

Einfluss des mechanosensitiven Ionenkanals Piezo1
auf die Mediator-Freisetzung in Keratinozyten

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Zahnmedizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Leonie Gloria

aus

Essen

Berichter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Andreas Ludwig
Prof. Dr. med. Jens Baron

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2026

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek
online verfügbar

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Haut	1
1.2	Mechanotransduktion in der Haut	2
1.3	Mechanotransduktion durch mechanosensitive Ionenkanäle	3
1.3.1	Piezol	4
1.3.2	Die Rolle von mechanosensitiven Ionenkanälen in der Wundheilung	5
1.4	ADAM-Proteasen	6
1.5	EGF-Rezeptor	8
2	Zielsetzung	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Materialien	11
3.1.1	Zellen	11
3.1.2	Zellkulturmedien und Zusätze	12
3.1.3	Chemikalien	12
3.1.4	Geräte	13
3.1.5	Stimulatoren und Inhibitoren	14
3.1.6	Kits	14
3.1.7	Puffer und Lösungen	15
3.1.8	Primer	15
3.1.9	Verbrauchsmaterialien	18
3.2	Zellbiologische Methoden	19
3.2.1	Kultivierung von Zelllinien	19
3.2.2	Bestimmung der Lebendzahl	20
3.2.3	Auftauen von Zellen	20
3.3	Molekularbiologische Methoden	20
3.3.1	RNA-Isolation	20
3.3.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	21
3.3.3	cDNA-Synthese	21
3.3.4	Etablierung der qPCR-Primer	21
3.3.5	Auswahl der Referenzgene	23
3.3.6	qPCR	23
3.3.7	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	24
3.4	Statistische Auswertung	25

4 Ergebnisse	26
4.1.1 Einfluss von FBS auf die ADAM-Aktivität und die Freisetzung von Wachstumsfaktoren.....	26
4.1.2 Einfluss von FBS auf Piezo1-abhängige Genexpressionsprofile von Wachstumsfaktoren.....	28
4.1.3 Einfluss von FBS auf die ADAM-Aktivität und die Freisetzung von Entzündungsmediatoren.....	30
4.1.4 Einfluss von FBS auf Piezo1-abhängige Genexpressionsprofile von Entzündungsmediatoren.....	31
4.2 Rekonstitution einzelner Wachstumsfaktoren und der Einfluss auf die ADAM-Aktivität	33
4.2.1 Rekonstitution von TGF α und der Einfluss auf die ADAM-abhängige Freisetzung von AREG und IL-8	33
4.2.2 Einfluss der TGF α -Rekonstitution auf Piezo1-abhängige Genexpressionsprofile.....	34
4.2.3 Rekonstitution von AREG und der Einfluss auf die ADAM-abhängige Freisetzung von IL-8	36
4.2.4 Einfluss der AREG-Rekonstitution auf Piezo1-abhängige Genexpressionsprofile.....	37
4.3 Regulierung der Yoda1-induzierten Antwort durch Inhibition des EGF-Rezeptors	39
4.3.1 Regulierung der AREG-Freisetzung durch eine Cetuximab Konzentrationsreihe	39
4.3.2 Regulierung des Genexpressionsprofil von Wachstumsfaktoren durch Cetuximab	40
4.3.3 Regulierung der Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch Cetuximab	41
4.3.4 Regulierung des Genexpressionsprofils von Entzündungsmediatoren durch Cetuximab	42
4.4 Regulierung der Yoda1-induzierten Antwort durch Inhibition des EGF-Rezeptors und gleichzeitiger Rekonstitution mit AREG	43
4.4.1 Regulierung der Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch Cetuximab und gleichzeitiger Rekonstitution mit AREG	44
4.4.2 Regulierung des Genexpressionsprofils von Wachstumsfaktoren durch Cetuximab und gleichzeitiger Rekonstitution mit AREG.....	45

