



# Der Antiporter SLC7A11/xCT als profibrotischer Faktor in dermalen Fibrose

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Sabrina Bianca Mücklich

geboren am 08.10.1991 in Kaiserslautern

Mainz, August 2023

Dekan: Prof. Dr. Eckhard Thines

1. Berichterstatterin: PD Dr. Verena K. Raker

2. Berichterstatter: Prof Dr. Eckhard Thines

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2024

**Eidesstattliche Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, Sabrina Mücklich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung, anderer als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt habe. Alles aus 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. Diese Doktorarbeit wurde in ähnlicher Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

**Teile dieser Arbeit wurden publiziert**

Für meine Mutter

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>I</b>
<b>II. ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>II</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 AUFBAU DER HAUT .....	1
1.2 SYSTEMISCHE SKLEROSE .....	2
1.2.1 Epidemiologie .....	2
1.2.2 Ätiologie und klinische Pathologie .....	3
1.2.3 Fibrose .....	4
1.2.4 Immunologische Mechanismen der Fibrose .....	4
1.3 OXIDATIVER STRESS.....	6
1.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies und ihre Rolle in der dermalen Fibrose .....	6
1.3.3 Fibroblasten.....	8
1.4 ANTIOXIDATIVE SYSTEME .....	11
1.4.1 Cystin/Glutamat-Antiporter xCT (SLC7A11) .....	11
1.5 FERROPTOSE .....	12
1.6 TIEREXPERIMENTELLE MODELLE DER SYSTEMISCHEN SKLEROSE.....	14
1.7 ZIELE DER ARBEIT.....	15
<b>2. MATERIAL UND METHODE .....</b>	<b>16</b>
2.1 MATERIAL .....	16
2.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmittel .....	16
2.1.2 Chemikalien/ Medikamente/ Enzyme .....	18
2.1.3 Puffer/ Kits/ Assays .....	19
2.1.4 FACS Antikörper.....	20
2.1.5 Histologie.....	21
2.2 METHODE .....	22
2.2.1 Luminol (L-012) basierte Detektion reaktiver Sauerstoffspezies.....	22
2.2.2 Lumineszenzbasierte Detektion von Glutathion und Glutathiondisulfid ..	22
2.2.3 Gewinnung von Patient/innenproben und Aufarbeitung von humaner Haut	
23	
2.2.4 HOCl-induzierte dermale Fibrose in der Maus.....	24
2.2.5 Versuchstiere und Zuchtbedingungen .....	24
2.2.6 Organentnahmen.....	24

2.2.7 Gewinnung und Kultivierung von murinen Fibroblasten.....	26
2.2.8 Durchflusszytometrie .....	27
2.2.9 Immunfluoreszenzfärbung .....	28
2.2.10 Alpha-Smooth Muscle Actin .....	29
2.2.12 Genexpressionsanalyse mithilfe der Nanostring nCounter .....	29
2.2.12 Kreuz-Transplantation von Wildtyp und xCT KO Haut.....	31
2.2.13 Statistik.....	32
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>33</b>
3.1 GENEXPRESSIONSANALYSE DER HAUT VON SKLERODERMIE PATIENT/INNEN .....	33
3.2 OXIDATIVER STRESS IN MURINER HAUT .....	35
3.1.1 Chemilumineszente Detektion von ROS Stress nach Injektion reaktiver Sauerstoffspezies in vivo mithilfe von L-012.....	36
3.1.2 Analyse von Glutathion und Glutathiondisulfid Mengen in Abhängigkeit des Antiporters xCT/SLC7A11 .....	37
3.3 ANALYSE PROFIBROTISCHER UND FIBROTISCHER PARAMETER IN xCT KO MÄUSEN	39
3.3.1 Analyse des kutanen zellulären Infiltrats der Haut .....	39
3.3.2 Histologische Bestimmung des Kollagengehalts in der Haut.....	43
3.3.3 Myofibroblastenaktivierung in der Haut.....	45
3.3.4 Nanostring Genexpressionsanalyse in muriner Haut.....	47
3.4 SLC7A11/xCT DEFIZIENZ IN EX VIVO FIBROBLASTEN DIFFERENZIERUNG .....	61
3.4.1 Fibroblastenkultivierung.....	61
3.4.2 Inhibierung des SLC7A11/xCT Systems mithilfe von Imdidazol Keton Erastin .....	64
3.4.3 Kreuz-Transplantation von Wildtyp und xCT KO Haut.....	67
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>70</b>
<b>5. ABSTRACT.....</b>	<b>77</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>78</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>III. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>XII</b>
<b>IV. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>X. CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>XVI</b>

<b>VI. DANKSAGUNG .....</b>	<b>XVII</b>
-----------------------------	-------------

## **I. Veröffentlichungen**

Muecklich S, Shehzad K, Tiemann J, Li L, Leson S, Nelson PJ, Jennemann R, Klein M, Becker C, Sandhoff R, Steinbrink K, Raker VK. DKK3 Promotes Oxidative Stress–Induced Fibroblast Activity. *J Invest Dermatol.* 2023 Jun;143(6):1088-1090.e2. doi: 10.1016/j.jid.2022.12.004. Epub 2022 Dec 17. PMID: 36539030.

## II. Abkürzungen

ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
ACR	American College of Rheumatology
AECA	Anti-Endothel-Zell-Antikörper
Ang II	Angiotensin II
ATP	Adenosin Triphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTGF	ConnectiveTissue Growth Factor
dcSSc	Diffuse kutane systemische Sklerose
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET-1	Endothelin-1
EZ	Endothelzellen
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
fcs	Flow Cytometry Standard
FGF	Fibroblast Growth Factor
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
GPX4	Glutathion Peroxidase 4
GR	Glutathion Reduktase
GS	Glutathion Synthetase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HO·	Hydroxidradikal
HOCl	Hypochlorsäure
HSC	Hepatische Sternzellen
IKE	Imidazol Keton Erastin

IL-13	Interleukin-13
IL-4	Interleukin-4
ILD	Interstitielle Lungenerkrankung
lcSSc	Limitierte kutane systemische Sklerose
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MMP	Matrix Metalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidradikal
PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SNAT	Sodium Coupled Neutral Amino Acid Transporter
SLC7A11	Solute Carrier Family 7 Member 11
SOD	Superoxid-Dismutase
SSc	Systemische Sklerose
SSC	Seitwärtsstreulicht (Side scatter)
TGF-β	Transforming Growth Factor β
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt1	Wingless/Int-1
γ-GCS	γ-Glutamylcystein
α-SMA	Alpha Smooth Muscle Actin

## **1. Einleitung**

### **1.1 Aufbau der Haut**

Die Haut stellt aufgrund ihrer Oberfläche, das größte, menschliche Organ dar und umgibt den gesamten Körper mit einer Fläche von etwa eineinhalb bis zwei Quadratmetern. Dabei fungiert sie nicht nur als primäre Barriere gegen externe Einflüsse, sondern erfüllt neben der Schutzfunktion, eine Stützfunktion, reguliert den Wasserverlust und die Körpertemperatur (Yousef, Alhadj, and Sharma 2022).

Die drei Schichten der Haut umfassen von außen nach innen die Epidermis, gefolgt von der Dermis und der Hypodermis und unterscheiden sich in Anatomie und Funktion.

Die Epidermis ist in fünf Strukturebenen unterteilt: Stratum corneum, Stratum lucidum, Stratum granulosum, Stratum spinosum und das Stratum basale. Den hier überwiegenden Zelltyp stellen die Keratinozyten dar. Weitere wichtige Zelltypen sind die Langerhanszellen, Merkelzellen und Melanozyten. Die Epidermis fungiert als Schutzbarriere für UV Strahlung, Chemikalien, Viren und Bakterien (Ramos-e-Silva and Jacques 2012).

Die Epidermis ist über die Basalmembran mit der Dermis verbunden. Sie ist von faseriger Struktur bestehend aus Kollagen- und elastischen Fasern, extrazellulären Komponenten wie Haarfollikeln, vaskulären Nervenendungen, Drüsen und kann in die Papillarschicht (Stratum papillare), oder auch Zapfenschicht genannt, und die Retikularschicht (Stratum reticulare), Netzschicht genannt, untergliedert werden. Ein wichtiger Bestandteil der Dermis ist die extrazelluläre Matrix (ECM). Sie besteht aus zwei Hauptproteinen dem Kollagen (hauptsächlich Typ I und Typ III Kollagenen) und dem Elastin, die den faserigen Bestandteil darstellen. Während die Epidermis vor allem von Keratinozyten und Langerhanszellen durchsetzt ist, findet man Fibroblasten, Myofibroblasten sowie eine Vielzahl dermaler dendritischer Zelltypen in der Dermis, um nur wenige spezialisierte Zellen zu nennen. Das kutane Immunzell-Netzwerk wird deshalb auch als Haut-assoziiertes lymphatisches Organ (skin-associated lymphoid tissue =SALT) bezeichnet (Quaresma 2019).

## 1.2 Systemische Sklerose

Die systemische Sklerose (SSc), auch systemische Sklerodermie oder progressive Systemsklerose genannt, leitet sich vom griech. *skleros* = hart und *derma* = Haut ab und ist eine entzündliche Autoimmunerkrankung (Postlethwaite et al. 2010). Der Terminus Sklerodermie wurde 1836 das erste Mal von Fantonetti De Pavia eingeführt. Mitte des 19. Jahrhunderts folgten weitere Berichte von Thirial (1845), Forget (1847) und Grisolle (1847), die den Weg der Sklerodermie als eigenständige, klinische Entität ebneten (De Silva, Silva, and Parish 1994).

Systemische Sklerose ist eine Autoimmunerkrankung, die zur Gruppe der Kollagenosen gehört und durch drei pathophysiologische Eigenschaften gekennzeichnet ist: Vaskulopathie, Inflammation und die progrediente Synthese und Ablagerung von Kollagenen in der Haut, auch Fibrose genannt. Im Gegensatz zu lokalisierter Sklerodermie (Morphea) findet Fibrose bei der SSc auch in viszeralen Organen statt und weist autoimmune Komponenten auf (Careta and Romiti 2015). SSc gilt als eine der komplexesten Autoimmunerkrankungen, da sowohl vaskuläre Zellen und Bindegewebszellen als auch Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen und die genaue Ursache der Krankheit bis heute noch ungeklärt ist. Therapien setzen daher derzeit auf die Behandlung und Eindämmung der Symptome.

### 1.2.1 Epidemiologie

Die Inzidenz der Systemischen Sklerose weist geografisch, geschlechtlich und ethnische Varianzen auf. Im deutschsprachigen Raum liegt die Zahl der Erstdiagnosen bei 100.000 pro Jahr mit einer Prävalenz von 10-15 pro 100.000 Einwohner. Die Krankheit tritt meist im dritten bis fünften Lebensjahrzent auf mit einer Gynäkotropie im Verhältnis von 3:1 oder größer (Peoples et al. 2016). Die globale Prävalenz liegt bei 17,6 pro 100.000 Einwohner mit einer Erstdiagnoserate von 1,4 pro Jahr (Bairkdar et al. 2021).

Dabei wurden Umweltfaktoren wie Siliciumstaub, Polyvinylchlorid, Anilin, Epoxidharze, aromatische Kohlenwasserstoffe wie Benzin und Toluene mit der Entwicklung der SSc, oder Sklerodermie ähnlichen Erkrankungen, in Zusammenhang gebracht. Obwohl der

## Einleitung

Beitrag von Umweltfaktoren und genetischer Disposition nachgewiesen wurde, bleibt die genaue Ursache der SSc weiterhin unklar.

### 1.2.2 Ätiologie und klinische Pathologie

Die SSc zeichnet sich durch eine starke Heterogenität in Bezug auf die klinische Ausprägung, dem Ausmaß und der Schwere der Organbeteiligung, sowie immunologischen Veränderung aus (Renz-Polster and Aries 2006). 1988 legten LeRoy et al. klinische Charakteristika zur Unterscheidung zweier Subtypen im Hinblick auf die Sklerosierung von Haut und Organen fest (LeRoy and Medsger 2001). Bei der limitierten kutanen Systemischen Sklerose (lcSSC) tritt die Hautsklerose in den distalen Bereichen wie beispielsweise Ellenbogen, Knien und Schlüsselbeinen auf, während die diffus kutan Systemische Form (dcSSC) durch einen progressiven Verlauf gekennzeichnet ist und der Körper auch internistisch von Gewebsfibrosen betroffen sein kann. Hierbei sind die inneren Organe meist im frühen Stadium betroffen (Bergamasco et al. 2019) (Sticherling 2019). Die 1980 vom Subkomitee des *American College of Rheumatology* (ACR) veröffentlichten Klassifizierungskriterien werden oftmals nicht nur in Studien, sondern auch in der Diagnostik zur Klassifizierung der SSc herangezogen (LeRoy and Medsger 2001). Da in mehr als 90 % der Fälle bei SSc Patient/innen Sklerodermie-spezifische Autoantikörper (Anti-Zentromer, Anti-Topoisomerase I (Scl70), Anti-RNA Polymerase III) nachgewiesen werden können, sind diese wegweisende und diagnoseunterstützende Faktoren zur klinischen Charakterisierung (Yang et al. 2020) und ersetzen weitestgehend die gewebshistologische Diagnosestellung.

Der Krankheitsverlauf erstreckt sich meist über viele Jahre und in etwa 90 % der Fälle ist das Raynaud-Phänomen ein erstes Frühsymptom, bei dem es zu vasospastischen Verschlüssen der kleinen Arterien im Bereich der Finger, Fingernägel und Zehen kommt. Interstitielle Lungenerkrankungen durch Lungenfibrose (ILD) und pulmonale, arterielle Hypertonie (PAH) sind die häufigsten Todesursachen im Verlauf der SSc (De Almeida Chaves et al. 2021). Derzeitige therapeutische Ansätze zielen besonders auf anti-inflammatorische Medikamente, Immunsuppressiva und gefäßaktive Substanzen (Campochiaro and Allanore 2021). Des Weiteren kann bei stark progressivem Verlauf die Behandlung mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor und Angiokinasehemmer erfolgen (Nintedanib, Handelsnamen: Vargatef, Ofev). Dieses Medikament blockiert

## Einleitung

Rezeptoren für den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), den Fibroblasten Growth Factor (FGF), und den Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) (Aringer et al. 2022). Eine kausale Therapie oder kurative Behandlungsoption existiert derzeit nicht.

### **1.2.3 Fibrose**

Durch Gewebsverletzungen wie z.B. Endothelschäden, Toxine, Autoimmunreaktionen, bakterielle Infektionen oder Strahlung treten im Laufe der SSc fibrotische Veränderungen der Haut, der Gefäßwände und u.U. in inneren Organen auf. Fibrose ist ein Schlüsselfaktor der Pathogenese. Dabei ist Fibrose durch eine exzessive Akkumulation von ECM Komponenten wie Kollagen und Fibronectin und der Sekretion von Wachstumsfaktoren, proteolytischen Enzymen, Angiogenesefaktoren und fibrogenen Zytokinen, gekennzeichnet (Wynn 2008). Fibrose ist irreversibel und durch die Verdickungen (Ödeme), Verhärtungen (Indurationen) in Haut und Organengewebe, kann es in schweren Verläufen zu Organversagen kommen.

### **1.2.4 Immunologische Mechanismen der Fibrose**

Durch die mikrovaskuläre Gewebsschädigung werden residente Immunzellen wie Mastzellen, dendritische Zellen, Makrophagen oder T-Zellen im umgebenden Gewebe dazu angeregt Mediatoren wie Histamine, Interleukine, Zytokine und Chemokine freizusetzen (Mukai et al. 2018). Auch die Aktivierung von Blutplättchen, welche wiederum Zytokine wie Platelet-derived Growth Factor PDGF und Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) frei setzen und mit Neutrophilen und Monozyten interagieren, spielen bereits eine frühe Rolle in der Pathogenese der SSc (V. Raker et al. 2017). In der Sklerodermie findet meist eine Aktivierung und Apoptose der Endothelzellen statt, die beispielsweise durch reaktive Sauerstoffspezies oder Anti-Endothel-Zell-Antikörper (AECA) beschädigt werden (Thuan et al. 2018). Durch die Dysfunktion von Endothelzellen werden neben endogenen Vasokonstriktoren (wie beispielsweise Endothelin-1) auch vasodilatorische Substanzen (z.B. Stickstoffmonoxid NO) und Chemokine wie beispielsweise dem Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) freigesetzt. Dies führt zur Rekrutierung weiterer Immunzellen wie Monozyten und neutrophilen Granulozyten in das betroffene Gewebe. Neutrophile sekretieren sogenannte Neutrophil Extracellular Traps (NETs) und weitere Mediatoren wie Metalloproteasen (MMPs), Myeloperoxidasen (MPO) und

## Einleitung

reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Monozyten differenzieren zu Makrophagen, die inflammatorische Prozesse vorantreiben und schließlich anti-inflammatorische und pro-reparatorische Zytokine wie TGF- $\beta$ 1, IL-13 und PDGF freisetzen, um die Entzündung wieder einzudämmen. Außerdem werden Myofibroblasten aktiviert, die ECM Proteine produzieren und fibrotisches Gewebe entsteht. Ist dieser Vorgang unkontrolliert, residieren langlebige, profibrotische Makrophagen, die durch Zytokine wie IL-4 und IL-13 aktiviert werden, im betroffenen Gewebe. Dadurch kommt es zu einer anhaltenden Aktivierung von Myofibroblasten, welche kontinuierlich extrazelluläre Matrixproteine produzieren (Murray and Wynn 2011). In gesunden Zellen folgt auf die fibrotische Phase eine regenerative Phase, bei der sich Parenchymzellen bilden und überflüssige ECM von Cathepsinen und Matrix Metalloproteinasen, welche durch Makrophagen und Fibroblasten freigesetzt wurden, abgebaut werden (Florez-Sampedro, Song, and Melgert 2018). Im Laufe dieses Prozesses führen Dysregulationen innerhalb der Zellpopulationen oder der Wundheilungsphasen, die altersbedingt, aufgrund des Geschlechts oder durch genetische Veranlagung auftreten, zur Fibrosebildung.

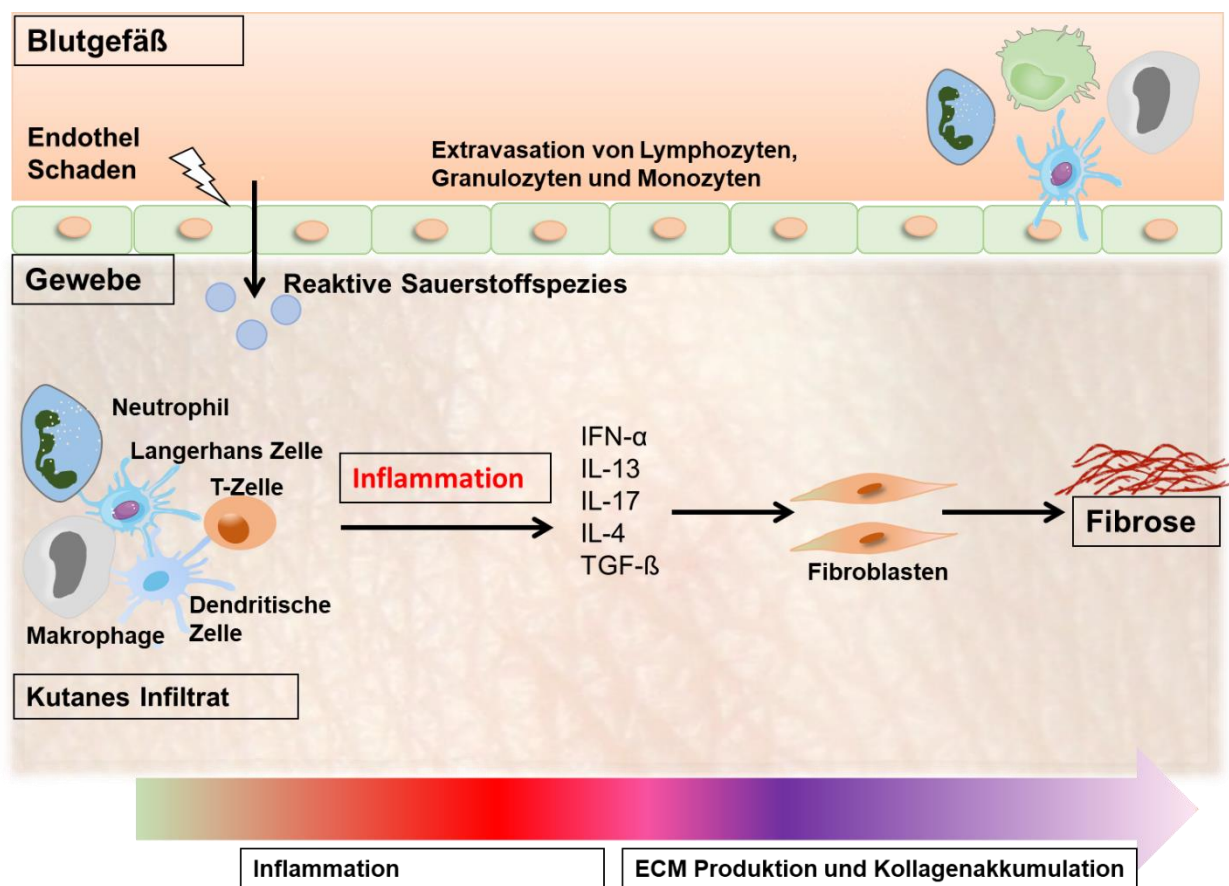


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Pathogenese der Systemischen Sklerose (erstellt mit Biorender).

## Einleitung

Ein Endothelschaden führt zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Dies löst eine Koagulationskaskade aus und bewirkt die vermehrte Ausschüttung von Zytokinen und Autoantigenen. Myeloide Zellen fungieren als wichtige antigenpräsentierende Zellen, Regulatoren von Immunantworten und schütten Zytokine aus. Diese infiltrieren das Gewebe und TGF- $\beta$  wird freigesetzt. TGF- $\beta$  gilt als Schlüsselzytokin zur Stimulation der Proliferation, Differenzierung und Migration von Fibroblasten und somit zur Aktivierung der fibrotischen Prozesse.

### 1.3 Oxidativer Stress

Reichern sich reaktive Sauerstoffspezies im Gewebe an, zum Beispiel aufgrund einer Deregulation anti-oxidativer Prozesse, kommt es aufgrund einer hohen Radikal-Reaktivität zu Zellschäden, Zellaktivierung und Zelltod. 1993 wurde durch Murrell eine erste Verknüpfung von oxidativem Stress und der Pathogenese der Systemischen Sklerose hergestellt (Murrell 1993). Im Laufe der Jahre wurde der Zusammenhang zwischen ROS und der Produktion pro-inflammatorischer und pro-fibrotischer Zytokine in vielen Studien deutlich. Eine Vielzahl der heute verwendeten chemisch induzierten Mausmodelle nutzen die Applikation reaktiver Sauerstoffspezies zur Induktion pathophysiologischer Faktoren der SSc (Vona et al. 2018) (Sambo et al. 2001).

#### 1.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies und ihre Rolle in der dermalen Fibrose

Reaktive Sauerstoffspezies wurden erstmals von Fenton 1894 beschrieben und stehen als Überbegriff für sauerstoffhaltige Substanzen, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen in den äußeren Atom- oder Molekülorbitalen enthalten. Das Superoxid-Radikal  $O_2^-$ , Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Hypochlorsäure (HOCl), und das Hydroxidradikal ( $HO\cdot$ ) sind bekannte Vertreter und Vorläufer dieser Substanzen (Murrell 1993). Aufgrund der freien Elektronenpaare sind diese Stoffe höchst reaktiv und entstehen als Nebenprodukte des Zellmetabolismus. Bei einer Deregulation der Aktivität antioxidativer Systeme akkumulieren ROS, dies führt wiederum zu Zellschäden, Zelltransformationen und Zelltod (Thuan et al. 2018). Reaktive Sauerstoffspezies können nicht-enzymatisch, durch Metall- katalysierte Reaktionen (z.B. der Fenton-Reaktion), oder durch intrazelluläre enzymatische Reaktionen entstehen. Der Hauptanteil an produzierten ROS fällt bei der Produktion von ATP (Adenosin Triphosphat) mithilfe von molekularem Sauerstoff an, auch als mitochondriale ROS bekannt. Neben mitochondrialen ROS werden durch die NADPH Oxidase zytosolische ROS produziert, die sich wiederum von Lipid ROS, unterscheiden. Lipid ROS entstehen durch Lipid-Peroxidation (Abdulle et al. 2018).

## Einleitung

In der SSc findet die Produktion von ROS vor allem durch Endothelzellen, dermale und viszerale Fibroblasten und Monozyten statt. Synthetisierte ROS sind vor allem Wasserstoffperoxid, Hydroxidradikale und Peroxynitrit (Piera-Velazquez and Jimenez 2021). Studien haben gezeigt, dass vor allem Malondialdehyde, ein Marker für die Lipid-Peroxidation und somit Lipid ROS, in Blutproben von SSc Patient/innen erhöht sind (Doridot et al. 2019). Außerdem konnten, auch im Hinblick auf die viszerale Ausbreitung der Krankheit, erhöhte Mengen an ausgeatmeten Wasserstoffperoxid und Stickstoffmonoxid bei SSc Patient/innen nachgewiesen werden (Vona et al. 2018). Durch Sambo et al. konnte gezeigt werden, dass ruhende sklerodermische Fibroblasten, isoliert aus Hautstanzen von SSc Patient/innen, eine erhöhte Produktion von freien Radikalen wie Wasserstoffperoxid und Superoxid-Radikalen *in vitro* aufweisen, im Vergleich zu gesunden Spendern. (Sambo et al. 2001). Da oxidativer Stress in mehreren pathophysiologischen Schritten der SSc partizipiert, stellt dieser Faktor einen interessanten therapeutischen Ansatzpunkt dar.

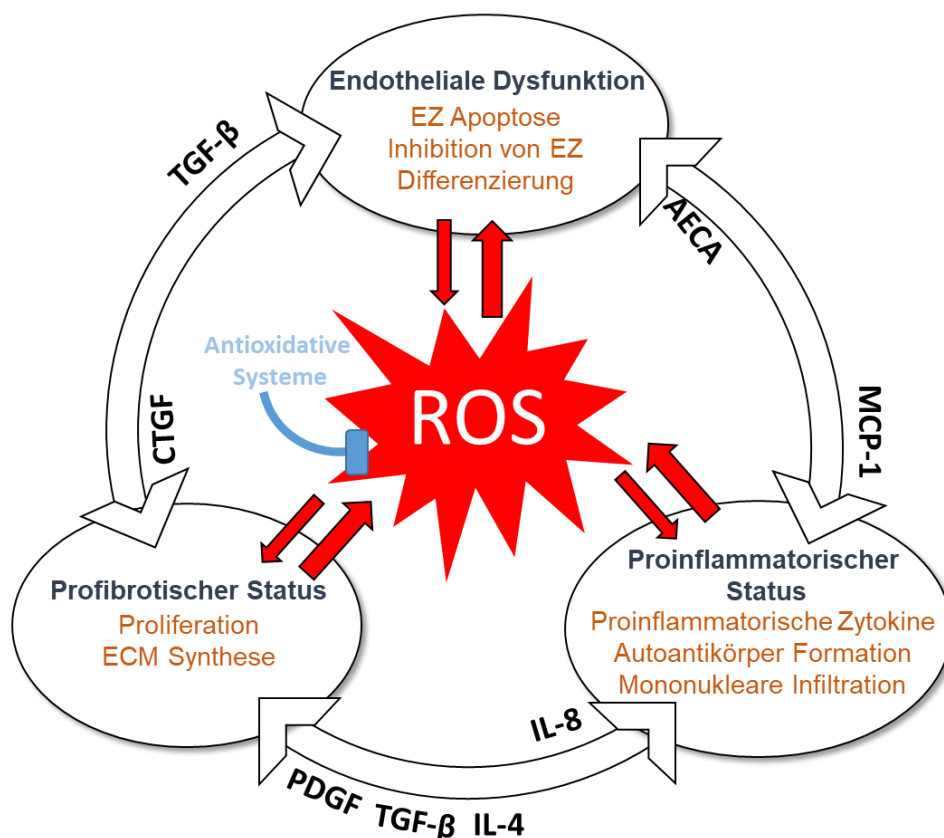


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zusammenspiels von reaktiven Sauerstoffspezies in der Pathogenese der systemischen Sklerose (verändert nach (Abdulle et al. 2018))

Dargestellt ist das Zusammenspiel von profibrotischen, proinflammatorischen und endothelialen Prozessen in Bezug auf die Entstehung und Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies. Durch eine Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies wird eine endotheliale Dysfunktion verursacht und der proinflammatorische als auch der

## Einleitung

profibrotische Zustand gefördert. Diese Prozesse sind durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Zytokine verknüpft. CTGF: Connective Tissue Growth Factor, AECA: Anti-endothelial Cell Antibodies, MPC-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1, EZ: Endothelzellen, PDGF: Platelet Derived Growth Factor.

### 1.3.3 Fibroblasten

Der am häufigsten vorkommende Zelltyp in der ECM sind spindelförmige, mesenchymale Zellen, die Fibroblasten genannt werden und aus mesodermalem Gewebe entstehen. Fibroblasten kommen in der Mehrheit der Organe vor und regulieren ECM Proteine. Mesenchymale Zellen wie Perizyten und Adipozyten sind dazu in der Lage zu Fibroblasten zu differenzieren. Fibroblasten sind sehr dehnbare Zellen und können ihre Funktion und Physiologie ändern und sich sogar in neue Zelltypen differenzieren (Tracy, Minasian, and Caterson 2016). Sie produzieren die Strukturproteine der ECM (fasriges Kollagen und Elastin), Adhäsionsproteine (Laminin und Fibronectin) und Grundsubstanzen (Glykosaminoglykane wie Hyaluron und Glykoproteine). Eine Deregulation dieser Proteine wie beispielsweise von Kollagen des Typ I und III führt zu pathophysiologischen Veränderungen, die klinische Charakteristika in der Systemischen Sklerose darstellen. Hierbei findet sich vor allem Kollagen Typ I in der Fibrose wieder (Wells 2022) . Im Körper tragen Fibroblasten vor allem durch die Produktion und Reabsorption der ECM bei der Wundheilung zur Gewebemöostase bei. Des Weiteren spielen Fibroblasten bei der Inflammation, Angiogenese, der Krebsentstehung und der Fibrose eine Rolle (Kendall and Feghali-Bostwick 2014). Fibroblasten werden durch eine Reihe chemischer Signale aktiviert, um die Proliferation anzuregen. Dabei reagieren Fibroblasten auf Zytokine wie TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-13 und IL-33 und können selbst auch TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-33, CXC und CC Chemokine produzieren und sekretieren (Gharaee-Kermani et al. 2012).

#### 1.3.3.1 Fibroblastenphänotypen

Die unterschiedlichen Fibroblastenphänotypen ergeben sich aufgrund der interorganellen Heterogenität und unterschiedlicher Genexpressionsprofile. Dabei können Fibroblasten z.B. aufgrund der Expression von Typ I Kollagenen, Cluster Of Differentiation 90 (Thy-1/CD90), Alpha Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) und Vimentin unterschieden werden (Phan 2008). In den unterschiedlichen Schichten der Dermis finden sich mehrere Subpopulationen von Fibroblasten mit individuellen

## Einleitung

morphologischen und physiologischen Funktionen (Tracy, Minasian, and Caterson 2016).

Einer der bekanntesten Fibroblastenphänotypen sind Myofibroblasten, die neben der Aktivierung durch residierende Fibroblasten auch durch den Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) aus Epithelzellen, oder aus Fibrozyten entstehen können und durch die Expression von  $\alpha$ -SMA detektierbar sind. In der Proliferationsphase des Wundheilungsprozesses werden sie durch die Freisetzung von TGF- $\beta$ 1 aktiviert und migrieren entlang des Fibrinnetzes zum betroffenen Gewebe. Dort tragen sie durch ihre kontraktile Wirkung zur Verdichtung der Wunde bei. Die Fähigkeit zur Kontraktion ist neben dem  $\alpha$ -SMA auch durch das Myosin im Zytoskelett der Myofibroblasten möglich (Chitturi et al. 2015). Hierbei ist die Regulation molekularer Signale durch z.B. TGF- $\beta$ 1, ET-1 Endothelin 1 (ET-1) und Angiotensin II (AngII) ausschlaggebend. Denn bei einer unkontrollierten Aktivität von Myofibroblasten kommt es zu einer verstärkten Vernarbung von Gewebe (Gibb, Lazaropoulos, and Elrod 2020)

### 1.3.3.2 Funktion in der Fibrose

Zusammen mit einer Reihe von weiteren Zellen (Epithelzellen, Endothelzellen, Immunzellen) sind Fibroblasten in gesundem Gewebe für die Erhaltung der extrazellulären Matrix, durch den Abbau und die Neusynthese von Kollagen und weiteren ECM Proteinen, verantwortlich. In fibrotischen Verläufen werden meist durch oxidative Endothelschäden (z. B. durch eine erhöhte Aktivität der NADPH (Nicotinamidadeninukleotidphosphat Oxidase (NOX)) reaktive Sauerstoffspezies generiert. Dadurch wird die Aktivierung von Fibroblasten angeregt und proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet. Im weiteren Verlauf werden Myofibroblasten aktiviert und spielen durch ihre erhöhte Produktion von ECM und fibrogenen Zytokinen eine treibende Rolle in der Fibrose. Neben Kollagen des Typs I und III produzieren Myofibroblasten auch Kollagene des Typs IV, V, VI, Glykoproteine und Proteoglykane wie Laminin, Fibronectin und Tenascin (Bochaton-Piallat, Gabbiani, and Hinz 2016). Letzteres wurde in erhöhter Konzentration in Serum von SSc Patient/innen mit pulmonaler Fibrose gemessen (Kasprzycka, Hammarström, and Haraldsen 2015). In gesundem Gewebe wird der fibrotische Prozess nach der Gewebsreparatur gestoppt. Geschieht dies nicht, ist die Konsequenz eine chronisch

## Einleitung

inflammatorische Umgebung, in der Makrophagen und Immunzellen das Gewebe weiterhin infiltrieren und Zytokine und Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1 oder des Wingless/Int-1 (Wnt1) Signalwegs freisetzen (Muecklich et al. 2023) (Frangogiannis 2020).

Myofibroblasten produzieren folglich weiterhin ECM Komponente, dies führt zu einer Verhärtung, Verdickung und letztendlich einer Fibrosierung des Gewebes.

### 1.3.3.3 ECM Produktion

Die extrazelluläre Matrix (ECM) stellt ein dynamisches Gerüst dar, dass durch konstante und kontrollierte Remodellierung und Synthese gekennzeichnet ist. Die ECM findet sich in zwei Kompartimenten wieder: der Basalmembran und dem interstitiellen Bindegewebe. Kollagene sind die organischen Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix und machen etwa 30 % der gesamten Proteinmasse des menschlichen Körpers aus. Dabei finden sich vor allem Typ I, Typ III und Typ V Kollagene als eine Art Grundgerüst in der interstitiellen Matrix, die vor allem für die Fibrillogenese verantwortlich sind (Juhl et al. 2020). Hauptbestandteil der Basalmembran sind maschenartig vernetzte Typ IV Kollagene, die im Gegensatz zu anderen Kollagentypen, keine Fibrillen ausbilden (Abreu-Velez and Howard 2012). Eingelagert in die Vernetzung von Typ IV Kollagenen sind Glykoproteine und Proteoglykane. Kollagene machen im interstitiellen Bindegewebe bis zu 90 % der organischen Komponente aus. Die Zusammensetzung der verschiedenen Kollagene ist je nach Organ und Funktion unterschiedlich. Die notwendigen Kollagene der ECM werden neben basalen Keratinozyten größtenteils von Fibroblasten und Myofibroblasten synthetisiert (Tracy, Minasian, and Caterson 2016). Durch die bereits oben beschriebene Aktivierung von Thrombozyten ist in SSc Blutproben und Hautläsionen eine erhöhte TGF- $\beta$  Konzentration nachweisbar, wodurch Fibroblasten aktiviert werden (Farina et al. 2010). Außerdem werden Myofibroblasten durch übermäßige Sekretion von TGF- $\beta$ 1 dazu angeregt, ECM Proteine Fibronectin und Kollagene zu synthetisieren (Pfisterer et al. 2021). Fibronectin bildet zusammen mit akkumulierten Kollagen und ECM Komponenten ein Geflecht aus fibrotischem Gewebe.

## 1.4 Antioxidative Systeme

Antioxidative Systeme regulieren die Bildung und Inaktivierung reaktiver Sauerstoffspezies und deren modifizierenden Einfluss auf zelluläre Makromoleküle. Es gibt mehrere antioxidative Systeme im Menschen. Diese werden unterteilt in enzymatische antioxidative Systeme, wie beispielsweise die Superoxid-Dismutase (SOD), Glutathionperoxidase und Katalaseenzyme, und nicht enzymatische Systeme wie Carotinoide, Vitamin E, Vitamin C, Thiol und Glutathion. (Koçak et al. 2019). Im Vergleich zu gesunden Proband/innen, konnten im Blutplasma von SSc Patient/innen geringere Konzentrationen von klassischen antioxidativen Vitamine und Mineralien (z. B. Ascorbinsäure,  $\alpha$ -Tocopherol, Zink) nachgewiesen werden (Vona et al. 2018).

