuse unterschieden sich jedoch schon phänotypisch von der Wildtyp-Kontrollgruppe. Außerdem bleibt unklar, inwiefern weitere Zytokine und Signalwege Einfluss auf das Ergebnis nehmen. So könnte der ubiquitär vorhandene gp130-Rezeptor von anderen Liganden verstärkt genutzt werden, wenn IL-11 als Ligand ausfällt und sich so das Gleichgewicht biologischer Abläufe hin zu einer verstärkten Fibroseneigung verschieben.

Neben Kollagen I und α -SMA spielt Fibronectin als Strukturprotein der extrazellulären Matrix ebenfalls eine wichtige Rolle und war in der Vergangenheit Gegenstand der Fibroseforschung. So konnte eine erhöhte Fibronectin-Expression durch TGF- β -Stimulation bereits in embryonalen Hühner-Fibroblasten belegt werden (Ignatz und Massagué 1986; Serini et al. 1998). Analog dazu konnten wir ebenfalls eine verstärkte Genexpression auf humanen Fibroblasten nach Stimulation mit TGF- β nachweisen (vgl. Abb. 9). Zu einem anderen Ergebnis kam jedoch die Arbeitsgruppe um Kupfahl *et al.* Diese konnten nach 24-stündiger Stimulation mit TGF- β keine Fibronectin-Erhöhung in humanen kardialen Fibroblasten feststellen (Kupfahl et al. 2000). Auch die Funktion von Fibronectin im verletzten Herzen bleibt umstritten. So wurden dem Protein im Zebrafisch-Herzen pro-regenerative Eigenschaften zugesprochen (Wang et al. 2013; Allanki et al. 2021). In einem anderen Modell muriner und humaner Fibroblasten hatte im Gegensatz

dazu die Inhibition der Fibronectin-Expression *in vitro* und *in vivo* kardioprotektive Eigenschaften (Valiente-Alandi et al. 2018). Dies legt nahe, dass die Expression und Funktion von Fibronectin spezies- und gewebeabhängig ist, oder eine Zeit- beziehungsweise Dosisabhängigkeit besitzt. In der Vergangenheit wurde die Fibronectin-Erhöhung durch TGF- β als SMAD4-unabhängig beschrieben (Hocevar et al. 1999). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass eine Stimulation mit IL-11 in unserem Fall keine Auswirkungen auf die Fibronectin-Transkription hatte, während eine Kostimulation mit TGF- β für eine Transkriptionserhöhung sorgte. Dass IL-11 keinen hemmenden Effekt auf die Fibronectin-Transkription durch TGF- β hatte, passt zu der Hypothese, dass der hemmende Effekt von IL-11 auf TGF- β auf einer STAT3 - SMAD3/SMAD4-Interaktion beruhe (Wang et al. 2016; Becerra et al. 2017). Somit ist die Transkriptionserhöhung am ehesten durch TGF- β und weniger durch IL-11 zu erklären.

4.4 Einfluss von TGF- β und IL-11 auf matrizelluläre Proteine

Neben α -SMA, Kollagen I und Fibronectin, welche als Strukturproteine eine wichtige Rolle bei fibrotischen Prozessen spielen, üben verschiedene weitere Proteine regulatorische Funktionen im Extrazellularraum aus (Frangogiannis 2017). Dazu gehören matrizelluläre Proteine, welche nach Gewebsverletzung verstärkt exprimiert werden und sowohl Zell-Zell-, als auch Zell-Matrix-Kontakte modulieren (Frangogiannis 2012).

So kommt es zu einer verstärkten Akkumulation des extrazellulären Proteins Periostin unter pathologischen Bedingungen im Herzen (Zhao et al. 2014; Stansfield et al. 2009; Willems et al. 1996; Frøen und Larsen 1995); . *In vitro* konnte gezeigt werden, dass TGF- β für eine Erhöhung der Periostin-Expression in Fibroblasten sorgt (Cho et al. 2018; Wen et al. 2010). Auch *in vivo* gibt es Hinweise darauf, dass transdifferenzierte Myofibroblasten verstärkt Periostin exprimieren (Kanisicak et al. 2016; Snider et al. 2009; Takeda et al. 2010). Aus diesem Grund wurde Periostin in der Vergangenheit ebenfalls als möglicher Myofibroblasten-Marker diskutiert (Kong et al. 2013). In den hier durchgeführten Versuchen konnte eine verstärkte Periostin-Genexpression nach der Stimulation mit TGF- β nachgewiesen werden (vgl. Abb. 16). Auf Proteinebene ließ sich diese Erhöhung jedoch nicht durchgängig validieren (vgl. Abb. 17). Dies deckt sich mit der datenbasierten Schlussfolgerung, dass Periostin kein verlässlicher Marker für eine Myofibroblastentransdifferenzierung sei, da die TGF- β -Induktion zeitabhängig schwanke (Lajiness und Conway 2014). In vorherigen Versuchen erreichte die

Expressionserhöhung ein Maximum nach etwa 24 Stunden, sodass der hier gewählte Zeitpunkt von 48 Stunden Stimulationszeit eventuell nicht geeignet war, um eine verstärkte Expression des Proteins darzustellen (Cho et al. 2018). Interleukin-11 übte keine signifikanten Veränderungen auf Periostin hinsichtlich der mRNA- und Proteinexpression aus. Dies ist als weiterer Hinweis darauf zu werten, dass IL-11 nicht für eine Transdifferenzierung von Fibroblasten sorgt. Im Gegensatz dazu wurde eine Erhöhung der Periostin-Expression durch IL-11 auf kardialen Fibroblasten in einer vorangegangenen Publikation beschrieben (Schafer et al. 2017). Dies konnte in dieser Arbeit jedoch weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene reproduziert werden.

Konzentrationsänderungen des matrizellulären Proteins Osteoglycin sind in der Pathophysiologie von Herzerkrankungen ebenfalls von Bedeutung. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen eine sehr deutliche Reduktion der Osteoglycin-Expression auf transkriptioneller- und Proteinebene, wenn mit TGF- β stimuliert wurde (vgl. Abb. 16 – 17). Dies deckt sich mit vorher veröffentlichten Ergebnissen der Arbeitsgruppe um van Aelst *et al.* (van Aelst et al. 2015). IL-11 konnte diese Wirkung von TGF- β auf Osteoglycin in einer Kostimulation kaum beeinflussen, es blieb bei einer starken Expressions-Reduktion. Es kann angenommen werden, dass TGF- β seine pro-fibrotische Wirkung unter anderem über eine Suppression von Osteoglycin erzielt, da eine Expressionsminderung mit einer verstärkten Fibrose *in vivo* in Verbindung gebracht werden konnte (Jazbutyte et al. 2013). Eine erhöhte Osteoglycin-Expression schützt hingegen vor schädlichem kardialen Remodeling (van Aelst et al. 2015). IL-11 sorgte ebenfalls für eine signifikante Verringerung der Protein- und mRNA-Menge von Osteoglycin. Einen solchen Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig dargestellt werden. Inwiefern die Osteoglycin-Reduktion durch IL-11 in der Konsequenz auch für verstärkte fibrotische Vorgänge verantwortlich sein könnte, bleibt jedoch fraglich.