4.4.3 Regulierung des Genexpressionsprofil von Entzündungsmediatoren durch Cetuximab und gleichzeitiger Rekonstitution mit AREG.....	46
4.5 Validierung der Ergebnisse durch N/TERT-1-Zellen	47
4.5.1 Regulierung der AREG und IL-8 Freisetzung durch Cetuximab in N/TERT-1-Zellen.....	47
4.5.2 Regulierung des Genexpressionsprofils von Wachstumsfaktoren durch Cetuximab in N/TERT-1-Zellen	48
4.5.3 Regulierung des Genexpressionsprofils von Entzündungsmediatoren durch Cetuximab in N/TERT-1-Zellen	50
5 Diskussion.....	52
5.1 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren ..	52
5.2 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren	56
5.3 Einfluss von FBS und GW auf die mRNA-Expression von Galectin-7	59
5.4 Ausblick	60
6 Zusammenfassung.....	62
7 Literaturverzeichnis.....	63
8 Anhang (SAS-Code)	74
Danksagung.....	78
Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung.....	79
Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. 1 und § 11 Abs. 3 12. der Promotionsordnung	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie der Epidermis	2
Abbildung 2: Aufbau ADAM10/17	8
Abbildung 3: FBS-Abhängigkeit der Yoda1-induzierten AREG-Freisetzung	27
Abbildung 4: AREG- Freisetzung nach FBS-freier Kultivierung und ADAM10/17-Inhibierung	28
Abbildung 5: mRNA-Expression von Wachstumsfaktoren nach FBS-freier Kultivierung und ADAM10/17-Inhibierung	29
Abbildung 6: IL-8 Freisetzung nach FBS-freier Kultivierung und ADAM10/17-Inhibierung	30
Abbildung 7: TNFR1 und IL-6R- Freisetzung nach FBS-freier Kultivierung und ADAM10/17 Inhibierung.....	31
Abbildung 8: mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren nach FBS-freier Kultivierung und ADAM10/17-Inhibierung.....	32
Abbildung 9: Freisetzung von AREG und IL-8 nach FBS-freier Kultivierung und Rekonstitution mit $TGF\alpha$	34
Abbildung 10: mRNA-Expression von <i>AREG</i> , <i>HBEGF</i> und <i>TGFA</i> nach FBS-freier Kultivierung und Rekonstitution mit $TGF\alpha$	35
Abbildung 11: mRNA-Expression von <i>CXCL8</i> , <i>IL-1B</i> und <i>IL-6</i> nach FBS freier Kultivierung und Rekonstitution mit $TGF\alpha$	36
Abbildung 12: Freisetzung von IL-8 nach FBS-freier Kultivierung und Rekonstitution mit AREG	37
Abbildung 13: mRNA-Expression von <i>AREG</i> , <i>HBEGF</i> und <i>TGFα</i> nach EGFR-Inhibierung und Rekonstitution mit AREG	38
Abbildung 14: mRNA-Expression von <i>CXCL8</i> , <i>IL-1B</i> und <i>IL-6</i> nach FBS-freier Kultivierung und Rekonstitution mit AREG	39
Abbildung 15: Freisetzung von AREG nach Inhibierung durch Cetuximab	40
Abbildung 16: mRNA-Expression von <i>AREG</i> , <i>HBEGF</i> und <i>TGFα</i> nach Inhibierung durch Cetuximab	41
Abbildung 17: Freisetzung von IL-8 nach Inhibierung durch Cetuximab.....	42
Abbildung 18: mRNA-Expression von <i>CXCL8</i> , <i>IL-1B</i> und <i>IL-6</i> nach Inhibierung durch Cetuximab	43
Abbildung 19: Freisetzung von IL-8 nach Inhibierung durch Cetuximab und Rekonstitution mit AREG	44

Abbildung 20: Genexpression von <i>AREG</i> , <i>HBEGF</i> und <i>TGFA</i> nach Inhibierung durch Cetuximab und Rekonstitution mit AREG	45
Abbildung 21: Genexpression von <i>CXCL8</i> , <i>IL-1B</i> und <i>IL-6</i> nach Inhibierung durch Cetuximab und Rekonstitution mit AREG	46
Abbildung 22: Freisetzung von AREG und IL-8 nach Inhibierung durch Cetuximab ...	48
Abbildung 23: Genexpression von <i>AREG</i> , <i>HBEGF</i> und <i>TGFA</i> nach Inhibierung durch Cetuximab	49
Abbildung 24: Genexpression von <i>CXCL8</i> , <i>IL-1B</i> und <i>IL-6</i> nach Inhibierung durch Cetuximab	51
Abbildung 25: Schematischer Überblick der im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Signalwege in HaCaT-Zellen und N/TERT-1-Zellen	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zellen	11
Tabelle 2: Zellkulturmedien und Zusätze	12
Tabelle 3: Chemikalien	12
Tabelle 4: Geräte	13
Tabelle 5: Stimulatoren und Inhibitoren	14
Tabelle 6: Kits	14
Tabelle 7: Puffer und Lösungen	15
Tabelle 8: Primer	15
Tabelle 9: Ausgewählte Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 10: Master Mix für die Gradienten-PCR	22
Tabelle 11: Ablaufprotokoll für Gradienten-qPCR	22
Tabelle 12: Master Mix für die qPCR	23
Tabelle 13: Ablaufprotokoll für die qPCR	24