### 1.4.1 Cystin/Glutamat-Antiporter xCT (SLC7A11)

SLC7A11 (Solute Carrier Family 7 Member 11), oder auch als xCT bezeichnet, ist die funktionale leichte Ketten Untereinheit des  $x_c^-$  Systems und wird durch das menschliche *slc7a11* Gen auf Chromosom 4 kodiert. Zusammen mit den zwei schweren Ketten Untereinheiten des SLC3A2 Chaperon Proteins, transportiert das SLC7A11 Protein natriumunabhängig extrazelluläres L-Cystin in die Zelle im Austausch gegen intrazelluläres L-Glutamat. Die Untereinheiten sind durch kovalente Disulfidbindungen verbunden. Für die Transportaktivität sind beide Untereinheiten notwendig. SLC7A11 fungiert als substratspezifische Einheit des  $x_c^-$  Systems, wohingegen SLC3A2 auch in anderen Transportern zu finden ist (Koppula et al. 2018).

Die Aminosäure Cystin spielt eine wichtige Rolle in der Proteinbiosynthese, der posttranslationalen Modifizierung und der Aufrechterhaltung des zellulären Redox-Gleichgewichts. Dabei wird Cystin durch NADPH-abhängige Reduktion im Zytosol zu Cystein umgewandelt. Cystin kann außerdem durch den Alanin-Serin-Cystin-Transporter in die Zelle gelangen und findet in der Synthese von Glutathion, einem wichtigen Antioxidanz, Verwendung. Dabei wird zunächst aus Cystein  $\gamma$ -Glutamylcystein hergestellt und dies durch die Glutathion-Synthetase dann weiter zu Glutathion umgewandelt (Jyotsana, Ta, and DelGiorno 2022). Cystin stellt nicht nur für Glutathion eine wichtige Vorläufersubstanz dar, sondern auch für Taurin und Hydrogensulfid (Stipanuk et al. 2006). Das  $x_c^-$  System ist also ein nicht enzymatisches antioxidatives System, das regulatorische Funktionen in der Synthese von Glutathion übernimmt.

## 1.5 Ferroptose

Zelltod ist ein biologisch notwendiges Ereignis, das zur zellulären Homöostase eines Organismus beiträgt. Bei einem erwachsenen Menschen sterben täglich  $10^{11}$  körpereigene Zellen. Dabei wird zwischen zwei Kategorien des Zelltods unterschieden: Akzidenteller Zelltod (ACD) und regulierter Zelltod (RCD). Während ACD meist durch chemische oder physische Schäden eingeleitet wird, findet der regulierte Zelltod als eine Art Selbstregulation des Organismus statt und ist durch eine komplexe Signalkaskade gekennzeichnet (Chen et al. 2020).

Bereits vor vielen Jahren, zeigte sich, dass Cystin-Entzug im Zellkulturmedium zu einem signifikanten Absterben von Zellen führt, jedoch war der Mechanismus dieses Zelltods noch unbekannt. In weiteren Studien wurde nachgewiesen, dass diese Form des Zelltods durch die Zugabe von Vitamin E verhindert werden kann, was zu der Annahme eines durch ROS induzierten Zelltods führte (Bannai, Tsukeda, and Okumura 1977). 2012 entdeckten Dixon et al., dass durch die pharmakologische Hemmung des  $x_c^-$  Systems und somit der intrazellulären Cystin-Aufnahme durch Erastin eine neue Form des Zelltods, Ferroptose, induziert wird (Koppula, Zhuang, and Gan 2021).

Ferroptose stellt somit eine neue Form des programmierten Zelltods dar, dabei ist Ferroptose Eisen abhängig. Hohe Konzentrationen an Eisen gehen mit einem Aktivitätsverlust der Glutathion Peroxidase 4 (GPX4) einher, dies führt zu einer Akkumulation von letalen Lipidperoxiden (Feng and Stockwell 2018). Lipidperoxide sind die Hauptverursacher in allen Signalwegen der Ferroptose und initiieren durch die oxidative Degradation von Lipiden (Lipidperoxidation) ferroptotischen Zelltod. Neben erhöhten Mengen intrazellulären Eisens tragen auch eine erhöhte Aktivierung des SAT1 Gens oder die Blockierung der GPX4 zur Entstehung von Lipidoxiden bei (J. Li et al. 2020). Es konnte gezeigt werden, dass Eisenchelatoren wie beispielsweise Ferrostatin-1 Lipidoxide unschädlich machen und somit den ferroptotischen Zelltod blockieren (Dixon et al. 2012).

Das bekannteste antioxidative System zur Regulation toxischer Lipidperoxide ist GPX4. Mithilfe von Glutathion als Kofaktor, wandelt GPX4 Lipidoxide zu Lipidalkoholen um und verhindert somit den ferroptotischen Zelltod. Da Cystin ein limitierender Faktor für die Glutathionsynthese ist, wirkt sich die Cystinkonzentration auf die GPX4-Aktivität

## Einleitung

und der Initiation von Ferroptose aus. Bisher sind vier Wege zur Initiierung von Ferroptose in Zellen bekannt. Durch die direkte Inhibierung der GPX4 mithilfe von RSL3 kann Ferroptose ausgelöst werden. Des Weiteren durch die Depletion des GPX4 und  $Q_{10}$  Proteins mithilfe eines Ferroptose Induktors z.B. FIN56. Durch das Endoperoxid  $FINO_2$  kann ebenfalls Ferroptose in Zellen ausgelöst werden. Eine weitere Möglichkeit stellt der Einsatz von SLC7A11-Inhibitoren, die das  $x_c^-$  System hemmen und ebenfalls Zelltod durch Ferroptose initiieren, dar (Feng and Stockwell 2018).

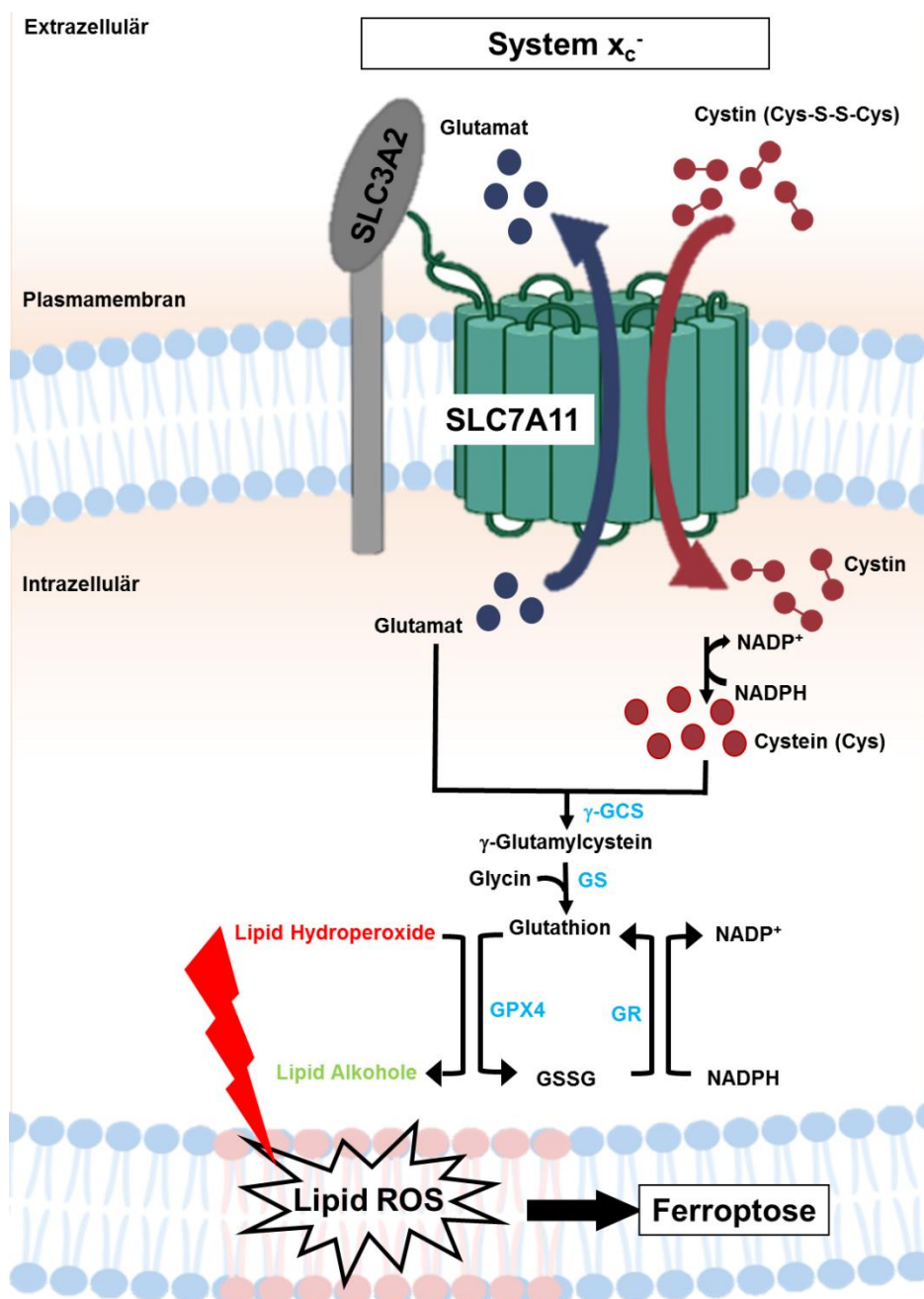


Abbildung 3: Struktur und Funktion des System  $x_c^-$  (verändert nach Koppula et al., 2021 - erstellt mit biorender.com).

## Einleitung

Das  $x_c^-$  System, bestehend aus der SLC7A11 und der SLC3A2 Untereinheit, importiert Cystin aus dem extrazellulären Raum in das Innere der Zelle im Austausch für Glutamat. Cystin wird intrazellulär mithilfe von NADPH zu Cystein umgewandelt. Durch die Glutamylcystein Synthetase wird  $\gamma$ -Glutamylcystein generiert und durch die Glutathion Synthetase weiter zu Glutathion umgewandelt. Glutathion dient als Kofaktor der Glutathion Peroxidase 4, welche Lipidoxide zu Lipidalkoholen umwandelt und so die Lipid ROS Formation und Ferroptose verhindert.  $\gamma$ -GCS:  $\gamma$ - Glutamylcystein Synthetase, GS: Glutathion Synthetase, GPX4: Glutathion Peroxidase 4, GR: Glutathion Reductase, GSSG: oxidiertes Glutathion.

## 1.6 Tierexperimentelle Modelle der systemischen Sklerose

Um charakteristische pathophysiologische Faktoren der SSc wie Vaskulopathie, Fibrose, Inflammation und Autoimmunität *in vivo* abzubilden, gibt es eine Reihe von Mausmodellen, die zur Untersuchung unterschiedlichster Aspekte der Krankheit geeignet sind. In Abbildung 4 sind sowohl chemisch induzierbare als auch Mausmodelle mit genetisch veränderten Tieren aufgelistet. Auffällig ist, dass keins der Modelle alle pathophysiologischen Aspekte der SSc abdeckt, sodass unterschiedliche Modelle für bestimmte Mechanismen verwendet werden (Storkanova and Tomcik 2017).

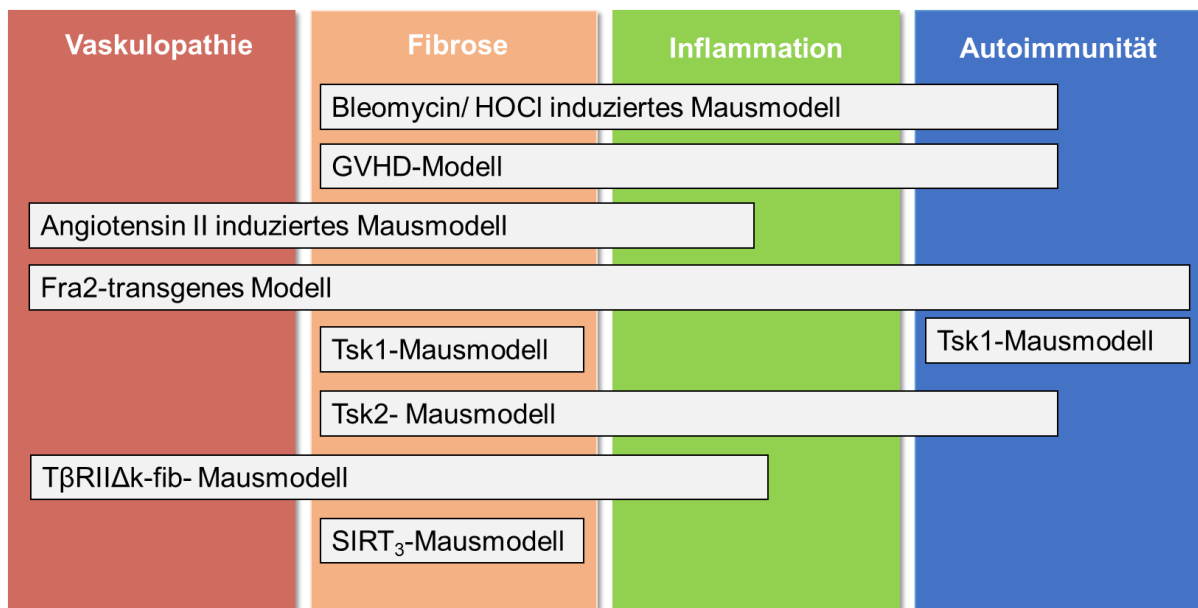


Abbildung 4: Pathophysiologische Faktoren der Systemischen Sklerose in verschiedenen Mausmodellen.

Zur pathophysiologischen Charakteristik von systemischer Sklerose zählen erhöhte ROS-Level im Blut. (Abdulle et al. 2018). Studien haben außerdem gezeigt, dass Monozyten und Fibroblasten vermehrt reaktive Sauerstoffspezies generieren, was wiederum die Kollagensynthese begünstigt (Doridot et al. 2019). Daher werden durch wiederholte Injektionen von Hypochlorsäure als ROS-Donor in murine Haut die

## Einleitung

pathophysiologischen Vorgänge der SSc im Menschen, vor allem die Inflammation (nach 2 Wochen HOCl-Behandlung) und die Fibroseentwicklung (nach 4 Wochen HOCl-Behandlung), imitiert (Artlett 2014).

Dieses Modell wurde zuerst vorgestellt von Servettaz et al. und es lassen sich damit repräsentative diffus kutane Läsionen, Lungenfibrose und die Produktion von anti-DNA Topoisomerase 1 Autoantikörpern im Serum nachweisen. All diese Komponenten ähneln der diffusen kutanen SSc im Menschen (Meng et al. 2019) (Servettaz et al. 2009). Das Protokoll nach Servettaz et al. wurde dabei in abgewandelter- auf vier Wochen verkürzte- Form angewandt gemäß Raker et al. (V. Raker et al. 2017). Die entzündliche und fibrotische Manifestation ist hier auf die Haut begrenzt.

### 1.7 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die funktionelle Rolle des xCT/SLC7A11 Antiporters als profibrotischer Faktor in der Pathogenese der Systemischen Sklerose mithilfe des chemisch induzierten Mausmodells zu ermitteln. Mithilfe einer *slc7a11*-defizienten Mauslinie soll die Funktion des SLC7A11 in Fibroblasten untersucht werden. Außerdem soll xCT/SLC7A11-Inhibition als potenzielle Interventionsstrategie für dermale Fibrose *in vivo* untersucht werden. Des Weiteren soll die Rolle des ferroptotischen Zelltods im Zusammenspiel mit der Regulation der xCT/SLC7A11 Aktivität analysiert werden. Dabei werden mithilfe molekularbiologischer und immunologischer Methoden die zelluläre Infiltration, profibrotische und fibrotische Parameter und Fibroblastendifferenzierung im Mausmodell untersucht.

## 2. Material und Methode

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmittel

Tabelle 1: Liste der Laborgeräte.

Laborgeräte/Verbrauchsmittel	Firma/ Herkunft
ABI 7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham (US)
Autoklav	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim (D)
Brutschrank	Hera-Cell 240i von Thermo Scientific, Bonn, (D)
Durchflusszytometer	LSR II mit Diva 6.0 von BD, Heidelberg, (D)
ELISA Microplate Reader	Model 450, Bio-Rad Laboratories, München (D)
gentleMACS Dissociator	Miltenyi, Bergisch Gladbach, (D)
Hidex Sense Microplate Reader	Hidex, Mainz (D)
Fluoreszenzmikroskope	-Leica Thunder DM 6000, Mannheim (D) -Evos Fluoreszenz Mikroskop, Hamburg (D) -Keyence BZ-X800 Mikroskop, Osaka (JPN)
IVIS Spectrum OI System	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim (D)
Lichtmikroskope	-IMT2, Olympus, Hamburg, (D) -DIAPLAN, Leitz,Wetzlar, (D) -Axiovert 135, Zeiss, (D) -Lichtmikroskop Kamera Model 3.2.0, Visitron Sytems GmbH, -Software Metavue,Version 6.2r2, Universal Imaging Group (US)
Magnetrührer	MR2002, Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, (D)
Nanodrop 2000	.ThermoFisher Scientific, Waltham (US)
Nanozoomer 2.0 Ht	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City (JPN)
nCounter Sprint Profiler	nanoString, Amersham (UK)
Paraffin-Einbett-Maschine	.Tissue-Tek, TEC TM, Sakura, Torrance, (US)
pH-Meter	. Lab 845, SI Analytics, Xylem (D)
Qiagen TissueLyser II	Qiagen N.V., Venlo, (NLD)
Schwenker/Schüttler	Heidolph Polymax 2040 von Labotec, Wiesbaden, (D)

## Material und Methode

Sterilwerkbank	HeraSafe, ThermoFischer Scientific, Langenselbod, (D)
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg, (D)
Vortexer	.VV3 von VWR (Darmstadt), (D)
Wasserbad	TW12, Julabo, Seelbach, (D)
VWR Thermocycler	VWR, Software Version 2.3.0.0, Radnor, (US)
Waage	MC1, Labor LC 2200P, Sartorius, Göttingen, (D)
Zentrifugen	Heraeus Fresco 17, Multifuge 3 L-R von ThermoScientific (Bonn), Rotina 46R von Hettich (Tuttlingen), (D)

*Tabelle 2: Liste der Verbrauchsmittel.*

Laborgeräte/Verbrauchsmittel	Firma/ Herkunft
1 ml Insulinspritzen	Omnican F, Braun, (D)
5 ml Polystyrene Round Bottom Tube	NUNC, Wiesbaden, (D)
96-Well Mikrotiterplatte	NUNC, Wiesbaden, (D)
96-Well-V-Bottomplatte	NUNC, Wiesbaden, (D)
96-Well-U-Bottomplatte	NUNC, Wiesbaden, (D)
Biopsien Puncher	Biopsy Punch, Stiefel, (US)
Deckgläser	Waldemar Knittel Glasbereitung GmbH, Braunschweig
Einmal-Feindosierungsspritze (1ml)	BRAUN, Melsungen, (D)
Einweg Skalpelle No24	Pulox, Köln, (D)
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 ml/1ml/2ml)	Eppendorf AG, Hamburg, (D)
Kanülen (steril)	BD MicrolanceTM3, Heidelberg, (D)
Kanülen (steril)	Sterican® (21 G x 1 1/2, Gr.2) Braun, Melsungen, (D)
LS Columns	Miltenyi, Bergisch Gladbach, (D)
MS Columns	Miltenyi, Bergisch Gladbach, (D)
Objektträger (25 x 75 x 1mm)	.Menzel GmbH & CoKG, Braunschweig, (D)
PCR Klebefolie, Ampliseal	Greiner BIO-ONE, Kremsmünster, (OÖ)
Pipettenspitzen (10 µl/ 200 µl/ 1000 µl)	.Greiner GmbH, Frickenhausen, (D)

## Material und Methode

Sapphire Mikroplatte, 96-well	Greiner BIO-ONE, Kremsmünster, (ÖÖ)
Spülkanüle	Acufirm, Dreieich, (D)
Stainless Steel Beads (7mm)	Qiagen N.V., Venlo,(NLD)
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer, Merck, Wiesbaden, (D)
Zellsieb (70µm+40 µm)	BD Falcon, Schwerte, (D)
Zentrifugen-Röhrchen (15ml/50ml)	Greiner GmbH, Frickenhausen, (D)

### 2.1.2 Chemikalien/ Medikamente/ Enzyme

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien, Medikamente und Enzyme.

Chemikalien/ Medikamente/ Enzyme	Firma/ Herkunft	Cat. No
1-Propanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, (D)	71-23-8HS
ACK Lyse	ThermoFisher Scientific, Waltham, (US)	A1049201
Anilinblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)	28983-56-4
Aqua dest.	Apotheke des Klinikums der Universitätsmedizin Mainz, (D)	
BD FACS Lysing Solution 10 x	BD Biosciences, (US)	111-46-6
BSA	Bovine Serum Albumin Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)	9401.1
CaCl <sub>2</sub> x 2xH <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, (D)	10035-04-8
CD45 MojoSort human Nanobeads	BioLegend, San Diego, (US)	480029
DMEM	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, (US)	11594486
DNase I	Sigma-Aldrich Merck, Darmstadt, (D)	10104159001
Dispase II	Sigma-Aldrich Merck, Darmstadt, (D)	42613-33-2
Dorbene Vet	Medetomidin, Zoetis, Berlin, (D)	
EDTA	Merck, Darmstadt, (D)	6381-92-6
Eosin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, (D)	17372-87-1
Ethanol (70 %/100 %)	Brüggemann Alcohol, Heilbronn, (D)	64-17-5
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)	64-17-5
FCS	ThermoFisher Scientific, Waltham (US)	11550356
Fentanyl	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, (D)	

## Material und Methode

Formaldehyd	Sigma Aldrich, Taufkirchen, (D)	50-00-0
Ficoll	Ficoll 400 Sigma Aldrich, Taufkirche, (D)	26873-85-8
H <sub>2</sub> DCFDA	ThermoFisher Scientific, Waltham,(US)	D399
Forene	Abbvie, Ludwigshafen am Rhein, (D)	1961701
Hematoxylin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, (D)	517-28-2
Heparin-Natrium	Ratiopharm, Ulm, (D)	
KCl	Merck, Darmstadt, (D)	7447-40-7
Kollagenase IV	Worthington Biochemical Corporation, (US)	LS0004186
Kollagenase A	Worthington Biochemical Corporation, (US)	LS0004196
L-012	Wako Chemical, Neuss, (D)	12004891
Midazolam	Hameln Pharma, Hameln, (D)	
Phalloidin-iFluor 488	Abcam, Cambridge, (UK)	Ab176753
RPMI	Lonza, (Belgien)	BE12-752F
Roti Histofix	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)	5666.2
Trypanblau	Sigma Aldrich, Taufkirchen, (D)	T8154
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	ThermoFisher Scientific, Waltham (US)	10977015
Xylol	Baack, Schwerin, (D)	108298

### 2.1.3 Puffer/ Kits/ Assays

Table 4: Liste der verwendeten Puffer, Kits und Assays.

Puffer	Herstellung/ Firma	Cat. No
10 x PBS	402 g NaCl und 69 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O mittels H <sub>2</sub> O dest auf 5 L aufgefüllt pH = 6,6	
1 x PBS	aus 10 x PBS, 1:10 verdünnt, pH = 7,2	
7AAD	BD Becton Dickinson, Franklin Lakes (US)	559925
Annexin/Apoptosis Detection Kit	BD Biosciences, US	88-8007-72
Brilliant Staining Buffer	ThermoFisher Scientific, Waltham, (US)	00-4409-42
eBiosciences Foxp3 staining buffer set	ThermoFisher Scientific, Waltham, (US)	00-5523-00
eBioscience Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set	ThermoFisher Scientific, Waltham, (US)	88-8824-00

## Material und Methode

ACK Lysepuffer	ThermoFisher Scientific, Waltham, (US)	A1049201
FACS-Puffer	1x PBS + 5mM EDTA + 0,5% BSA	
GSH/GSSG Assay	Promega, Wisconsin, (US)	V6611
HB Puffer	BSA (10%) + EDTA 0,5 M	
HBSS Puffer	Lonza Bioscience, (Belgien)	04-315Q
iScript cDNA Synthesis Kit	BIO-RAD, (US)	1708890
nCounter Myeloid Innate Immunity Panel	nanoString, Amersham, (UK)	
nCounter Hybridization Puffer	nanoString, Amersham, (UK)	
nCounter Reagent Pack	nanoString, Amersham, (UK)	
nCounter Fibrosis Panel	nanoString, Amersham, (UK)	
MACS-Puffer	1x PBS + 5 mM EDTA + 0,5% HSA	
SYBR Green qPCR Master Mix	bimake.com, US	B21202
Whole Skin Dissociation Kit human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, (D)	130-101-540

### 2.1.4 FACS Antikörper

Tabelle 5: Liste der verwendeten FACS-Antikörper.

Antikörper	Markierung	Verdünnung	Firma	Klon	Cat. No
Anti-Maus CD45	BV650	1:50	BioLegend	30-F11	103164
Anti-Maus CD45	APCCy7	1:50	BioLegend	30-F11	103163
Anti-Maus TCR beta chain	PE	1:25	BioLegend	H57-597	109208
Anti-Maus TCR beta chain	BV711	1:200	BioLegend	H57-597	109243
Anti-Maus Ly6C	PerCP-Cy5.5	1:50	BioLegend	HK1.4	128011
Anti-Maus CD11b	Efluor450	1:50	ThermoFisher	M1/70	48-0112-82

## Material und Methode

Anti-Maus CD64	PeCy7	1:400	BioLegend	X54-5/7.1	139314
Anti-Maus MHC class II (I-A/I-E)	BV711	1:800	BioLegend	M5/114.15.2	107643
Zombie NIR	APCCy7	1:1000	BioLegend		423105
Anti-Maus CD335	PE	1:100	BioLegend	29A1.4	137603
Anti-Maus CD19	PE	1:100	BioLegend	6D5	115507
Anti-Maus CD24	BV510	1:400	BDBiosciences	M1/69	747717
Anti-Maus CD31	PerCP-Cy5.5	1:100	BioLegend	MEC13.3	102522
Anti-Maus CD90.2	efluor450	1:100	BDBiosciences	53-2.1	48-0902-82
Anti-Maus CD29	BV650	1:50	BDBiosciences	HMβ1-1	740500
Anti-Maus CD140a	PeCy7	1:100	BioLegend	APA5	135911
Ki67	PE	1:100	BioLegend	16A8	652403
Vimentin	APC	10µl /1x10 <sup>7</sup>	Abcam	VI-RE/1	Ab176512

### 2.1.5 Histologie

Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper für histologische Analysen.

Antikörper	Firma
α-SMA Anti-rabbit polyclonal	Abcam, Cambridge, (UK)

## 2.2 Methode

### 2.2.1 Luminol (L-012) basierte Detektion reaktiver Sauerstoffspezies

Mithilfe von L-012 ein Luminol-basiertes chemilumineszentes Reagenz wurden reaktive Sauerstoffspezies *in vivo* detektiert. Die oxidierte Form des L-012 reagiert mit  $O_2^-$  -Ionen, dadurch werden Photonen chemilumineszent emittiert.

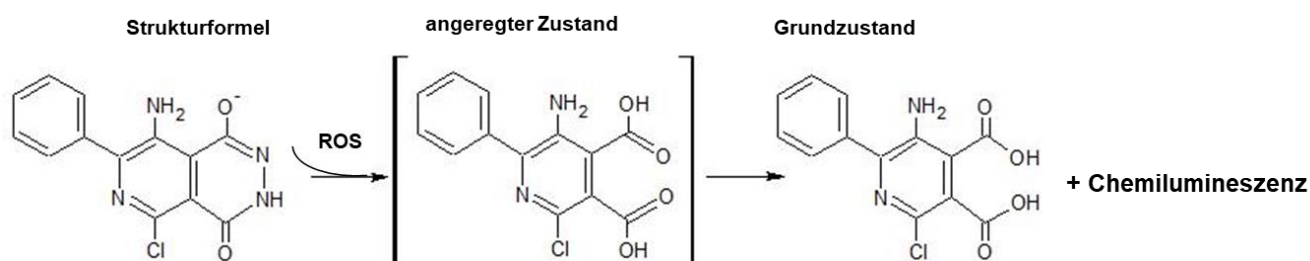


Abbildung 5: Strukturformel des L-012 im angeregten Zustand und im Grundzustand.

Zunächst wurden den Versuchstieren reaktive Sauerstoffspezies in Form von Hypochlorsäure intradermal (100  $\mu$ l 2,6 % aktives Chlor in 100  $\mu$ M  $KH_2PO_4$  Puffer) in die Rückenhaut injiziert. Nach 5 min wurde L-012 (gelöst in ultrapurem  $H_2O$ ) mit einer Konzentration von 5 mg/ml gelöst und intraperitoneal mit einer Konzentration von 25 mg pro kg Körpergewicht injiziert. Für das Imaging wurden die Mäuse mit Isofluran (2,5- 3,5%) betäubt und mit dem IVIS Spectrum OI System analysiert. Die Strahlung von PBS- und HOCl-behandelten Wildtyp Mäusen wurden nach 0, 4, 12 und 24 Stunden gemessen. Die Zellen wurden anschließend am Hidex Sense Microplate Reader gemessen. Der Versuch wurde in einer Kooperation mit [...] durchgeführt (Mehling et al. 2021).

### 2.2.2 Lumineszenzbasierte Detektion von Glutathion und Glutathiondisulfid

Zunächst wurden Hautstanzen aus den Versuchstieren isoliert und aufgearbeitet (siehe 2.2.6.1). Anschließend wurden die Zellen mithilfe von CD45 Microbeads (Miltenyi) auf einer LS Säule positiv auf CD45 selektiert. Dafür wurden die Zellen zunächst in 100  $\mu$ l FACS Puffer aufgenommen, 10  $\mu$ l Beads hinzugegeben und 20 min inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 2 ml FACS Puffer wurde die Zellsuspension bei 300 x g zentrifugiert und anschließend die Pufferlösung abgesaugt. Während des Zentrifugierens wurden die LS Säulen in einen MACS

## Material und Methode

Magneten eingeklemmt und mit 5 ml FACS Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule pipettiert und nachdem die Zellsuspension vollständig durch die Säule gelaufen war, wurde diese dreimal mit 3 ml FACS Puffer gewaschen. Der Durchlauf wurde aufgehoben (CD45 negative Zellen) und die Säule aus dem Magneten genommen und mit FACS Puffer die CD45 positiven Zellen in einem neuen Gefäß eluiert. Nach einem weiteren Waschschriff und Zentrifugieren wurde die Lebendzellzahl hämozytometrisch bestimmt. 10.000 Zellen wurden in 20 µl Hanks Balance Salt Solution (HBSS) Puffer aufgenommen und gemäß des Promega GSH/GSSG-Glo<sup>™</sup> Assays aufgearbeitet. Es wurde je eine Platte nach dem Protokoll für die Messung von Glutathion (GSH) und der andere Teil der Zellen für die Messung von Glutathiondisulfid (GSSH) behandelt.

### **2.2.3 Gewinnung von Patient/innenproben und Aufarbeitung von humaner Haut**

Aus läsionalen Bereichen wurden etwa 5 mm breite Hautstanzen entnommen. Diese wurden nach der Biopsie in C-Tubes (Miltenyi Biotec) mit 2 ml MACS Tissue Storage Solution (Miltenyi Biotec) gegeben und nachdem das Fettgewebe mit einem Skalpell abgetrennt wurde in zwei etwa gleich große Teile geteilt. Ein Teil wurde auf einem Eisblock in Tissue Tek eingebettet und bei -80 °C eingefroren. Zum zweiten Teil der Stanze wurden neben der MACS Tissue Storage Solution aus dem Whole Skin Dissociation Kit (Miltenyi Biotec) die Enzyme P, D und A nach Herstellerangaben hinzugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. In der weiteren Aufarbeitung wurden 500 µl Medium (1x DMEM mit 10 % FBS, 10mM HEPES, 1 % Penicillin/Streptavidin und 1 mM Natrium pyruvat) zum Verdau hinzugegeben und die C-Tubes in den gentleMACS eingespannt und das Gewebe zerkleinert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und durch ein 70 µm Zellsieb gefiltert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und mit anti-CD45 MojoSort Beads (BioLegend) in CD45<sup>+</sup> und CD45<sup>-</sup> Zellen mittels einer MS Säule aufgetrennt. Die Zellen wurden anschließend erneut gezählt und ein Teil für durchflusszytometrische Analysen und der andere Teil für RNA Sequencing (RNAseq) verwendet. Für das RNAseq wurden mindestens 50000 Zellen in 350 µl RLT Puffer (mit 1 % β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Diese RNAseq-Analysen wurden in Kooperation mit [...] am Forschungszentrum für Immuntherapie (FZI) Genomics Core Facility der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

#### **2.2.4 HOCl-induzierte dermale Fibrose in der Maus**

Die Hypochlorsäure wird intradermal (100 µl 2,6 % aktives Chlorid in 100 µM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Puffer) in die Rückenhaut der Versuchstiere, mit je zwei Injektionsstellen, die einen Abstand von 1 cm betragen, injiziert. Durch den ROS-Donor werden Fibroblasten stimuliert und Myofibroblasten gebildet, diese produzieren wiederum Typ I Kollagen, wodurch nach 4 Wochen (mit je 5 Injektionen/ Woche) eine Hautfibrose am Rücken der Versuchstiere ausgebildet wird.

#### **2.2.5 Versuchstiere und Zuchtbedingungen**

Als Kontrolltiere wurden Mäuse vom Charles River Labor verwendet und unter keimfreien Bedingungen im „Translational Animal Research Center (TARC)“ der Johannes Gutenberg-Universität gehalten. Die SLC7A11/xCT Knockout Mäuse (xCT KO) wurden initial von [...] vom Universitätsklinikum Tübingen zur Verfügung gestellt, wie in Arensman et al. beschrieben generiert und mit B6/J Mäusen rückgekreuzt (Arensman et al. 2019). Dabei wird gezielt die Funktion der SLC7A11 Untereinheit des x<sub>c</sub>-Systems ausgesetzt und die Tiere im Laufe dieser Arbeit als xCT KO bezeichnet. Eine Genotypisierung der xCT KO Linie zeigte einen 51 zu 49% gemischten B6/J zu B6/N Hintergrund. Daher wurden zunächst als Kontrollen C57BL/6J mit C57BL/6NRj Tieren gekreuzt um einen B6/JN Hintergrund zu erhalten. Im Folgenden werden wildtypische Mäuse hier im Text als WT bezeichnet.

Eine Genehmigung aller Tierversuche wurde durch das Landesaufsichtsamt Rheinland-Pfalz erteilt (Ref.Nr: LUA23 117-07/G18-1-070).

#### **2.2.6 Organentnahmen**

##### **2.2.6.1 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus muriner Haut**

Zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen muriner Haut wurden die Versuchstiere mithilfe von CO<sub>2</sub>-Gas euthanasiert und anschließend am Rücken rasiert. Die Rückenhaut wurde mit einer Pinzette angehoben, um ein 5x2 cm großes Hautstück mit einer Schere zu entnehmen. Überschüssiges Fett wurde mit einem Papiertuch von der Dermis entfernt. Mithilfe einer Hautstanze mit 8 mm Durchmesser wurden die Hautproben entnommen und anschließend in eine 6-well Platte mit kaltem 1x PBS überführt. Jeweils drei Stanzen wurden für die durchflusszytometrische Analyse entnommen und weitere Stanzen für spätere RNA-

## Material und Methode

Isolationen und PCR-Analysen eingefroren. Die Stenzen wurden anschließend mit einem Skalpell auf der haarlosen Seite angeritzt und der enzymatische Verdau vorbereitet.

### **2.2.6.2 Enzymatischer Verdau zur Detektion myeloider Marker**

Für jede Maus wurde eine Enzymlösung bestehend aus 200 µl Dispase II (10 mg/ml; 0.5 U/mg) + 1 µl DNase I (10.000 U/ml) angesetzt und nach dem Entfernen des 1x PBS in die 6-well Platte hinzugefügt. Anschließend wurde die Platte für 45 min bei 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) im Brutschrank inkubiert. Der Verdau wurde mit 5 % fetalem Kälberserum (FCS) abgestoppt und die Stenzen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die zweite Verdauung wurde pro Maus mit 300 µl DMEM + 180 µl FCS+ 180 µl Kollagenase IV (8000U/ml) + 0,9 µl DNase I (10000 U/ml) angesetzt und ein Teil der Lösung in das 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Bevor mit 1,8 ml DMEM Medium aufgefüllt wurde, erfolgte die Zerkleinerung der Stenzen mit einer Schere. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße im Thermomix bei 37 °C und 600 rpm für 60 min inkubiert. Durch Zugabe von 40 µl 0,5M EDTA Lösung für weitere 10 min, wurde die Enzymreaktion gestoppt. Über ein 40 µm Zellsieb wurden die Verdaureste in ein 50 ml Falcon Tube gegeben und mit HB Puffer (HBSS + 2mM EDTA + 0,5 BSA) nachgespült und auf 30 ml aufgefüllt. Bei 4 °C und 350 x g wurden die Falcon Tubes für 10 min zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Die Zellen wurden gezählt und 1x10<sup>6</sup> Zellen in eine V-Boden Platte pipettiert.