4.5 Unterschiede zwischen IL-11 und Hyper-IL-11

Neben der klassischen Signalweiterleitung (*cis-signalling*) sind einige Zytokine zusätzlich dazu in der Lage, bereits an ihren löslichen Rezeptor gekoppelt die Signaltransduktion in den Zielzellen zu aktivieren (Pflanz et al. 1999). Für IL-11 konnten ebenfalls Beweise eines solchen *trans-signallings* erbracht werden (Pflanz et al. 1999; Koch et al. 2021; Dams-Kozłowska et al. 2012). Somit benötigt ein solches rekombinant hergestelltes Zytokin lediglich den ubiquitär exprimierten GP130-Rezeptor, um die STAT3-Achse

zu aktivieren. Das strukturell verwandte Zytokin IL-6 existiert ebenfalls in einer bereits an den Rezeptor gekoppelten Form, Hyper-IL-6 (Garbers und Scheller 2013). Interessanterweise bestehen zwischen IL-6 und Hyper-IL-6 teils gegensätzliche Funktionen im Organismus. So hat das klassische *signalling* von IL-6 regenerative und anti-inflammatorische Eigenschaften, während das *trans-signalling* des Zytokins pro-inflammatorische Funktionen ausübt (Scheller et al. 2011). *In vivo*-Untersuchungen ergaben außerdem erhöhte Konzentrationen des löslichen IL-6-Rezeptors bei inflammatorischen Erkrankungen und legen eine pathophysiologische Bedeutung des *trans-signalling* nahe (Garbers et al. 2015). Bislang war unbekannt, ob solche Unterschiede bei IL-11 ebenfalls zu beobachten sind und ob ein *trans-signalling* durch IL-11 von pathophysiologischer Bedeutung ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden IL-11 und Hyper-IL-11 in ihren unterschiedlichen Auswirkungen auf fibrotische Parameter untersucht.

Hyper-IL-11 zeigte zunächst eine in der Kinetik mit IL-11 vergleichbare STAT3-Aktivierung. Hyper-IL-11 bewies sich dabei jedoch als deutlich potenterer Aktivator der JAK2/STAT3-Achse (vgl. Abb. 5). Es zeigte sich, dass durch ein *trans-signalling* insbesondere auf transkriptioneller Ebene stärkere anti-fibrotische Eigenschaften im Sinne einer Suppression von α -SMA und Kollagen I erreicht werden konnten (vgl. Abb. 7 und 12). Dennoch waren die stärkeren anti-fibrotischen, transkriptionellen Effekte nicht in allen Fällen auf Proteinebene reproduzierbar. Diskrepanzen gab es beispielsweise in der Kostimulation von TGF- β und Hyper-IL-11. Trotz der signifikanten Verringerung von ACTA in der Kostimulation ließ sich im Western Blot eine geringfügige α -SMA-Erhöhung im Vergleich zu einer reinen TGF- β -Stimulation finden (vgl. Abb. 8). Dies könnte daran liegen, dass die α -SMA-Induktion in diesen Versuchen bereits sehr stark war und die Effekte von Hyper-IL-11 somit nicht mehr darstellbar waren. Des Weiteren sind posttranskriptionelle Modifizierungen möglich, die sich in der qRT-PCR nicht abbilden lassen.

Bei den untersuchten Proteinen Fibronectin und Periostin verhielt sich Hyper-IL-11 analog zu IL-11 und bewirkte keine signifikanten Veränderungen (vgl. Abb. 9 und 17). Lediglich bei Osteoglycin ließen sich Unterschiede feststellen. So sorgte Hyper-IL-11 für eine stärkere Suppression der Gen- und Proteinexpression als IL-11 (vgl. Abb. 16 – 17). Zusammenfassend könnten die unterschiedlichen Auswirkungen von klassischem und *trans-signalling* auf α -SMA, Kollagen I und Osteoglycin auf die veränderte STAT3-Aktivierung durch Hyper-IL-11 zurückzuführen sein. Denkbar ist, dass die leicht veränderte Kinetik und Intensität der Aktivierung für unterschiedliche *downstream*-Effekte sorgt.

Außerdem benötigt das bereits an seinen Rezeptor gekoppelte Hyper-IL-11 zur Signaltransduktion keinen membranständigen IL-11R α , wodurch die erhöhte Wirksamkeit von Hyper-IL-11 erklärt werden könnte.

4.6 Limitationen

Die Verwendung einer einzelnen Zelllinie als Modellsystem bringt neben den oben genannten Vorteilen auch einige Limitationen mit sich. So sind fibrotische Prozesse komplexe Vorgänge, welche *in vivo* als dynamisches Zusammenspiel zwischen verschiedenen Zellarten vorliegen, die sich in ihrem Verhalten gegenseitig beeinflussen (Kendall und Feghali-Bostwick 2014). Diese Heterogenität geht bei der Verwendung einer Zelllinie weitestgehend verloren. Außerdem bestehen *in vivo* auch innerhalb der Fibroblasten unterschiedliche Subpopulationen mit verschiedenen Genexpressionsprofilen, welche sich in ihren Kapazitäten als Produzenten der extrazellulären Matrix und damit in ihrer Rolle bei fibrotischen Gewebsveränderungen unterscheiden (Travers et al. 2016). Diese phänotypischen Differenzen bestehen sowohl zwischen verschiedenen Organen als auch innerhalb eines Organs unter verschiedenen physiologischen Bedingungen (Kendall und Feghali-Bostwick 2014; Lajiness und Conway 2014). Nichtsdestotrotz konnte mit dem vorliegenden Zellmodell bereits *in vitro* und *in vivo* beschriebene Signalantworten reproduziert werden und somit einen komplexen Prozess auf die Mechanismen in Fibroblasten reduziert untersuchen. Unsere Daten geben Anlass zu der Annahme, dass IL-11 die durch TGF- β induzierte Fibroseantwort reduziert und somit Überlegungen zur therapeutischen Anwendung schlüssig sind.

4.7 IL-11 als Therapeutikum

Die deutliche Expressionserhöhung der IL-11-mRNA nach Myokardinfarkt legt eine endogene Bedeutung des Zytokins im Herzen nahe (Obana et al. 2010). Insbesondere die STAT3-Aktivierung durch IL-11 scheint in pathophysiologischen Prozessen eine Rolle zu spielen und könnte in der Zukunft Gegenstand therapeutischer Überlegungen sein. So wurden bei Patienten mit Herzinsuffizienz erniedrigte Spiegel von aktiviertem STAT3 detektiert, was als Hinweis darauf zu werten ist, dass die verminderte JAK2/STAT3-Aktivität für die Erkrankung relevant ist (Podewski et al. 2003). Interleukin-11 als Aktivator von STAT3 stellt somit eine medikamentöse Interventionsmöglichkeit dar.

Die Sicherheit und Pharmakokinetik von IL-11 wurde bereits 1997 an gesunden Probanden getestet (Aoyama et al. 1997). Das Zytokin wird außerdem bereits eingesetzt, um chemotherapie-assoziierte Thrombozytopenien zu behandeln (Gordon et al. 1996). Jedoch gibt es bis jetzt noch keine zugelassene Medikation, welche die kardioprotektiven Eigenschaften des Zytokins berücksichtigt, obgleich IL-11 bereits Gegenstand erster therapeutischer Versuche in dieser Richtung war. So wurde in einem Mausmodell der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) ein positiver Effekt der therapeutischen Gabe von rekombinanten IL-11 beobachtet. Dabei kam es zu einer verbesserten Genesung und verstärktem Wachstum von Kollateralgefäßen (Aitsebaomo et al. 2011). Außerdem wurde IL-11 bereits vier Patienten nach stattgefundenem Herzinfarkt im Rahmen einer Studie gegeben, ohne dass dabei ernste Nebenwirkungen auftraten (Nakagawa et al. 2016). Bisher gibt es jedoch noch keine randomisierte, kontrollierte Studie mit einem ausreichend großen Patientenkollektiv, die mögliche therapeutische Einsatzmöglichkeiten genauer beleuchtet.