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloprotease</i>
AREG	Amphiregulin
BTC	Betacellulin
Bp	Basenpaare
CA	Mastermix
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CX3CL1	<i>C-X3-C motif chemokine ligand 1</i> , Fractalkin
CXCL1	<i>C-X-C motif chemokine ligand 1</i>
CXCL16	<i>C-X-C motif chemokine ligand 16</i>
CXCR1	<i>C-X-C chemokine receptor type 1</i>
CXCR2	<i>C-X-C chemokine receptor type 2</i>
DMSO	Dymethylsulfoxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EREG	Epiregulin
EPGN	Epigen
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
et al.	et alii
FBS	<i>fetale bovine serum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPCR	<i>G Protein-coupled Receptor</i>
GI	GI 254023X
GW	GW 280264X
HB-EGF	<i>Heparin-binding EGF-like Growth Factor</i>
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
Rpm	Revolutions per Minute
RT	Raum Temperatur
shRNA	short hairpin ribonucleic acid
TACE	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha Converting Enzyme</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
TNFR1	<i>tumor necrosis factor receptor type 1</i>
TRPV4	<i>transient receptor potential cation channel subfamily V member 4</i>

1 Einleitung

1.1 Haut

Die Haut ist eines der wichtigsten menschlichen Organe, welches sich konstant erneuert und eine Barriere zwischen unserem Körper und unserer Umwelt darstellt. Sie hat nicht nur eine schützende Funktion, sondern macht es uns auch möglich unsere Umwelt wahrzunehmen (Baroni et al. 2012). Außerdem ist die Haut in der Lage unseren Temperatur- und Wasserhaushalt zu regulieren. Da die Haut, in ihrer Funktion als Schutzschild unseres Körpers, besonders anfällig für Entzündungen und Infektionen ist, ist ein grundlegendes Verständnis für die Anatomie und die Funktionen der Haut von großer Bedeutung in der Medizin. Die Haut lässt sich in drei Schichten unterteilen: Die Epidermis, die Dermis und die Hypodermis (Yousef et al. 2024). Die Epidermis, welche die oberste der drei Hautschichten darstellt, lässt sich weiter in fünf einzelne Schichten unterteilen, von unten nach oben findet man hier zuerst das *Stratum basale*, gefolgt von dem *Stratum spinosum*, dem *Stratum granulosum* und dem *Stratum lucidum*. Die oberste Schicht der Epidermis wird als *Stratum corneum* bezeichnet und besteht im Wesentlichen aus toten Keratinozyten und Keratin (Abbildung 1). Neben den Keratinozyten lassen sich in der Epidermis auch Melanozyten, Langerhans- und Merkel-Zellen finden. Während die Keratinozyten Keratin und Lipide produzieren und so eine wichtige Rolle bei der epidermalen Wasserbarriere spielen, produzieren Melanozyten Melanin und sind so in der Lage unseren Körper vor UV-Strahlung zu schützen (Yousef et al. 2024). Die Langerhans Zellen sind für die Immunantwort der Epidermis verantwortlich (Neagu et al. 2022) und auch die Merkel Zellen übernehmen eine wichtige Aufgabe in der Epidermis, da sie in der Lage sind Komplexe mit Nervenendigungen zu bilden und so als langsam adaptierende Mechanorezeptoren zu fungieren (Moll et al. 2005). Gerät die Homöostase in unserer Haut aus dem Gleichgewicht, spielen die Keratinozyten außerdem eine wichtige Rolle in der Wundheilung. Als vorherrschender Zelltyp in der Epidermis spielen sie eine Schlüsselrolle in der Wundreparatur, indem sie in der Lage sind zu migrieren und zu proliferieren. Hierbei werden die Keratinozyten durch verschiedene Faktoren in der Wundumgebung beeinflusst, darunter unter anderem Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine (Piipponen et al. 2020), wobei der Wachstumsfaktor HB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth factor) von besonderer Bedeutung für die Wundheilung ist (Shirakata et al. 2005). Im Rahmen der Wundheilung sind Keratinozyten außerdem ein wichtiger Teil der Immunantwort unserer Epidermis, da sie in der Lage sind große Mengen an Zytokinen, Chemokinen, AMPs (*antimicrobial peptides*) und extrazellulären Vesikeln freizusetzen, welche dann wiederum