### **2.2.6.3 Gewinnung und Aufarbeitung von axillären/ zervikalen Lymphknoten und Milz**

Die zervikalen/axillären Lymphknoten wurden in RPMI Medium in ein 50 ml Falcon überführt und auf Eis gelagert. Die Lymphknoten wurden in einem 70 µm Zellsieb mit 50 ml Falcon Röhrchen verrieben. Das Sieb wurde mit RPMI Medium gespült und auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C und 300 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt, indem 1 ml Ammonium-Chloride-Potassium Lyse Puffer (ACK) auf das Zellpellet gegeben wurden und für 1 min inkubierte. Durch das Auffüllen mit 1x PBS auf 50 ml wurde die Lyse gestoppt und die Zellen gewaschen. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen gezählt und eine Zellzahl von 1x10<sup>6</sup> in eine V-Boden-Platte ausgesät.

## Material und Methode

Nach Entnahme der Milz wurde diese in einem 70 µm Zellsieb zerkleinert und das Sieb anschließend mit RPMI gespült. Daraufhin wurden die Zellen bei 4 °C und bei 300 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt, indem 1 ml ACK Lyse-Puffer auf das Zellpellet gegeben und für 1 min inkubiert wurde. Die Lyse wurde mit 1x PBS gestoppt, die Zellen gewaschen, zentrifugiert und mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  in eine V-Boden-Platte verteilt. Anschließend erfolgte die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern (FACS).

### 2.2.6.4 Hämocyto-metrische Zellzahlbestimmung

Um die Lebendzellzahl von Zellsuspensionen zu bestimmen wurden 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Trypan Blau gemischt und aus dem Gemisch 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Lichtmikroskop gezählt. Tote Zellen färben sich aufgrund der fehlenden Integrität der Plasmamembran blau, während lebende Zellen als ungefärbte Strukturen erkennbar sind. Die Lebendzellzahl aus ungefärbten Zellen in der Neubauer-Zählkammer wurde wie folgt berechnet:

$$\sum \text{Gesamtzellzahl} = X (\text{Gezähltes}) \cdot \text{Volumen} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Kammerfaktor} (10^4)$$

### 2.2.7 Gewinnung und Kultivierung von murinen Fibroblasten

Zunächst wurden die Versuchstiere ordnungsgemäß euthanasiert und an den Ohren rasiert. Mit einer Schere wurden die Ohren entnommen und in einer Petrischale in 80 %igem Ethanol inkubiert. Anschließend wurde die dorsale und ventrale Seite der Ohren mithilfe einer Pinzette aufgetrennt. Für jedes Ohr wurde eine Verdauungslösung mit 153 µl Kollagenase IV (8000 U/ml) vorbereitet und 400 µl Dispase II (10 mg/ml) vorbereitet und auf 1 ml mit Medium (500 ml 1x DMEM, 5 ml 1x MEM, 50 ml FCS, 5 ml Pen/Strep) aufgefüllt. Die Ohren wurden über Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension über ein 40 µm Zellsieb in ein 50 ml Falcon gegeben und mit 1x PBS gespült. Die Zellen wurden gewaschen (4°C 300 x g für 15 min), gezählt und mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^7$  auf eine 150 mm Platte oder 8-Well NUNC Chamber Slide ( $1 \times 10^4$ ) ausgesät. Am nächsten Tag wurde die Adhäsion der Fibroblasten überprüft und das Medium anschließend alle zwei Tage gewechselt. Am Tag 7 wurde das Medium entfernt und mit 5 ml Trypsin-EDTA 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (4°C 112 x g für 15 min) wurden die Zellen gezählt und  $1 \times 10^6$  Zellen pro Well für die FACS Färbung eingesetzt.

## Material und Methode

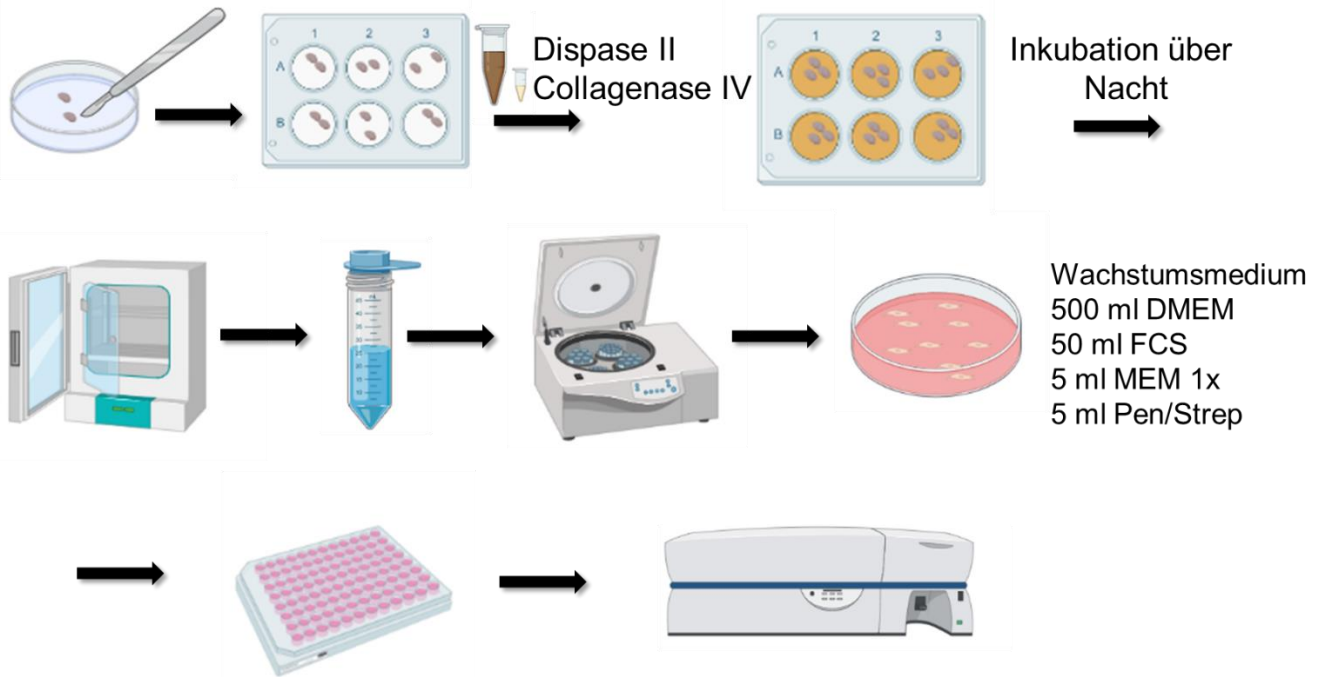


Abbildung 6: Isolation von Fibroblasten aus Mausohren (erstellt mit biorender.com)

### 2.2.8 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie oder auch FACS- Analyse (Fluorescence-Activated Cell Sorting) können einzelne Partikel aufgrund ihrer physikalischen Charakteristika oder mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper in einem durch einen Laser geleiteten Flüssigkeitsstrom untersucht und analysiert werden. Zu untersuchende physikalische Eigenschaften sind hierbei die Größe, Granularität und Komplexität, die dabei helfen Zellproben in unterschiedliche Zellpopulationen zu differenzieren. Die Zellflüssigkeit wird in der Messzelle an einem Laser vorbei mittels hydrodynamischer Fokussierung zentriert und das Streu-/Fluoreszenzlicht wird über ein optisches System durch verschiedene Spiegel und Filter in einzelne Wellenlängenbündel differenziert. Die Detektoren im System messen ein Signal in Form von Spannungsänderung. Mittels Photomultiplier Tubes (PMT) werden Lichtquanten in einen elektrischen Puls umgewandelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellen aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle mithilfe von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern differenziert und am BD LSR II Durchflusszytometer gemessen und analysiert. Das BD LSR II verfügt über eine RBV-Konfiguration mit einem roten Laser (633 nm), blauen Laser (488 nm) und violettem Laser (405 nm) und erlaubt die Darstellung von 10 Parametern.

### **2.2.8.3 Extrazelluläre Färbung**

Die aus drei Hautstanzen gewonnenen Zellen wurden in eine V-Boden Platte pipettiert und mit FACS Puffer (1x PBS + 5mM EDTA + 0,5% BSA) gewaschen. Um nichtspezifische Bindungen von monoklonalen Antikörpern zu vermeiden, wurde der Fcy-Rezeptor mithilfe des CD16/CD32 Antikörpers geblockt, in dem dieser 1:100 mit PBS verdünnt und 20 µl auf jedes Well gegeben wurden. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 10 µl des Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper-Mix gegen Oberflächenantigene auf die Zellen gegeben und für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden anschließend durch zweimaliges Waschen mit 100 µl FACS Puffer entfernt und die Zellen in 150 µl FACS Puffer aufgenommen und in ein FACS Röhrchen überführt.

### **2.2.8.4 Intrazelluläre Färbung**

Zur intrazellulären Färbung der Fibroblasten wurden die Zellen nach der extrazellulären Färbung zunächst fixiert. Dafür wurde das Fixation/Permeabilisation Buffer Kit (ThermoFisher Scientific) genutzt. Zur Fixation wurde das Fixiermittel mit der Permeabilisierungs-Lösung in einem 1:3 Verhältnis gemischt und jeweils 75 µl des Fix/Perm-Mix für 30 min bei 4 °C im Dunkeln auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde mit 150 µl 1x Permeabilisierungs-Puffer (ThermoFisher Scientific) gewaschen und der Fluoreszenz-gekoppelte intrazelluläre Antikörper Mix angesetzt. Dafür wurden die Antikörper in optimierter Verdünnung in 1x Permeabilisierungs-Puffer gegeben. Der Mix wurde für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Permeabilisierungs-Puffer und FACS-Puffer gewaschen und in 150 µl FACS Puffer aufgenommen.

### **2.2.9 Immunfluoreszenzfärbung**

Die Fibroblasten wurden wie in 2.2.7 beschrieben kultiviert und nach dem Verdau in ein 8-Well NUNC Chamber Slides mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  ausgesät. Das Medium wurde alle zwei Tage vorsichtig gewechselt und an Tag 7 wurde das Medium durch 100 µl 4 % Formaldehyd zur Fixierung ersetzt und für 15 min inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das iFluor488 Reagenz vorbereitet, indem 1 µl des 1000x Phalloidins in 1 ml PBS mit 1 % BSA verdünnt wurde. Nach dem Entfernen des Formaldehyds wurden die Zellen mit 100 µl 0,1 % Triton X-100 in PBS für 3-5 min inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Färbekongugate wurden mit jeweils einer Inkubationszeit von 20 min auf die

## Material und Methode

Zellen gegeben (Phalloidin, alpha-tubulin-PE, DAPI, Vimentin). Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und nach dem Entfernen der Chambers mithilfe von SignalStain Mounting Medium (Cell Signaling Technology) ein Deckglas auf dem Objektträger fixiert.

### **2.2.10 Alpha-Smooth Muscle Actin**

Entparaffinierte Hautschnitte (0,1  $\mu\text{m}$ ) wurden mit Antikörpern ( $\alpha$ -SMA Anti-Kaninchen polyklonal, Abcam) immun-histochemisch gefärbt. Die Objektträger wurden mit dem primären Antikörper markiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen in PBS wurden die Schnitte 1 Stunde lang mit einem biotinylierten sekundären Antikörper (Universal Alkaline Phosphatase Polymer, Histofine) inkubiert und anschließend in PBS gewaschen. Schließlich wurde die Reaktion durch 15-minütige Inkubation in alkalischer Phosphatase (AP-Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA) sichtbar gemacht. Isotyp-Kontrollen wurden entsprechend verwendet, um unspezifische Messpunkte zu identifizieren.

### **2.2.11 RNA Isolation**

Die Isolation von Ribonukleinsäuren (RNA) erfolgte mithilfe des QIAmp RNeasy Fibrous Tissue mini Kits (Qiagen). Dafür wurden Hautstanzen mit einem Durchmesser von 8 mm von Versuchstieren entnommen und jeweils eine Stanze mit einer Metallkugel (Stainless Steel Beads (Qiagen Durchmesser 7 mm) und 300  $\mu\text{l}$  Lysepuffer (RLT-Puffer von Qiagen + 1% beta-Mercaptoethanol) in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden die Stanzen im TissueLyser II für 4 min bei 30 Hz zerkleinert. Gemäß den Herstellervorgaben wurde mithilfe einer Proteinase K ein RNase-freier DNase Verdau durchgeführt und die RNA anschließend in 30  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser bei -80° C gelagert.

### **2.2.12 Genexpressionsanalyse mithilfe der Nanostring nCounter**

Mithilfe des NanoString nCounter können durch den Einsatz farbkodierter komplementärer Nukleinsäuren Multiplex-Detektionen mit bis zu 800 Analyten pro Durchlauf durch direkte Hybridisierung der Sonden mit den mRNA Transkripten erfolgen. Dafür wurde RNA isoliert (siehe 2.2.11) und anschließend mit dem Nanodrop 2000 die RNA-Konzentration bestimmt. Für jedes Zielgen wird in der NanoString Technologie ein Sondenpaar eingesetzt, bestehend aus einer 50 bp langen Reportersonde (reporter probe) und einer 50 bp langen Adaptersonde

## Material und Methode

(capture probe). Beide Sonden sind komplementär zur Zielsequenz, wobei die Reportersonde den Farbcode am 5'-Ende und die Adaptersonde eine Biotin-Markierung am 3'-Ende trägt (Geiss et al. 2008).

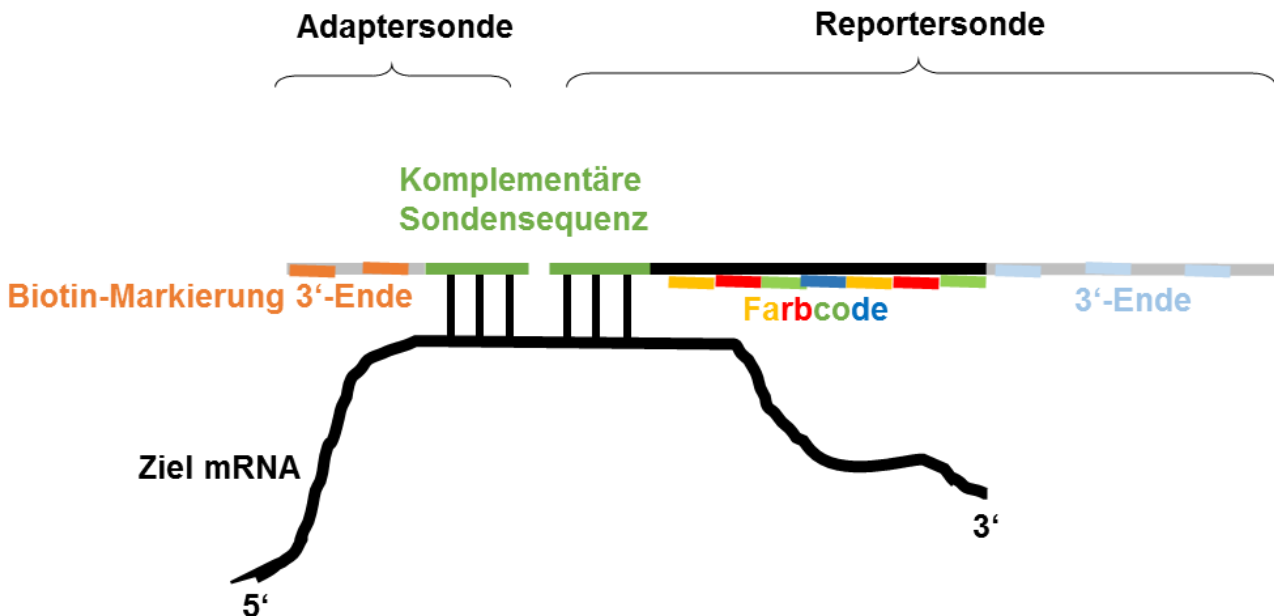


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Hybridisierungskomplexes der Adaptersonde und Reportersonde mit der RNA Zielsequenz (verändert nach Geiss et al. 2008).

Das nCounter Mouse „Myeloid Innate Immunity Panel v2“ und „Mouse fibrosis Panel v1“ wurden zur Hybridisierung der RNA mit Barcode-Oligonukleotiden für 18 Stunden bei 65° C verwendet. Dafür wurden 200 ng RNA mit RNase-freiem Wasser auf 5 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Für den Master-Mix wurden 70 µl Hybridisierungspuffer in das Reporter Codeset Reagenz gegeben und jeweils 8 µl Master-Mix zu jeder RNA Probe pipettiert. Anschließend wurden 2 µl capture probe hinzugegeben und jede Probe auf 32 µl mit Hybridisierungspuffer aufgefüllt und die Proben auf die nCounter Cartridge überführt. Für die Datenanalyse wurde die Cartridge in den nCounter Sprint Analyzer gegeben und die Farbcodes für jedes Zielmolekül ausgelesen. Die Normalisierung der Genexpressionsanalyse erfolgte anhand von 10 Referenzgenen (house keeping genes), deren Genexpression in der Haut als nicht differenziert reguliert gilt.

Die Daten wurden mit der nSolver Analysis Software von NanoString ausgewertet und normalisiert. Normalisierung, fold changes, p-Werte und die technischen Standard-Qualitätskontrollen wurden gemäß der Herstellerangabe durchgeführt und mithilfe des ROSALIND Programms von NanoString berechnet. Proben, die außerhalb der von NanoString festgelegten Grenzwerte lagen, wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

## Material und Methode

Anhand der Vorgaben von Nanostring wurde zunächst ein Geomittel aller Referenzgene errechnet, anschließend der Mittelwert der Geomittel aller Proben errechnet und der Referenzgen-Normalisierungsfaktor, durch Division des Geomittels der Probe durch Mittelwert der Geomittel, bestimmt. Mithilfe einer HyperScale Datenbank von ROSALIND® OnRamp BioInformatics, Inc. (San Diego, CA) wurden Violin Plots, prozentuale Verteilungen, Heatmaps und multidimensionale Diagramme der Daten erstellt. Zur Darstellung von Gen-Clustern wurde die PAM Methode (partitioning around medoids) mithilfe der fpc R library verwendet (Hennig 2020), außerdem wurden folgende Datenbanken zur erweiterten Analyse der Daten hinzugezogen: topGO R (Alexa and Rahnenfuhrer 2022), libraryInterpro (Mitchell et al. 2019), NCBI (Geer et al. 2010), MSigDB (Subramanian et al. 2005), REACTOME (Fabregat et al. 2018), WikiPathways (Slenter et al. 2018).

### **2.2.12 Kreuz-Transplantation von Wildtyp und xCT KO Haut**

Die Kreuztransplantationen von Mausohren auf Mause Rücken wurden nach dem Protokoll von Garrod & D.Cahalan (2008) unter behördlicher Modifikation (LUA) durchgeführt (Garrod and D. Cahalan 2008). Die Spendertiere wurden mit CO<sub>2</sub> Gas getötet und die Ohren mit einer Schere entnommen. Die dorsale und ventrale Seite der Ohren wurden voneinander getrennt, die Ohren mit Ethanol desinfiziert und anschließend ein Wundrand um das gesamte Ohr geschnitten. Die Empfängertiere wurden durch eine Mischung aus Midazolam (5 mg/kg; Hameln Pharma, Hameln, Germany), Dorbene Vet (Medetomidin, 1 mg/ml, Zoetis, Berlin, Germany), und Fentanyl (0.05 mg/kg; Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Germany) in chirurgische Toleranz versetzt und die Körpertemperatur der Tiere wurde mittels einer Wärmelampe aufrechterhalten. Die Narkose wurde durch das Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes überprüft. Die Empfängermaus wurde in die Bauchlage gelegt und die Rückenpartie rasiert und mit Enthaarungscreme zusätzlich enthaart. Anschließend wurde der Rücken mit Ethanol desinfiziert und im mittigen Bereich des Rückens die Haut mit einer Pinzette gegriffen und mit der Schere ein kleiner Schnitt unterhalb der Pinzette gemacht. Das Spenderohr wurde auf das Transplantatbett gelegt und überschüssige Haut mit der Schere entfernt, sodass das Spenderohr passgenau im Transplantatbett lag. Nach dem Abtupfen überschüssiger Flüssigkeit wurde ein Pflaster mit dem Gaze-Segment über das Hauttransplantat platziert und der klebende Bereich des Pflasters um die Maus gewickelt. Das Pflaster wurde am Rücken mit einer Knopfnahnt gesichert. Es folgte eine 21-tägige

## Material und Methode

Wundheilungsphase, in der die Tiere täglich überwacht, gescored und mit Schmerzmittel (Paracetamol-Sirup 4 mg/ml) versorgt wurden. Das Pflaster wurde bereits an Tag 7 entfernt. Nach Tag 20 wurde die dermale Fibrose durch Injektion von 2,6 % Hypochlorsäure für 14 Tage begonnen. Und abschließend Hautproben des Transplantat- und des umliegenden Hautbereichs für histologische Analysen entnommen.

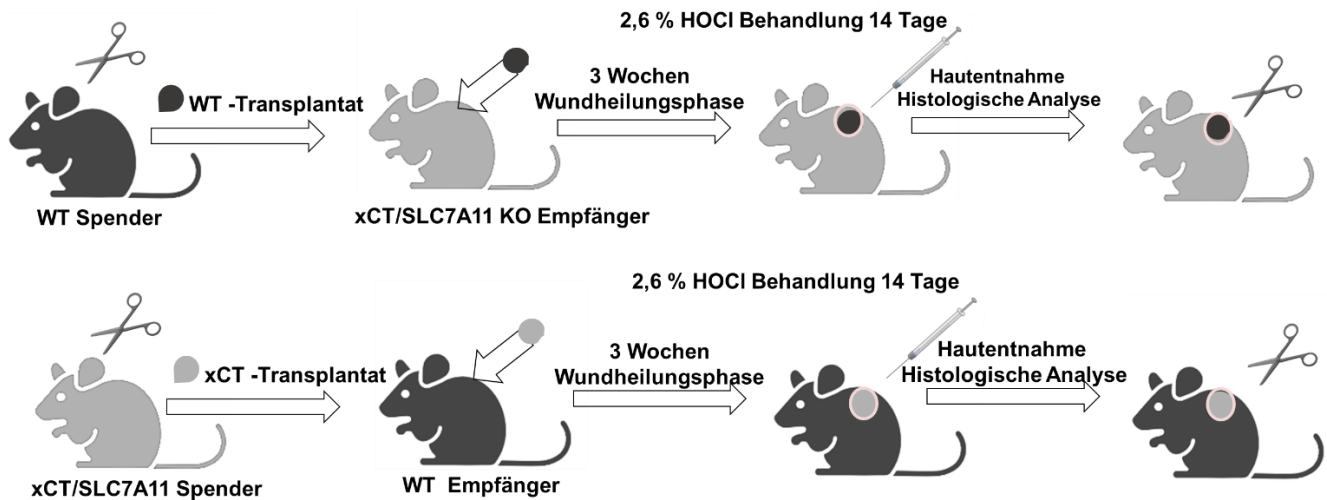


Abbildung 8: Versuchsaufbau und Transplantationsschema von Spenderohren auf Empfängermäuse mit WT und xCT KO Mäusen (mit biorender.com erstellt).

### 2.2.13 Statistik

Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 8, dabei wurden die Variablen auf Normalverteilung mithilfe des Shapiro-Wilk Tests überprüft. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen wurde eine parametrische One-way ANOVA Analyse verbunden mit einem Post Hoc Test nach Tukey durchgeführt. Bei zwei Gruppen wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (Abb. 28, 29, 32).

### **3. Ergebnisse**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Einfluss des antioxidativen Systems xCT/SLC7A11 auf die Kollagenakkumulation, zelluläre Infiltration, und Genexpression in Wildtyp und xCT KO Mäusen untersucht. Der Fokus lag auf profibrotischen und fibrotischen Prozessen und der Rolle des xCT/SLC7A11 Systems als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt in der SSc.

#### **3.1 Genexpressionsanalyse der Haut von Sklerodermie Patient/innen**

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Kliniker/innen der Hautklinik (Universitätsmedizin Mainz) wurden SSc Patient/innen und gesunde Spender/innen rekrutiert und Hautstanzen aus läsionalen Hautbereichen entnommen. Ein Teil der Stanze wurde für das Kryoimaging verwendet und das restliche Gewebe lysiert. Die CD45 positiven Zellen wurden depletiert und CD45 negative Zellen (Fibroblasten und Keratinozyten) selektiert und durchflusszytometrische und RNA sequencing (RNAseq) Analysen durchgeführt. Die Genexpressionsanalysen sind in Abbildung 9 dargestellt. Abgebildet sind die Expressionen von Genen, die an der Kollagensynthese, oxidativem Stress, dem Aufbau und der Remodellierung der extrazellulären Matrix und der Kodierung für SLC Carrier Membranproteine, beteiligt sind. Die Genexpressionen werden jeweils für gesunde Proband/innen und SSc Patient/innen in einer Heatmap gegenübergestellt. Hierbei wurde sich vor allem auf die Genexpression innerhalb der CD45 negativen Zellen fokussiert, die beispielsweise das Fibroblasten- und Epithelzellkompartiment repräsentieren.

## Ergebnisse

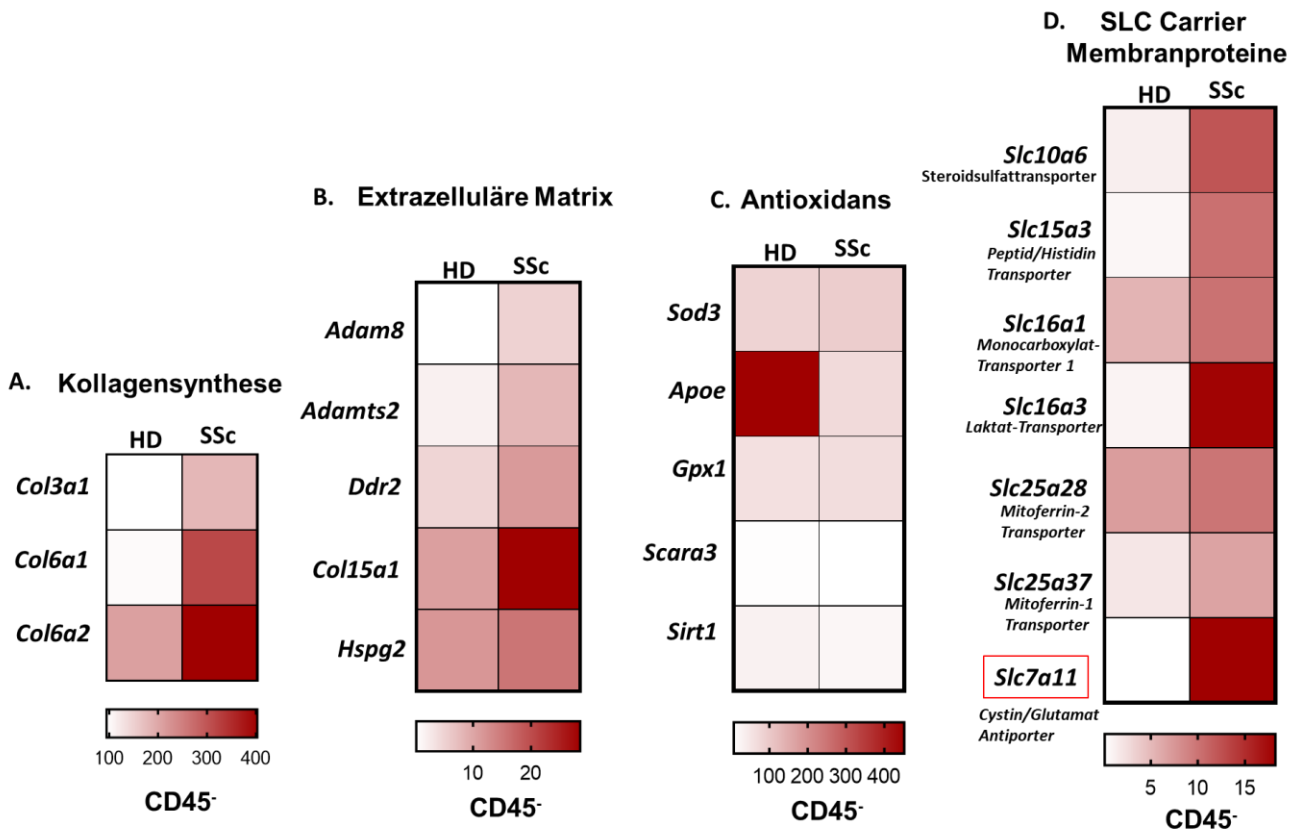


Abbildung 9: Heatmap der Genexpression von Sklerodermie Patient/innen und Proband/innen im Vergleich.

Dargestellt sind die Genexpressions-Werte der Bulk RNA Sequenzanalyse aus humaner Haut. Zelllysate wurden mithilfe von CD45 Microbeads (Miltenyi) auf einer MS Säule in CD45 positive und CD45 negative Zellen selektiert. Gezeigt sind Gene der Kollagensynthese (*col5a1*, *col6a1*, *col6a2*), extrazellulären Matrix Synthese (*adam8*, *adamts2*, *ddr2*, *col15a1*, *hspg2*), oxidativem Stress (*sod3*, *apoe*, *gpx1*, *scara3*, *sirt1*) und SLC Carrier Membranproteinen (*slc10a6*, *slc15a3*, *slc16a1*, *slc16a3*, *slc25a28*, *slc25a37*, *slc7a11*) für je drei Patient/innen und drei Proband/innen (gepoolt) im CD45 negativen Zellkompartiment. Dabei werden gesunde Personen links (HD) abgebildet und SSc Patient/innen rechts. Je intensiver die rote Farbgebung, desto höher ist die Genexpression eines bestimmten Gens.

Die Genexpressionsanalyse humaner CD45<sup>-</sup> Hautzellen zeigt eine verstärkte Genexpression an Typ III (*col3a1*) und Typ VI Kollagen (*col6a1* und *col6a2*) in der SSc- Kohorte (Abb. 9A). Des Weiteren sind Gene, die am Aufbau und der Remodellierung der extrazellulären Matrix beteiligt sind, durch Abspaltung von Prokollagenen mithilfe von Metalloproteinasen, zum Beispiel A Disintegrin And Metalloproteinase Domain-containing Protein 8 (*adam8*), A Disintegrin And Metalloproteinase With Thrombospondin Motifs 2 (*adamts2*) in SSc- Hautzellen stark exprimiert. Discoidin Domain Deceptor Tyrosine Kinase 2 (*ddr2*), verantwortlich für die Regulation der Zellmatrix Kommunikation (Faraci et al. 2003), und Heparane Sulfate Proteoglycan 2 (*hspg2*), weisen ebenfalls eine verstärkte Genexpression in SSc Patient/innen auf (Abb. 9B). Das antioxidative Gen Apolipoprotein E (*apoe*) nicht aber Sirtuin 1 (*sirt1*) zeigt in der SSc-Kohorte eine reduzierte Expression im Vergleich zur

## Ergebnisse

Kontrollkohorte (Abb. 9C), während die Gene Superoxid Dismutase 3 (*sod3*) und Glutathione Peroxidase 1 (*gpx1*) kaum Unterschiede in den Expressionen aufweisen im Vergleich zu HD. Die Expression von Transportproteinen, sogenannten solute carrier Transportern (SLC), wie z.B. Solute Carrier Family 10 Member 6 (*slc10a6*), Sodium-dependent Organic Anion Transporter und dem Solute Carrier Family 15 Member 3 (*slc15a3*), ein peptide/histidine Transporter, als auch bei Solute Carrier Family 16 Member 3 (*slc16a3*), ein Monocarboxylate Transporter 4 (*mct4*) in in Hautzellen von Sklerodermie Patient/innen erhöht. Grundlage weiterer Analysen ist die erhöhte Expression des *slc7a11* Gens. Es kodiert für die substratspezifische Region des Cystin/Glutamat Antiporters des Systems  $x_c^-$  und steht somit für einen wichtigen Regulator des oxidativen Stresses (Abb. 9D).

### 3.2 Oxidativer Stress in muriner Haut

Oxidativer Stress ist definiert durch eine Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies bei fehlender antioxidativer Kompensation. Es wurde bereits gezeigt, dass Biomarker des oxidativen Stresses in SSc Patient/innen erhöht sind (Doridot et al. 2019). Zur Untersuchung des Einflusses antioxidativer Systeme und deren Rolle in der Pathogenese der systemischen Sklerose wurde in dieser Arbeit das chemisch induzierte Fibrosemodell mit intradermaler Injektion einer Hypochlorsäure (HOCl) verwendet. Dabei wird durch die tägliche Applikation des Radikaldonors Hypochlorsäure, eine Entzündungsreaktion, die sich klinisch in einer Akkumulation von Kollagen in der Dermis äußert und zur Ausbildung einer Fibrose führt, induziert und somit Aspekte der humanen SSc in der Maus dargestellt. In den ersten 14 Tagen wird eine inflammatorische Phase ausgelöst. Es entsteht ein zelluläres Infiltrat aus aktivierten dermalen Makrophagen, monozytär abgeleiteten DCs und aktivierten CD11b<sup>+</sup> Zellen (V. K. Raker et al. 2016). Gefolgt von einer fibrotischen Phase charakterisiert durch Infiltration proliferierender Myofibroblasten (Maria et al. 2018). Mit dem chemisch induzierten Mausmodell können Aspekte wie Inflammation und Akkumulation von Kollagen untersucht werden. Daher wurden sowohl das 7 Tage Modell als auch das 28 Tage Modell angewendet.

## Ergebnisse

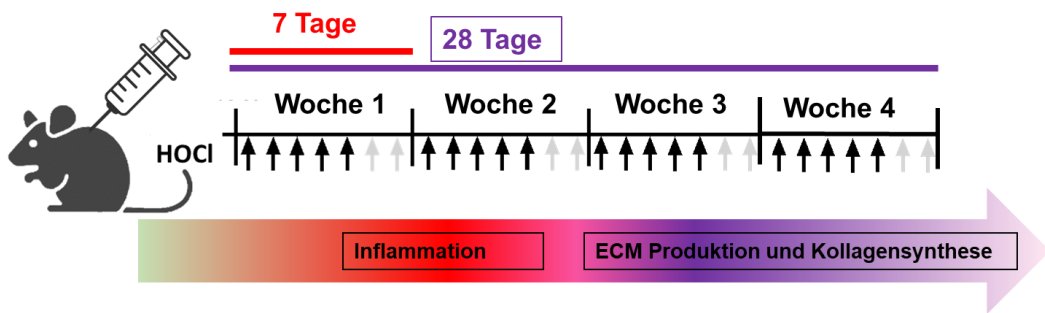


Abbildung 10: Injektionsschema des chemisch induzierten Mausmodells mit Hypochlorsäure für 7 und 28 Tage.

Schematische Darstellung des chemisch induzierten Mausmodells der Fibrose mit Hypochlorsäure (HOCl) für den Zeitraum von 7 und 28 Tagen. Repräsentative Aspekte der humanen SSc wie beispielsweise Inflammation und Fibrose können an verschiedenen Zeitpunkten des Modells untersucht werden.

### 3.1.1 Chemilumineszente Detektion von ROS Stress nach Injektion reaktiver Sauerstoffspezies *in vivo* mithilfe von L-012

Zur ROS-Detektion nach der Injektion von Hypochlorsäure in muriner Haut, wurde eine chemilumineszenz Sonde (L-012) nach einer intradermalen HOCl-Injektion intraperitoneal verabreicht und die durchschnittliche Strahlung am lebenden Tier unter Isofluran-Narkose gemessen. Die Ergebnisse sind in Form von Box Plots in Abbildung 11 dargestellt, dabei sind mit HOCl behandelte Tiere in blau dargestellt, während die PBS-Gruppe in weiß abgebildet ist.

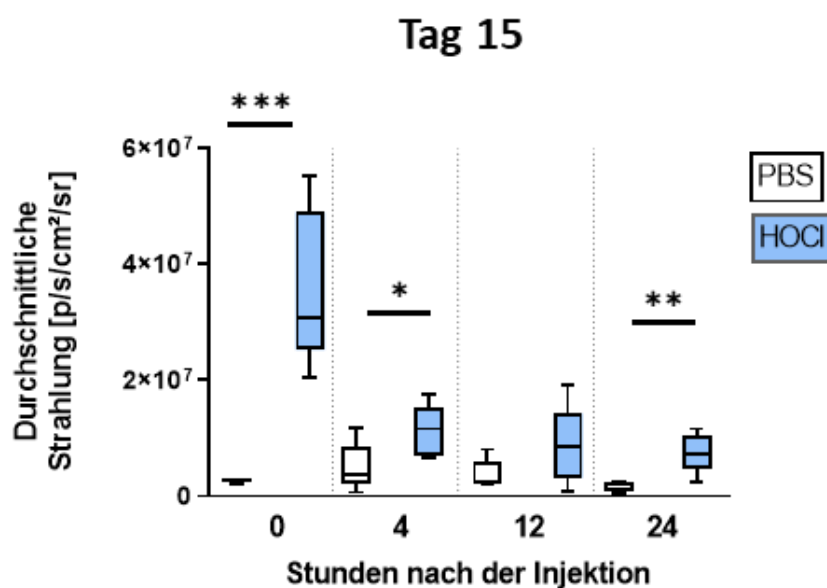


Abbildung 11: ROS-Detektion mithilfe von L-012 nach 15 Tagen *in vivo*.