4.8 Resümee und Ausblick

Auch wenn die aktuelle Studienlage in Hinblick auf die Rolle von IL-11 in fibrotischen Vorgängen in mancher Hinsicht noch widersprüchlich ist, so geben unsere Daten dennoch klare Hinweise darauf, dass die Wirkung von IL-11 von anti-fibrotischer Natur ist. Wir konnten zeigen, dass IL-11 die Transkription von TGF- β supprimiert und über den STAT3-Signalweg antagonistisch im Sinne eines negativen Feedback-Inhibitors zu diesem pro-fibrotischen Zytokin wirkt. Bislang war noch unklar, welche Rolle dabei das bereits an seinen Rezeptor gekoppelte Zytokin Hyper-IL-11 spielt. Unsere Daten deuten klar darauf hin, dass Hyper-Interleukin-11 ein ähnliches Verhalten wie IL-11 zeigt und insbesondere auf transkriptioneller Ebene die Expression von α -SMA und Kollagen I stärker als IL-11 supprimiert. Aktuell ist allerdings noch nicht endgültig bewiesen, dass ein *trans-signalling* durch Hyper-IL-11 ebenfalls *in vivo* existiert. Wichtig sind daher Untersuchungen, die sich auf ein Vorkommen von Hyper-IL-11 *in vivo* konzentrieren und dabei auf eventuell vorhandene Unterschiede zwischen klassischem und *trans-signalling* eingehen. Auch die mögliche Rolle bei pathophysiologischen Prozessen sollte dabei näher untersucht werden. Um unsere Daten zu verifizieren und eine kardiale Bedeutung der gewonnenen Erkenntnisse zu validieren, wären weiterhin *in vitro* Analysen auf humanen kardialen Fibroblasten und die Untersuchung weiterer pro-fibrotischer Zytokine in

Interaktion mit IL-11 wünschenswert. Auch das Zusammenspiel zwischen kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten mit Berücksichtigung der Effekte von IL-11 *in vivo* können ein interessanter Gegenstand weiterer Untersuchungen sein und zur Aufklärung über die widersprüchlichen Thesen über IL-11 in fibrotischen Prozessen beitragen.

Durch die medikamentöse Gabe von ACE-Hemmern existiert bereits eine spezifische Therapiemöglichkeit, welche ein schädliches kardiales Remodeling hemmt (Garvin et al. 2021). Ein vermehrter Erkenntnisgewinn über Fibroblasten und die beteiligten Zytokine im Pathomechanismus der Fibrose ist gerade deshalb von Bedeutung, da weitere Zell-spezifische Therapiemöglichkeiten gefunden werden müssen um fibrotischen Vorgängen verstärkt entgegenwirken zu können. Diese Arbeit zeigt, dass IL-11 anti-fibrotische Eigenschaften besitzt und als weitere medikamentöse Interventionsmöglichkeit für zukünftige therapeutische Überlegungen in Betracht kommt.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Multiple kardiale Erkrankungen münden in der Herzinsuffizienz, einer chronisch-progredienten Erkrankung mit schlechter Prognose. Pathomechanistisch liegt der Herzinsuffizienz ein myokardiales Remodeling zugrunde, welches durch eine verstärkte fibrotische Gewebsversteifung gekennzeichnet ist. Transforming Growth Factor-Beta spielt als wichtiges pro-fibrotisches Zytokin eine Schlüsselrolle im kardialen fibrotischen Gewebebau indem es die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten fördert. Als therapeutischer Angriffspunkt zur Abmilderung fibrotischer Reaktionen ist eine komplette Inhibition des TGF- β -Signalweges jedoch nicht möglich. Aus diesem Grund müssen andere Wege gefunden werden, um Teile des Signalwegs zu inhibieren und therapeutisch nutzen zu können. Interleukin-11 hat in dieser Hinsicht in der letzten Zeit an Bedeutung gewonnen und insbesondere der Einfluss des Zytokins auf den fibrotischen Gewebebau ist für therapeutische Überlegungen von Relevanz. Bisher war in diesem Kontext noch unklar, welchen Einfluss das bereits an seinen löslichen Rezeptor gekoppelte Zytokin Hyper-IL-11 auf fibrotische Prozesse nimmt.

Anhand eines *in vitro*-Modells humaner Fibroblastenzellen konnten wir grundlegende Mechanismen im Zusammenspiel der beiden Zytokine untereinander näher beleuchten. Dafür wurden die Fibroblasten für verschiedene Zeitpunkte mit TGF- β , IL-11, Hyper-IL-11 und einer Kostimulation aus TGF- β und IL-11 oder Hyper-IL-11 behandelt und anschließend durch verschiedene Methoden analysiert. Hierbei stellte sich heraus, dass TGF- β für eine verlässliche Aktivierung der Fibroblasten sorgte und diese mit einer fibrotischen Signalantwort reagierten. Außerdem zeigte sich, dass TGF- β und IL-11 sich gegenseitig in ihrer Expression beeinflussten und IL-11 dabei die Expression von *TGFBI* supprimierte. Auch die Produktion von verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix wurde durch TGF- β und IL-11 moduliert. Dabei verminderte IL-11 vor allem die Transkription von Strukturproteinen. Der Einfluss von IL-11 auf die untersuchten extrazellulären Proteine Periostin, Fibronectin und Osteoglycin war deutlich geringer. Ein *trans-signalling* durch Hyper-IL-11 wies weitestgehend identische Effekte wie IL-11 auf, jedoch war es in seiner anti-fibrotischen Wirkung insbesondere auf transkriptioneller Ebene deutlich potenter. Mithilfe eines IL-11-Rezeptor-*knockdowns* und einer Blockierung des JAK2/STAT3-Signalweges konnten wir zeigen, dass die beobachteten Effekte STAT3-abhängig über den IL-11R α vermittelt werden. Die gewonnen Erkenntnisse

geben somit weitere wertvolle Hinweise auf eine TGF- β -antagonisierende und anti-fibrotische Rolle von IL-11 und machen es für therapeutische Überlegungen in der Zukunft interessant.

5.2 Abstract

Multiple cardiac diseases culminate in heart failure, a chronic progressive disease with poor prognosis. Pathomechanistically, myocardial remodeling underlies heart failure, which is characterized by increased fibrotic tissue stiffening. Transforming growth factor β , as an important pro-fibrotic cytokine, plays a key role in cardiac fibrotic tissue remodeling by promoting transdifferentiation of fibroblasts to myofibroblasts. However, as a therapeutic target to attenuate fibrotic responses, complete inhibition of TGF- β signaling is not possible. For this reason, other pathways must be found to inhibit and therapeutically target parts of the pathway. Interleukin-11 has also gained importance recently. In particular, its influence on fibrotic tissue remodeling is relevant for therapeutic considerations. Until now, it was also unclear what influence hyper IL-11, which is already coupled to its soluble receptor, has on fibrotic processes. Using an *in vitro* model of human fibroblast cells, we were able to elucidate basic mechanisms in the interaction of the two cytokines with each other. For this purpose, fibroblasts were treated with TGF- β , IL-11, hyper-IL-11, and a costimulation of TGF- β and IL-11 or hyper-IL-11 for different time points and subsequently analyzed by different methods. It was found that TGF- β provided a reliable activation of fibroblasts, which reacted with a fibrotic response. In addition, TGF- β and IL-11 were found to influence each other's expression, with IL-11 decreasing TGFB1 gene expression. The production of various extracellular matrix proteins was also modulated by TGF- β and IL-11. In this regard, IL-11 mainly suppressed the transcription of structural proteins. The influence of IL-11 on the investigated matricellular proteins periostin, fibronectin, and osteoglycin was significantly lower. Trans-signaling by hyper-IL-11 showed largely identical effects to IL-11, but was significantly more potent in its anti-fibrotic effect, particularly at the transcriptional level. With the aid of an IL-11 receptor knockdown and blockade of the JAK2/STAT3 pathway, we demonstrated that the observed effects are mediated in a STAT3-dependent manner via the IL-11R α . The findings obtained thus provide further valuable evidence for a TGF- β -antagonizing and anti-fibrotic role of IL-11 and make it interesting for therapeutic considerations in the future.