Immunzellen rekrutieren und aktivieren. Keratinozyten sind in der Lage eine Vielzahl von unterschiedlichen Zytokinen zu produzieren (IL-1, -6, -7, -8, -10, -12, -15, -18, und -20, und TNF- α) (Piipponen et al. 2020). Kommt es zu einer Entzündung in unserer Haut reagieren Keratinozyten mit der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, einer Hyperproliferation und einer fehlerhaften Differenzierung. Allerdings ist die Bedeutung mechanischer Reize für das Entzündungsgeschehen innerhalb der Haut bislang noch nicht vollständig geklärt und im Fokus aktueller Studien (Shutova & Boehncke 2022).

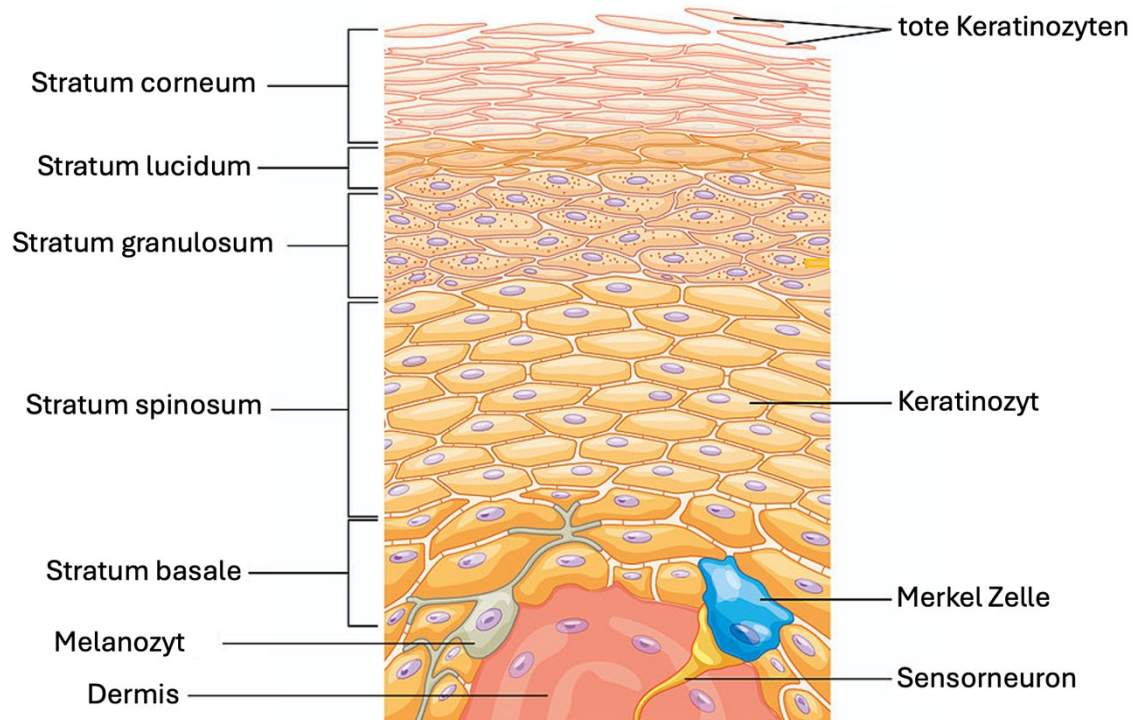


Abbildung 1: Anatomie der Epidermis

Schematische Darstellung der menschlichen Epidermis. Übersetzt aus dem Englischen von Biga, et al., von OpenStax lizenziert durch CC BY 4.0 <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