## Ergebnisse

Dargestellt ist die Detektion von reaktiver Sauerstoffspezies *in vivo* mithilfe von L-012, ein chemilumineszentes Reagenz, das in Kontakt mit reaktiver Sauerstoff- oder Stickstoffspezies Licht produziert. Durchschnittliche Strahlungsintensität gemessen nach 0, 4, 12 und 24 Stunden nach 15 Tagen PBS- oder HOCl-Behandlung. Es wurden je die Mittelwerte +/-SD aus zwei Experimenten mit n=5 berechnet. (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

Wildtyp Mäuse wurden 15 Tage mit HOCl behandelt und mithilfe eines chemilumineszenten Reagenz (L-012) wurden reaktive Sauerstoffspezies in der Haut 0, 4, 12 und 24 Stunden nach der HOCl- oder PBS-Injektion im IVIS Spectrum visualisiert (Abb. 11). Durch die Applikation von Hypochlorsäure in murine Haut wurden erhöhte Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies injiziert, die in Abbildung 11 durch Strahlungsmessung deutlich gemacht werden. Der oxidative Stress ist besonders prominent direkt nach der Injektion (0 Stunden ~5 min), aber auch noch nach 24 Stunden messbar im Vergleich zur PBS-behandelten Haut. Die Injektion von HOCl erzeugt also in muriner Haut einen konstanten ROS Stress, um Auswirkungen auf Immunzellen und Hautzellen untersuchbar zu machen.

### **3.1.2 Analyse von Glutathion und Glutathiondisulfid Mengen in Abhängigkeit des Antiporters xCT/SLC7A11**

Glutathion (GSH), eine antioxidative Substanz, spielt zusammen mit dem SLC7A11/xCT eine wichtige Rolle in der Regulation von oxidativem Stress und liegt in der Zelle sowohl in der reduzierten Form L-g-glutamyl-L-cysteinylglycine (GSH), als auch der oxidierten Form Glutathiondisulfid (GSSG) vor. Im chemisch induzierten SSc Mausmodell wurden Mäuse täglich intradermal mit HOCl behandelt und nach 7 Tagen die Rückenhaut entnommen, lysiert und mithilfe eines MACS Magneten CD45<sup>+</sup> und CD45<sup>-</sup> Zellen isoliert und anschließend ein GSH/GSSG Assay durchgeführt. Dabei wurden die Zählimpulse (Photon Counting Electronics) pro Sekunde von GSH und GSSG bestimmt. Verglichen wurden die GSH/GSSG Level in Wildtyp Mäusen und xCT KO Mäusen.

## Ergebnisse

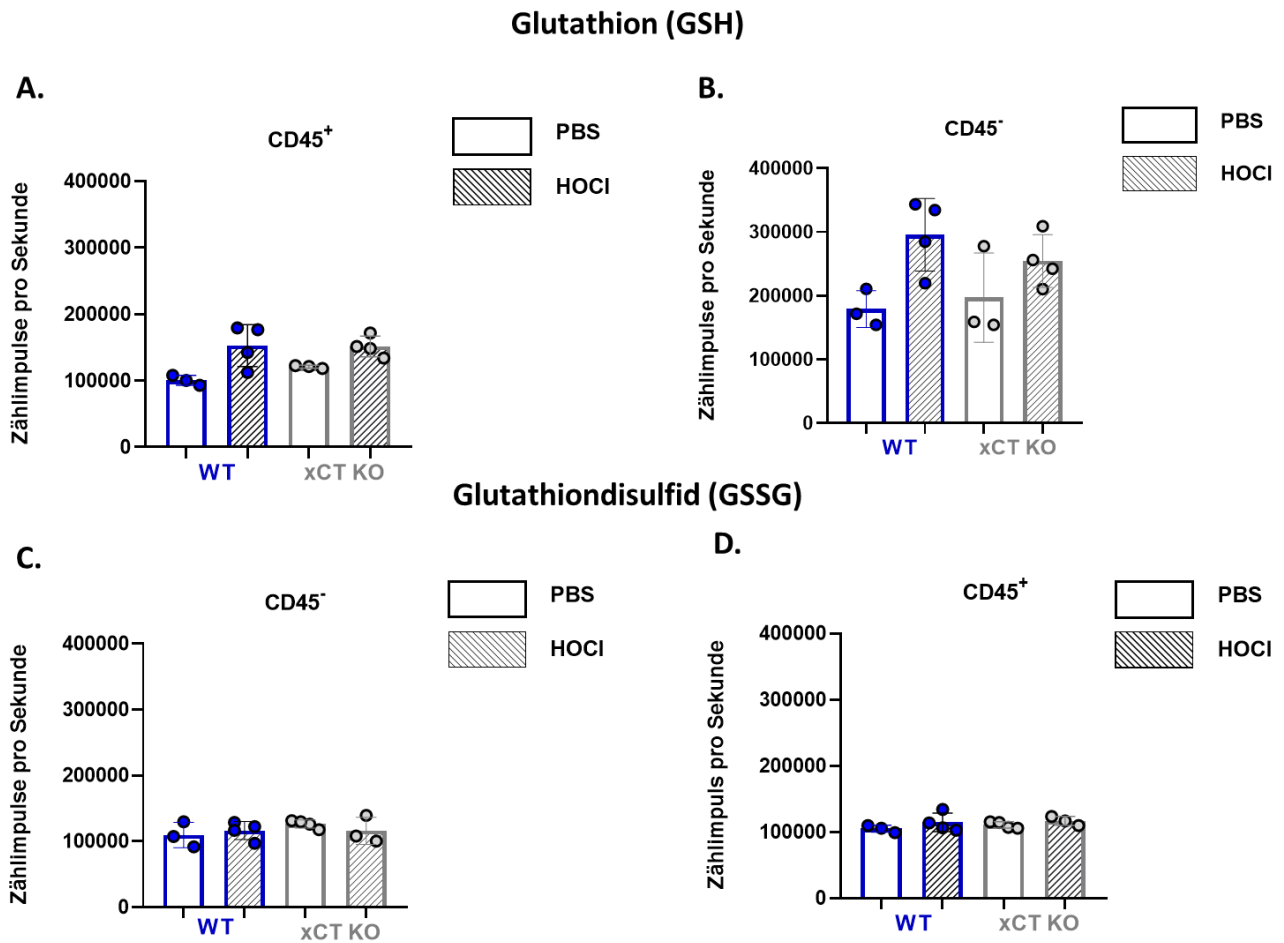


Abbildung 12: Messergebnisse des Glutathion/ Glutathiondisulfid Assays in CD45<sup>+</sup> und CD45<sup>-</sup> Zellen von WT und xCT KO Mäusen. Die Daten erreichten keine statistische Signifikanz.

Gezeigt sind die Messergebnisse als Zählimpulse pro Sekunde von Glutathion (GSH) und der oxidierten Form Glutathiondisulfid (GSSG) in CD45<sup>+</sup> und CD45<sup>-</sup> Zellen von mit PBS- oder HOCl-behandelten WT und xCT KO Mäusen. (A-B) Ergebnisse für die Glutathionmessung aus muriner Haut für CD45<sup>-</sup> (A) und CD45<sup>+</sup> (B). (C-D) Zählimpulse pro Sekunde für die oxidierte Form (GSSG) in CD45<sup>+</sup> und CD45<sup>-</sup> Zellen.

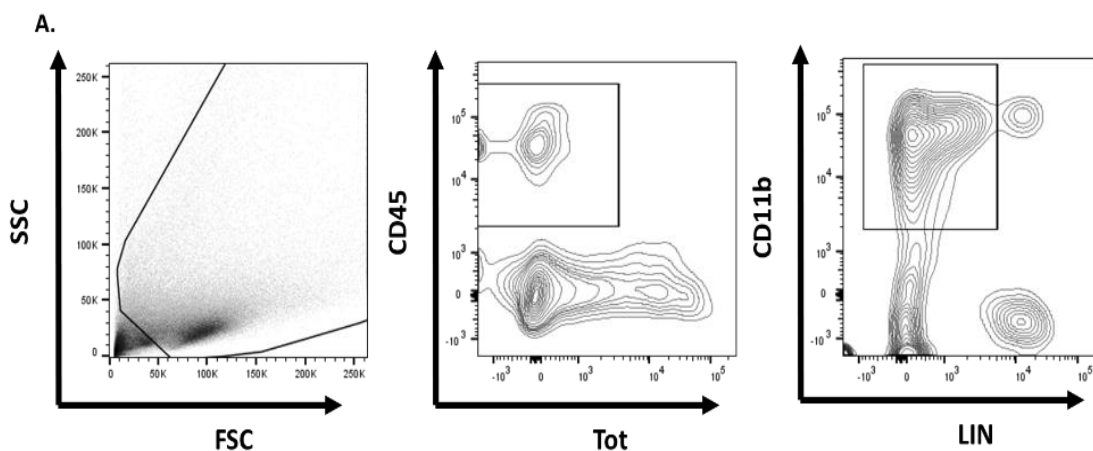
Es ist ein deutlicher Anstieg an GSH in der HOCl-Gruppe der CD45<sup>-</sup> Zellen erkennbar. In den CD45<sup>+</sup> Zellen war ein minimaler Anstieg an GSH in der HOCl-Gruppe messbar, der Anstieg ist sowohl bei den CD45 negativen als auch bei den CD45 positiven Zellen nicht signifikant (Abb. 12A/B). Die Messergebnisse für die oxidierte Form GSSG lassen kaum Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe (PBS) und den HOCl-behandelten Versuchstieren erkennen (siehe Abb. 12C/D). Es zeigt sich eine Tendenz zu einer reduzierten GSH Produktion aufgrund von ROS Stress in den xCT KO Mäusen bei gleichbleibendem GSSG Level, im Vergleich zum Wildtyp.

### 3.3 Analyse profibrotischer und fibrotischer Parameter in xCT KO Mäusen

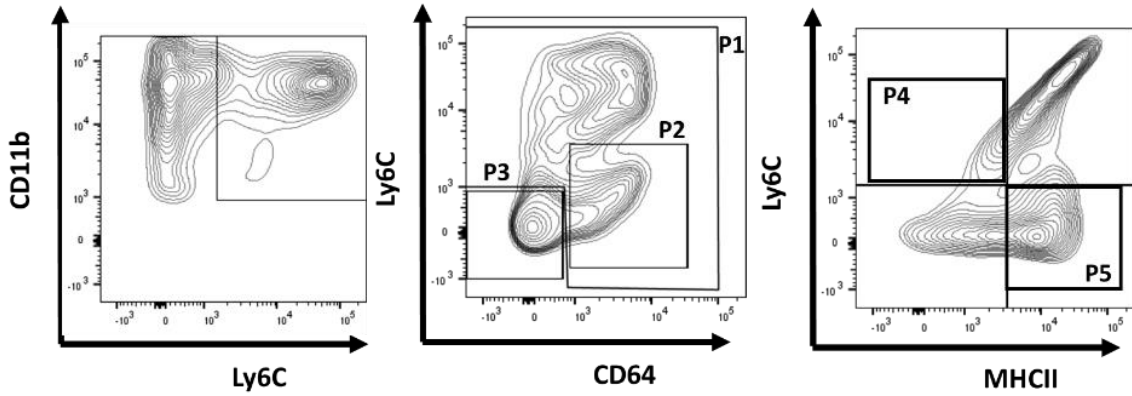
Die Systemische Sklerose ist durch drei pathophysiologische Charakteristika gekennzeichnet. Vaskulopathie, Inflammation und die progrediente Synthese und Ablagerung von Kollagenen. Mit dem chemisch induzierten Mausmodell können zwei dieser Aspekte in der Maus wiedergespiegelt werden: Inflammation und Fibrose. Im nachfolgenden sind die Ergebnisse zur Untersuchung der Inflammation und Fibrose im chemisch induzierten Mausmodell mit HOCl in xCT KO und Wildtyp Mäusen dargestellt.

#### 3.3.1 Analyse des kutanen zellulären Infiltrats der Haut

Um den Einfluss des xCT/SLCA11 Antiporters auf das Immunzellinfiltrat zu untersuchen wurden Wildtyp und xCT KO Mäuse sowohl 7 als auch 28 Tage mit HOCl behandelt, die Haut lysiert und anschließend durchflusszytometrisch auf verschiedene Immunzellmarker untersucht. Tag 7 spiegelt hier die entzündliche und Tag 28 die fibrotische Krankheitsphase wider. Zunächst wurde im SSC/FSC Debris ausgeschlossen und auf lebende CD45<sup>+</sup> Zellen gated. Anschließend wurden die CD19, NKp46 und TCRbeta (LIN) negativen Zellen ausgeschlossen und auf CD11b positive Zellen (myeloide Zellen) gated. Des Weiteren sind innerhalb der CD11b positiven Population die dermalen dendritischen Zellen (Ly6C<sup>low</sup> CD64<sup>low</sup>), die nicht dendritischen Zellen (Ly6C<sup>high</sup> CD64<sup>low-high</sup>), die Makrophagen (Ly6C<sup>low</sup> CD64<sup>high</sup>) dargestellt. Außerdem wurden die Zellen mithilfe von Ly6C und MHCII in inflammatorische und patrollierende Monozyten unterteilt (nicht gezeigt).



# Ergebnisse



P1: Nicht dendritische Zellen (nonDCs), P2: Makrophagen, P3: dermale DCs, P4: inflammatorische Monozyten, P5: patrollierende Monozyten.

## Tag 7

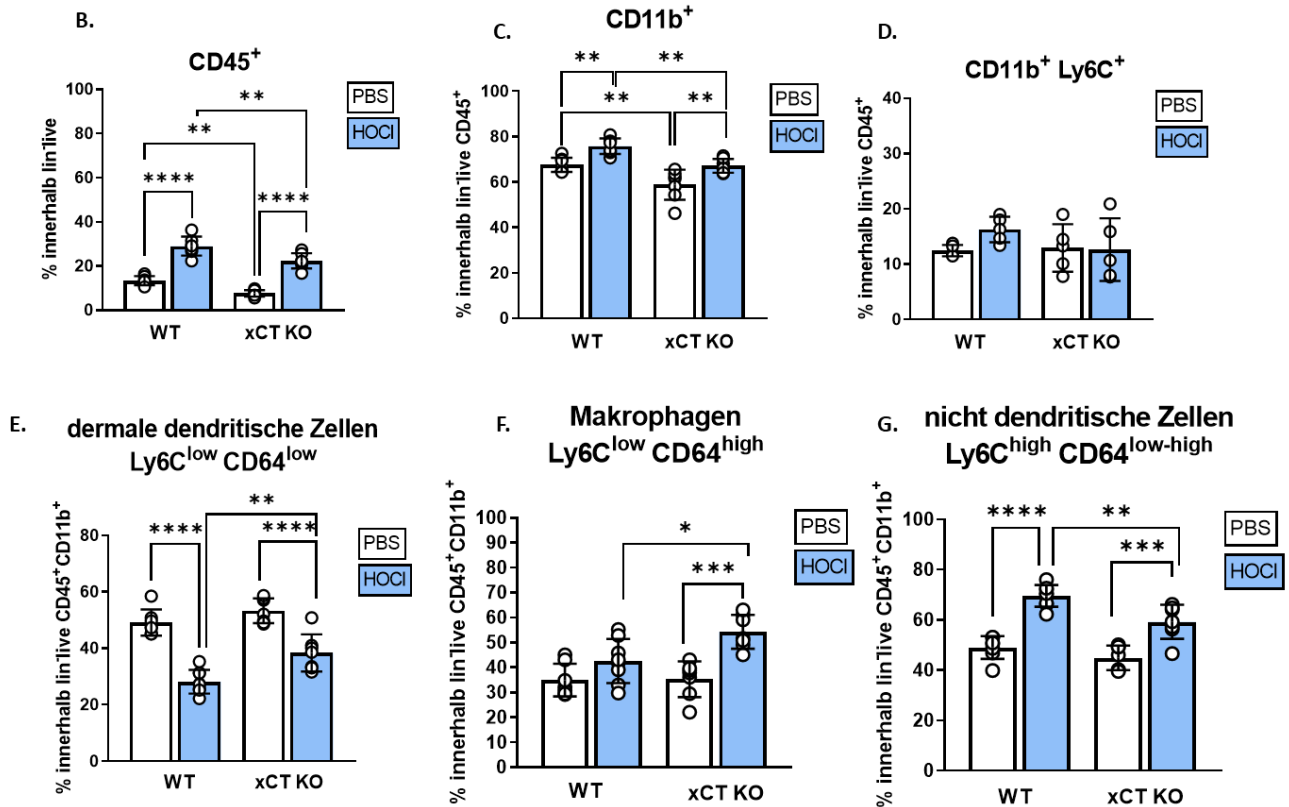


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse des dermalen Infiltrats nach 7 Tagen.

(A) Gating Strategie.

(B-G) Gezeigt ist die Frequenz in % von CD45, CD11b positiven Zellen innerhalb der lebend LIN negativen Zellen sowie myeloiden Populationen innerhalb der viablen CD45+Lin-CD11b+ Zellen. Dargestellt sind die Mittelwert +/-SD aus einem Experiment mit n=4-6. (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 und \*\*\*\* p<0.0001).

## Ergebnisse

Nach jeweils 7 und 28 Tagen HOCl-/ PBS-Behandlung wurden Wildtyp und xCT KO Mäusen Hautstanzen am Rücken entnommen, enzymatisch verdaut und durchflusszytometrisch untersucht. Aus der Analyse wurden Debris, tote Zellen und T-, B-, und NK-Zellen ausgeschlossen und mithilfe eines allgemeinen Immunzellmarker (CD45) alle Immunzellen eingeschlossen. Gezeigt ist die Frequenz (%) von CD45 und CD11b positiven Zellen innerhalb der lebend LIN negativen Zellen. Anhand der Frequenz der CD45 positiven Zellen lässt sich an Tag 7 (inflammatorische Phase) erkennen, dass die Frequenz der Immunzellen in der Haut von HOCl-behandelten Wildtyptieren signifikant erhöht ist (Abb. 13B). Auch in xCT KO Haut konnte HOCl eine Infiltration der CD45<sup>+</sup> Zellen hervorrufen, jedoch war diese signifikant geringer als in der Haut der WT Tiere. Ähnliche Effekte lassen sich auch in den Frequenzen der myeloiden CD11b<sup>+</sup> Zellen erkennen (Abb. 13C). In beiden Stämmen sieht man einen deutlichen Influx an CD11b positiven Zellen nach der HOCl-Behandlung, dieser ist signifikant reduziert in der xCT KO Haut.

Die HOCl-Behandlung zeigte lediglich in xCT KO Tieren eine Erhöhung der CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> Zellen, die jedoch nicht signifikant ist, während in beiden Stämmen durch die PBS-Behandlung minimale Unterschiede der CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> Zellen im Vergleich erkennbar sind (siehe Abb. 13D).

Durch die HOCl-Behandlung könnte eine Reduktion des Infiltrats von Ly6C<sup>low</sup> CD64<sup>high</sup> Zellen (Makrophagen) in xCT KO und Wildtyptieren hervorgerufen werden. Im Vergleich der HOCl-Gruppen zeigt sich eine signifikante Reduktion der Ly6C<sup>low</sup> CD64<sup>high</sup> Zellen in xCT kompetenter Haut (siehe Abb. 13F). In den xCT KO Mäusen als auch in den Wildtyp Mäusen ist ein signifikanter Anstieg von Ly6C<sup>high</sup> CD64<sup>low-high</sup> Zellen (myeloiden nicht dendritischen Zellen) nach 7 Tagen HOCl-Applikation erkennbar (siehe Abb. 13G). Im Vergleich zu xCT kompetenter Haut ist die Frequenz der Ly6C<sup>high</sup> CD64<sup>low-high</sup> Zellen in xCT inkompetenter Haut signifikant reduziert.

## Ergebnisse

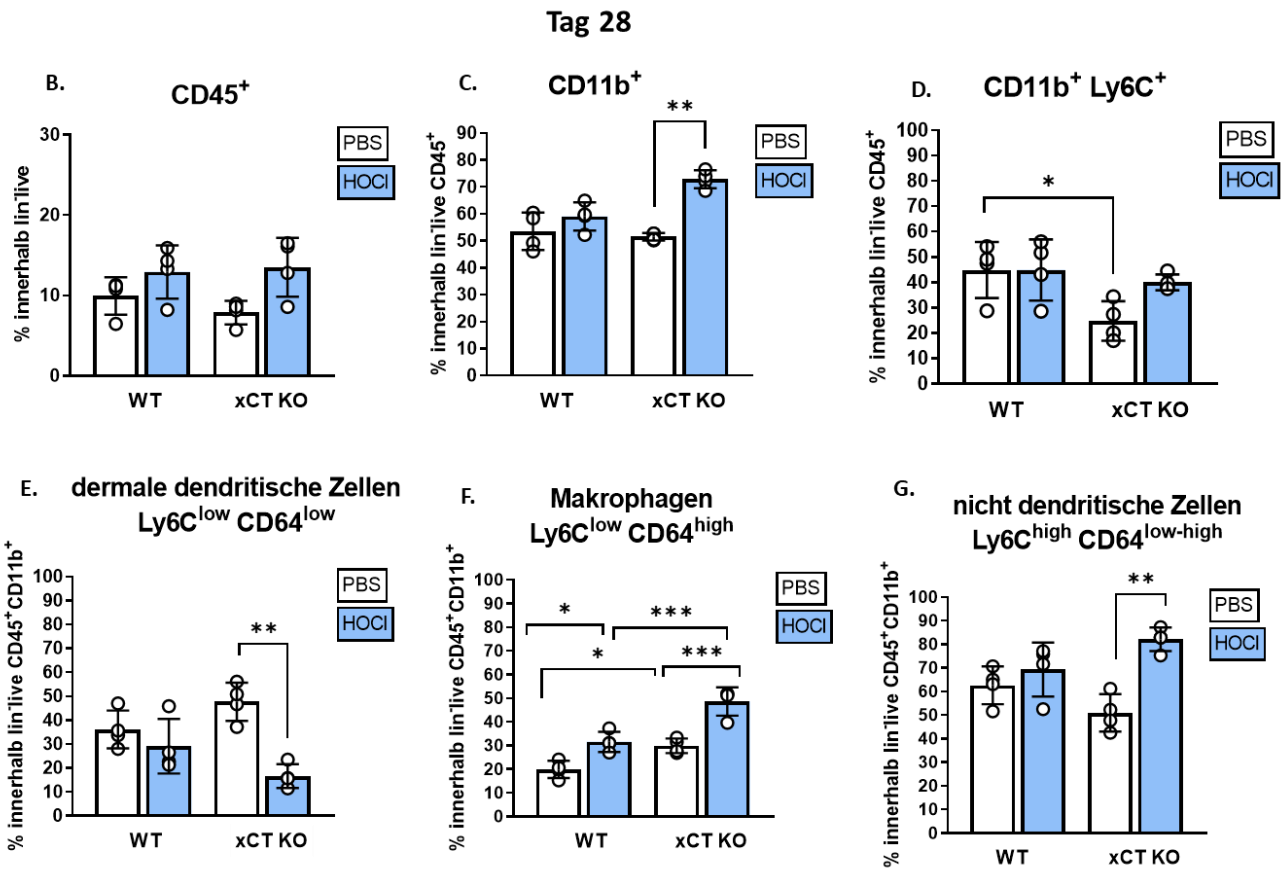


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse des dermalen Infiltrats nach 28 Tagen.

(A) siehe Abb. 13 A

(B-G) Gezeigt ist die Frequenz (%) von CD45, CD11b positiven Zellen innerhalb der lebend LIN negativen Zellen. Des Weiteren sind innerhalb der CD11b positiven Population die dermalen dendritischen Zellen (Ly6C<sup>low</sup> CD64<sup>low</sup>), die nicht dendritischen Zellen (Ly6C<sup>high</sup> CD64<sup>low-high</sup>) und die Makrophagen (Ly6C<sup>low</sup> CD64<sup>high</sup>), gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/-SD aus einem Experiment mit n=3-4. (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

Im chemisch induzierten Mausmodell nach 28 Tagen (fibrotische Phase) ist die Entzündungsreaktion abgeflacht. Der Unterschied in der Menge der CD45<sup>+</sup> Zellen bei xCT KO PBS Mäusen im Vergleich zum Wildtyp ist nicht mehr signifikant (siehe Abb. 14B). HOCl-behandelte xCT KO Haut zeigt signifikant erhöhte CD11b<sup>+</sup> Zellen (Abb. 14C).

In xCT KO Haut sind signifikant weniger dendritische Zellen zu finden (Abb. 14E). Die Frequenz der Makrophagen ist auch an Tag 28, unabhängig vom Genotyp der Tiere, unter HOCl tendenziell erhöht (Abb. 14F).

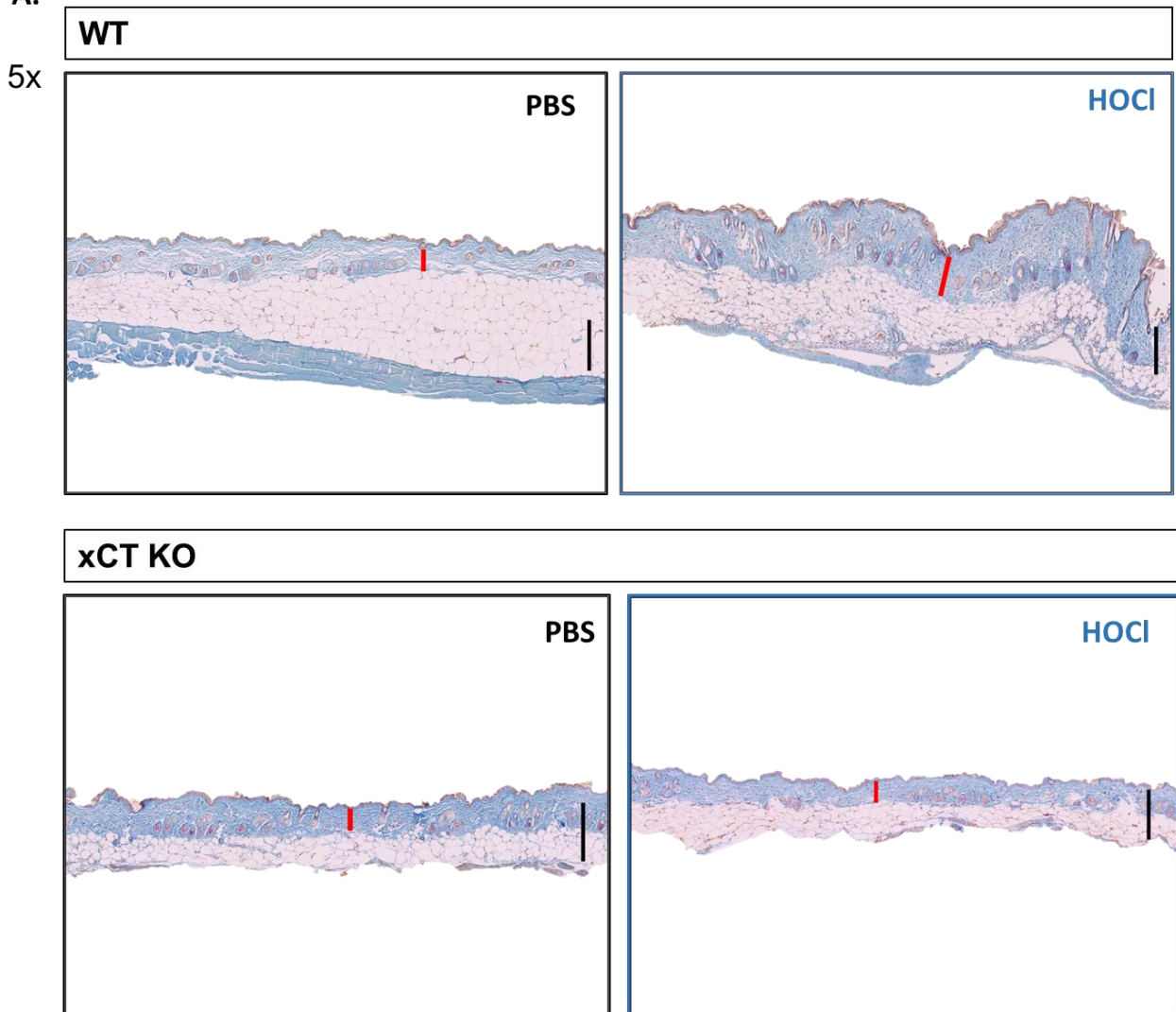
## Ergebnisse

### 3.3.2 Histologische Bestimmung des Kollagengehalts in der Haut

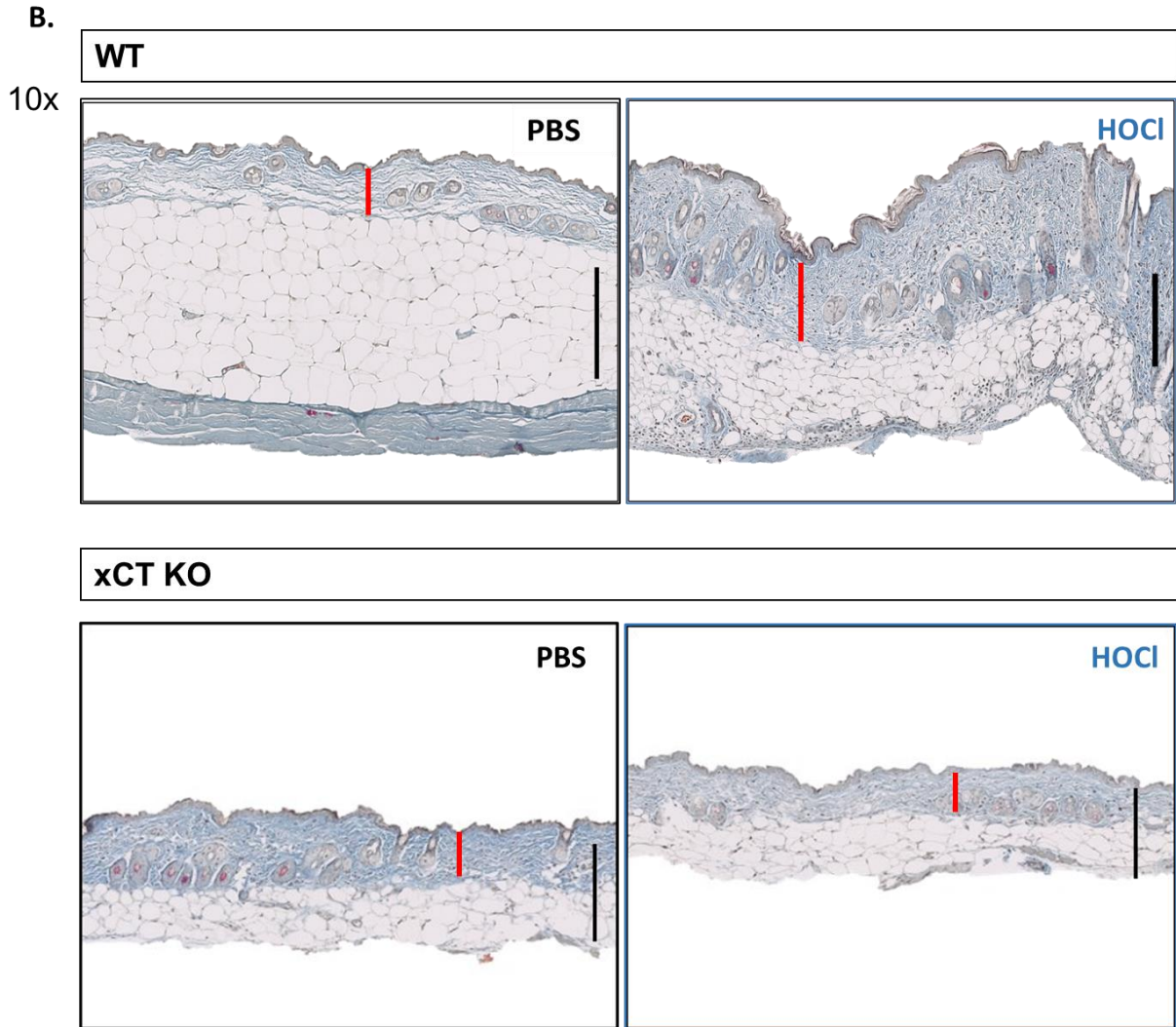
Fibrotisches Gewebe kann mithilfe der Masson-Goldner-Trichrom (GT) Färbung durch Anfärben von Kollagenen (blau) analysiert werden. Die Muskelfasern und Gefäße sind bei dieser Färbemethode pink angefärbt.

Die Akkumulation von Kollagenen und somit die Dicke der Dermis nimmt bei Wildtyp Mäusen aufgrund der HOCl-Behandlung signifikant zu (Abb. 15A/B) und ist signifikant größer im Vergleich zu mit HOCl-behandelten xCT KO Mäusen (Abb. 15C). Im Knockout Stamm ist ein leichter Anstieg in der HOCl-Gruppe zu erkennen, dieser ist aber im Vergleich zur PBS-Gruppe nicht signifikant (Abb. 15C). xCT KO Tiere weisen eine geringere Dermisdicke in der HOCl-Gruppe im Vergleich zu Wildtyp Tieren auf, dies spricht für eine geringere Kollagenakkumulation in xCT KO Haut nach HOCl-Behandlung.

A.



Ergebnisse



**C.**

**Tag 28**

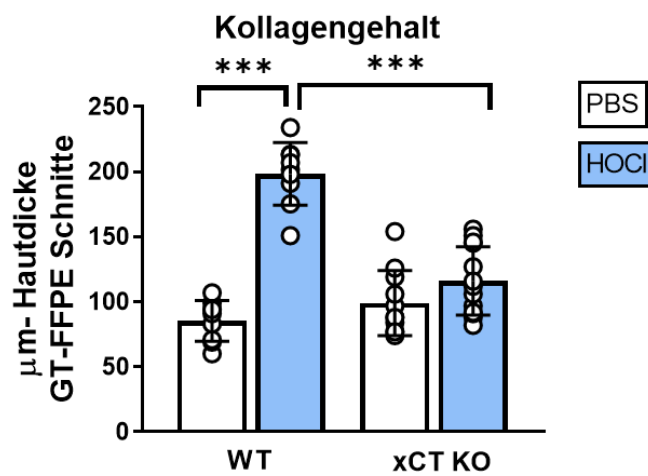


Abbildung 15: Bestimmung der Hautdicke in Wildtyp) und xCT KO Mäusen nach 28 Tagen PBS-/HOCl-Behandlung.

## Ergebnisse

(A) FFPE Hautstanzen wurden mittels Masson-Goldner-Trichrom Färbung analysiert. Dargestellt sind 5x Okularvergrößerungen eines repräsentativen Ausschnitts der Schnitte und die Dicke der Dermis (roter Strich) wurde ausgemessen. Die Kalibrierungsbalken zeigen einen Abstand von 200  $\mu\text{m}$ . (B) Dargestellt sind 10x Okularvergrößerungen eines repräsentativen Ausschnitts der Schnitte. (C) Grafische Auswertung der histologischen Hautdicke innerhalb der Dermis. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$ SD aus zwei Experimenten mit  $n=5-8$ . (\*\* $p < 0.001$ ). GT=Goldner trichrome, FFPE=Formalin-Fixed Paraffin Embedded.

### 3.3.3 Myofibroblastenaktivierung in der Haut

Im Laufe der Pathogenese der Systemischen Sklerose werden unter anderem durch die Extravasation von Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten aus dem Blut in die Haut bestimmte Mediatoren freigesetzt. Diese haben Einfluss auf die Fibroblastenentwicklung, sodass zunächst Myofibroblasten aktiviert werden. Myofibroblasten exprimieren  $\alpha$ -SMA (Alpha Smooth- Muscle- Actin), sodass über die Färbung von Hautschnitten mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -SMA, eine Aussage über die Zahl der  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>-Zellen und somit die Myofibroblastenaktivierung getroffen werden kann. Nach Entnahme der Hautproben, wurden diese immunhistologisch analysiert und anschließend die Zahl der  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>-Zellen im Schnitt bestimmt. Die immunhistochemische Färbung ist in Abbildung 16A dargestellt und die Anzahl der  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>-Zellen in Abbildung 16B.