6 Abbildungs- Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Fibroblasten-Aktivierung.....	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung des TGF- β -Rezeptors.....	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung des IL-11 cis- bzw. trans-signalling.....	17
Abbildung 4: Volcano Plot nach Stimulation mit TGF- β	33
Abbildung 5: Induktion von pSTAT3 und pERK zu verschiedenen Zeitpunkten.....	34
Abbildung 6: TGFB1-Expression.....	35
Abbildung 7: Expressionsänderung von ACTA2.....	37
Abbildung 8: α -SMA-Proteinexpression.	39
Abbildung 9: Fibronectin-Genexpression.	40
Abbildung 10: α -SMA- und Fibronectin-Expression in der Immunofluoreszenz.....	42
Abbildung 11: Proteinexpression von Kollagen I.....	45
Abbildung 12: Genexpression von Kollagen I.....	46
Abbildung 13: Knockdown des IL-11R α durch eine siRNA.....	47
Abbildung 14: TGF- β -Stimulation nach IL-11R α -knockdown.....	48
Abbildung 15: STAT3-knockout durch Ruxolitinib.....	49
Abbildung 16: Genexpressionsänderung matrizellulärer Proteine.....	51
Abbildung 17: Proteinexpression von Periostin und Osteoglycin.....	53

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeine Labormaterialien.....	19
Tabelle 2: Geräte.....	20
Tabelle 3: Materialien und Medien für die Zellkultur.....	21
Tabelle 4: Antikörper und Primer.....	22
Tabelle 5: Inhibitoren und Stimulantien.....	22
Tabelle 6: Primer für die Real-Time PCR.....	23
Tabelle 7: Chemikalien und Reagenzien.....	24
Tabelle 8: Kits.....	24
Tabelle 9: Angesetzte Lösungen und Puffer.....	26
Tabelle 10: Software.....	27

6.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α -SMA	Alpha smooth muscle actin
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
Aqua dest.	Aqua destillata
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
COL1A1/2	Kollagen-1A1/2
CT	Cycle threshold
DAMP	Danger associated molecular pattern
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DC	Detergent compatible
DNA	Desoxyribonucleid acid
DPBS	Dulbeccos phosphate buffered saline
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epithelial to mesenchymal transformation
EndoMT	Endothelial to mesenchymal transformation
FCS	Fetal calf serum
FN1	Fibronectin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
h	Hour(s)
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HRP	Horseradish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin-6
IL-11	Interleukin-11
JAK	Janus kinase
KHK	Koronare Herzkrankheit
M	Molar
MAPK	Mitogen activated proteine kinase
Min	Minute(n)
ml	Milliliter
MMP	Matrix metalloproteinases
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NaCl	Natrium-Chlorid
NP	Nonyl phenoxypolyethoxylethanol
OGN	Osteoglycin
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonyluoride
POSTN	Periostin
PVDF	Polyvinylidenuoride
RT/qPCR	Real Time/quantitative Polymerase Chain Reaction
ROS	Reactive oxygen species
SDS	Sodiumdodecylsulfate

SMAD	Small body size mothers against decapentaplegic
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TBS	Tris-buffered saline
Tris	Trishydroxymethylaminomethane
V	Volt
WB	Western Blot
WCE	Whole cell extraction

7 Literaturverzeichnis

- Agthe, Maria; Garbers, Yvonne; Putoczki, Tracy; Garbers, Christoph (2017): Interleukin-11 classic but not trans-signaling is essential for fertility in mice. In: *Placenta* 57, S. 13–16. DOI: 10.1016/j.placenta.2017.05.015.
- Aitsebaomo, Julius; Srivastava, Siddharth; Zhang, Hua; Jha, Sushmita; Wang, Zhongjing; Winnik, Stephan et al. (2011): Recombinant human interleukin-11 treatment enhances collateral vessel growth after femoral artery ligation. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31 (2), S. 306–312. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.216986.
- Allanki, Srinivas; Strilic, Boris; Scheinberger, Lilly; Onderwater, Yeszamin L.; Marks, Alora; Günther, Stefan et al. (2021): Interleukin-11 signaling promotes cellular reprogramming and limits fibrotic scarring during tissue regeneration. In: *Science Advances* 7 (37), eabg6497. DOI: 10.1126/sciadv.abg6497.
- Ancey, Cecile; Corbi, Pierre; Froger, Josy; Delwail, Adriana; Wijdenes, John; Gascan, Hugues et al. (2002): Secretion of IL-6, IL-11 and LIF by human cardiomyocytes in primary culture. In: *Cytokine* 18 (4), S. 199–205. DOI: 10.1006/cyto.2002.1033.
- Aoyama, K.; Uchida, T.; Takanuki, F.; Usui, T.; Watanabe, T.; Higuchi, S. et al. (1997): Pharmacokinetics of recombinant human interleukin-11 (rhIL-11) in healthy male subjects. In: *British journal of clinical pharmacology* 43 (6), S. 571–578. DOI: 10.1046/j.1365-2125.1997.00605.x.
- Becerra, Alvaro; Rojas, Macarena; Vallejos, Alejandro; Villegas, Vicente; Pérez, Lorena; Cabello-Verrugio, Claudio; Simon, Felipe (2017): Endothelial fibrosis induced by suppressed STAT3 expression mediated by signaling involving the TGF- β 1/ALK5/Smad pathway. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 97 (9), S. 1033–1046. DOI: 10.1038/labinvest.2017.61.
- Biernacka, Anna; Dobaczewski, Marcin; Frangogiannis, Nikolaos G. (2011): TGF- β signaling in fibrosis. In: *Growth factors (Chur, Switzerland)* 29 (5), S. 196–202. DOI: 10.3109/08977194.2011.595714.
- Bilinski, P.; Hall, M. A.; Neuhaus, H.; Gissel, C.; Heath, J. K.; Gossler, A. (1996): Two differentially expressed interleukin-11 receptor genes in the mouse genome. In: *The Biochemical Journal* 320 (Pt 2) (Pt 2), S. 359–363. DOI: 10.1042/bj3200359.
- Bilinski, P.; Roopenian, D.; Gossler, A. (1998): Maternal IL-11R α function is required for normal decidua and fetoplacental development in mice. In: *Genes and Development* 12 (14), S. 2234–2243. DOI: 10.1101/gad.12.14.2234.
- Bitterman, P. B.; Henke, C. A. (1991): Fibroproliferative disorders. In: *Chest* 99 (3 Suppl), 81S–84S. DOI: 10.1378/chest.99.3_supplement.81s.
- Breton, Jean-Didier; Heydet, Déborah; Starrs, Lora M.; Veldre, Tim; Ghildyal, Reena (2018): Molecular changes during TGF β -mediated lung fibroblast-myofibroblast differentiation: implication for glucocorticoid resistance. In: *Physiological reports* 6 (7), e13669. DOI: 10.14814/phy2.13669.
- Cho, Nathan; Razipour, Shadi E.; McCain, Megan L. (2018): Featured Article: TGF- β 1 dominates extracellular matrix rigidity for inducing differentiation of human cardiac

fibroblasts to myofibroblasts. In: *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.) 243 (7), S. 601–612. DOI: 10.1177/1535370218761628.

Chomczynski, Piotr; Sacchi, Nicoletta (2006): The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. In: *Nature protocols* 1 (2), S. 581–585. DOI: 10.1038/nprot.2006.83.

Cleutjens, Jack P. M.; Verluyten, Monique J.A.; Smits, Jos F.M.; Daemen, Mat J. A. P. (1995): Collagen Remodeling after Myocardial Infarction in the Rat heart. In: *American Journal of Pathology*, S. 325–338.

Cohn, Jay N.; Ferrari, Roberto; Sharpe, Norman (2000): Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. In: *Journal of the American College of Cardiology* 35 (3), S. 569–582. DOI: 10.1016/S0735-1097(99)00630-0.

Cook, Stuart A.; Schafer, Sebastian (2020): Hiding in Plain Sight: Interleukin-11 Emerges as a Master Regulator of Fibrosis, Tissue Integrity, and Stromal Inflammation. In: *Annual review of medicine* 71, S. 263–276. DOI: 10.1146/annurev-med-041818-011649.

Corden, Benjamin; Adami, Eleonora; Sweeney, Mark; Schafer, Sebastian; Cook, Stuart A. (2020): IL-11 in cardiac and renal fibrosis: Late to the party but a central player. In: *British journal of pharmacology* 177 (8), S. 1695–1708. DOI: 10.1111/bph.15013.

Crawford, Jeffrey R.; Haudek, Sandra B.; Cieslik, Katarzyna A.; Trial, JoAnn; Entman, Mark L. (2012): Origin of developmental precursors dictates the pathophysiologic role of cardiac fibroblasts. In: *Journal of cardiovascular translational research* 5 (6), S. 749–759. DOI: 10.1007/s12265-012-9402-7.