1.2 Mechanotransduktion in der Haut

Zellen sind in der Lage ihre physische Umgebung wahrzunehmen, indem sie mechanische Kräfte in biochemische Signale umwandeln. Dieser Vorgang wird als Mechanotransduktion bezeichnet. Die Wahrnehmung von mechanischen Kräften moduliert innerhalb der Zelle wichtige zelluläre Mechanismen wie z.B. Migration, Proliferation, Differenzierung bis hin zu Apoptose. Daher kann ein Defekt in der Mechanotransduktion und somit eine Dysregulation eben genannter zellulärer Mechanismen zu einem breiten Spektrum an Krankheiten führen. Hierzu zählen u.a. Muskeldystrophien, Kardiomyopathien und Neoplasien (Jaalouk & Lammerding 2009). In der Haut kann ein Defekt in der Mechanotransduktion zu entzündlichen Erkrankungen und gestörter Wundheilung führen

(Shutova & Boehncke 2022). Die Mechanotransduktion innerhalb der Zelle kann mehrere Signalwege aktivieren (Jaalouk & Lammerding 2009). Zum einen spielt die extrazelluläre Matrix eine entscheidende Rolle in der Mechanotransduktion, da die Rezeptoren der extrazellulären Matrix, Integrine, in der Lage sind, als Mechanosensoren zu fungieren, indem sie sich bündeln und so das Signal an das Aktin-Zytoskelett der Zelle weitergeben. Eine weitere wichtige Rolle bei der Mechanotransduktion spielen die Zellkontakte in der Haut, besonders die Adhärenzkontakte (*Adherens Junctions*), da sie, wie Integrine, als Sensor für mechanische Belastungen fungieren. Das bereits erwähnte Aktin-Zytoskelett der Zelle nimmt selbst auch eine zentrale Funktion in der Mechanotransduktion ein (Shutova & Boehncke 2022), indem es in der Lage ist mechanische Kräfte nicht nur wahrzunehmen, um auf externe Stimuli zu reagieren, sondern auch selbst die mechanischen Kräfte zu generieren, die die Zelle für wichtige zelluläre Prozesse, wie der Zellteilung und Migration, braucht (Olson 2022). Die Intermediärfilamente, ein weiterer Bestandteil des Zytoskeletts, spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Mechano-transduktion. Die Zelle nutzt Desmosomen und Hemidesmosomen, um die mechanischen Kräfte anschließend an die Intermediärfilamente zu übermitteln, welche wiederum in der Lage sind, mechanische Belastungen abzuf puffern und die Zelle so zu schützen. In Keratinozyten lassen sich außerdem mechanosensitive Ionenkanäle finden. Wird die Zelle mechanischer Belastung ausgesetzt, öffnen sich diese und es kommt zu einem Einstrom von Kalzium in die Zelle (Shutova & Boehncke 2022). Von besonderer Relevanz für diese Arbeit sind daher Kationenkanäle und im speziellen Piezo1.

1.3 Mechanotransduktion durch mechanosensitive Ionenkanäle

Mechanosensitive Ionenkanäle lassen sich in verschiedene Gruppen unterteilen. Von zentraler Bedeutung für diese Arbeit, sind zum einen die TRP-Kanäle (*Transient receptor potential*), von denen eine Unterfamilie die Vanilloid Unterfamilie darstellt. Eine wichtige Funktion übernimmt der TRPV4 (Toft-Bertelsen & MacAulay 2021), bei dem es sich um einen nicht selektiven Kationenkanal handelt, welcher eine höhere Permeabilität für Kalzium aufweist. In der Haut übernimmt der TRPV4 eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase, für das Wachstum der Haarfollikel und in Entzündungsreaktionen. Er ist nicht nur in der Lage mechanische und chemische Signale wahrzunehmen, sondern ist außerdem thermosensitiv. Zu Untersuchungszwecken wird im Labor zudem häufig GSK1016790A zur chemischen Aktivierung eingesetzt (Rosenbaum et al. 2020). Zum anderen gibt es die Familie der Piezokanäle, bestehend aus Piezo1 und

Piezo2. Piezo1 ist vorwiegend in nicht neuronalen Zellen zu finden, Piezo2 hingegen wird hauptsächlich von sensorischen Neuronen exprimiert. Genau wie TRPV4 sind Piezo-Kanäle nicht selektive Kationenkanäle, welche eine hohe Selektivität für Kalzium aufweisen und sich im Gegensatz zu TRP-Kanälen nur mechanisch aktivieren lassen. Chemisch lässt sich Piezo1 selektiv durch Yoda1 aktivieren, da Yoda1 keine Wirkung auf Piezo2 zeigt (Murthy et al. 2017; Syeda et al. 2015).