Ergebnisse

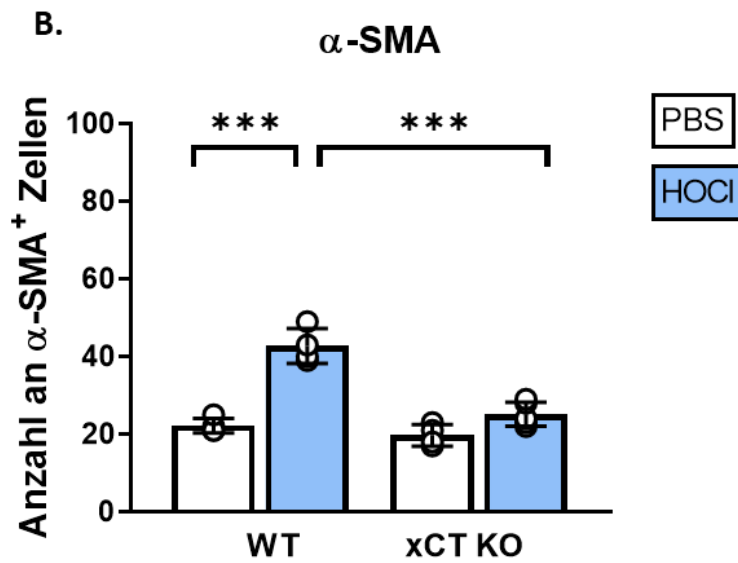
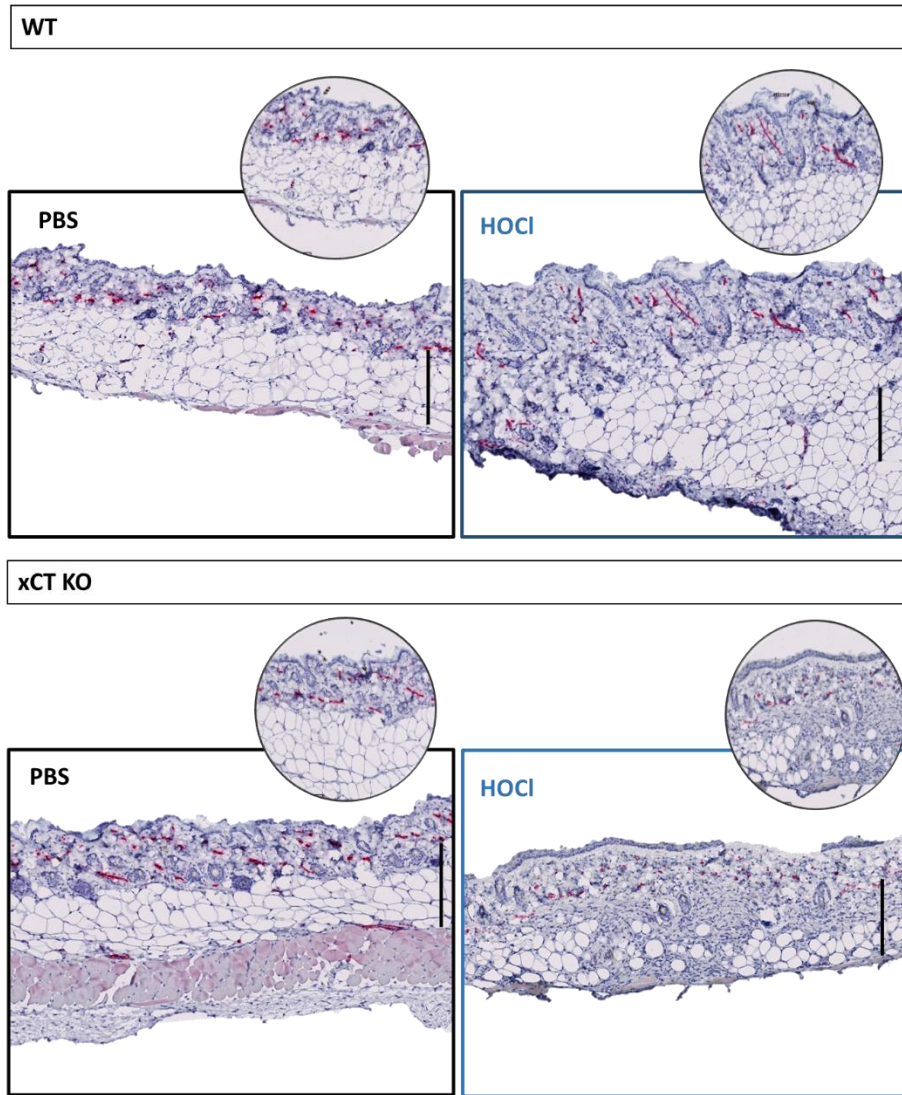


Abbildung 16: Immunhistochemische Analyse der Haut zur Bestimmung von  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> -Zellen im chemisch induzierten Mausmodell nach 28 Tagen.

## Ergebnisse

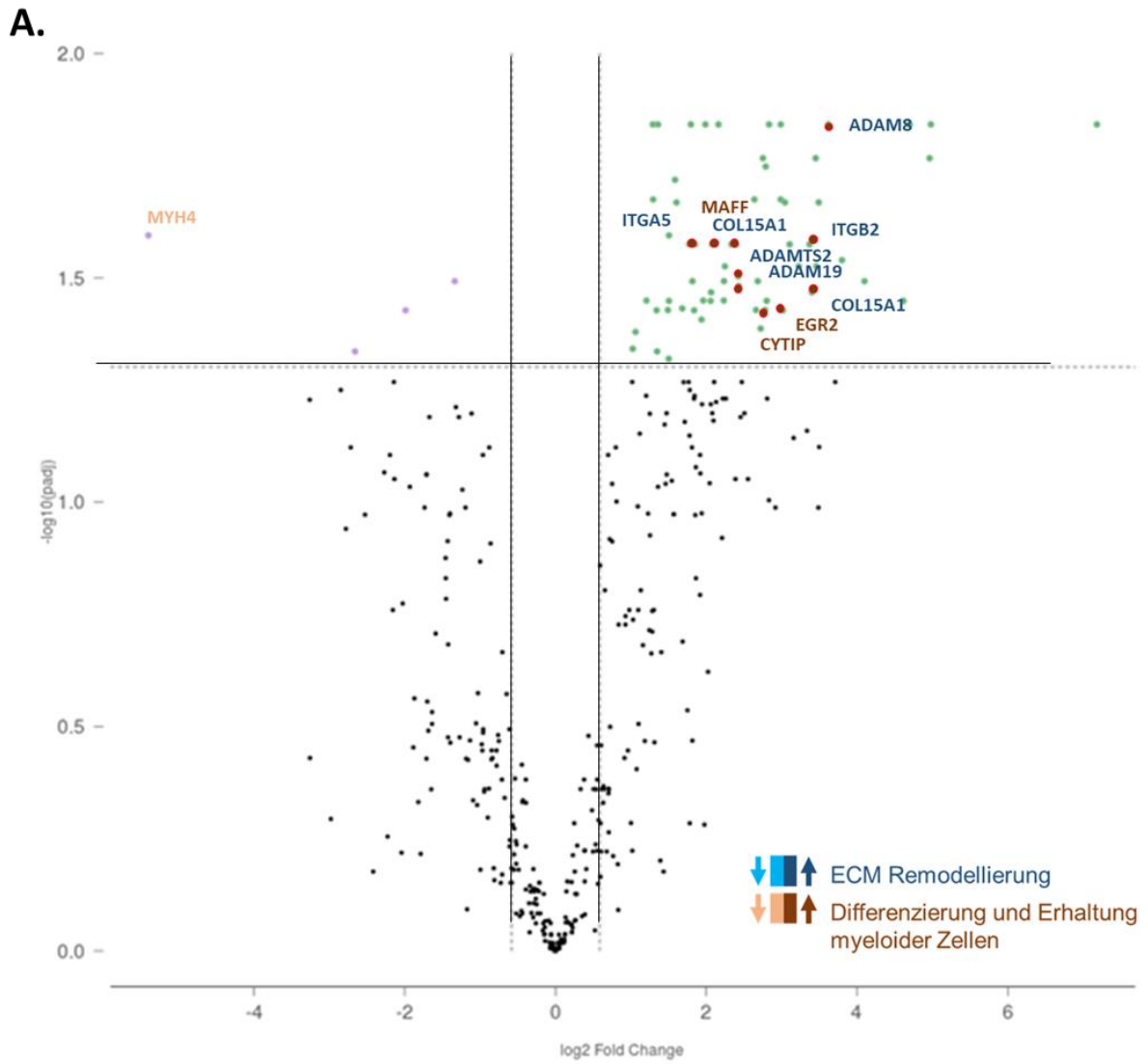
(A) Hautstanzen wurden in Formalin fixiert und Paraffin eingebettet und anschließend immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -SMA und mit Eosin gefärbt. Dargestellt ist jeweils eine 5x Okularvergrößerung und eine in einem Kreis dargestellte 10x Vergrößerung der gefärbten Hautschnitte. Die Kalibrierungsbalken zeigen einen Abstand von 200  $\mu$ m. (B) Grafische Auswertung der Anzahl an  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> innerhalb der Dermis. Dargestellt sind die Mittelwerte +/-SD aus einem Experiment mit n=3-4. (\*\*p<0.001).

Im Vergleich zu PBS Tieren weisen mit HOCl-behandelte Tiere im WT vermehrte rote Färbungen in der Dermis auf (Abb. 16A). Die Auszählung der  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>-Zellen zeigt eine signifikant erhöhte Zahl im Bereich von 40-50  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> -Zellen in der WT HOCl-Gruppe (Abb. 16A), während kein signifikanter Unterschied zwischen PBS- und HOCl-Gruppe im xCT KO Stamm erkennbar ist. Die Anzahl der  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>-Zellen in der WT HOCl-Gruppe ist signifikant höher im Vergleich zur xCT KO HOCl-Gruppe (Abb. 16B).

### 33.4 Nanostring Genexpressionsanalyse in muriner Haut

Zur weiteren Analyse profibrotischer und fibrotischer Prozesse sowie myeloider Genprofile wurde mithilfe des nCounter „Myeloid Innate Immunity“ und des „Fibrosis xT“ Panels von NanoString Wildtyp und xCT KO Haut auf die Genexpression von 754 myeloiden und 760 fibrotischen Genen untersucht. Die Daten wurden mithilfe des ROSALIND® Programms ausgewertet und die Genexpressionen mithilfe von Heatmaps und Volcano Plots dargestellt. Das Panel „nCounter Myeloid Innate Immunity“ enthielt 20 Referenzgene: *abcf1*, *alas1*, *edc3*, *eef1g*, *EIF2B4*, *g6pdc*, *gusb*, *hdac3*, *hprt*, *nubp1*, *oaz1*, *polr1b*, *polr2a*, *pbia*, *rpl19*, *sap10*, *sgha*, *sf3a3*, *tbp*, *tubb5*. Das „Fibrosis xT Panel“ enthielt 10 Referenzgene: *acad9*, *armh3*, *cnot10*, *gusb*, *mtmr14*, *nol7*, *nubp1*, *pgk1*, *ppia*, *rplp0*.

### 3.3.4.1 Vergleich der Genexpression myeloider Gene in WT Mäusen nach PBS-/HOCl-Behandlung



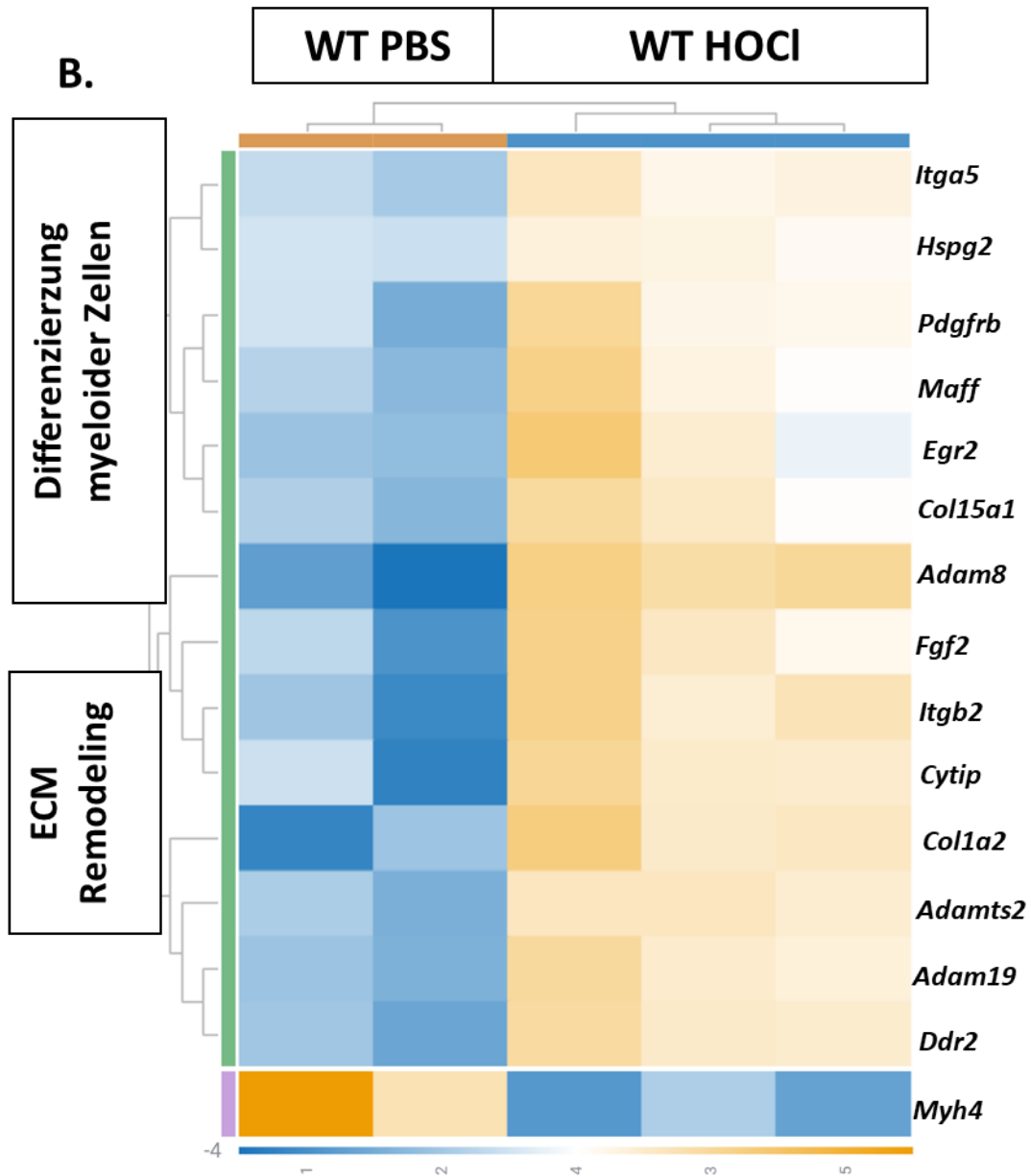


Abbildung 17: Genexpressionsanalyse myeloider Gene gezeigt als Volcano Plot und Heatmap für Wildtyp Tiere nach PBS-/HOCl-Behandlung.

(A) Gezeigt ist die Genexpressionsanalyse aller Gene des myeloiden Panels im Volcano Plot  $-\log_{10}$  (p-Wert) und  $\log_2$  (Fold Change). Im Volcano Plot gezeigt sind insgesamt 68 Gene im oberen Diagrammbereich mit einem korrigierten p-Wert von  $p < 0.05$  mit einem Fold Change von  $\geq 1.5$  bzw.  $\leq -1.5$ . Farblich markiert sind die Gene, die an der Synthese der extrazellulären Matrix und der Differenzierung und Erhaltung myeloider Zellen beteiligt sind. (B) In einer Heatmap gezeigt sind die am statistisch höchsten signifikanten Gene im Bereich der ECM Remodellierung und der Differenzierung myeloider Zellen mit einem korrigierten p-Wert von  $p < 0.05$  und einem absoluten Fold Change von 1,5 oder größer.

In Abbildung 17 wird das Expressionsniveau verschiedener myeloider Gene des „nCounter Myeloid Innate Immunity Panel“ der PBS- und HOCl-Gruppe in Wildtyp Tieren gezeigt. Statistisch signifikant überexprimierte Gene im Vergleich zu den Haushaltsgenen sind im

## Ergebnisse

oberen Bereich des Diagramms über der Horizontallinie angeordnet, die die p-Wert-Schwelle nach der Benjamini-Hochberg Methode (FDR) darstellt. Gene mit reduzierter Genexpression sind im oberen linken Bereich und im oberen rechten Bereich Gene mit verstärkter Genexpression angeordnet. Davon sind 4 Gene stark reduziert in ihrer Expression und 64 Gene überexprimiert.

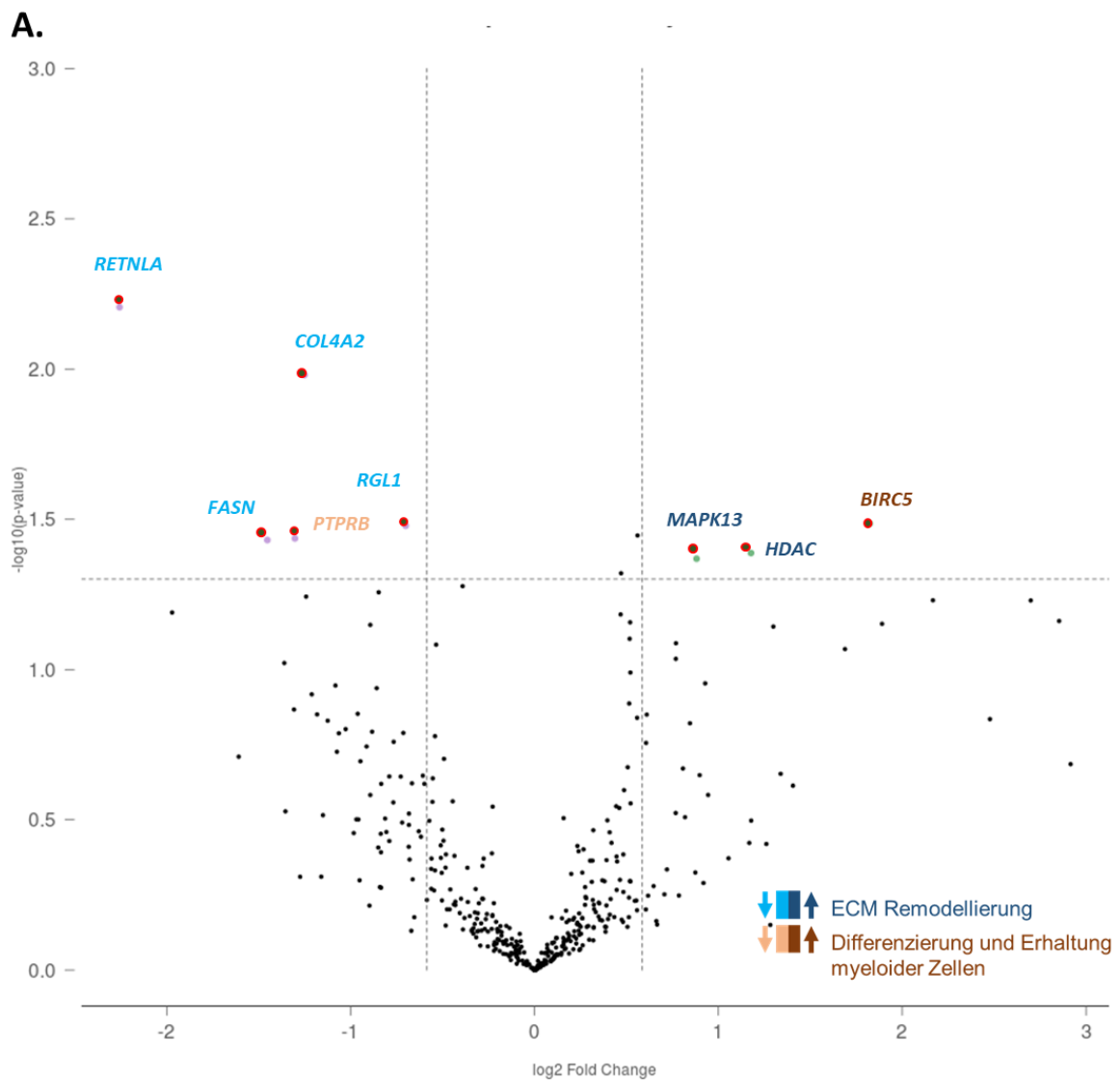
Eine signifikante Erhöhung ist bei einer Vielzahl von Genen erkennbar, die an der Synthese und Remodellierung der extrazellulären Matrix beteiligt sind, z.B. starke Expressionen bei: Collagen Type I Alpha 2 Chain (*col1a2*), A Disintegrin and Metalloproteinase Domain 8 (*adam8*), Integrin Beta Chain-2 (*itgb2*) und Fibroblast Growth Factor 2 (*fgf2*) (Abb. 17A blaue Markierungen).

Differentielle Expressionen haben sich bei deutlich weniger Genen, die an der Differenzierung und Erhaltung myeloider Zellen beteiligt sind, gezeigt. Die Gene Early Growth Response 2 (*egr2*), Cytohesin-interacting Protein (*cytip*), V-maf Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Family Protein F Avian (*maff*) waren hochreguliert, während Myosin Heavy Polypeptide 4 Skeletal Muscle (*myh4*) runterreguliert war (braun markiert in Abb. 17A).

Die Einteilung von Genclustern nach den Herstellerangaben von ROSALIND® zeigte, dass die meisten stark exprimierten Gene in Prozessen wie ECM Remodellierung, Lymphozytenaktivierung z.B. Protein Tyrosine Kinase Binding Protein (*tyro*), Colony Stimulating Factor 2 Receptor (*csf2ra*), Janus Kinase 3 (*jak3*) und Zytokin Signaltransduktion, Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 1b (*tnfrsf1b*), Fibroblast Growth Factor 2 (*fgf2*), Nucleotide-binding Oligomerization Domain Containing 1 (*nod1*) beteiligt sind (nicht abgebildet). Durch die HOCl-Behandlung zeigt sich in Wildtyp Tieren eine starke Expression vor allem in Genen, die an der Synthese und Akkumulation von Kollagen und der ECM Remodellierung beteiligt sind. Zudem wird dies auch einigen Genen deutlich, die für die Differenzierung und Erhaltung myeloider Zellen verantwortlich sind.

### 3.3.4.2 Vergleich der Genexpression myeloider Gene im xCT KO Stamm nach PBS-/HOCl-Behandlung

Ebenfalls durchgeführt wurde eine Genexpressionsanalyse in xCT KO Tieren und diese anschließend mit dem Expressionsprofil des Wildtyps verglichen. In Abbildung 18 sind zunächst die Ergebnisse für den xCT KO Stamm dargestellt.



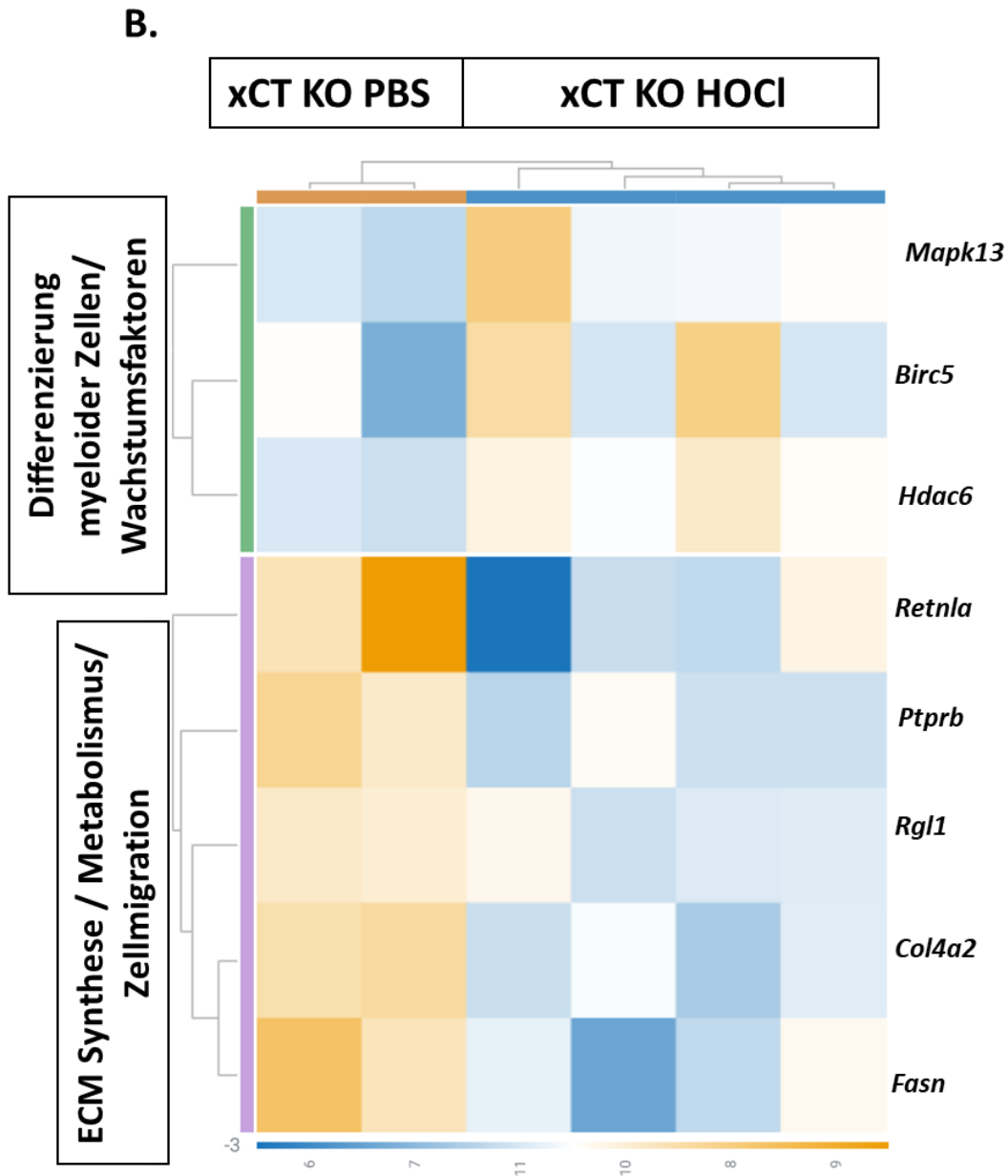


Abbildung 18: Genexpressionsanalyse myeloider Gene gezeigt als Volcano Plot und Heatmap für xCT KO Tiere nach PBS- / HOCl-Behandlung.

(A) Gezeigt ist die Genexpressionsanalyse aller Gene des myeloiden Panels im Volcano Plot  $-\log_{10}$  (p-Wert) und  $\log_2$  (Fold Change). Im Volcano Plot gezeigt sind insgesamt 8 Gene im oberen Diagrammbereich mit einem korrigierten p-Wert von  $p < 0.05$  mit einem Fold Change von  $\geq 1.5$  bzw.  $\leq -1.5$ . Farblich markiert sind die Gene, die an der Synthese der extrazellulären Matrix und der Differenzierung und Erhaltung myeloider Zellen beteiligt sind. (B) In einer Heatmap gezeigt sind die am statistisch höchsten signifikanten Gene im Bereich der ECM Remodellierung und der Differenzierung myeloider Zellen mit einem korrigierten p-Wert von  $p < 0.05$  und einem absoluten Fold Change von  $\geq 1.5$  bzw.  $\leq -1.5$  oder größer.

Lediglich 5 Gene sind stark reduziert in ihrer Expression und 3 Gene verstärkt exprimiert, während im Wildtyp 4 Gene stark reduziert und 64 Gene überexprimiert sind (Abb. 17). Auffällig ist somit eine allgemeine geringere Differenzierung von Genen im xCT KO Stamm

## Ergebnisse

im Vergleich zum Wildtyp. Lediglich 8 Gene zeigten eine differentielle Genexpression mit einem korrigierten p-Wert von  $p < 0.05$  mit einem Fold Change von  $\geq 1.5$  bzw.  $\leq -1.5$  (Abb. 18A). Von diesen Genen ist lediglich Collagen, Type IV, Alpha 2 (*col4a2*) stark reduziert in der Expression. Unter den stark exprimierten Genen sind neben Baculoviral IAP Repeat-Containing 5 (*birc5*) auch noch Mitogen-Activated Protein Kinase 13 (*mapk13*) und Histone Deacetylase 6 (*hdac6*).

Im Vergleich zum Wildtyp sind nicht nur in Bezug auf die ECM Remodellierung, sondern auch der Differenzierung und Erhaltung myeloider Zellen weniger Gene differentiell exprimiert (Abb. 18A/B).

Im Bereich der Wachstumsfaktor-Signalisierung zeigten sich die meisten differentiellen Genexpressionen (*hdac6* und *mapk13*) stark exprimiert und Collagen, Type IV, Alpha 2 (*col4a2*) und Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator -like 1 (*rgl1*), geringer exprimiert. In Abbildung 19 sind die Genexpressionen für die mit HOCl-behandelten Wildtyp und xCT KO Mäuse im Vergleich dargestellt.

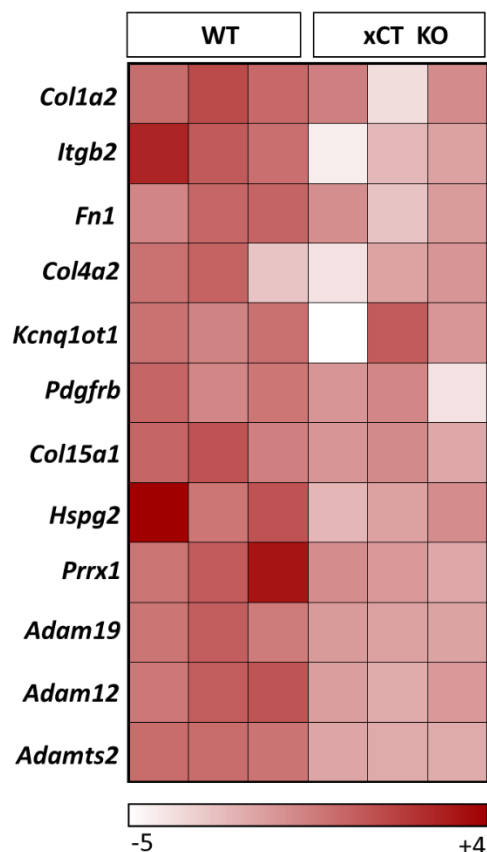


Abbildung 19: Vergleich der Genexpression im Bereich der ECM Remodellierung zwischen mit HOCl-behandelten xCT KO und Wildtyp Mäusen

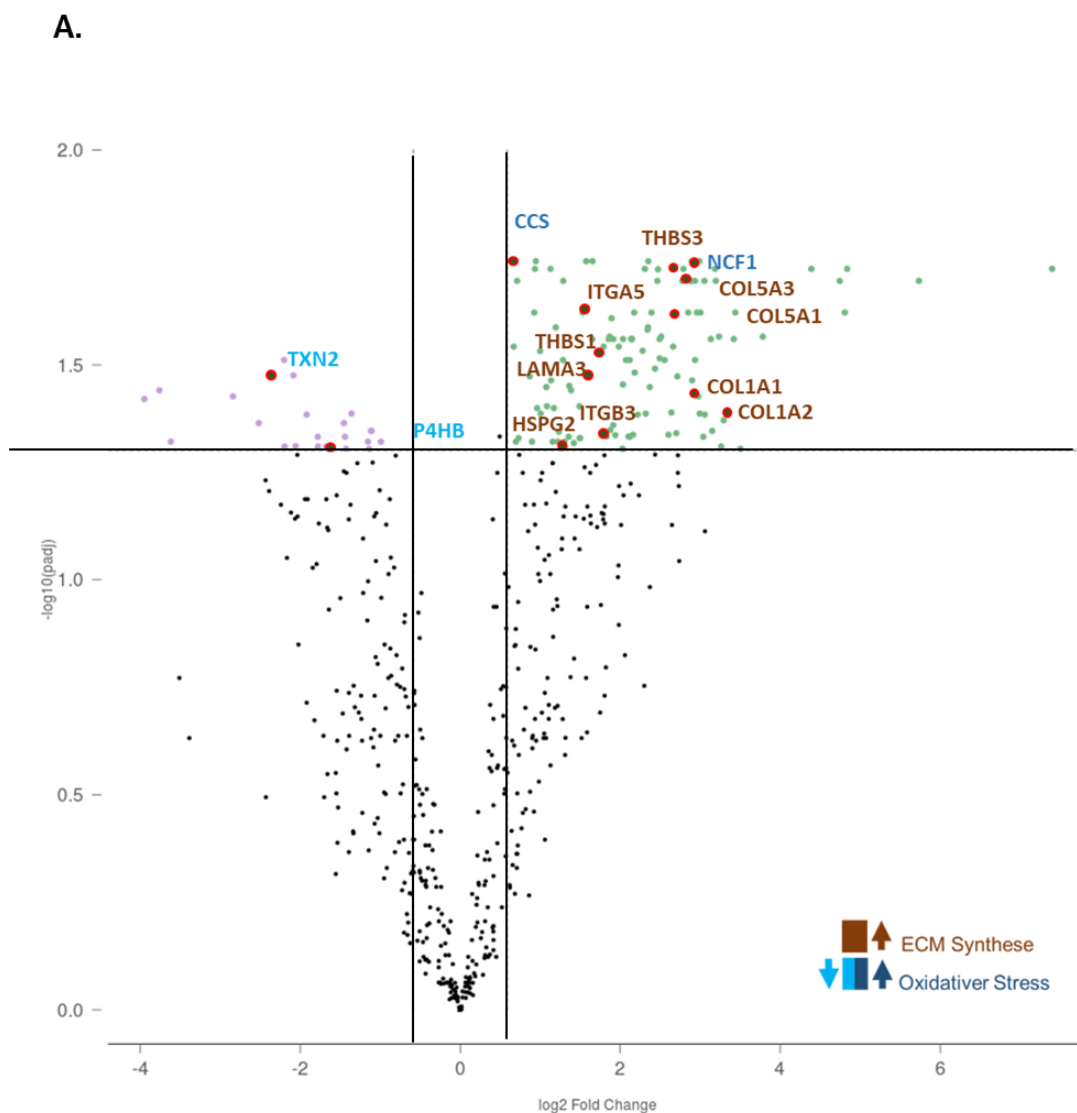
Gezeigt sind in einer Heatmap die differentiell exprimierten Gene von mit HOCl-behandelten Wildtyp Mäusen und xCT KO Mäusen, deren Genprodukte in der Remodellierung der extrazellulären Matrix involviert sind.

## Ergebnisse

xCT KO Mäuse zeigen reduzierte Genexpressionen in Genen für die ECM Remodellierung (*col4a2*), während sich im Wildtyp eine starke Expression von Genen zeigt, die an der Synthese und Remodellierung der extrazellulären Matrix beteiligt sind (*col1a2*), (*adam8*), (*fgf2*).

### 3.3.4.3 Vergleich der Genexpression fibrotischer Gene im Wildtyp Stamm nach PBS-/HOCl-Behandlung

Mithilfe der NanoString nCounter Multiplex Technologie und dem nCounter „Mouse Fibrosis V2 Panel“ wurde die Genexpression von 760 fibrotischen Genen in der Rückenhaut von Wildtyp und xCT KO Mäusen analysiert.



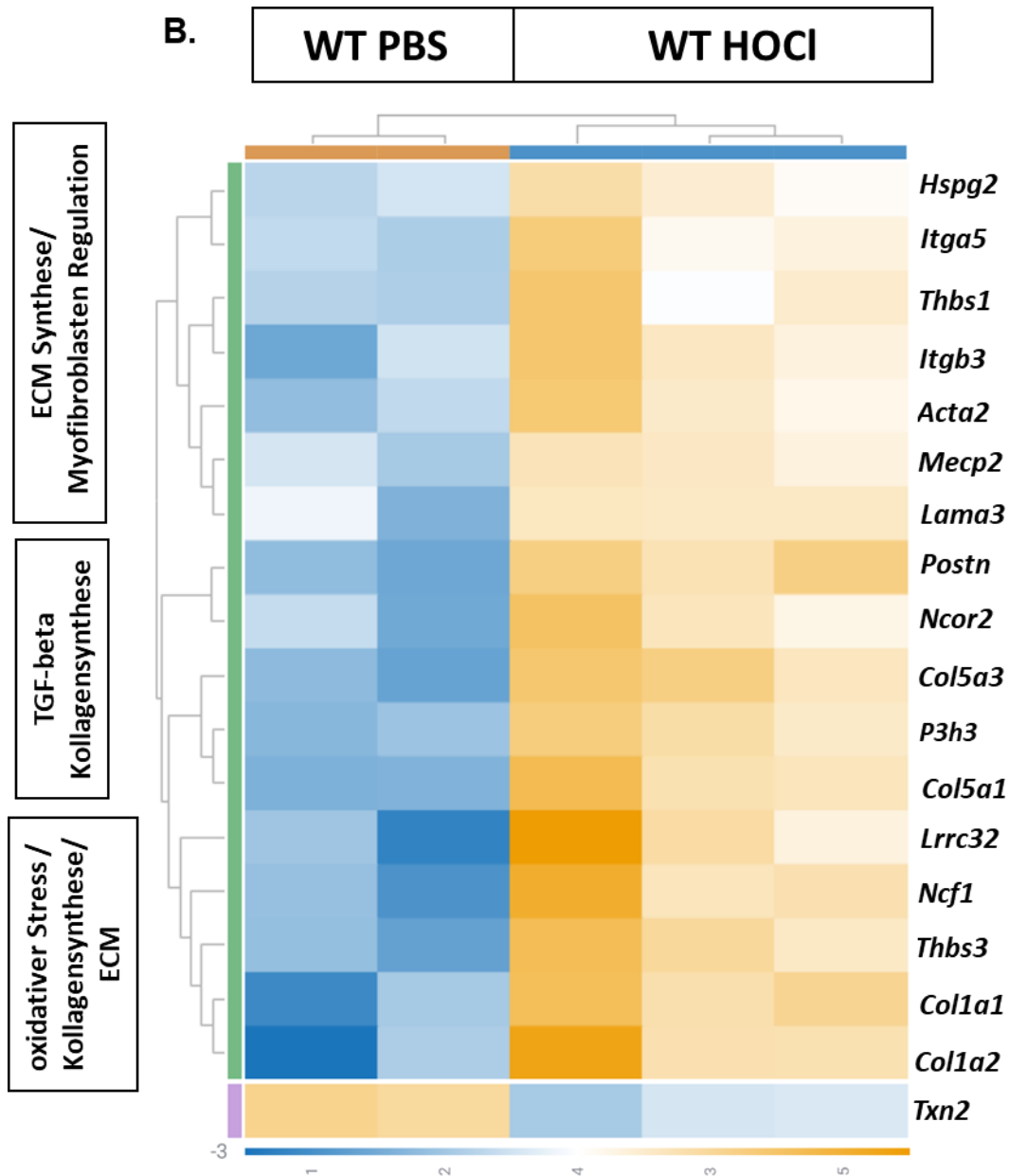


Abbildung 20: Genexpressionsanalyse fibrotischer Gene gezeigt als Volcano Plot und Heatmap für Wildtyp Tiere nach PBS-/ HOCl-Behandlung.