Dams-Kozłowska, Hanna; Gryśka, Katarzyna; Kwiatkowska-Borowczyk, Eliza; Izycki, Dariusz; Rose-John, Stefan; Mackiewicz, Andrzej (2012): A designer hyper interleukin 11 (H11) is a biologically active cytokine. In: *BMC biotechnology* 12, S. 8. DOI: 10.1186/1472-6750-12-8.

Daniel, Christoph; Wiede, Julia; Krutzsch, Henry C.; Ribeiro, Solange M. F.; Roberts, David D.; Murphy-Ullrich, Joanne E.; Hugo, Christian (2004): Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta in fibrotic renal disease in the rat in vivo. In: *Kidney international* 65 (2), S. 459–468. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2004.00395.x.

Darby, Ian A.; Skalli, Omar; Gabbiani, Giulio (1990): α -Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. In: *Laboratory investigation*, S. 21–29.

Davis, Jennifer; Molkenin, Jeffery D. (2014): Myofibroblasts: trust your heart and let fate decide. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 70, S. 9–18. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.10.019.

Derynck, Rik; Jarrett, Julie A.; Chen, Ellson Y.; Eaton, Dennis H.; Bell, John R.; Assoian, Richard K. et al. (1985): Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. In: *Nature*. DOI: 10.1038/316701a0.

Desmoulière, Alexis; Geinoz, Antoine; Gabbiani, Françoise; Gabbiani, Giulio (1993): Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation

tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. In: *Journal of Cell Biology*, S. 103–111. DOI: 10.1083/jcb.122.1.103.

Desmoulière, Alexis; Redard, Mireille; Darby, Ian; Gabbiani, Giulio (1995): Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. In: *American Journal of Pathology*, S. 56–66.

Dimitriadis, E.; Robb, L.; La Salamonsen (2002): Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. In: *Molecular human reproduction* 8 (7), S. 636–643. DOI: 10.1093/molehr/8.7.636.

Distler, Jörg H. W.; Györfi, Andrea-Hermina; Ramanujam, Meera; Whitfield, Michael L.; Königshoff, Melanie; Lafyatis, Robert (2019): Shared and distinct mechanisms of fibrosis. In: *Nature reviews. Rheumatology* 15 (12), S. 705–730. DOI: 10.1038/s41584-019-0322-7.

Du, X.; Williams, D. A. (1997): Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use. In: *Blood* 89 (11), S. 3897–3908.

Elias, J. A.; Zheng, T.; Whiting, N. L.; Trow, T. K.; Merrill, W. W.; Zitnik, R. et al. (1994): IL-1 and transforming growth factor-beta regulation of fibroblast-derived IL-11. In: *The Journal of Immunology* 152 (5), S. 2421–2429.

Frangogiannis, Nikolaos G. (2012): Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. In: *Physiological reviews* 92 (2), S. 635–688. DOI: 10.1152/physrev.00008.2011.

Frangogiannis, Nikolaos G. (2017): The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. In: *The Journal of clinical investigation* 127 (5), S. 1600–1612. DOI: 10.1172/JCI87491.

Frangogiannis, Nikolaos G. (2019): Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. In: *Molecular aspects of medicine* 65, S. 70–99. DOI: 10.1016/j.mam.2018.07.001.

Frøen, J. F.; Larsen, T. H. (1995): Fibronectin penetration into heart myocytes subjected to experimental ischemia by coronary artery ligation. In: *Acta anatomica* 152 (2), S. 119–126. DOI: 10.1159/000147690.

Garbers, Christoph; Aparicio-Siegmund, Samadhi; Rose-John, Stefan (2015): The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition. In: *Current opinion in immunology* 34, S. 75–82. DOI: 10.1016/j.coi.2015.02.008.

Garbers, Christoph; Hermanns, Heike M.; Schaper, Fred; Müller-Newen, Gerhard; Grötzinger, Joachim; Rose-John, Stefan; Scheller, Jürgen (2012): Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. In: *Cytokine & growth factor reviews* 23 (3), S. 85–97. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2012.04.001.

Garbers, Christoph; Scheller, Jürgen (2013): Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different. In: *Biological chemistry* 394 (9), S. 1145–1161. DOI: 10.1515/hsz-2013-0166.

Garvin, Alexandra M.; Both, Matthew D. de; Talboom, Joshua S.; Lindsey, Merry L.; Huentelman, Matthew J.; Hale, Taben M. (2021): Transient ACE (Angiotensin-Converting Enzyme) Inhibition Suppresses Future Fibrogenic Capacity and Heterogeneity of

Cardiac Fibroblast Subpopulations. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 77 (3), S. 904–918. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.16352.

Gordon, M. S.; McCaskill-Stevens, W. J.; La Battiato; Loewy, J.; Loesch, D.; Breeden, E. et al. (1996): A phase I trial of recombinant human interleukin-11 (neumega rhIL-11 growth factor) in women with breast cancer receiving chemotherapy. In: *Blood* 87 (9), S. 3615–3624. DOI: 10.1182/blood.V87.9.3615.bloodjournal8793615.

Grande, María T.; López-Novoa, José M. (2009): Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. In: *Nature reviews. Nephrology* 5 (6), S. 319–328. DOI: 10.1038/nrneph.2009.74.

Gurtner, Geoffrey C.; Werner, Sabine; Barrandon, Yann; Longaker, Michael T. (2008): Wound repair and regeneration. In: *Nature* 453 (7193), S. 314–321. DOI: 10.1038/nature07039.

Györfi, Andrea Hermina; Matei, Alexandru-Emil; Distler, Jörg H. W. (2018): Targeting TGF- β signaling for the treatment of fibrosis. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 68-69, S. 8–27. DOI: 10.1016/j.matbio.2017.12.016.

Hashimura, Hiromi; Kimura, Fumiko; Ishibashi-Ueda, Hatsue; Morita, Yoshiaki; Higashi, Masahiro; Nakano, Shintaro et al. (2017): Radiologic-Pathologic Correlation of Primary and Secondary Cardiomyopathies: MR Imaging and Histopathologic Findings in Hearts from Autopsy and Transplantation. In: *RadioGraphics* 37 (3), S. 719–736. DOI: 10.1148/rg.2017160082.

Heinrich, Peter C.; Behrmann, Iris; Haan Serge; Hermanns Heike M.; Müller-Newen, Gerhard; Schaper, Fred (2003): Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. In: *The Biochemical Journal* 347 (Pt 1). DOI: 10.1042/BJ20030407.

Hibi, M.; Murakami, M.; Saito, M.; Hirano, T.; Taga, T.; Kishimoto, T. (1990): Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. In: *Cell* 63 (6), S. 1149–1157. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90411-7.

Hocevar, B. A.; Brown, T. L.; Howe, P. H. (1999): TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. In: *The EMBO journal* 18 (5), S. 1345–1356. DOI: 10.1093/emboj/18.5.1345.

Ignatz, R. A.; Massagué, J. (1986): Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. In: *Journal of Biological Chemistry* 261 (9), S. 4337–4345. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)35666-1.

Jazbutyte, Virginija; Fiedler, Jan; Kneitz, Susanne; Galuppo, Paolo; Just, Annette; Holzmann, Angelika et al. (2013): MicroRNA-22 increases senescence and activates cardiac fibroblasts in the aging heart. In: *Age (Dordrecht, Netherlands)* 35 (3), S. 747–762. DOI: 10.1007/s11357-012-9407-9.

Jenkins, Brendan J.; Grail, Dianne; Nheu, Thao; Najdovska, Meri; Wang, Bo; Waring, Paul et al. (2005): Hyperactivation of Stat3 in gp130 mutant mice promotes gastric hyperproliferation and desensitizes TGF-beta signaling. In: *Nature medicine* 11 (8), S. 845–852. DOI: 10.1038/nm1282.