A) Gezeigt ist die Genexpressionsanalyse aller Gene des Fibrosepanels im Volcano Plot  $-\log_{10}$  (p-Wert) und  $\log_2$  (Fold Change). Statistisch signifikant stark exprimierte Gene sind im oberen Bereich des Diagramms über der Horizontallinie angeordnet, die die p-Wert- Schwelle nach der Benjamini-Hochberg Methode (FDR) darstellt. Gene mit stark reduzierter Genexpression sind im oberen linken Bereich und im oberen rechten Bereich Gene mit erhöhter Genexpression angeordnet. Die in der weiteren Analyse der ECM Synthese, und oxidativem Stress betrachteten Gene sind im Volcano Plot farblich markiert. (B) In einer Heatmap gezeigt sind die statistisch am höchsten signifikanten Gene im Bereich profibrotischer Prozesse, ECM Synthese, Kollagensynthese und oxidativen Stress mit einem korrigierten p-Wert von  $p < 0.05$  und einem absoluten Fold Change von  $\geq 1.5$  bzw  $\leq -1.5$  oder größer.

Das Genexpressions-Profil, erstellt mit dem ROSALIND® Programm, zeigt insgesamt 139 differentiell exprimierte Gene aus dem „Fibrose V2 Panel“ (NanoString) mit 760 Maus Genen

## Ergebnisse

und 10 Referenzgenen (house keeping genes). Stark differenzierte Gene, die an Prozessen wie der ECM Synthese, Kollagensynthese, oxidativem Stress, TGF-beta, Myofibroblastenaktivierung und die einen p-Wert von  $p < 0.05$  aufweisen mit einem absoluten fold change von 1.5 oder größer sind in Abbildung 20B zusammengefasst. Insgesamt waren 21 Gene stark reduziert in ihrer Expression und 118 Gene verstärkt exprimiert.

In Bezug auf die ECM Synthese zeigen Wildtyp Tiere aufgrund der HOCl-Behandlung eine erhöhte Genexpression verschiedener Kollagene (*col1a2*, *col1a1*, *col5a3*, *col5a1*) und an der Kollagensynthese beteiligten Gene, z.B. Prolyl 3-hydroxylase 3 (*p3h3*), Laminin Alpha 3 (*lama3*) (Abb. 20B).

Außerdem stark exprimiert sind Gene, die an der Signaltransduktion von TGF-beta beteiligt sind Nuclear Receptor Co-repressor 2 (*ncor2*), Thrombospondin 1 (*thbs1*) (Abb.20B) und an der Aktivierung und Regulation von Myofibroblasten Actin, Alpha 2, Smooth Muscle (*acta2*), Chemokine C-X-C Motif Ligand 10 (*csc10*), Periostin Osteoblast Specific Factor (*postn*), Integrin Alpha 5 Fibronectin Receptor Alpha (*itga5*) und Methyl CpG Binding Protein 2 (*mecp2*) (Abb. 20B).

Thioredoxin 2 (*txn2*) und Neutrophil Cytosolic Factor 1 (*ncf1*), Gene, die in der Regulation von oxidativem Stress eine Rolle spielen sind im Wildtyp ebenfalls differentiell exprimiert. Die Ergebnisse der Genexpression fibrotischer Gene im Wildtyp sind in Abbildung 21 zusammengefasst:

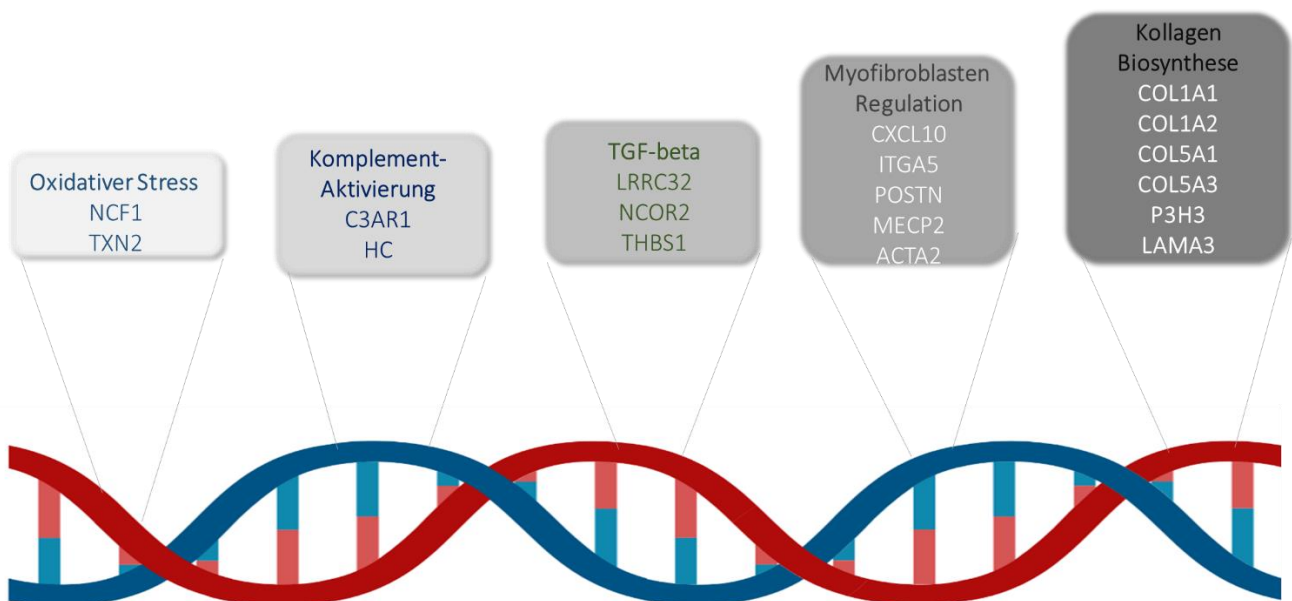


Abbildung 21: Übersicht differentiell regulierter Gene in WT Mäusen (erstellt mit Biorender.com).

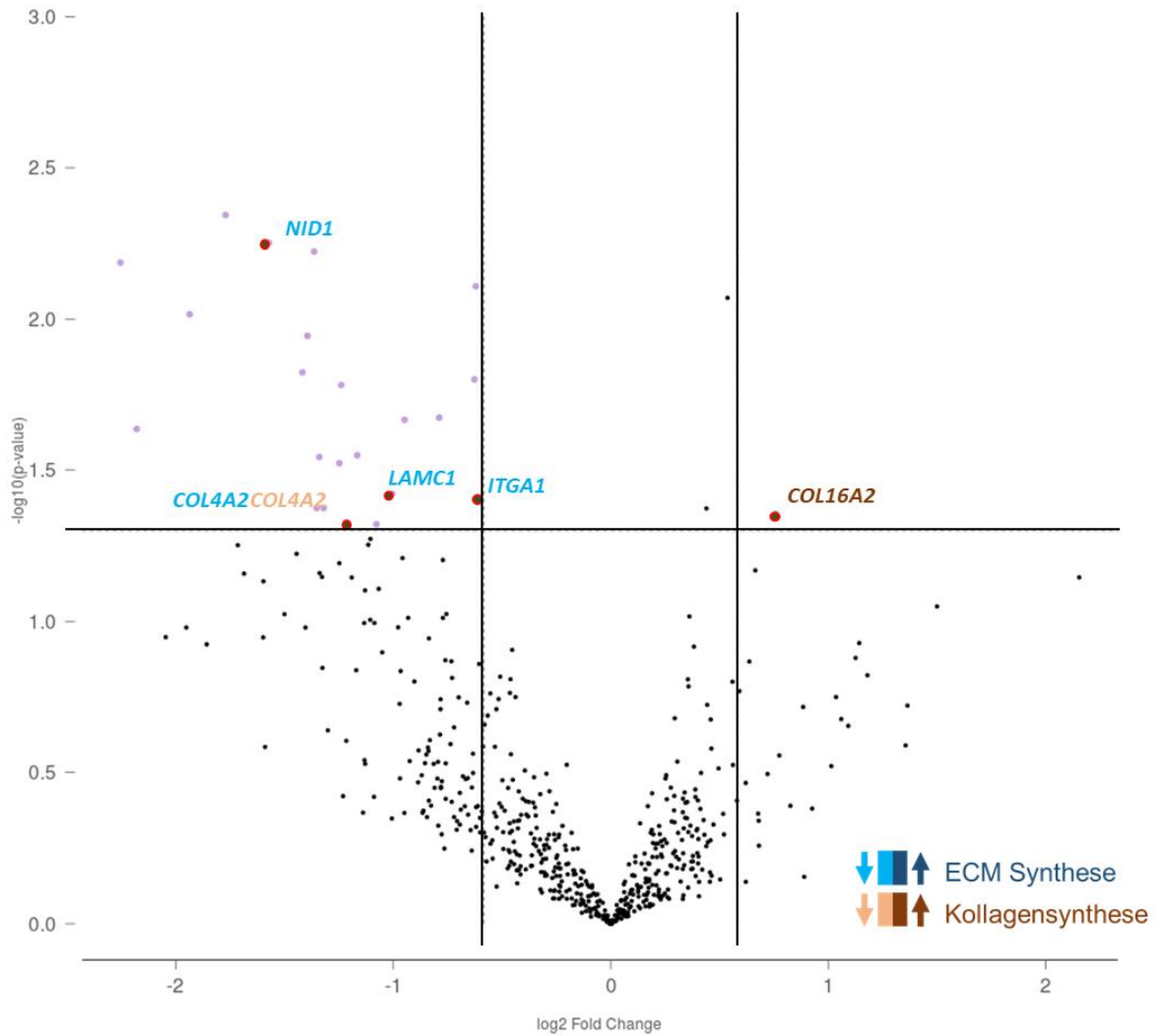
Gezeigt sind differentiell exprimierte Gene, kategorisiert in oxidativen Stress, Komplementaktivierung, TGF-beta Signaltransduktion, Myofibroblasten Regulation und Kollagen Biosynthese.

## Ergebnisse

In Abbildung 21 wird deutlich, dass im Wildtyp eine Vielzahl der differentiell exprimierten Gene in Prozesse der Kollagensynthese und Myofibroblasten Regulation involviert sind.

### 3.3.4.4 Vergleich der Genexpression fibrotischer Gene im xCT KO Stamm nach PBS-/HOCl-Behandlung

A.



## Ergebnisse

B.

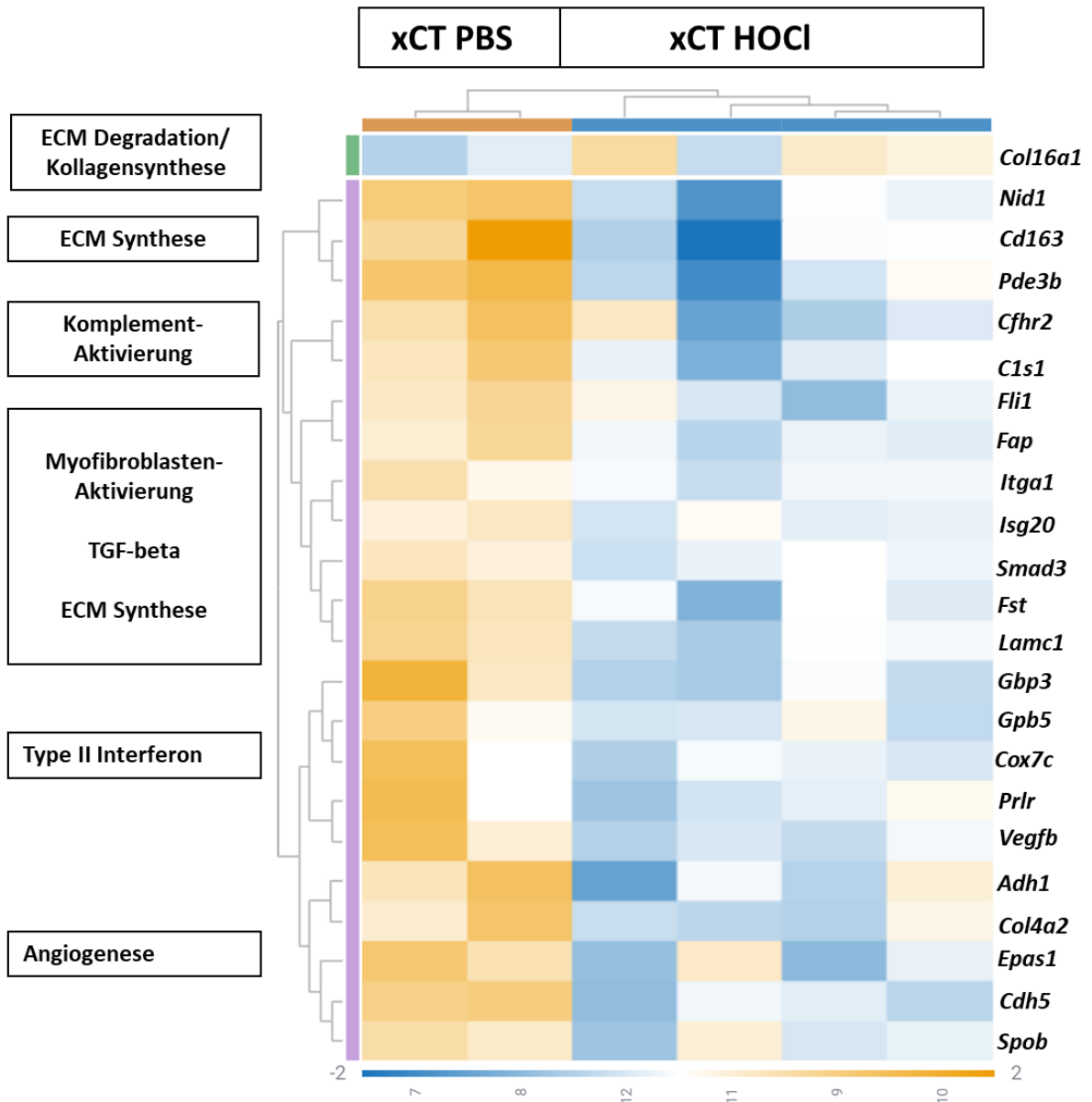


Abbildung 22: Genexpressionsanalyse fibrotischer Gene gezeigt als Volcano Plot (A) und Heatmap (B) für xCT KO Tiere nach PBS-/HOCl-Behandlung.

(A) Gezeigt ist die Genexpressionsanalyse aller Gene des Fibrosepanels im Volcano Plot  $-\log_{10}$  (p-Wert) und  $\log_2$  (fold change). Im Volcano plot gezeigt sind insgesamt 23 Gene im oberen Diagrammbereich mit einem korrigierten p-Wert von  $p < 0.05$  mit einem Fold Change von  $\geq 1.5$  bzw.  $\leq -1.5$ . Davon sind 22 Gene stark reduziert in ihrer Expression und 1 Gen verstärkt exprimiert. Farblich markiert sind die Gene, die an der Synthese der extrazellulären Matrix und der Kollagensynthese beteiligt sind. (B) In einer Heatmap gezeigt sind die am statistisch höchsten signifikanten Gene mit korrigierten p-Wert von  $p < 0.05$  und einem absoluten Fold Change von  $\geq 1.5$  bzw.  $\leq -1.5$  oder größer.

In der Genexpressionsanalyse fibrotischer und profibrotischer Gene wird deutlich, dass wesentlich weniger Gene eine differentielle Regulation mit einem korrigierten p-Wert von  $p < 0.05$  mit einem Fold Change von  $\geq 1.5$  bzw.  $\leq -1.5$  im xCT KO Stamm aufweisen im Vergleich

## Ergebnisse

zum Wildtyp (Abb. 22A/B). Insgesamt 22 Gene sind stark reduziert in ihrer Expression und nur 1 Gen ist stark exprimiert.

Das Kollagen-kodierende Gen *col4a2*, ist im xCT/SLC7A11 Stamm unter HOCl reduziert exprimiert (Abb. 22A). Die reduziert exprimierten Gene sind an Prozessen wie beispielsweise der Myofibroblastenaktivierung, TGF-beta und Typ II Interferon Signaltransduktion, ECM Synthese und Angiogenese beteiligt (Abb. 22B).

Die Überexpression von *slc7a11* in der Haut von Sklerodermie Patient/innen (Abb. 9) zusammen mit Untersuchungen, die gezeigt haben, dass der Antiporter in ferroptotische Prozesse involviert ist (Koppula, Zhuang, and Gan 2021) (Du et al. 2021) (Liu et al. 2022), veranlasste uns zur Untersuchung von ferroptotischen Genexpressionen im Wildtyp Stamm und xCT KO Haut.

Die weiteren Analysen konnten zeigen, dass mit Ferroptose assoziierte Gene wie Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Alpha (*map1lc3a*), Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 (*ptgs2*) und Cytochrome B-245 Beta Chain (*cybb*) in HOCl-behandelter xCT/SLC7A11 KO Haut eine reduzierte Expression im Vergleich zu Wildtyp HOCl Tieren aufweisen, für das Gen *ptgs2* ist diese Reduktion signifikant (Abb. 23A).

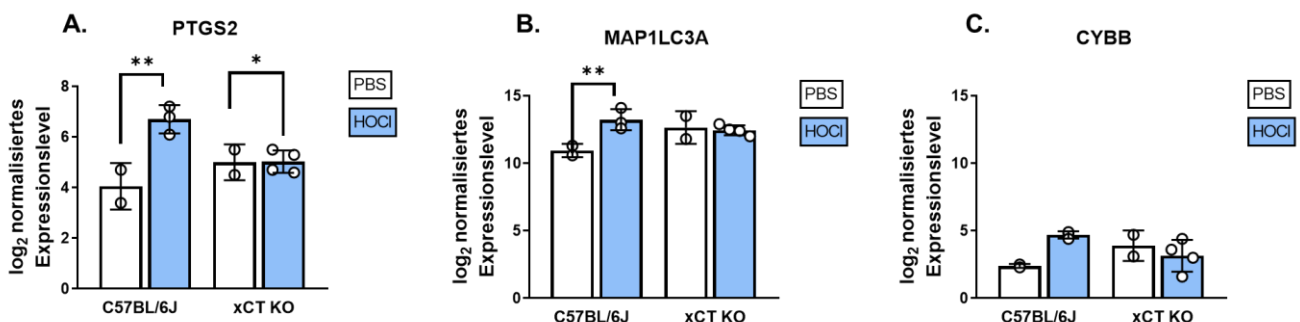


Abbildung 23: Normalisierte Genexpression mit Ferroptose assozierter Gene in WT und xCT KO Haut.

Grafische Auswertung der Genexpressionslevel ferroptotischer Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD aus einem Experiment mit n=2-4. (\*p<0.05 \*\*p<0.01).

Die Fold Change und p-Wert Daten in Bezug auf ECM Synthesegene und Gene für die Myofibroblasten Aktivierung und Regulation sind in Abb. 24 für beide Mausstämme gegenübergestellt.

## Ergebnisse

WT				xCT KO			
<b>ECM Synthese</b> 10 <sup>↑</sup> 0 <sup>↓</sup>							
Gen	-8 — +8	Fold change	p-Wert				
Col1a2		3.19312	0.007255				
Col1a1		2.97516	0.005462				
Col5a3		2.88805	0.000721				
Thbs3		2.87755	0.000730				
Col5a1		2.84939	0.001240				
Itgb3		1.87447	0.007958				
Thbs1		1.79245	0.002883				
Itga5		1.5318	0.001431				
Lama3		1.36425	0.004788				
Hspg2		1.22071	0.010323				
				<b>ECM Synthese</b> 0 <sup>↑</sup> 4 <sup>↓</sup>			
Gen	-3 — +3	Fold change	p-Wert				
Nid1		-1.57191	0.005597				
Col4a2		-1.21952	0.048209				
Lamc1		-1.00486	0.037825				
Itga1		-0.62371	0.039488				
WT				xCT KO			
<b>Myofibroblasten Regulation</b> 5 <sup>↑</sup> 0 <sup>↓</sup>							
Gen	-8 — +8	Fold change	p-Wert				
Cxcl10		4.80735	0.001473				
Postn		2.78992	0.000464				
Acta2		1.91373	0.002492				
Itga5		1.5318	0.001431				
Mecp2		1.28468	0.003585				
				<b>Myofibroblasten Regulation</b> 0 <sup>↑</sup> 3 <sup>↓</sup>			
Gen	-3 — +3	Fold change	p-Wert				
Fli1		4.80735	0.001473				
Fap		2.78992	0.000464				
Smad3		1.91373	0.002492				

Abbildung 24: Vergleich der Genexpression im Bereich der ECM Remodellierung und Myofibroblasten Regulation zwischen xCT KO und Wildtyp Mäusen.

Tabellarisch aufgelisteter Vergleich der differentiell exprimierten Gene, deren Genprodukte in der Synthese der extrazellulären Matrix und Myofibroblasten Regulation involviert sind, von Wildtyp und xCT KO Mäusen.

In der Gegenüberstellung zwischen den Genexpressionen in Wildtyp und xCT KO Mäusen wird deutlich, dass in Bezug auf die ECM Synthese und Myofibroblasten-Regulation im Wildtyp durch die HOCl-Behandlung vermehrt Gene in ihrer Expression steigen. Während im Wildtyp 10 Gene zur ECM Synthese stark exprimiert sind, wurden 4 Gene im Knockout Stamm als reduziert exprimiert analysiert. Für Prozesse der Myofibroblasten Regulation sind im Wildtyp 5 Gene hochreguliert und im xCT KO Stamm 3 Gene in ihrer Expression herunterreguliert (Abb. 24).

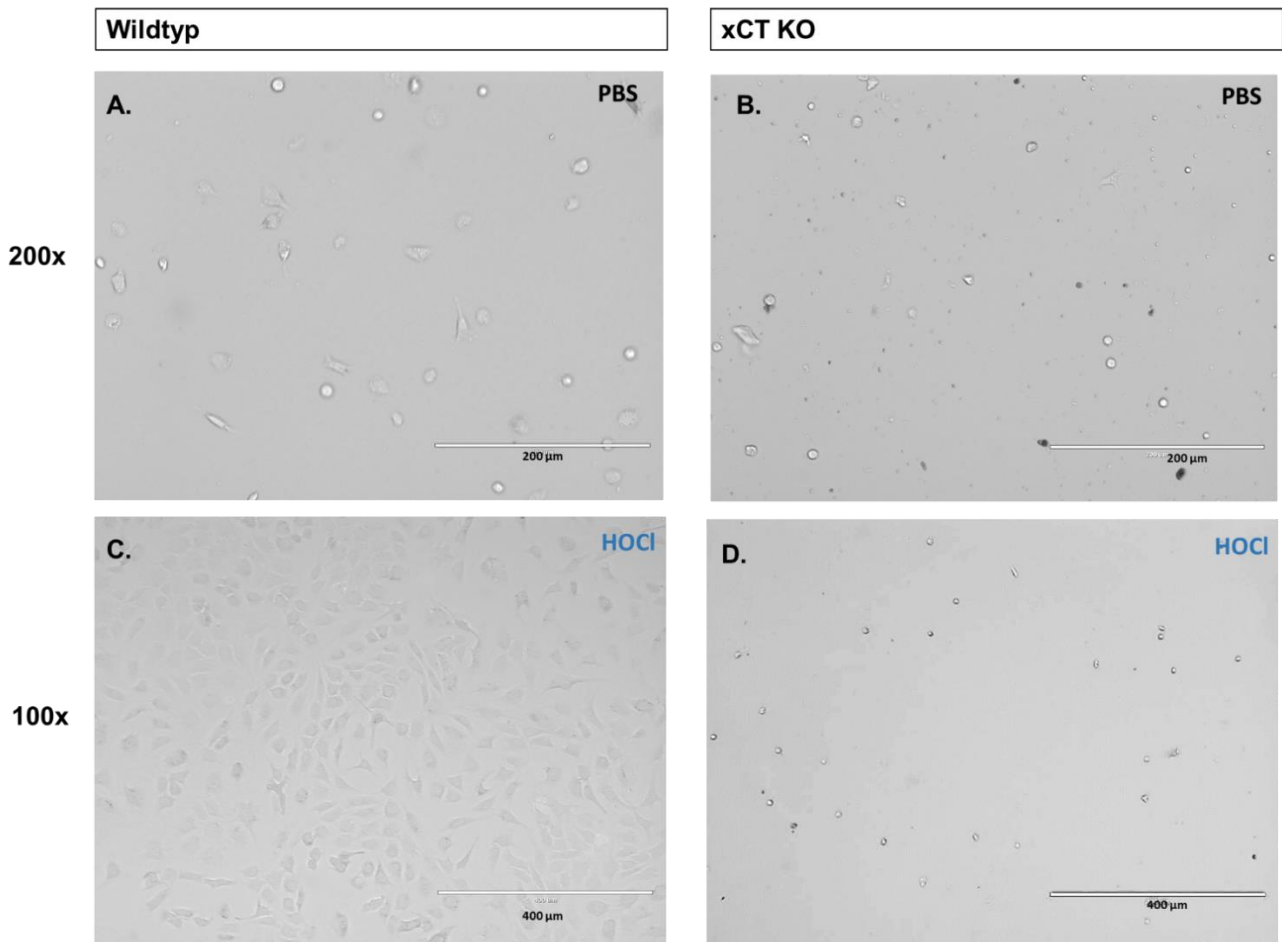
### 3.4 SLC7A11/xCT Defizienz in *ex vivo* Fibroblasten Differenzierung

Zur weiteren Untersuchung der Rolle des xCT/SLC7A11 Antiporters als profibrotischer Faktor in dermalen Fibrose, wurden aus Wildtyp und xCT/SLC7A11 Tieren Fibroblasten aus den Ohren isoliert und durchflusszytometrisch analysiert.

#### 3.4.1 Fibroblastenkultivierung

Die Mausohren wurden mit jeweils 20  $\mu$ l HOCl/PBS behandelt, anschließend wurden die Mäuse mit CO<sub>2</sub> Gas getötet und die Mausohren entnommen und über Nacht verdaut. Am nächsten Tag wurden die Zellen isoliert und ausplattiert und für 5-7 Tage kultiviert. Danach wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf unterschiedliche Proteinexpression, oder mithilfe einer Immunfluoreszenz-Färbung mikroskopisch analysiert.

Fibroblasten aus Mausohren an Tag 3



## Ergebnisse

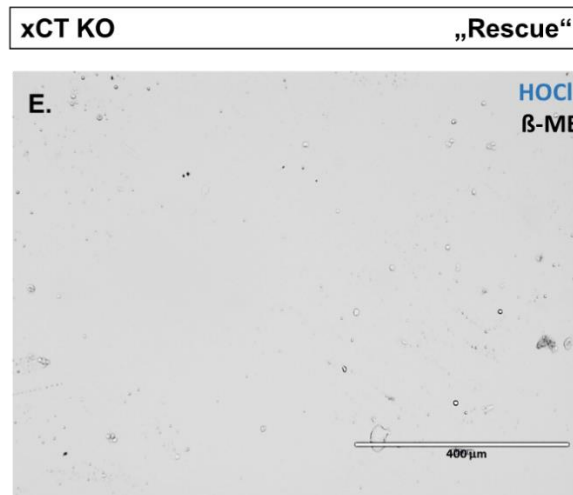


Abbildung 25: Fibroblastenkultur an Tag 3 aufgenommen mit dem Evos M7000.

Gezeigt sind Fibroblasten der Wildtyp und xCT KO Mäuse an Tag 3 mithilfe des digitalen EVOS Fluoreszenzmikroskops. Die Kalibrierung zeigt 400  $\mu\text{m}$  an.

Wildtyp Fibroblasten zeigen in Kultur nach HOCl-Behandlung eine vermehrte Zellzahl an Fibroblasten (Abb. 25A/C), während die Zellzahl an xCT KO Fibroblasten stark reduziert war. Dies zeigte sich sowohl aus PBS-behandelter Haut als auch nach der HOCl-Behandlung (Abb. 25B/D). In mehreren Versuchen wurde auffällig, dass die Fibroblasten Zellzahlen kontinuierlich gering und die Debris Zellzahlen für den Knockout Stamm eher hoch blieben. Die Zellzahl der Fibroblasten ließ sich auch durch Zugabe von 10  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Mercaptoethanol zum Medium (Abb. 25E) nicht steigern. Dagegen wiesen die *ex vivo* Wildtyp Fibroblasten in der PBS-Gruppe mehr Fibroblasten auf und die errechnete Zellzahl in der HOCl-Gruppe war mehr als doppelt so hoch.

Ergebnisse

Fluoreszenzmikroskopie Färbung an Tag 5

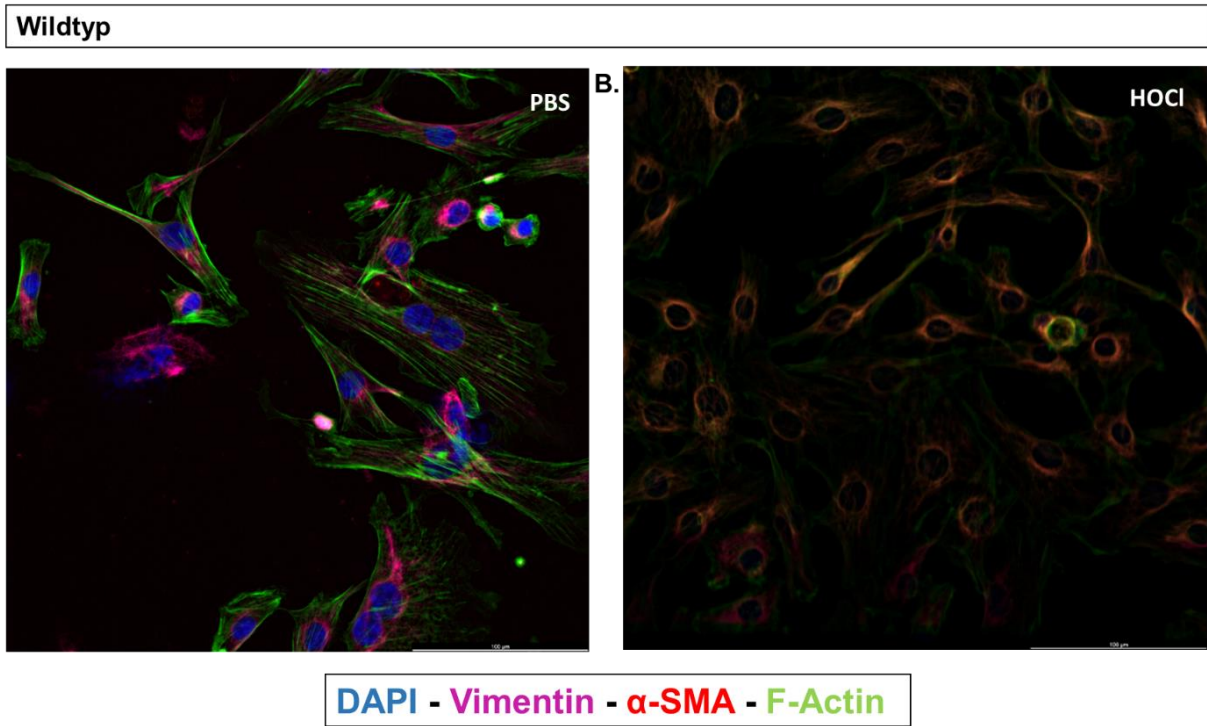
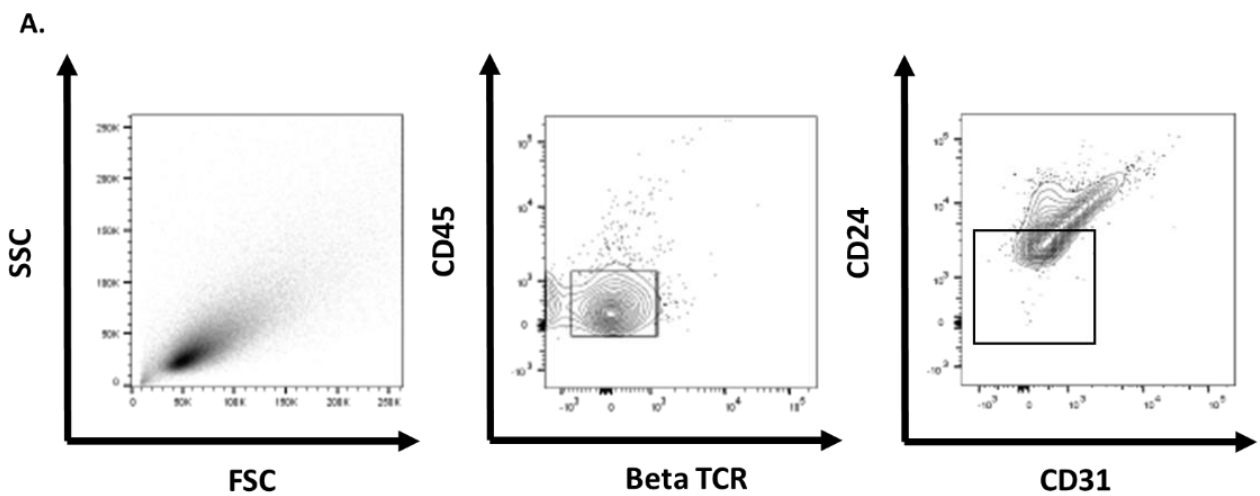


Abbildung 26: Immunfluoreszenz-Färbung von Wildtyp Fibroblasten.

Gezeigt sind kultivierte *ex vivo* mit PBS-/HOCl-behandelte Wildtyp Fibroblasten an Tag 5 nach einer Immunfluoreszenz-Färbung für DAPI (blau), Vimentin (lila), alpha-SMA (rot) und F-Actin (grün) mithilfe des Leica Thunder DM 6000.

Unstimulierte WT Fibroblasten zeigen in der Immunfluoreszenz eine starke Vimentin Expression. Durch Behandlung mit HOCl sieht man eine Erhöhung der  $\alpha$ -SMA Expression, die die Zellen dann in der Überlagerung mit Vimentin orange erscheinen lässt (Abb. 26B). Dies lässt auf eine Myofibroblastendifferenzierung durch HOCl schließen.



## Ergebnisse

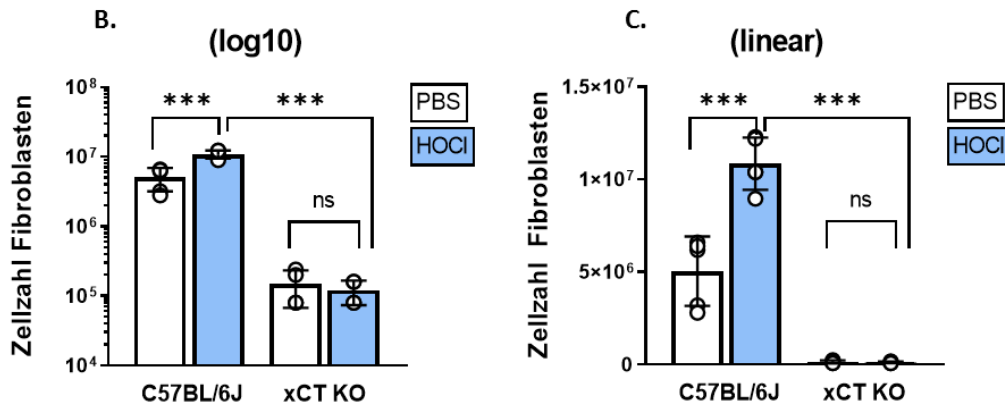


Abbildung 27: Durchflusszytometrische Analyse von WT und xCT/SLC7A11 KO Fibroblasten an Tag 7.

(A) Gatingstrategie: SSC/FSC Debrisausschluss und CD45/beta-TCR positive. Aus den CD45 negativen wurden die CD24/CD31 negativen Zellen ausgewählt. (B) Gezeigt ist zunächst die Zellzahl in log10 und linear die Zellzahl aus den Fibroblastenkulturen von Wildtyp und xCT KO Fibroblasten.

Wie bereits in Kultur beobachtet wurde, zeigt sich auch mithilfe der Durchflusszytometrie eine deutlich geringere Zellzahl für die xCT KO Fibroblasten im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 27B/C). Des Weiteren ist kein signifikanter Unterschied zwischen PBS- und HOCl-Fibroblasten im Knockout Stamm erkennbar, während die Zahl der Fibroblasten aufgrund der HOCl-Behandlung signifikant in Wildtyp Tieren steigt (Abb. 27B/C).

### 3.4.2 Inhibierung des SLC7A11/xCT Systems mithilfe von Imidazol Keton Erastin

Imidazol Keton Erastin (IKE) ist ein metabolisch stabiler xCT/SLC7A11-Inhibitor, der zur Untersuchung *in vivo* bereits eine potentielle Eignung zur Induktion von Ferroptose gezeigt hat (Y. Zhang et al. 2019). Durch die tägliche subkutane Applikation von IKE in Wildtyp Mäusen und gleichzeitiger Auslösung einer dermalen Fibrose durch HOCl-Injektionen wurde der xCT/SLC7A11 Antiporter in Wildtyp Mäusen inhibiert und der Einfluss auf die Ausbildung der Fibrose analysiert.

Ergebnisse

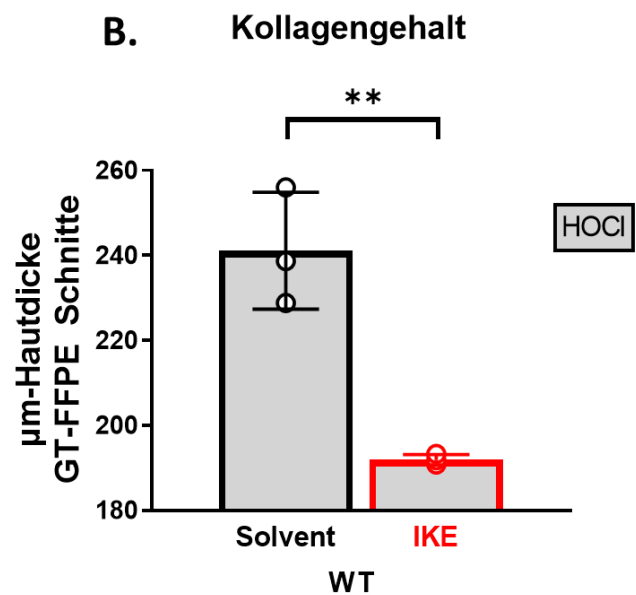
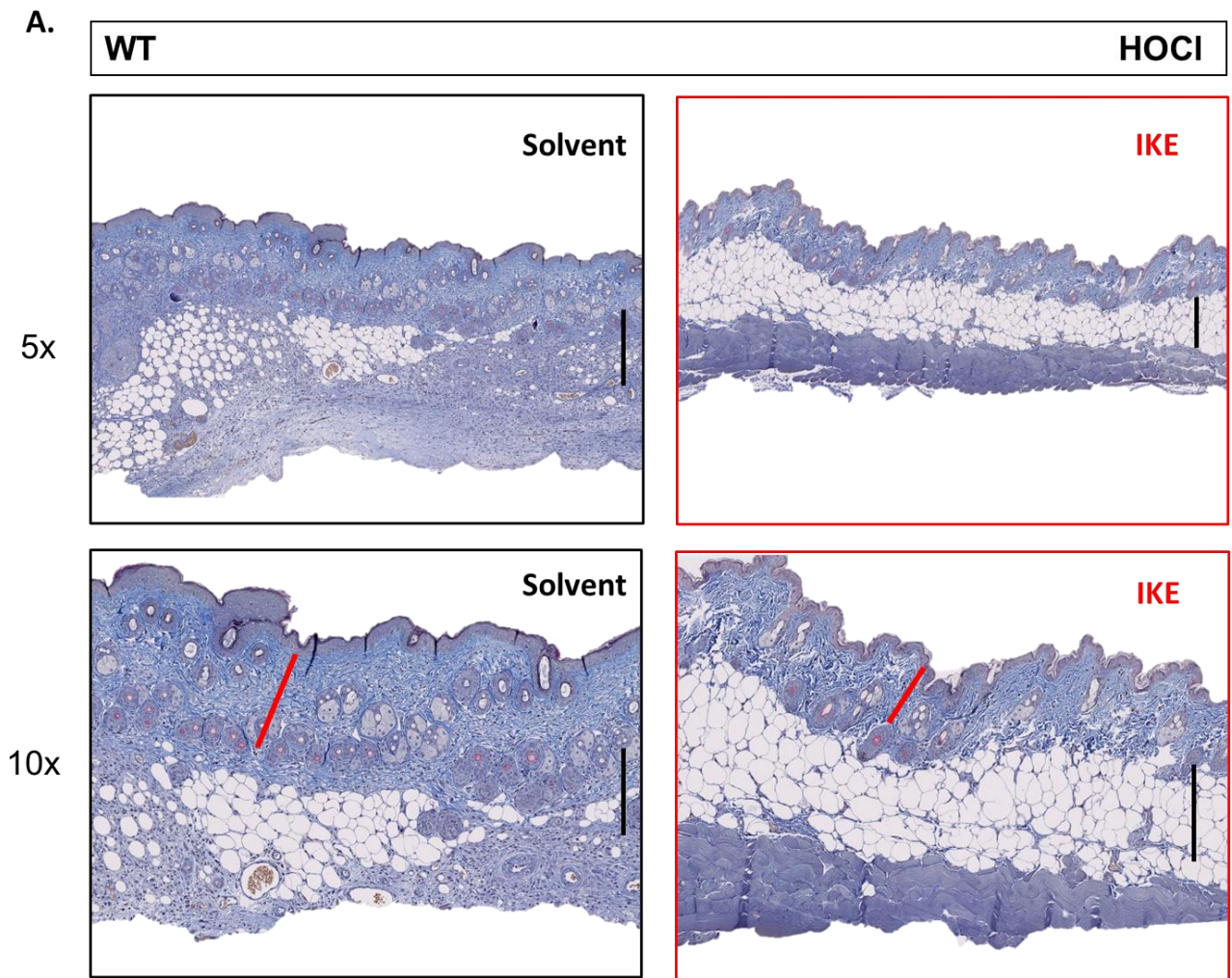
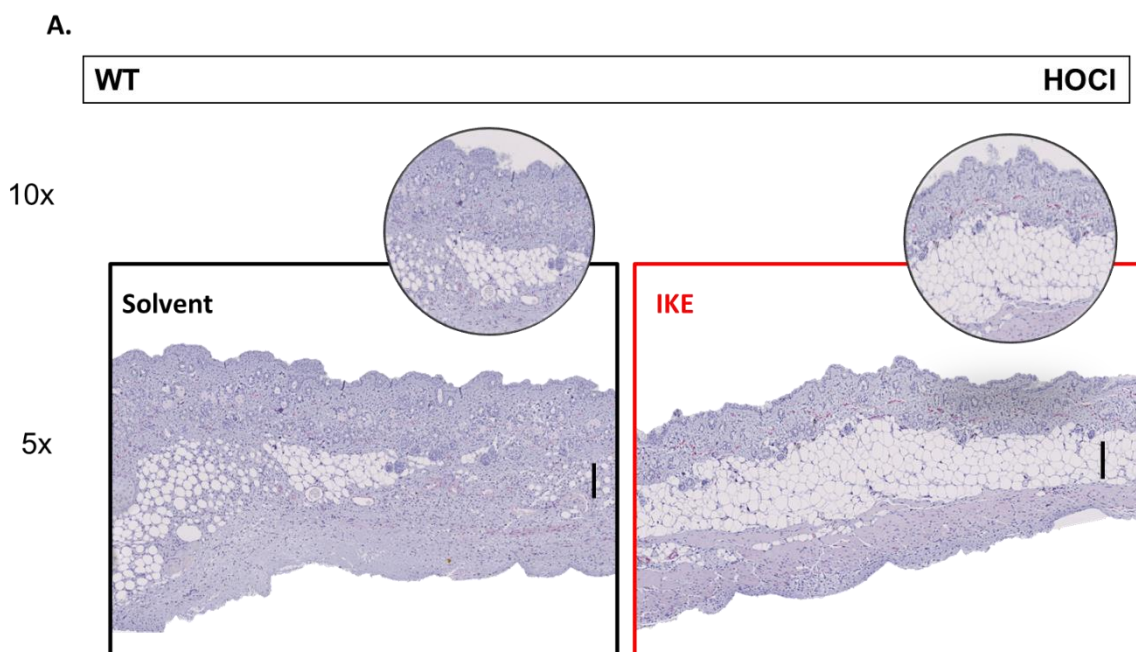


Abbildung 28: Histologische Analyse fibrotischer Haut nach Verabreichung des IKE Inhibitors/Solvents und Applikation von HOCl in Wildtyp Mäusen.

## Ergebnisse

(A) Hautstanzen wurden in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend mittels der Masson-Goldner-Trichrom Färbung analysiert. Dargestellt sind 5x und 10x Okularvergrößerungen der Schnitte und die Dicke der Dermis wurde ausgemessen. Die Kalibrierungsbalken zeigen einen Abstand von 200  $\mu\text{m}$ . (B) Grafische Auswertung der histologischen Hautdicke innerhalb der Dermis (roter Strich). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus einem Experiment mit  $n=3$ . (\*\* $p<0.01$ )

In Abbildung 28A sind die histologischen Untersuchungen nach Applikation von IKE im chemisch induzierten Mausmodell mit HOCl dargestellt. Gemessen wurde die Dicke der Dermis (Markierung rot). Kollagene sind in der Masson-Goldner-Trichrom Färbung blau gefärbt. Die mit Solvent und HOCl-behandelten Tiere wiesen eine erhöhte Verdickung der Dermis von  $241,3 \pm 13,6 \mu\text{m}$  auf, während die Dermis IKE-/ HOC- behandelter Tiere mit  $191,6 \pm 1,1 \mu\text{m}$  signifikant dünner ist (Abb. 28B). Die Behandlung mit IKE verringerte somit den fibrotischen Phänotyp unter HOCl.



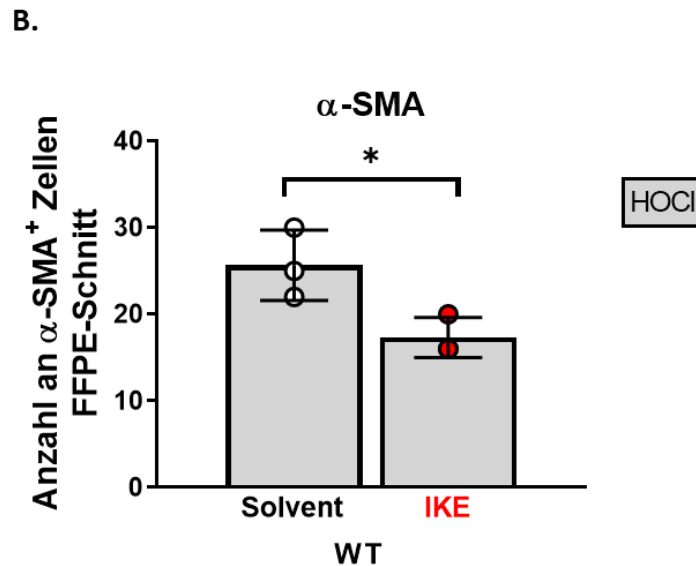


Abbildung 29: Immunhistochemische Analyse der Haut zur Bestimmung von α-SMA<sup>+</sup>- Zellen nach Applikation des IKE Inhibitors/Solvent im chemisch induzierten Mausmodell mit HOCl.

(A) Hautstanzen wurden in Formalin fixiert in Paraffin eingebettet und anschließend immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen α-SMA und mit Eosin gefärbt. Dargestellt ist jeweils eine 5x Okularvergrößerung und eine in einem Kreis dargestellte 10x Vergrößerung der gefärbten Hautschnitte. Die Kalibrierungsbalken zeigen einen Abstand von 200 μm. (B) Grafische Auswertung der Anzahl an α-SMA<sup>+</sup> innerhalb der Dermis. Dargestellt sind die Mittelwerte +/-SD aus einem Experiment mit n=2-3 (\*p<0.05).

In Abbildung 29 A sind die immunhistochemischen Analysen der IKE behandelten Hautschnitte dargestellt. Im Vergleich zur IKE Gruppe weisen die mit Solvent behandelten HOCl Tiere tendenziell eine erhöhte Anzahl an α-SMA<sup>+</sup>- Zellen auf (Abb. 29B).

### 3.4.3 Kreuz-Transplantation von Wildtyp und xCT KO Haut

Im weiteren Verlauf wurden Transplantationsversuche mit WT und xCT KO Mäusen durchgeführt um einen spezifischen Effekt des xCT Knockouts auf die Haut nachzuweisen. Dafür wurden aus jedem Stamm Spendertieren die Ohren entnommen, die dorsale und ventrale Seite aufgetrennt und ein Wundrand geschnitten. Das xCT KO Transplantat wurde anschließend auf den Rücken einer WT Maus transplantiert und das WT Transplantat auf ein xCT KO Empfängertier (Abbildung 30). Nach einer Wundheilungsphase von 20 Tagen wurden die Empfänger Tiere für 14 Tage mit HOCl behandelt und histologische Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse der histologischen Analyse sind in Abbildung 31 und 32 dargestellt.

Ergebnisse

**xCT/SLC7A11 KO**



**Wildtyp  
Transplantat  
Tag 6**

**Wildtyp**



**xCT/SLC7A11 KO  
Transplantat  
Tag 6**



**Wildtyp  
Transplantat  
Tag 18**

Abbildung 30: Wundheilungsprozess von Wildtyp vs xCT KO Transplantaten.

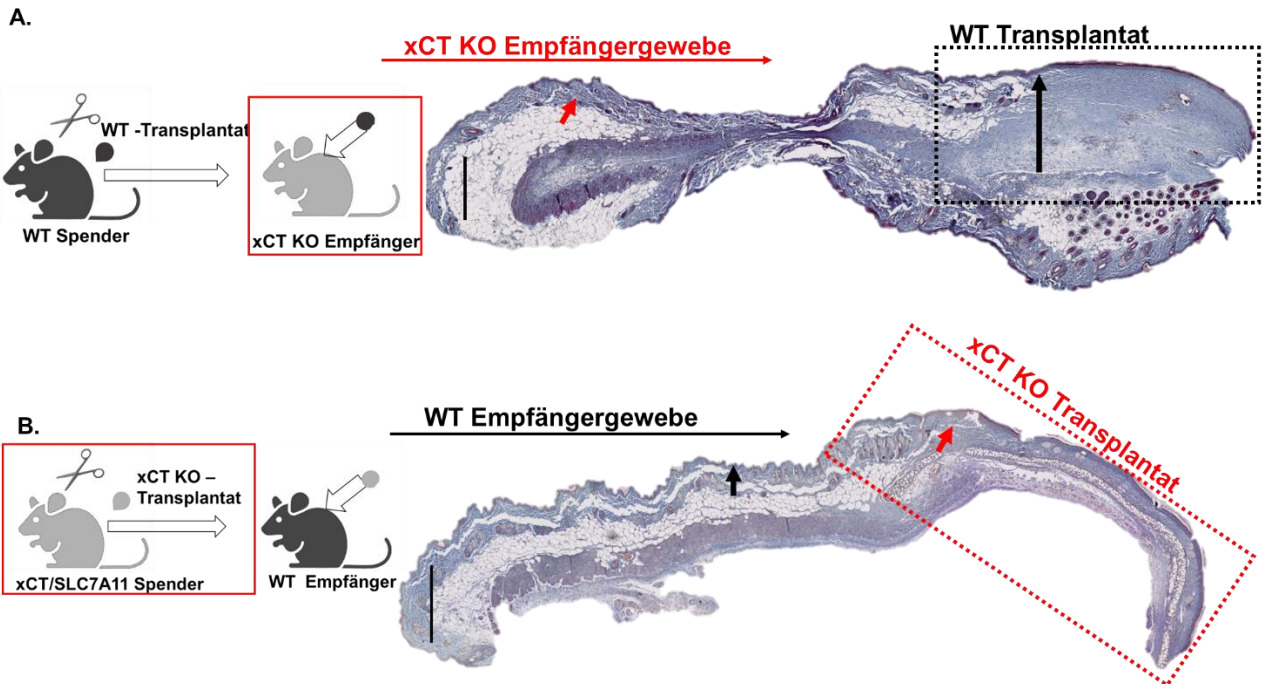


Abbildung 31: Histologische Analyse der Transplantationsversuche mittels Goldner-Trichrom Färbung.

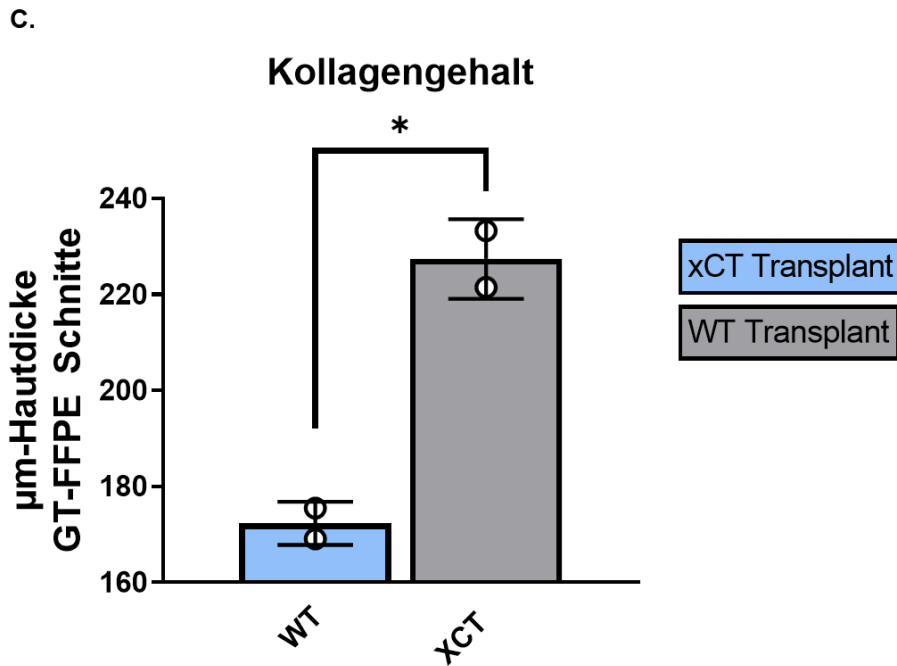


Abbildung 32: Bestimmung des Kollagengehalts in Wildtyp und xCT KO Mäusen mit xCT KO und WT Transplantat nach 14 Tagen HOCl-Behandlung.

(A) Gezeigt ist das Transplantationsschema des Wildtyp-Transplantats auf eine xCT/SLC7A11 Empfängermaus und die Masson-Goldner-Trichrome Färbung der Gewebeschnitte reisolierter Transplante, (B) Gezeigt ist das Transplantationsschema des xCT KO Transplantats auf eine Wildtyp Empfängermaus und die histologische Analyse von in Formalin fixierten und Paraffin eingebetteten Hautstanzen, die anschließend mit der Masson-Goldner-Trichrom Färbung gefärbt wurden. (C) Grafische Auswertung der histologischen Hautdicke innerhalb der Dermis. Dargestellt sind die Mittelwerte +/-SD aus einem Experiment mit n=2. (\*p<0.05)

Wildtyp-Transplantate weisen nach 14 Tagen HOCl-Behandlung auf der xCT KO Maus eine erhöhte Akkumulation von Kollagen auf (Abb. 32) mit einer Dicke der Dermis von  $227,5 \pm 7,7 \mu\text{m}$ , während xCT KO Transplantate auf der Wildtyp Maus eine geringere Dicke von  $172,5 \pm 4,9 \mu\text{m}$  und somit weniger Kollagenakkumulation nach der HOCl-Behandlung aufweisen als der Wildtyp. Die xCT KO Transplantate behalten auch auf der Wildtyp Maus den Fibrose-resistenten Phänotyp, der bereits in Abbildung 15 beschrieben wurde.

#### 4. Diskussion

Erkrankte Haut weist eine verstärkte metabolische Aktivität auf, bei der reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet werden. Dabei entstehen 90% des ROS in Mitochondrien, die dann in das Cytosol abgegeben werden (Zorov, Juhaszova, and Sollott 2014). Antioxidative Mechanismen stellen somit für die Zelle einen essentiellen Bestandteil dar, um mit exzessivem oxidativen Stress in Mitochondrien und dem Cytosol fertigzuwerden. Denn freie Sauerstoffradikale können für die Zelle schwerwiegende, unter Umständen tödliche, Folgen haben. Systemische Sklerose ist eine dieser Erkrankungen, bei der Endothelschäden eine Entzündungsreaktion mit myeloider Immunzellinfiltration auslösen, die zur Freisetzung von ROS in Immunzellen, aber auch Hautzellen wie Fibroblasten führt (Sambo et al. 2001). Diese Berichte verifizieren auch die RNA Sequenzierungen der SSc Haut im Vergleich zu gesunder Haut in dieser Arbeit. Entzündungsprozesse in Sklerodermie Patient/innen und die entsprechende hohe metabolische Aktivität in den untersuchten Hautläsionen, führte zur Überexpression von Genen, die an der Synthese der extrazellulären Matrix beteiligt sind (*col1a2*, *adam8*, *adamts2*). SSc Hautzellen zeigten außerdem eine Depletion des antioxidativen Moleküls Apolipoprotein (*apoe*), welches die Oxidation von Lipiden verhindert, was eine Anreicherung von Lipiden zur Folge hat (Chaudhari et al. 2020). Eine Verringerung weiterer antioxidativer Substanzen wie z.B. Glutathion ist auch für andere autoimmune und entzündliche Erkrankungen wie z.B. Krebs, und cystischer Fibrose beschrieben worden (Perricone, De Carolis, and Perricone 2009) (Ballatori et al. 2009).

Interessanterweise fand ich aber eine Überexpression des für die Glutathionsynthese entscheidenden Antiporter Systems *slc7a11* in SSc Haut. Über das Molekül SLC7A11, auch xCT genannt, gelingt es der Zelle Cystin im Austausch für Glutamat zu importieren. Cystin stellt einen limitierenden Faktor für die Glutathionsynthese dar. Glutathion selbst kann dann, über die Induktion von Glutathion-Peroxidasen wie GPX-4, Oxidationsprozesse in Zellmembranen verhindern (Song et al. 2020). Die Depletion von Glutathion gilt als Marker von oxidativem Stress (Sun et al. 2018). Im Umkehrschluss sollte eine Überexpression dieses Moleküls dazu führen, dass Zellen resistenter gegen oxidativen Stress würden und seine Abwesenheit würde den Organismus oder die Zelle anfälliger machen.

*Slc7a11* Expressionen sind vor allem für Hirnzellen beschrieben worden. „The Human Protein Atlas“ (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000151012-SLC7A11/tissue>) gibt für

## Diskussion

die Haut geringe Expressionslevel an, die sich vor allem in Langerhanszellen und Makrophagen detektieren lassen. Für nicht- hämatopoetische Zellen ist bislang nichts dazu beschrieben worden. Eine jüngere Publikation führte eine Single Cell RNA Sequencing Analyse von verschiedenen SSc Fibroblasten im Vergleich zu solchen aus gesunden Spendern durch und fand ebenfalls eine Überexpression des *slc7a11* in Myofibroblasten aus SSc Spendern (Tabib et al. 2021). Dies wurde allerdings nur im Zusatzmaterial erwähnt.

Welche Auswirkungen der Antiporter SLC7A11 auf die ROS induzierte Entzündung und eine anschließende Fibroseentstehung hat, konnte nun in dieser Arbeit mit einer SLC7A11-defizienten Mauslinie (xCT KO) untersucht werden. Die xCT-defizienten Tiere waren überraschenderweise vor der Ausbildung einer Gewebsfibrose durch HOCl-Injektionen weitgehend geschützt. Ein Grund könnte sein, dass die xCT Defizienz sich auf die Entzündungsreaktion nach Verabreichung von HOCl auswirkte und so weniger Fibroblasten aktiviert wurden.

Myeloide Zellen wie Monozyten und Makrophagen wirken entscheidend an der Aktivierung und Differenzierung von Fibroblasten mit (V. K. Raker et al. 2016) (Kania, Rudnik, and Distler 2019). Auch SSc Patient/innen zeigen in der Frühphase der Erkrankung vermehrt CD14+ Monozyten und dermale Makrophagen in der Haut (Rudnik et al. 2021). Außerdem konnten erhöhte Expressionen von Monozyten/Makrophagen mit fibrotischen Markern (CD163 und CD204) in Blut- und Hautproben von SSc Patient/innen nachgewiesen werden (Al-Adwi et al. 2023). Einen funktionellen Nachweis für die myeloide Beteiligung an fibrotischen Prozessen brachte die Depletion von myeloiden CD11b<sup>+</sup> Zellen oder auch die Blockade der Rekrutierung dieser Zellen über CCR2/CCl2, wodurch eine Gewebsfibrose effizient blockiert werden konnte (Haub et al. 2019). Andere Studien belegen, dass profibrotische Makrophagen (sogenannte „M2“ oder alternative Makrophagen) und ihre therapeutische Adressierung vielversprechend für antifibrotische Therapien sein kann. Kolb et al. beschrieben einen reduzierten fibrotischen Phänotyp aufgrund einer reduzierten Differenzierung der alternativ-aktivierten Makrophagen durch Blockade von cAMP (Kolb, Crestani, and Maher 2023). Studien von Wang und Kollegen vermuten einen Zusammenhang zwischen *slc7a11* Expression und Makrophagen Polarisation. Sie beobachteten, dass IL-4 induzierte M2 Makrophagen eine erhöhte *slc7a11* Genexpression aufweisen (Wang et al. 2020) und xCT-defiziente Makrophagen im Vergleich zu WT Makrophagen ROS akkumulieren (Kobayashi et al. 2018). Ein weiterer Einfluss einer xCT-Defizienz auf das Immunsystem wurde 2021 durch Du et al. gezeigt. Dabei führt die

## Diskussion

Inaktivierung des xCT Antiporters in hepatischen Sternzellen (HSCs) zur Einschränkung der Myofibroblastenaktivität und somit zu einer Reduzierung der Leberfibrose (Du et al. 2021).

In dieser Arbeit konnte ich in xCT KO Haut zwar eine reduzierte Anzahl an Immunzellen nach HOCl-Behandlung im Vergleich zum WT beobachten. Die Effekte der HOCl-Injektionen auf die Differenzierung von Immunzellen, auch der Makrophagen, in der Haut erwies sich aber zwischen WT und xCT KO als vergleichbar. Dies könnte bedeuten, dass weniger die Entzündung, sondern vielmehr die Fibroblasten selbst Kern der Fibroseresistenz bei fehlendem xCT Antiporter sind. Gestärkt wurde dies durch die Tatsache, dass der fibroseresistente-Phänotyp auch nach Transplantation auf einen xCT kompetenten Empfänger noch erhalten blieb. Aus diesem Grund habe ich in weiteren Studien den Fokus auf die Rolle des xCT Antiporters in Fibroblasten gelegt.

Zunächst fiel auf, dass xCT KO Fibroblasten *in vitro* wenig proliferativ sind bzw. nicht anwachsen und xCT KO Haut eine geringere Wundschlusskapazität aufwies. Auswirkungen auf die Proliferation von Zellen wurde bereits für xCT-defiziente Lymphozyten beschrieben (Arensman et al. 2019). Die Auswirkung des xCT-Signalwegs auf das Zellwachstum ist aus diesem Grund seit vielen Jahren Gegenstand der Krebsforschung. Da man sich hier erhofft durch Verhinderung der Hyperproliferation im Tumor therapeutische Erfolge zu erzielen (Arensman et al. 2019) (S. Li et al. 2022) (Lin et al. 2020) (Koppula, Zhuang, and Gan 2021).

Fehlender Cystin-Import durch xCT führt zu einer reduzierten Proliferation von Zellen, da diese abhängig von der Cystin-Konzentration ist und vermutlich auch Grund für das geringere Überleben der xCT KO Fibroblasten *in vitro* ist. Dieser Zusammenhang zeigte sich bereits als vielversprechender Therapieansatz in T-Zell stimulierten Krebsimmuntherapien (He et al. 2021) (Jyotsana, Ta, and DelGiorno 2022).

HOCl führt in Fibroblasten zum Anstieg des intrazellulären GSH-Levels. Dies konnte ich, wenn auch reduziert, in xCT inkompetenten Zellen detektieren. Die xCT KO Zellen scheinen *in vivo* alternative Wege zu nutzen, um GSH synthetisieren zu können, denn auch hier ist GSH messbar. So gibt es neben dem xCT System noch den Transsulfurierungsweg oder das Alanin-Serin-Cystein-System (ASC). Beim ASC wird Cystin in seiner reduzierten Form (Cystein) transportiert und in der Zelle zu Cystin oxidiert (Lewerenz et al. 2013).

In der Haut findet man neben Fibroblasten auch Keratinozyten, die indirekt auf die Fibroblasten einwirken können. Ein globaler xCT KO würde auch diese Zellen betreffen. Zwar sah man in der Epidermis der xCT KO Tiere keine Veränderung, aber die Wechselbeziehung

## Diskussion

zwischen Fibroblasten und Keratinozyten beeinflusst Proliferation, Differenzierung, Aktivierung und Adhäsion der Zellen (Russo, Brembilla, and Chizzolini 2020). *In vitro* Versuche von in SSc-Keratinozyten Medium kultivierten Fibroblasten zeigten eine TGF- $\beta$  unabhängige Aktivierung von Fibroblasten durch erhöhte *acta2*, *cola1* und mRNA Protein Expressionen (McCoy et al. 2017). In humanen Keratinozyten von Psoriasis Patient/innen konnte eine verminderte Expression von *slc7a11* durch das Medikament Ouabain hervorgerufen werden. Damit einhergehend zeigte sich eine reduzierte Proliferation und eine Apoptose der Keratinozyten *in vitro* (Zhou et al. 2023). Um das komplexe Zusammenspiel von Fibroblasten und Keratinozyten genauer untersuchen zu können, werden vermehrt humane 3D Hautmodelle angewendet. Epidermale SSc Keratinozyten werden in Kokulturen, in Kollagen eingebettet und mit Fibroblasten kokultiviert. Hierbei konnte eine Stimulierung der Fibroblasten Aktivierung durch epidermale SSc Keratinozyten beobachtet werden (De Pieri et al. 2021).

Der Zusammenhang zwischen Fibroblastenaktivierung und SLC7A11/xCT konnte auch in weiteren Krankheitsbildern untersucht werden. Durch Gene-Silencing von *slc7a11* mithilfe von Nanopartikeln konnte ein reduzierter fibrotischer Phänotyp in Gewebe von duktalem Pankreasadenokarzinomen beobachtet werden. Zuvor zeigte sich eine Überregulierung von *slc7a11* in Fibroblasten, die aus karzinösem Pankreasgewebe isoliert wurden (Sharbeen et al. 2021). Eine Inaktivierung des xCT Antiporters in hepatischen Sternzellen führte zur Einschränkung der Myofibroblastenaktivität und somit zur einer Reduzierung der Leberfibrose (Du et al. 2021).

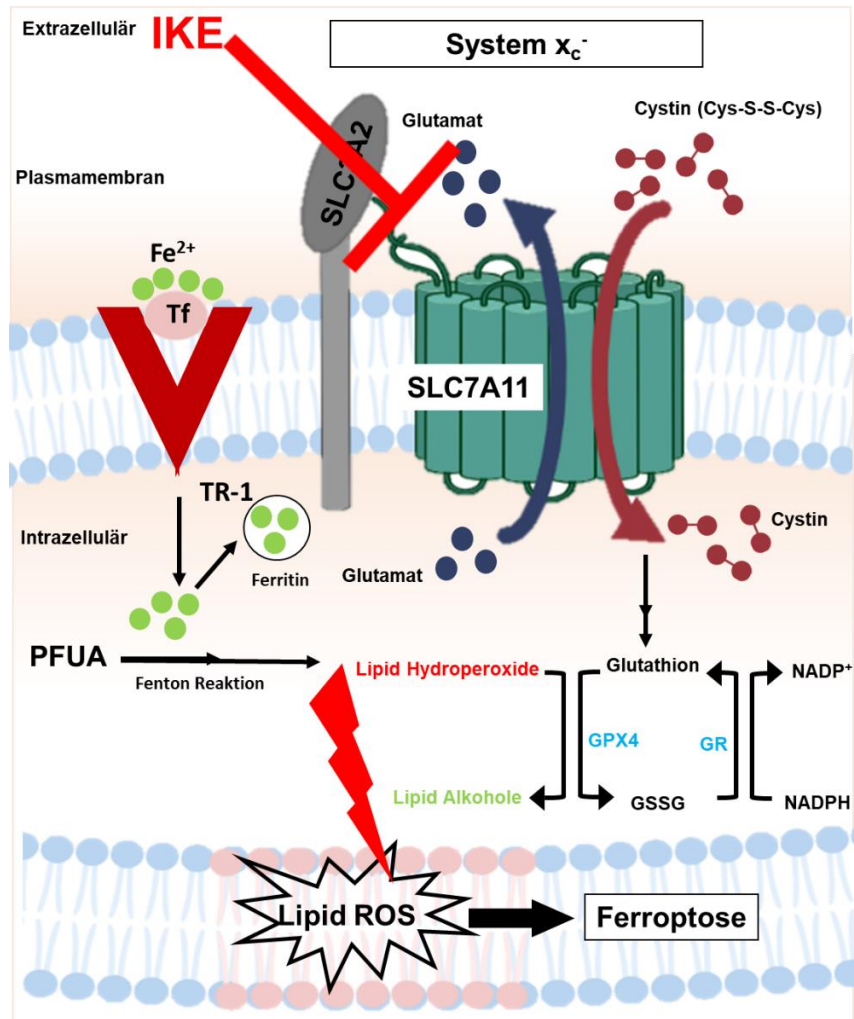
Die Stimulation von SSc Fibroblasten mit HOCl, regte deren proliferative Kapazität an (Maria et al. 2018). Auch in WT Mäusen konnten wir dies nachweisen und mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie außerdem zeigen, dass HOCl-Fibroblasten vermehrt  $\alpha$ -SMA und Vimentin exprimieren und somit im Vergleich zur PBS-Gruppe aktiviert werden. In embryonalen Fibroblasten, die aus einem xCT Knockout gewonnen wurden, konnte vermehrt Ferroptose beobachtet werden (Sato et al. 2005) und die Deletion des *slc7a11* Gens in Pankreaskarzinom Zellen (PDAC) führte zu einer Tumor-selektiven Ferroptose (Badgley et al. 2020). Meira et al. konnten zeigen, dass eine Depletion des xCT-Transporters zu einer Inhibierung der GSH Synthese und zu einem, erstmals 2012 beschriebenen, Zelltod in Pankreaskarzinomzellen (PDAC) führt: der Ferroptose. Im weiteren Verlauf ihrer Studien zeigte sich, dass durch natriumabhängige Transporter für neutrale Aminosäuren (SNATs)

## Diskussion

und exzitatorische Aminosäure-Transporter (EAATs) ebenfalls Cystin in PDAC Zellen transportiert wird (Meira et al., 2021).

Du et al. konnten 2021 bereits zeigen, dass die Inhibierung von xCT zu einer reduzierten Leberfibrose führt. In ihrer Studie legten sie dar, dass Myofibroblasten durch das Fehlen des Antiporters durch Ferroptose sterben (Du et al. 2021). In dieser Arbeit konnte ich außerdem durch die Verwendung eines xCT Inhibitors, Imidazol Keton Erastin (IKE), HOCl induzierte Kollagenakkumulation verhindern. IKE ist ein carbonylhaltiges Erastin Analog, das durch seine nanomolare Potenz, hohe Stoffwechselstabilität und gute Wasserlöslichkeit eine verbesserte Wirksamkeit gegenüber Erastin gezeigt hat und bereits in mehreren Studien zur Hemmung des  $x_c^-$ -Systems in Mäusen angewandt wurde (Y. Zhang et al. 2019) (Jyotsana, Ta, and DelGiorno 2022) (Yan et al. 2022).

IKE verhindert den Import von Cystin in die Zelle durch die Blockierung des  $x_c^-$  Proteinkomplexes. Als Konsequenz wird Cystin nicht mehr durch den Antiporter in die Zelle transportiert und somit kein Cystein hergestellt, sodass die Konzentration von intrazellulärem GSH verringert wird (Yan et al. 2022). Da GSH einen wichtigen Cofaktor für die GPX4 darstellt, wird die Aktivität von GPX4 eingeschränkt und es kommt zur Akkumulation von Lipidperoxiden. Lipidhydroperoxide können nicht mehr in adäquaten Mengen in Lipidalkohole, mithilfe der GPX4 umgewandelt werden, und als Konsequenz findet durch die Akkumulation von Lipidperoxiden eine sogenannte Lipidperoxidation der Membran statt. Dies führt zur Störung der Membran Integrität und Fluidität und somit zu Ferroptose der Zelle (Y. Zhang et al. 2019). Die Entstehung von Lipidoxiden ist außerdem Eisenabhängig. Die Inhibierung des  $x_c^-$ -Systems und der damit einhergehenden Einleitung des ferroptotischen Zelltods wurde bisher in Lymphom Mausmodellen beobachtet und führte zu einer Reduzierung des Tumorwachstums (Y. Zhang et al. 2019). Außerdem konnte durch die Verwendung von Sorafenib, einem weiteren xCT Inhibitor, eine Induktion von Ferroptose in murinen HSC Zellen und einer damit einhergehend Reduzierung der murinen Leberfibrose erreicht werden (Z. Zhang et al. 2018).