- Kanısıcak, Onur; Khalil, Hadi; Ivey, Malina J.; Karch, Jason; Maliken, Bryan D.; Correll, Robert N. et al. (2016): Genetic lineage tracing defines myofibroblast origin and function in the injured heart. In: *Nature communications* 7, S. 12260. DOI: 10.1038/ncomms12260.
- Karow, J.; Hudson, K. R.; Hall, M. A.; Vernallis, AB; Taylor, J. A.; Gossler, A.; Heath, J. K. (1996): Mediation of interleukin-11-dependent biological responses by a soluble form of the interleukin-11 receptor. In: *Biochemical Journal* 318 (Pt 2), S. 489–495. DOI: 10.1042/bj3180489.
- Kendall, Ryan T.; Feghali-Bostwick, Carol A. (2014): Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. In: *Frontiers in pharmacology* 5, S. 123. DOI: 10.3389/fphar.2014.00123.
- Kenneth J. Livak; Thomas D. Schmittgen (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. In: *Methods* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Khalil, Hadi; Kanısıcak, Onur; Prasad, Vikram; Correll, Robert N.; Fu, Xing; Schips, Tobias et al. (2017): Fibroblast-specific TGF- β -Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis. In: *The Journal of clinical investigation* 127 (10), S. 3770–3783. DOI: 10.1172/JCI94753.
- Kim, Tae Kyung; Eberwine, James H. (2010): Mammalian cell transfection: the present and the future. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 397 (8), S. 3173–3178. DOI: 10.1007/s00216-010-3821-6.
- Kimura, Ryusuke; Maeda, Makiko; Arita, Atsushi; Oshima, Yuichi; Obana, Masanori; Ito, Takashi et al. (2007): Identification of cardiac myocytes as the target of interleukin 11, a cardioprotective cytokine. In: *Cytokine* 38 (2), S. 107–115. DOI: 10.1016/j.cyto.2007.05.011.
- Koch, Lydia; Kespohl, Birte; Agthe, Maria; Schumertl, Tim; Dusterhöft, Stefan; Lemberg, Marius K. et al. (2021): Interleukin-11 (IL-11) receptor cleavage by the rhomboid protease RHBDL2 induces IL-11 trans-signaling. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 35 (3), e21380. DOI: 10.1096/fj.202002087R.
- Kong, Ping; Christia, Panagiota; Saxena, Amit; Su, Ya; Frangogiannis, Nikolaos G. (2013): Lack of specificity of fibroblast-specific protein 1 in cardiac remodeling and fibrosis. In: *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 305 (9), H1363-H1372. DOI: 10.1152/ajpheart.00395.2013.
- Kubista, Mikael; Andrade, José Manuel; Bengtsson, Martin; Forootan, Amin; Jonák, Jiri; Lind, Kristina et al. (2006): The real-time polymerase chain reaction. In: *Molecular aspects of medicine* 27 (2-3), S. 95–125. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007.
- Kupfahl, C.; Pink, D.; Friedrich, K.; Zurbrügg, H. R.; Neuss, M.; Warnecke, C. et al. (2000): Angiotensin II directly increases transforming growth factor β 1 and osteopontin and indirectly affects collagen mRNA expression in the human heart. In: *Cardiovascular research* 46 (3), S. 463–475. DOI: 10.1016/S0008-6363(00)00037-7.

- Lafyatis, Robert (2014): Transforming growth factor β --at the centre of systemic sclerosis. In: *Nature reviews. Rheumatology* 10 (12), S. 706–719. DOI: 10.1038/nrrheum.2014.137.
- Lajiness, Jacquelyn D.; Conway, Simon J. (2014): Origin, development, and differentiation of cardiac fibroblasts. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 70, S. 2–8. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.11.003.
- Lazarides, E.; Lukens, L. N. (1971): Collagen Synthesis on Polysomes in vivo and in vitro. In: *Nature New Biology* 232 (28), S. 37–40. DOI: 10.1038/newbio232037a0.
- Leask, Andrew (2007): TGF β , cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. In: *Cardiovascular research* 74 (2), S. 207–212. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.07.012.
- Lip, G. Y. H.; Gibbs, C. R.; Beevers, D. G. (2000): ABC of heart failure: Aetiology. In: *BMJ*, S. 104–107. DOI: 10.1136/bmj.320.7227.104.
- Lipps, Christoph; Klein, Franziska; Wahlicht, Tom; Seiffert, Virginia; Butueva, Milada; Zauers, Jeannette et al. (2018): Expansion of functional personalized cells with specific transgene combinations. In: *Nature communications* 9 (1), S. 994. DOI: 10.1038/s41467-018-03408-4.
- Liu, Rui-Ming; Desai, Leena P. (2015): Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. In: *Redox biology* 6, S. 565–577. DOI: 10.1016/j.redox.2015.09.009.
- Liu, Tong; Song, Deli; Dong, Jianzeng; Zhu, Pinghui; Liu, Jie; Liu, Wei et al. (2017): Current Understanding of the Pathophysiology of Myocardial Fibrosis and Its Quantitative Assessment in Heart Failure. In: *Frontiers in physiology* 8, S. 238. DOI: 10.3389/fphys.2017.00238.
- Lodyga, Monika; Hinz, Boris (2020): TGF- β 1 - A truly transforming growth factor in fibrosis and immunity. In: *Seminars in cell & developmental biology* 101, S. 123–139. DOI: 10.1016/j.semcdb.2019.12.010.
- Lokau, Juliane; Agthe, Maria; Garbers, Christoph (2016a): Generation of Soluble Interleukin-11 and Interleukin-6 Receptors: A Crucial Function for Proteases during Inflammation. In: *Mediators of inflammation* 2016, S. 1785021. DOI: 10.1155/2016/1785021.
- Lokau, Juliane; Nitz, Rebecca; Agthe, Maria; Monhasery, Niloufar; Aparicio-Siegmund, Samadhi; Schumacher, Neele et al. (2016b): Proteolytic Cleavage Governs Interleukin-11 Trans-signaling. In: *Cell reports* 14 (7), S. 1761–1773. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.01.053.
- Lokmic, Zerina; Musyoka, James; Hewitson, Timothy D.; Darby, Ian A. (2012): Hypoxia and hypoxia signaling in tissue repair and fibrosis. In: *International review of cell and molecular biology* 296, S. 139–185. DOI: 10.1016/B978-0-12-394307-1.00003-5.
- Lyons, Rusette M.; Gentry, Larry E.; Purchio, A. F.; Moses, Harold L. (1990): Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. In: *Journal of Cell Biology* 110 (4), S. 1361–1367. DOI: 10.1083/jcb.110.4.1361.
- Metcalf, Riley D.; Aizel, Kaheina; Zlatic, Courtney O.; Nguyen, Paul M.; Morton, Craig J.; Lio, Daisy Sio-Seng et al. (2020a): The structure of the extracellular domains of human

interleukin 11 α receptor reveals mechanisms of cytokine engagement. In: *The Journal of biological chemistry* 295 (24), S. 8285–8301. DOI: 10.1074/jbc.RA119.012351.

Metcalfe, Riley D.; Putoczki, Tracy L.; Griffin, Michael D. W. (2020b): Structural Understanding of Interleukin 6 Family Cytokine Signaling and Targeted Therapies: Focus on Interleukin 11. In: *Frontiers in immunology* 11, S. 1424. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01424.

Mullis, K. B.; Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Methods in enzymology* 155, S. 335–350. DOI: 10.1016/0076-6879(87)55023-6.

Nagaraju, Chandan K.; Robinson, Emma L.; Abdesselem, Mouna; Trenson, Sander; Dries, Eef; Gilbert, Guillaume et al. (2019): Myofibroblast Phenotype and Reversibility of Fibrosis in Patients With End-Stage Heart Failure. In: *Journal of the American College of Cardiology* 73 (18), S. 2267–2282. DOI: 10.1016/j.jacc.2019.02.049.

Nakagawa, Masashi; Owada, Yasuko; Izumi, Yasukatsu; Nonin, Shinichi; Sugioka, Kenichi; Nakatani, Daisaku et al. (2016): Four cases of investigational therapy with interleukin-11 against acute myocardial infarction. In: *Heart and vessels* 31 (9), S. 1574–1578. DOI: 10.1007/s00380-015-0788-4.