5.

Abbildung 33: Inhibition des xC<sup>-</sup>-Systems durch Imidazol Keton Erastin (verändert nach (Koppula, Zhuang, and Gan 2021))

Graphisch dargestellt ist der Zusammenhang des xC<sup>-</sup>-Systems und intrazellulärem Eisen mit der Generierung von Lipidperoxiden und ferroptotischen Zelltod als Konsequenz. GPX4: Glutathion Peroxidase, GR: Glutathion Reduktase, GSSG: oxidiertes Glutathion, TR-1: Transferrin-Rezeptor, Tf: Transferrin, PFUA: polyungesättigte Fettsäuren, IKE: Imidazol Keton Erastin.

Diese Arbeit legt den Schluss nahe, dass durch die Überexpression des xCT-Moleküls in SSc und experimenteller Hautfibrose eine Hypoproliferation und Zelltodresistenz erreicht wird. Die Induktion des ferroptotischen Zelltods könnte somit ein therapeutisches Ziel antifibrotischer Ansätze darstellen. Die Ergebnisse deuten an, dass ferroptotischer Zelltod oder verminderte Proliferation dermalen Fibroblasten hierbei die Ursache für eine reduzierte Fibrose ist. Ungeklärt bleiben die genaue Rolle des Glutathions, der Glutathion Peroxidase und der Glutathion Reduktase in xCT-defizienten Mäusen und deren Beitrag zur Lipidperoxidation. Des Weiteren stellt der Zusammenhang zwischen Ferroptose und der allgemeinen Eisen-Defizienz bei SSc Patient/innen einen wichtigen Aspekt im ferroptotischen Zelltod dar (Wielosz and Majdan 2020), denn Ferroptose wird durch eine gestörte Redox &

## Diskussion

Eisen Homöostase charakterisiert und durch eine von Eisen generierte Lipid Peroxidation wird Ferroptose induziert.

Obwohl IKE bereits gute Ergebnisse in murinen Studien gezeigt hat in Bezug auf seine Verträglichkeit und auch xCT/SLC7A11 KO Tiere ein gering auffälligen Phänotyp aufzeigen, sind mögliche Toxizität oder Nebeneffekte einer systemischen Inhibierung des  $x_c^-$ -Systems in Patient/innen nicht auszuschließen. Eine Veränderung der Galenik des IKE in z.B. nanopartikuläre Strukturen, um Nebeneffekte und bessere Gewebsretention zu erreichen wäre sinnvoll. Es besteht also weiterhin Forschungsbedarf in der Formulierung und Indikation von IKE im Menschen, das bis dato nur in Mäusen angewendet wurde. Humane Mausmodelle eignen sich hierfür ideal zur Weiterentwicklung einer translationalen Therapiemethode für SSc Patient/innen. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass dermale Fibroblasten durch die Inhibierung des  $x_c^-$ -Systems in den ferroptotischen Zelltod übergehen. Somit könnte einer der dominantesten Faktoren in der SSc Pathogenese, die Ausbildung einer Fibrose, durch Induktion von ferroptotischen Zelltod in Fibroblasten verringert werden. In wieweit sich IKE, Sorafenib und andere Ferroptose-Induktoren als Therapeutika bei SSc eignen, könnte in präklinischen Studien untersucht werden.

## 5. Abstract

Systemic sclerosis (SSc) is a rheumatic, autoimmune systemic disease and is characterised by three pathophysiological features: Vasculopathy, inflammation and fibrosis. Endothelial damage triggers an inflammatory response with myeloid immune cell infiltration leading to the release of ROS in immune cells but also skin cells such as fibroblasts. Fibroblasts play an important role in the production of ECM proteins and thus in fibrotic processes. Our RNA sequencing studies of SSc skin compared to healthy skin showed overexpression of genes involved in extracellular matrix synthesis (*col1a2*, *adam8*, *adamts2*) and the *slc7a11* gene. This gene codes for the SLC7A11 subunit of the x<sub>c</sub><sup>-</sup>-system, an antiporter that plays an essential role in the regulation of intracellular ROS and thus the redox balance of cells. It transports cystine, a limiting factor for glutathione synthesis, into the cell against glutamate. Due to the disturbed redox balance caused by the absence of the xCT antiporter, it was assumed that xCT KO mice develop increased fibrosis. Surprisingly, xCT KO mice showed both lower accumulation of collagen in the dermis and lower myofibroblast activation after repetitive HOCl injections. Flow cytometric analysis showed little change in myeloid immune cell infiltrate and macrophage frequency in xCT KO mice. In vitro xCT KO fibroblasts had limited viability and proliferation could only be cultured in low cell numbers. To test a skin-specific fibrosis phenotype, wild-type ears were transplanted into xCT KO recipient animals and vice versa. After a wound healing period, fibrosis was induced by HOCl application and the xCT KO transplant retained its fibrosis resistance, while increased fibrosis was measured again in the wild-type transplant. In addition, application of imidazole ketone erastin (IKE) xCT inhibited fibrosis in wild-type animals and induced fibrosis in the chemically induced mouse model, thereby effectively preventing HOCl-induced collagen accumulation in IKE-treated WT mice. The results suggest that ferroptotic cell death and reduced proliferation of dermal fibroblasts are the cause of reduced fibrosis. xCT inhibitors, such as IKE, represent a possible therapeutic option in SSc patients and Inhibition of SLC7A11 is defined in this work as a therapeutic target for SSc.

## 6. Zusammenfassung

Systemische Sklerose (SSc) ist eine rheumatische, autoimmune Systemerkrankung und durch drei pathophysiologische Eigenschaften gekennzeichnet: Vaskulopathie, Entzündung und Fibrose. Durch Endothelschäden wird eine Entzündungsreaktion mit myeloider Immunzellinfiltration ausgelöst, die zur Freisetzung von ROS in Immunzellen, aber auch Hautzellen wie Fibroblasten, führt. Dabei spielen Fibroblasten eine wichtige Rolle in der Produktion der ECM Proteine und somit in fibrotischen Prozessen. Unsere Untersuchungen von RNA Sequenzierungen der SSc Haut im Vergleich zu gesunder Haut zeigten eine Überexpression von Genen, die an der Synthese der extrazellulären Matrix beteiligt sind (*col1a2*, *adam8*, *adamts2*) und des *slc7a11* Gens. Dieses Gen kodiert für die SLC7A11 Untereinheit des  $x_c^-$ -Systems, einen Antiporter, der eine essenzielle Rolle in der Regulation von intrazellulärem ROS und somit der Redox Balance von Zellen spielt. Dabei transportiert er Cystin, ein limitierender Faktor für die Glutathionsynthese, gegen Glutamat in die Zelle. Aufgrund der gestörten Redox Balance durch das Fehlen des xCT Antiporters lag die Vermutung nahe, dass xCT KO Mäuse eine verstärkte Fibrose ausbilden. Überraschenderweise wiesen xCT KO Mäuse nach repetitiven HOCl-Injektionen sowohl eine geringere Akkumulation von Kollagen in der Dermis als auch eine geringere Myofibroblastenaktivierung auf. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte nur wenig Änderung im myeloiden Immunzellinfiltrat und der Makrophagenfrequenz in xCT KO Mäusen. xCT KO Fibroblasten waren *in vitro* nur begrenzt lebens- und proliferationsfähig. Zur Überprüfung eines hautspezifischen Fibrosephänotyps wurden Wildtyp Ohren auf xCT KO Empfängertiere transplantiert und vice versa. Nach einer Wundheilungsphase wurde mithilfe von HOCl-Applikation Fibrose ausgelöst und das xCT KO-Transplantat behielt seine Fibroseresistenz, während beim Wildtyp-Transplantat erneut eine verstärkte Fibrose gemessen werden konnte. Außerdem wurde durch die Applikation von Imidazol Keton Erastin (IKE) xCT in Wildtyp Tieren inhibiert und verhinderte effektiv die HOCl-induzierte Kollagenakkumulation. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass ferroptotischer Zelltod und verminderte Proliferation dermalen Fibroblasten hierbei die Ursache für eine reduzierte Fibrose ist. Eine Inhibition des SLC7A11 ist somit in dieser Arbeit als therapeutisches Ziel für SSc definiert worden.

## 7. Literaturverzeichnis

### 7. Literaturverzeichnis

- Abdulle, Amaal E. et al. 2018. 'The Role of Oxidative Stress in the Development of Systemic Sclerosis Related Vasculopathy'. *Frontiers in Physiology* 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.01177> (April 25, 2022).
- Abreu-Velez, Ana Maria, and Michael S Howard. 2012. 'Collagen IV in Normal Skin and in Pathological Processes'. *North American Journal of Medical Sciences* 4(1): 1–8.
- Al-Adwi, Yehya et al. 2023. 'Macrophages as Determinants and Regulators of Fibrosis in Systemic Sclerosis'. *Rheumatology* 62(2): 535–45.
- Alexa, Adrian, and Jorg Rahnenfuhrer. 2022. 'TopGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology'. <https://bioconductor.org/packages/topGO/> (April 26, 2022).
- Arensman, Michael D. et al. 2019. 'Cystine–Glutamate Antiporter XCT Deficiency Suppresses Tumor Growth While Preserving Antitumor Immunity'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(19): 9533–42.
- Aringer, Martin et al. 2022. '[Modern drug therapy for systemic sclerosis associated interstitial lung disease]'. *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)* 147(4): 179–86.
- Artlett, Carol M. 2014. 'Animal Models of Systemic Sclerosis: Their Utility and Limitations'. *Open Access Rheumatology: Research and Reviews* 6: 65–81.
- Badgley, Michael A. et al. 2020. 'Cysteine Depletion Induces Pancreatic Tumor Ferroptosis in Mice'. *Science (New York, N.Y.)* 368(6486): 85–89.
- Bairkdar, Majd et al. 2021. 'Incidence and Prevalence of Systemic Sclerosis Globally: A Comprehensive Systematic Review and Meta-Analysis'. *Rheumatology* 60(7): 3121–33.
- Ballatori, Nazzareno et al. 2009. 'Glutathione Dysregulation and the Etiology and Progression of Human Diseases'. *Biological Chemistry* 390(3): 191–214.
- Bannai, Shiro, Hohko Tsukeda, and Hideo Okumura. 1977. 'Effect of Antioxidants on Cultured Human Diploid Fibroblasts Exposed to Cystine-Free Medium'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 74(4): 1582–88.
- Bergamasco, Aurore, Nadine Hartmann, Laura Wallace, and Patrice Verpillat. 2019. 'Epidemiology of Systemic Sclerosis and Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease'. *Clinical Epidemiology* 11: 257–73.
- Bochaton-Piallat, Marie-Luce, Giulio Gabbiani, and Boris Hinz. 2016. 'The Myofibroblast in Wound Healing and Fibrosis: Answered and Unanswered Questions'. *F1000Research* 5: F1000 Faculty Rev-752.

## 7. Literaturverzeichnis

- Campochiaro, Corrado, and Yannick Allanore. 2021. 'An Update on Targeted Therapies in Systemic Sclerosis Based on a Systematic Review from the Last 3 Years'. *Arthritis Research & Therapy* 23(1): 155.
- Careta, Mariana Figueiroa, and Ricardo Romiti. 2015. 'Localized Scleroderma: Clinical Spectrum and Therapeutic Update'. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 90(1): 62–73.
- Chaudhari, Kiran et al. 2020. 'ApoE Genotype-Dependent Response to Antioxidant and Exercise Interventions on Brain Function'. *Antioxidants* 9(6): 553.
- Chen, Xin, Chunhua Yu, Rui Kang, and Daolin Tang. 2020. 'Iron Metabolism in Ferroptosis'. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 590226.
- Chitturi, Ravi Teja et al. 2015. 'The Role of Myofibroblasts in Wound Healing, Contraction and Its Clinical Implications in Cleft Palate Repair'. *Journal of International Oral Health : JIOH* 7(3): 75–80.
- De Almeida Chaves, Sébastien et al. 2021. 'Sine Scleroderma, Limited Cutaneous, and Diffused Cutaneous Systemic Sclerosis Survival and Predictors of Mortality'. *Arthritis Research & Therapy* 23: 295.
- De Pieri, Andrea, Benjamin D. Korman, Astrid Jüngel, and Karin Wuertz-Kozak. 2021. 'Engineering Advanced In Vitro Models of Systemic Sclerosis for Drug Discovery and Development'. *Advanced Biology* 5(4): 2000168.
- De Silva, Upendra, Upendra De Silva, and Lawrence Charles Parish. 1994. 'Historical Approach to Scleroderma'. *Clinics in Dermatology* 12(2): 201–5.
- Dixon, Scott J. et al. 2012. 'Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death'. *Cell* 149(5): 1060–72.
- Doridot, Ludivine, Mohamed Jeljeli, Charlotte Chêne, and Frédéric Batteux. 2019. 'Implication of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis via Inflammation, Autoimmunity and Fibrosis'. *Redox Biology* 25: 101122.
- Du, Kuo et al. 2021. 'Inhibiting XCT/SLC7A11 Induces Ferroptosis of Myofibroblastic Hepatic Stellate Cells but Exacerbates Chronic Liver Injury'. *Liver International* 41(9): 2214–27.
- Fabregat, Antonio et al. 2018. 'The Reactome Pathway Knowledgebase'. *Nucleic Acids Research* 46(D1): D649–55.
- Faraci, Elena et al. 2003. 'An Extracellular Matrix-Specific Microarray Allowed the Identification of Target Genes Downstream of Discoidin Domain Receptors'. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 22(4): 373–81.
- Farina, G., D. Lafyatis, R. Lemaire, and R. Lafyatis. 2010. 'A Four-Gene Biomarker Predicts Skin Disease in Patients with Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis'. *Arthritis and Rheumatism* 62(2): 580–88.

## 7. Literaturverzeichnis

- Feng, Huizhong, and Brent R. Stockwell. 2018. 'Unsolved Mysteries: How Does Lipid Peroxidation Cause Ferroptosis?' *PLoS biology* 16(5): e2006203.
- Florez-Sampedro, Laura, Shanshan Song, and Barbro N. Melgert. 2018. 'The Diversity of Myeloid Immune Cells Shaping Wound Repair and Fibrosis in the Lung'. *Regeneration* 5(1): 3–25.
- Frangogiannis, Nikolaos G. 2020. 'Transforming Growth Factor- $\beta$  in Tissue Fibrosis'. *The Journal of Experimental Medicine* 217(3): e20190103.
- Garrod, Kym R., and Michael D. Cahalan. 2008. 'Murine Skin Transplantation'. *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (11): 634.
- Geer, Lewis Y. et al. 2010. 'The NCBI BioSystems Database'. *Nucleic Acids Research* 38(Database issue): D492-496.
- Geiss, Gary K. et al. 2008. 'Direct Multiplexed Measurement of Gene Expression with Color-Coded Probe Pairs'. *Nature Biotechnology* 26(3): 317–25.
- Gharaee-Kermani, Mehrnaz et al. 2012. 'CXC-Type Chemokines Promote Myofibroblast Phenoconversion and Prostatic Fibrosis'. *PloS One* 7(11): e49278.
- Gibb, Andrew A., Michael P. Lazaropoulos, and John W. Elrod. 2020. 'Myofibroblasts and Fibrosis-Mitochondrial and Metabolic Control of Cellular Differentiation'. *Circulation research* 127(3): 427–47.
- Haub, Jessica et al. 2019. 'Intervention of Inflammatory Monocyte Activity Limits Dermal Fibrosis'. *The Journal of Investigative Dermatology* 139(10): 2144–53.
- He, Jiajun et al. 2021. 'Intra-Tumoral Expression of SLC7A11 Is Associated with Immune Microenvironment, Drug Resistance, and Prognosis in Cancers: A Pan-Cancer Analysis'. *Frontiers in Genetics* 12: 770857.
- Hennig, Christian. 2020. 'Fpc: Flexible Procedures for Clustering'. <https://CRAN.R-project.org/package=fpc> (April 26, 2022).
- Juhl, Pernille et al. 2020. 'Type III, IV, and VI Collagens Turnover in Systemic Sclerosis – a Longitudinal Study'. *Scientific Reports* 10(1): 7145.
- Jyotsana, Nidhi, Kenny T. Ta, and Kathleen E. DelGiorno. 2022. 'The Role of Cystine/Glutamate Antiporter SLC7A11/XCT in the Pathophysiology of Cancer'. *Frontiers in Oncology* 12: 858462.
- Kania, Gabriela, Michal Rudnik, and Oliver Distler. 2019. 'Involvement of the Myeloid Cell Compartment in Fibrogenesis and Systemic Sclerosis'. *Nature Reviews. Rheumatology* 15(5): 288–302.
- Kasprzycka, M, C Hammarström, and G Haraldsen. 2015. 'Tenascins in Fibrotic Disorders—from Bench to Bedside'. *Cell Adhesion & Migration* 9(1–2): 83–89.

## 7. Literaturverzeichnis

- Kendall, Ryan T., and Carol A. Feghali-Bostwick. 2014. 'Fibroblasts in Fibrosis: Novel Roles and Mediators'. *Frontiers in Pharmacology* 5. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2014.00123> (May 18, 2022).
- Kobayashi, Sho et al. 2018. 'Cystine/Glutamate Transporter, System Xc-, Is Involved in Nitric Oxide Production in Mouse Peritoneal Macrophages'. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 78: 32–40.
- Koçak, Ayse et al. 2019. 'Antioxidant Effect of Epigallocatechin-3-Gallate in a Bleomycin-Induced Scleroderma Model'. *Archives of Rheumatology* 34(1): 001–008.
- Kolb, Martin, Bruno Crestani, and Toby M. Maher. 2023. 'Phosphodiesterase 4B Inhibition: A Potential Novel Strategy for Treating Pulmonary Fibrosis'. *European Respiratory Review* 32(167). <https://err.ersjournals.com/content/32/167/220206> (March 4, 2023).
- Koppula, Pranavi, Yilei Zhang, Li Zhuang, and Boyi Gan. 2018. 'Amino Acid Transporter SLC7A11/XCT at the Crossroads of Regulating Redox Homeostasis and Nutrient Dependency of Cancer'. *Cancer Communications* 38: 12.
- Koppula, Pranavi, Li Zhuang, and Boyi Gan. 2021. 'Cystine Transporter SLC7A11/XCT in Cancer: Ferroptosis, Nutrient Dependency, and Cancer Therapy'. *Protein & Cell* 12(8): 599–620.
- LeRoy, E. C., and T. A. Medsger. 2001. 'Criteria for the Classification of Early Systemic Sclerosis'. *The Journal of Rheumatology* 28(7): 1573–76.
- Lewerenz, Jan et al. 2013. 'The Cystine/Glutamate Antiporter System Xc- in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Opportunities'. *Antioxidants & Redox Signaling* 18(5): 522–55.
- Li, Jie et al. 2020. 'Ferroptosis: Past, Present and Future'. *Cell Death & Disease* 11(2): 88.
- Li, Sijia et al. 2022. 'The Role of SLC7A11 in Cancer: Friend or Foe?' *Cancers* 14(13): 3059.
- Lin, Wenyu et al. 2020. 'SLC7A11/XCT in Cancer: Biological Functions and Therapeutic Implications'. *American Journal of Cancer Research* 10(10): 3106–26.
- Liu, Xian et al. 2022. 'SLC7A11/GPX4 Inactivation-Mediated Ferroptosis Contributes to the Pathogenesis of Triptolide-Induced Cardiotoxicity'. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2022: 3192607.
- Maria, Alexandre T. J. et al. 2018. 'Fibrosis Development in HOCl-Induced Systemic Sclerosis: A Multistage Process Hampered by Mesenchymal Stem Cells'. *Frontiers in Immunology* 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02571> (June 2, 2022).

## 7. Literaturverzeichnis

- McCoy, Sara S et al. 2017. 'Scleroderma Keratinocytes Promote Fibroblast Activation Independent of Transforming Growth Factor Beta'. *Rheumatology (Oxford, England)* 56(11): 1970–81.
- Mehling, Roman et al. 2021. 'Immunomodulatory Role of Reactive Oxygen Species and Nitrogen Species during T Cell-Driven Neutrophil-Enriched Acute and Chronic Cutaneous Delayed-Type Hypersensitivity Reactions'. *Theranostics* 11(2): 470–90.
- Meng, Meng et al. 2019. 'The Fibrosis and Immunological Features of Hypochlorous Acid Induced Mouse Model of Systemic Sclerosis'. *Frontiers in Immunology* 10: 1861.
- Mitchell, Alex L. et al. 2019. 'InterPro in 2019: Improving Coverage, Classification and Access to Protein Sequence Annotations'. *Nucleic Acids Research* 47(D1): D351–60.
- Muecklich, Sabrina et al. 2023. 'DKK3 Promotes Oxidative Stress–Induced Fibroblast Activity'. *The Journal of Investigative Dermatology* 143(6): 1088-1090.e2.
- Mukai, Kaori, Mindy Tsai, Hirohisa Saito, and Stephen J. Galli. 2018. 'Mast Cells as Sources of Cytokines, Chemokines and Growth Factors'. *Immunological reviews* 282(1): 121–50.
- Murray, Peter J., and Thomas A. Wynn. 2011. 'Protective and Pathogenic Functions of Macrophage Subsets'. *Nature Reviews. Immunology* 11(11): 723–37.
- Murrell, Dédée F. 1993. 'A Radical Proposal for the Pathogenesis of Scleroderma'. *Journal of the American Academy of Dermatology* 28(1): 78–85.
- Peoples, Christine et al. 2016. 'Gender Differences in Systemic Sclerosis: Relationship to Clinical Features, Serologic Status and Outcomes'. *Journal of scleroderma and related disorders* 1(2): 177–240.
- Perricone, Carlo, Caterina De Carolis, and Roberto Perricone. 2009. 'Glutathione: A Key Player in Autoimmunity'. *Autoimmunity Reviews* 8(8): 697–701.
- Pfisterer, Karin, Lisa E. Shaw, Dörte Symmank, and Wolfgang Weninger. 2021. 'The Extracellular Matrix in Skin Inflammation and Infection'. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2021.682414> (May 17, 2022).
- Phan, Sem H. 2008. 'Biology of Fibroblasts and Myofibroblasts'. *Proceedings of the American Thoracic Society* 5(3): 334–37.
- Piera-Velazquez, Sonsoles, and Sergio A. Jimenez. 2021. 'Oxidative Stress Induced by Reactive Oxygen Species (ROS) and NADPH Oxidase 4 (NOX4) in the Pathogenesis of the Fibrotic Process in Systemic Sclerosis: A Promising Therapeutic Target'. *Journal of Clinical Medicine* 10(20): 4791.
- Postlethwaite, Arnold E. et al. 2010. 'Pharmacotherapy of Systemic Sclerosis'. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 11(5): 789–806.

## 7. Literaturverzeichnis

- Quaresma, Juarez Antonio Simões. 2019. 'Organization of the Skin Immune System and Compartmentalized Immune Responses in Infectious Diseases'. *Clinical Microbiology Reviews* 32(4): e00034-18.
- Raker, Verena et al. 2017. 'Early Inflammatory Players in Cutaneous Fibrosis'. *Journal of Dermatological Science* 87(3): 228–35.
- Raker, Verena K. et al. 2016. 'Myeloid Cell Populations and Fibrogenic Parameters in Bleomycin- and HOCl-Induced Fibrosis'. *Experimental Dermatology* 25(11): 887–94.
- Ramos-e-Silva, Marcia, and Claudio de-Moura-Castro Jacques. 2012. 'Epidermal Barrier Function and Systemic Diseases'. *Clinics in Dermatology* 30(3): 277–79.
- Renz-Polster, Herbert, and Sven-Philip Aries, eds. 2006. *Basislehrbuch Innere Medizin: kompakt - greifbar - verständlich: [Online-Zugang + interaktive Extras www.studentconsult.de]*. 3. Aufl., 1. Nachdr. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Rudnik, Michał et al. 2021. 'Elevated Fibronectin Levels in Profibrotic CD14+ Monocytes and CD14+ Macrophages in Systemic Sclerosis'. *Frontiers in Immunology* 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.642891> (March 4, 2023).
- Russo, Barbara, Nicolò C. Brembilla, and Carlo Chizzolini. 2020. 'Interplay Between Keratinocytes and Fibroblasts: A Systematic Review Providing a New Angle for Understanding Skin Fibrotic Disorders'. *Frontiers in Immunology* 11: 648.
- Sambo, P. et al. 2001. 'Oxidative Stress in Scleroderma: Maintenance of Scleroderma Fibroblast Phenotype by the Constitutive up-Regulation of Reactive Oxygen Species Generation through the NADPH Oxidase Complex Pathway'. *Arthritis and Rheumatism* 44(11): 2653–64.
- Sato, Hideyo et al. 2005. 'Redox Imbalance in Cystine/Glutamate Transporter-Deficient Mice'. *The Journal of Biological Chemistry* 280(45): 37423–29.
- Servettaz, Amélie et al. 2009. 'Selective Oxidation of DNA Topoisomerase 1 Induces Systemic Sclerosis in the Mouse'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182(9): 5855–64.
- Sharbeen, George et al. 2021. 'Cancer-Associated Fibroblasts in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Determine Response to SLC7A11 Inhibition'. *Cancer Research* 81(13): 3461–79.
- Slenter, Denise N et al. 2018. 'WikiPathways: A Multifaceted Pathway Database Bridging Metabolomics to Other Omics Research'. *Nucleic Acids Research* 46(D1): D661–67.
- Song, Wenxin et al. 2020. 'Solute Carrier Transporters: The Metabolic Gatekeepers of Immune Cells'. *Acta Pharmaceutica Sinica. B* 10(1): 61–78.

## 7. Literaturverzeichnis

- Sticherling, Michael. 2019. 'Systemische Sklerodermie – die dermatologische Sicht'. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 17(7): 716–29.
- Stipanuk, Martha H., John E. Dominy, Jeong-In Lee, and Relicardo M. Coloso. 2006. 'Mammalian Cysteine Metabolism: New Insights into Regulation of Cysteine Metabolism'. *The Journal of Nutrition* 136(6 Suppl): 1652S-1659S.
- Storkanova, Hana, and Michal Tomcik. 2017. Systemic Sclerosis *Animal Models of Systemic Sclerosis*. IntechOpen. <https://www.intechopen.com/chapters/55079> (April 26, 2022).
- Subramanian, Aravind et al. 2005. 'Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(43): 15545–50.
- Sun, Yun, Yingfeng Zheng, Chunxiao Wang, and Yizhi Liu. 2018. 'Glutathione Depletion Induces Ferroptosis, Autophagy, and Premature Cell Senescence in Retinal Pigment Epithelial Cells'. *Cell Death & Disease* 9(7): 1–15.
- Tabib, Tracy et al. 2021. 'Myofibroblast Transcriptome Indicates SFRP2hi Fibroblast Progenitors in Systemic Sclerosis Skin'. *Nature Communications* 12(1): 4384.
- Thuan, Duong Thi Bich et al. 2018. 'A Potential Link Between Oxidative Stress and Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis'. *Frontiers in Immunology* 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01985> (May 17, 2022).
- Tracy, Lauren E., Raquel A. Minasian, and E.J. Caterson. 2016. 'Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound'. *Advances in Wound Care* 5(3): 119–36.
- Vona, Rosa et al. 2018. 'Oxidative Stress in the Pathogenesis of Systemic Scleroderma: An Overview'. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 22(7): 3308–14.
- Wang, Guoping et al. 2020. 'Assessment of Para-Inflammation in a Wound Healing Model'. *Experimental and Therapeutic Medicine* 20(1): 655–61.
- Wells, Rebecca G. 2022. 'How Collagen Becomes “Stiff”'. *eLife* 11: e77041.
- Wielosz, Ewa, and Maria Majdan. 2020. 'Haematological Abnormalities in Systemic Sclerosis'. *Reumatologia* 58(3): 162–66.
- Wynn, TA. 2008. 'Cellular and Molecular Mechanisms of Fibrosis'. *The Journal of pathology* 214(2): 199–210.
- Yan, Renhong et al. 2022. 'The Structure of Erastin-Bound XCT–4F2hc Complex Reveals Molecular Mechanisms Underlying Erastin-Induced Ferroptosis'. *Cell Research*: 1–4.
- Yang, Changyi et al. 2020. 'Classical Disease-Specific Autoantibodies in Systemic Sclerosis: Clinical Features, Gene Susceptibility, and Disease Stratification'.

## 7. Literaturverzeichnis

- Frontiers in Medicine* 7.  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2020.587773> (May 17, 2022).
- Yousef, Hani, Mandy Alhadj, and Sandeep Sharma. 2022. 'Anatomy, Skin (Integument), Epidermis'. In *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/> (February 8, 2022).
- Zhang, Yan et al. 2019. 'Imidazole Ketone Erastin Induces Ferroptosis and Slows Tumor Growth in a Mouse Lymphoma Model'. *Cell Chemical Biology* 26(5): 623-633.e9.
- Zhang, Zili et al. 2018. 'Activation of Ferritinophagy Is Required for the RNA-Binding Protein ELAVL1/HuR to Regulate Ferroptosis in Hepatic Stellate Cells'. *Autophagy* 14(12): 2083–2103.
- Zhou, Xuan et al. 2023. 'Metabolomics Analysis Reveals Cytotoxic Effects of Ouabain towards Psoriatic Keratinocytes via Impairment of Glutathione Metabolism'. *Molecular Genetics and Genomics* 298(3): 567–77.
- Zorov, Dmitry B., Magdalena Juhaszova, and Steven J. Sollott. 2014. 'Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release'. *Physiological Reviews* 94(3): 909–50.

### III. Tabellenverzeichnis

#### **III. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Liste der Laborgeräte.....	16
Tabelle 2: Liste der Verbrauchsmittel. ....	17
Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien, Medikamente und Enzyme.....	18
Tabelle 4: Liste der verwendeten Puffer, Kits und Assays.....	19
Tabelle 5: Liste der verwendeten FACS-Antikörper.....	20
Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper für histologische Analysen.....	21

## IV. Abbildungsverzeichnis

### **IV. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Pathogenese der Systemischen Sklerose (erstellt mit Biorender). .....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zusammenspiels von reaktiven Sauerstoffspezies in der Pathogenese der systemischen Sklerose (verändert nach (Abdulle et al. 2018)).....	7
Abbildung 3:Struktur und Funktion des System $x_c^-$ (verändert nach Koppula et al., 2021 - erstellt mit biorender.com).....	13
Abbildung 4:Pathophysiologische Faktoren der Systemischen Sklerose in verschiedenen Mausmodellen.....	14
Abbildung 5: Strukturformel des L-012 im angeregten Zustand und im Grundzustand. ....	22
Abbildung 6: Isolation von Fibroblasten aus Mausohren (erstellt mit biorender.com)27	
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Hybridisierungskomplexes der Adaptersonde und Reportersonde mit der RNA Zielsequenz (verändert nach Geiss et al. 2008). ....	30
Abbildung 8: Versuchsaufbau und Transplantationsschema von Spenderohren auf Empfängermause mit WT und xCT KO Mäusen (mit biorender.com erstellt). ...	32
Abbildung 9: Heatmap der Genexpression von Sklerodermie Patient/innen und Proband/innen im Vergleich. ....	34
Abbildung 10: Injektionsschema des chemisch induzierten Mausmodells mit Hypochlorsäure für 7 und 28 Tage. ....	36
Abbildung 11: ROS-Detektion mithilfe von L-012 nach 15 Tagen <i>in vivo</i> . ....	36
Abbildung 12: Messergebnisse des Glutathion/ Glutathiondisulfid Assays in CD45 <sup>+</sup> und CD45 <sup>-</sup> Zellen von WT und xCT KO Mäusen. Die Daten erreichten keine statistische Signifikanz. ....	38
Abbildung 13:Durchflusszytometrische Analyse des dermalen Infiltrats nach 7 Tagen. ....	40
Abbildung 14:Durchflusszytometrische Analyse des dermalen Infiltrats nach 28 Tagen. ....	42

#### IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 15: Bestimmung der Hautdicke in Wildtyp) und xCT KO Mäusen nach 28 Tagen PBS-/HOCl-Behandlung.....	44
Abbildung 16: Immunhistochemische Analyse der Haut zur Bestimmung von $\alpha$ -SMA <sup>+</sup> -Zellen im chemisch induzierten Mausmodell nach 28 Tagen. ....	46
Abbildung 17: Genexpressionsanalyse myeloider Gene gezeigt als Volcano Plot und Heatmap für Wildtyp Tiere nach PBS-/HOCl-Behandlung.....	49
Abbildung 18: Genexpressionsanalyse myeloider Gene gezeigt als Volcano Plot und Heatmap für xCT KO Tiere nach PBS-/ HOCl-Behandlung.....	52
Abbildung 19: Vergleich der Genexpression im Bereich der ECM Remodellierung zwischen mit HOCl- behandelten xCT KO und Wildtyp Mäusen .....	53
Abbildung 20: Genexpressionsanalyse fibrotischer Gene gezeigt als Volcano Plot und Heatmap für Wildtyp Tiere nach PBS-/ HOCl-Behandlung.....	55
Abbildung 21: Übersicht differentiell regulierter Gene in WT Mäusen (erstellt mit Biorender.com).....	56
Abbildung 22: Genexpressionsanalyse fibrotischer Gene gezeigt als Volcano Plot (A) und Heatmap (B) für xCT KO Tiere nach PBS-/ HOCl-Behandlung. ....	58
Abbildung 23: Normalisierte Genexpression mit Ferroptose assozierter Gene in WT und xCT KO Haut. ....	59
Abbildung 24: Vergleich der Genexpression im Bereich der ECM Remodellierung und Myofibroblasten Regulation zwischen xCT KO und Wildtyp Mäusen. ....	60
Abbildung 25: Fibroblastenkultur an Tag 3 aufgenommen mit dem Evos M7000.....	62
Abbildung 26: Immunfluoreszenz-Färbung von Wildtyp Fibroblasten.....	63
Abbildung 27: Durchflusszytometrische Analyse von WT und xCT/SLC7A11 KO Fibroblasten an Tag 7.....	64
Abbildung 28: Histologische Analyse fibrotischer Haut nach Verabreichung des IKE Inhibitors/Solvents und Applikation von HOCl in Wildtyp Mäusen. ....	65
Abbildung 29: Immunhistochemische Analyse der Haut zur Bestimmung von $\alpha$ -SMA <sup>+</sup> -Zellen nach Applikation des IKE Inhibitors/Solvent im chemisch induzierten Mausmodell mit HOCl.....	67
Abbildung 30: Wundheilungsprozess von Wildtyp vs xCT KO Transplantaten. ....	68

#### IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 31: Histologische Analyse der Transplantationsversuche mittels Goldner-Trichrom Färbung.....	68
Abbildung 32: Bestimmung des Kollagengehalts in Wildtyp und xCT KO Mäusen mit xCT KO und WT Transplantat nach 14 Tagen HOCl-Behandlung. ....	69
Abbildung 33: Inhibierung des $x_c^-$ - Systems durch Imidazol Keton Erastin (verändert nach (Koppula, Zhuang, and Gan 2021) .....	75

X. Curriculum vitae

**X. Curriculum vitae**

## VI. Danksagung

### VI. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Personen nochmal herzlich bedanken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Betreuerin PD Dr. rer. nat Verena Raker ganz herzlich bedanken. Du hast mir die Chance gegeben über meinen Tellerrand zu schauen und in die Forschungswelt einzutreten. Mit deiner Begeisterungsfähigkeit, deinem Arbeitsethos und deinem umfassenden Wissen hast du mir die Welt der Immunbiologie eröffnet, mich in die Methodik eingearbeitet und es mir ermöglicht ein Teil vieler interessanter Projekte zu sein, neues zu Lernen und in meiner Promotionszeit weiter zu wachsen und mich zu entwickeln. Ich danke dir für dein allzeit offenes Ohr, den wissenschaftlichen Austausch und die Ratschläge in dieser intensiven Zeit. Ich habe dadurch unglaublich viel lernen dürfen.

Prof. Dr. Eckhard Thines danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Und [...] für die bereitwillige Übernahme des zweiten Betreuers.

Besonders möchte ich mich auch bei [...] bedanken, der es mir als Lehramtsstudentin ermöglichte eine Masterarbeit im pharmazeutischen Institut zu schreiben und mir somit den Einstieg in den Forschungsweg zu ermöglichen.

Ein großes Dankeschön geht an die (ehemaligen) Mitarbeiter/innen der Hautklinik Mainz für eure wertvolle Unterstützung und auch der ein oder anderen Aktivität außerhalb des Labors. Ein besonderer Dank geht an [...].

Außerdem möchte ich unseren Kooperationspartnern [...] herzlich für die gemeinsame Arbeit danken.

Anschließend möchte ich mich bei meiner Familie, vor allem meiner Schwester, meinen Freund/innen und meinem Freund für Eure Ermutigungen, Geduld und Euer offenes Ohr bedanken. Ohne Euch wäre diese Arbeit undenkbar gewesen.