Ng, Benjamin; Widjaja, Anissa A.; Viswanathan, Sivakumar; Dong, Jinrui; Chothani, Sonia P.; Lim, Stella et al. (2021): Similarities and differences between IL11 and IL11RA1 knockout mice for lung fibro-inflammation, fertility and craniosynostosis. In: *Scientific reports* 11 (1), S. 14088. DOI: 10.1038/s41598-021-93623-9.

Nieminen, Pekka; Morgan, Neil V.; Fenwick, Aimée L.; Parmanen, Satu; Veistinen, Lotta; Mikkola, Marja L. et al. (2011): Inactivation of IL11 signaling causes craniosynostosis, delayed tooth eruption, and supernumerary teeth. In: *American journal of human genetics* 89 (1), S. 67–81. DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.05.024.

Obana, Masanori; Maeda, Makiko; Takeda, Koji; Hayama, Akiko; Mohri, Tomomi; Yamashita, Tomomi et al. (2010): Therapeutic Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 by Interleukin-11 Ameliorates Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction. In: *Circulation* 121 (5), S. 684–691. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.893677.

O'Reilly, Steven; Ciechomska, Marzena; Cant, Rachel; van Laar, Jacob M. (2014): Interleukin-6 (IL-6) trans signaling drives a STAT3-dependent pathway that leads to hyperactive transforming growth factor- β (TGF- β) signaling promoting SMAD3 activation and fibrosis via Gremlin protein. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (14), S. 9952–9960. DOI: 10.1074/jbc.M113.545822.

Pedroza, Mesias; Le, Thuy T.; Lewis, Katherine; Karmouty-Quintana, Harry; To, Sarah; George, Anuh T. et al. (2016): STAT-3 contributes to pulmonary fibrosis through epithelial injury and fibroblast-myofibroblast differentiation. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30 (1), S. 129–140. DOI: 10.1096/fj.15-273953.

Petrov, Victor V; Fagard, Robert H; Lijnen, Paul J (2002): Stimulation of Collagen Production by Transforming Growth Factor- β 1 During Differentiation of Cardiac Fibroblasts to Myofibroblasts. In: *Hypertension* 39 (2), S. 258–263. DOI: 10.1161/hy0202.103268.

- Pflanz, Stefan; Tacke, Ingrid; Grötzinger, Joachim; Jacques, Yannick; Dahmen, Heike, Heinrich, Peter C.; Müller-Newen, Gerhard (1999): A fusion protein of interleukin-11 and soluble interleukin-11 receptor acts as a superagonist on cells expressing gp130. In: *FEBS Letters* 450 (1-2), S. 117–122. DOI: 10.1016/s0014-5793(99)00477-9.
- Podewski, Edith K.; Hilfiker-Kleiner, Denise; Hilfiker, Andres; Morawietz, Henning; Lichtenberg, Artur; Wollert, Kai C.; Drexler, Helmut (2003): Alterations in Janus kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling in patients with end-stage dilated cardiomyopathy. In: *Circulation* 107 (6), S. 798–802. DOI: 10.1161/01.cir.0000057545.82749.ff.
- Prêle, Cecilia M.; Yao, Eric; O'Donoghue, Robert J. J.; Mutsaers, Steven E.; Knight, Darryl A. (2012): STAT3: a central mediator of pulmonary fibrosis? In: *Proceedings of the American Thoracic Society* 9 (3), S. 177–182. DOI: 10.1513/pats.201201-007AW.
- Putoczki, Tracy; Ernst, Matthias (2010): More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer. In: *Journal of leukocyte biology* 88 (6), S. 1109–1117. DOI: 10.1189/jlb.0410226.
- Querejeta, Ramón; López, Begoña; González, Arantxa; Sánchez, Eloy; Larman, Mariano; Martínez Ubago, José L.; Díez, Javier (2004): Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis. In: *Circulation* 110 (10), S. 1263–1268. DOI: 10.1161/01.CIR.0000140973.60992.9A.
- Robb, L.; Hilton, D. J.; Brook-Carter, P. T.; Begley, C. G. (1997): Identification of a second murine interleukin-11 receptor alpha-chain gene (IL11Ra2) with a restricted pattern of expression. In: *Genomics* 40 (3), S. 387–394. DOI: 10.1006/geno.1996.4579.
- Robb, L.; Hilton, D. J.; Willson, T. A.; Begley, C. G. (1996): Structural analysis of the gene encoding the murine interleukin-11 receptor alpha-chain and a related locus. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (23), S. 13754–13761. DOI: 10.1074/jbc.271.23.13754.
- Rose-John, Stefan (2018): Interleukin-6 Family Cytokines. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10 (2), a028415. DOI: 10.1101/cshperspect.a028415.
- Schafer, Sebastian; Viswanathan, Sivakumar; Widjaja, Anissa A.; Lim, Wei-Wen; Moreno-Moral, Aida; DeLaughter, Daniel M. et al. (2017): IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. In: *Nature* 552 (7683), S. 110–115. DOI: 10.1038/nature24676.
- Scheller, Jürgen; Chalaris, Athena; Schmidt-Arras, Dirk; Rose-John, Stefan (2011): The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. In: *Biochimica et biophysica acta* 1813 (5), S. 878–888. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.
- Schlunegger, Michael P.; Grütter, Markus G. (1992): An unusual feature revealed by the crystal structure of an unusual feature revealed at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor-beta. In: *Nature*, S. 430–434. DOI: 10.1038/358430a0.
- Serini, G.; Bochaton-Piallat, M. L.; Ropraz, P.; Geinoz, A.; Borsi, L.; Zardi, L.; Gabbiani, G. (1998): The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. In: *The Journal of cell biology* 142 (3), S. 873–881. DOI: 10.1083/jcb.142.3.873.

- Snider, Paige; Standley, Kara N.; Wang, Jian; Azhar, Mohamad; Doetschman, Thomas; Conway, Simon J. (2009): Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. In: *Circulation research* 105 (10), S. 934–947. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.201400.
- Stansfield, William E.; Andersen, Nancy M.; Tang, Ru-Hang; Selzman, Craig H. (2009): Periostin is a novel factor in cardiac remodeling after experimental and clinical unloading of the failing heart. In: *The Annals of thoracic surgery* 88 (6), S. 1916–1921. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2009.07.038.
- Störk, Stefan; Handrock, Renate; Jacob, Josephine; Walker, Jochen; Calado, Frederico; Lahoz, Raquel et al. (2017): Epidemiology of heart failure in Germany: a retrospective database study. In: *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 106 (11), S. 913–922. DOI: 10.1007/s00392-017-1137-7.
- Suga, Kazutaka; Saitoh, Minori; Kokubo, Satoshi; Nozaki, Kazutoshi; Fukushima, Shinji; Yasuda, Shuhei et al. (2004): Synergism between interleukin-11 and bone morphogenetic protein-2 in the healing of segmental bone defects in a rabbit model. In: *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 24 (6), S. 343–349. DOI: 10.1089/107999004323142204.
- Sun, Yao; Weber, Karl T. (2012): Origin of Developmental Precursors Dictates the Pathophysiologic Role of Cardiac Fibroblasts. In: *Cardiovascular research*, S. 749–759.
- Takeda, Norifumi; Manabe, Ichiro; Uchino, Yuichi; Eguchi, Kosei; Matsumoto, Saho-hime; Nishimura, Satoshi et al. (2010): Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. In: *The Journal of clinical investigation* 120 (1), S. 254–265. DOI: 10.1172/JCI40295.
- Tang, Juan; Liu, Chun-yan; Lu, Miao-miao; Zhang, Jing; Mei, Wen-juan; Yang, Wen-jun et al. (2015): Fluorofenidone protects against renal fibrosis by inhibiting STAT3 tyrosine phosphorylation. In: *Molecular and cellular biochemistry* 407 (1), S. 77–87. DOI: 10.1007/s11010-015-2456-5.
- Tomasek, James J; Gabbiani, Giulio; Hinz, Boris; Chaponnier, Christine; Brown, Robert A (2002): Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodeling. In: *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, S. 349–363. DOI: 10.1038/nrm809.
- Torr, Elizabeth E.; Ngam, Caitlyn R.; Bernau, Ksenija; Tomasini-Johansson, Bianca; Acton, Benjamin; Sandbo, Nathan (2015): Myofibroblasts exhibit enhanced fibronectin assembly that is intrinsic to their contractile phenotype. In: *The Journal of biological chemistry* 290 (11), S. 6951–6961. DOI: 10.1074/jbc.M114.606186.
- Travers, Joshua G.; Kamal, Fadia A.; Robbins, Jeffrey; Yutzey, Katherine E.; Blaxall, Burns C. (2016): Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. In: *Circulation research* 118 (6), S. 1021–1040. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306565.
- Valiente-Alandi, Iñigo; Potter, Sarah J.; Salvador, Ane M.; Schafer, Allison E.; Schips, Tobias; Carrillo-Salinas, Francisco et al. (2018): Inhibiting Fibronectin Attenuates Fibrosis and Improves Cardiac Function in a Model of Heart Failure. In: *Circulation* 138 (12), S. 1236–1252. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034609.
- van Aelst, Lucas N. L.; Voss, Sandra; Carai, Paolo; van Leeuwen, Rick; Vanhoutte, Davy; Sanders-van Wijk, Sandra et al. (2015): Osteoglycin prevents cardiac dilatation and

dysfunction after myocardial infarction through infarct collagen strengthening. In: *Circulation research* 116 (3), S. 425–436. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304599.

Verrecchia, F.; Chu, M. L.; Mauviel, A. (2001): Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (20), S. 17058–17062. DOI: 10.1074/jbc.M100754200.

Wang, G.; Yu, Y.; Sun, C.; Liu, T.; Liang, T.; Zhan, L. et al. (2016): STAT3 selectively interacts with Smad3 to antagonize TGF- β signalling. In: *Oncogene* 35 (33), S. 4388–4398. DOI: 10.1038/onc.2015.446.

Wang, Jinhu; Karra, Ravi; Dickson, Amy L.; Poss, Kenneth D. (2013): Fibronectin is deposited by injury-activated epicardial cells and is necessary for zebrafish heart regeneration. In: *Developmental biology* 382 (2), S. 427–435. DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.08.012.

Wen, W.; Chau, E.; Jackson-Boeters, L.; Elliott, C.; Daley, T. D.; Hamilton, D. W. (2010): TGF- β 1 and FAK regulate periostin expression in PDL fibroblasts. In: *Journal of dental research* 89 (12), S. 1439–1443. DOI: 10.1177/0022034510378684.

Wilks, Andrew F.; Harpur, Ailsa G. (1994): Cytokine signal transduction and the JAK family of protein tyrosine kinases. In: *Bioessays* 16 (5), S. 313–320. DOI: 10.1002/bies.950160505.

Willems, Ingrid E. M. G.; Arends, Jan-Willeem; Daemen, Mat J. A. P. (1996): Tenascin and Fibronectin expression in healing human myocardial scars. In: *J. Pathol.* 179 (3), S. 321–325. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199607)179:3<321::AID-PATH555>3.0.CO;2-8.

Wipff, Pierre-Jean; Rifkin, Daniel B.; Meister, Jean-Jaques; Hinz, Boris (2007): Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix. In: *Journal of Cell Biology* 179 (6), S. 1311–1323. DOI: 10.1083/jcb.200704042.

World Health Organization (2018): Noncommunicable diseases country profiles 2018: World Health Organization.

Wrana, Jeffrey L.; Attisano, Liliana; Cárcamo, Juan; Zentella, Alejandro; Doody, Jaqueline; Laiho, Marikki; Massagué, Joan (1992): TGF-beta signals through a Heteromeric Protein Kinase Receptor Complex. In: *Cell* 71 (6), S. 1003–1014. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90395-s.

Wynn, T. A. (2008): Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. In: *The Journal of pathology* 214 (2), S. 199–210. DOI: 10.1002/path.2277.

Xu, Ming-Yi; Hu, Jun-Jie; Shen, Jie; Wang, Mei-Ling; Zhang, Qing-Qing; Qu, Ying; Lu, Lun-Gen (2014): Stat3 signaling activation crosslinking of TGF- β 1 in hepatic stellate cell exacerbates liver injury and fibrosis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1842 (11), S. 2237–2245. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.07.025.

Yancy, Clyde W.; Jessup, Mariell; Biykem Bozkurt; Javed Butler; Donald E. Casey; Mark H. Drazner et al. (2013): 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure. In: *Circulation* 128 (16), e240–e327. DOI: 10.1161/CIR.0b013e31829e8776.

- Yashiro, R.; Nagasawa, T.; Kiji, M.; Hormdee, D.; Kobayashi, H.; Koshy, G. et al. (2006): Transforming growth factor-beta stimulates interleukin-11 production by human periodontal ligament and gingival fibroblasts. In: *Journal of clinical periodontology* 33 (3), S. 165–171. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2006.00898.x.
- Yu, Ling; Border, Wayne A.; Huang, Yufeng; Noble, Nancy A. (2003): TGF-beta isoforms in renal fibrogenesis. In: *Kidney international* 64 (3), S. 844–856. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00162.x.
- Yu, Ying; Wang, Yumei; Niu, Yangyang; Fu, Lanjun; Chin, Y. Eugene; Yu, Chen (2015): Leukemia inhibitory factor attenuates renal fibrosis through Stat3-miR-29c. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 309 (7), F595-603. DOI: 10.1152/ajprenal.00634.2014.
- Zhang, Kai; Flanders, Kathleen C.; Phan, Sem H. (1995): Cellular localization of transforming growth factor-beta expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. In: *American Journal of Pathology* 147 (2), S. 352–361.
- Zhang, Ying E. (2009): Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. In: *Cell research* 19 (1), S. 128–139. DOI: 10.1038/cr.2008.328.
- Zhao, Sheng; Wu, Hengfang; Xia, Wenlong; Chen, Xiangjian; Zhu, Shushu; Zhang, Shijiang et al. (2014): Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts. In: *Journal of cardiology* 63 (5), S. 373–378. DOI: 10.1016/j.jjcc.2013.09.013.

8 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Datum

Unterschrift

9 Danksagung

Zum Ende meiner Arbeit möchte ich einer Reihe von Personen danken, die diese überhaupt möglich gemacht haben. Zuallererst danke ich Herrn PD Dr. Christian Troidl für die freundliche Überlassung des Themas und die wertvollen Hinweise besonders am Ende des Schreibprozesses.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Betreuern Dr. Christoph Lipps und Dr. Sven Reischauer. Ihr reges Interesse am Stand der Untersuchungen und die vielen Hinweise zur Laborarbeit haben wesentlich zum Gelingen beigetragen.

Weiterhin danke ich den technischen Assistentinnen Antje Weber, Steffanie Wolfram, Henrike Thomas, Sabine Schäfer und Benoush Parviz. Ihnen gilt mein Dank für die Einweisung und Unterstützung während der Laborabläufe, die Beantwortung technischer Fragen sowie für die herzliche Atmosphäre, die ich während meiner Zeit im Labor erleben durfte.

Außerdem möchte ich meinem Mit-Doktoranden Michel Hüller für die zahlreichen Anregungen, wertvolle Unterstützung und praktische Hilfe beim Durchführen der Laborarbeit danken. Mein Dank gilt weiterhin Hifza Idrees für die Beantwortung meiner Fragen und die vielen guten und ermutigenden Gespräche auch nach meiner Zeit im Labor.

Ich danke meinen Freunden, die mir eine persönliche Heimat während der Studienzeit und darüber hinaus gegeben haben. Danke an Sarah, Pia und Hannah. Mit euch unterwegs sein zu dürfen bedeutet mir sehr viel und macht mein Leben reicher.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Das Wissen, dass ich in euch jederzeit einen Rückhalt habe und eure bedingungslose, liebevolle Unterstützung erfahren darf, erfüllt mich mit tiefster Dankbarkeit.