1.3.1 Piezo1

Die Familie der mechanosensitiven Piezo-Ionenkanäle wurde erstmals im Jahr 2010 beschrieben. Seitdem hat die Forschung bedeutende Erkenntnisse in Bezug auf die physiologische Funktion der Kanäle gewonnen. Heute wissen wir, dass die Piezo-Kanäle eine bedeutende Rolle als Sensoren für Berührung und Schmerz spielen, in der Volumenregulierung von Erythrozyten, in der Wahrnehmung von Scherkräften, in der Barorezeption und in der Propriozeption, sowie der Atemphysiologie und der Wundheilung. Verdeutlicht wird die Bedeutung von Piezo1 auch durch Studien welche zeigten, dass Piezo1-defiziente Mausembryonen bereits im Mutterleib sterben, da Piezo1 bei der Entwicklung von Blutgefäßen von Mäusen ebenfalls eine wichtige Rolle spielt (Ranade et al. 2014). Aktiviert werden kann Piezo1 sowohl physisch durch Druck bzw. Scher- und Membranspannung als auch synthetisch chemisch wie zuvor erläutert, durch Yoda1 (Nosyreva et al. 2021). Ebenso kann auch eine Inhibition durch nicht-selektive Hemmstoffe erfolgen wie dem Peptid GsMTx4 (*Grammostola mechanotoxin #4*), welches aus dem Toxin einer Vogelspinne (*Grammostola rosea*) gewonnen wurde (Bae et al. 2011), Ruthenium-Rot (Nosyreva et al. 2021) oder Gadolinium (Gd^{3+}) (Nickolls et al. 2022). Mit dem Kryoelektronenmikroskop betrachtet, stellt sich Piezo1 als ein porenbildender Ionenkanal da. Er besteht insgesamt aus etwa 2500 Aminosäuren, die sich auf drei propellerförmige Untereinheiten mit jeweils mindestens 26 Transmembranhelices aufteilen (Fang et al. 2021; Saotome et al. 2018). Piezo-Kanäle werden sowohl auf der Zellmembran exprimiert als auch im endoplasmatischen Retikulum, den Mitochondrien und dem Zellkern (Rennekampff et al. 2024). Wie bereits erläutert, werden Piezo-Kanäle von einer Vielzahl von Zellen exprimiert. Werden eben diese Zellen einer mechanischen Kraft ausgesetzt, öffnen sich die Piezo-Kanäle und es kommt zu einem Einstrom von Kationen, primär Kalzium (Fang et al. 2021). Der Kalzium-Einstrom führt wiederum zu nachgeschalteten Signalkaskaden (Rennekampff et al. 2024) wie bspw. der Aktivierung der proteolytisch aktiven

Metalloproteasen aus der Familie der ADAMs (A Disintegrin and Metalloprotease) (Grannemann et al. 2023), welche im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden.

1.3.2 Die Rolle von mechanosensitiven Ionenkanälen in der Wundheilung

Die Wundheilung ist ein komplexer Prozess, an dem verschiedene Zelltypen beteiligt sind. Unter anderem sind hier Thrombozyten, Neutrophile, Makrophagen, Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten beteiligt. All diese Zellen exprimieren Piezo1 und werden von Zytokinen und Wachstumsfaktoren im Rahmen der Wundheilung gesteuert. Der Heilungsprozess der Haut lässt sich in die Entzündungsphase, die Proliferationsphase und die Reifungsphase unterteilen (Rennekampff et al. 2024). Die Entzündungsphase betreffend wurde gezeigt, dass sowohl eine erhöhte Piezo-Expression in Thrombozyten eine gerinnungsfördernde Wirkung zu Folge hat (Zhu et al. 2022), als auch, dass eine systemische Gabe des Piezo-Antagonisten GsMTx4 bei Mäusen einen gerinnungshemmenden Effekt hat (Zhao et al. 2021).

Bei genauerer Betrachtung der Proliferationsphase der Wundheilung zeigt sich, dass Keratinozyten auf mechanische Dehnung mit Proliferation reagieren, als auch mit einer Phosphorylierung des EGF-Rezeptors (*epidermal growth factor*) (Yano et al. 2004), da hier eine Aktivierung von Piezo1 stattfindet (Gudipaty et al. 2017). Des Weiteren führt die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors zu einer Aktivierung der Signalwege von ERK 1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase*). Für die Aktivierung des ERK1/2-Signalweges ist ebenfalls der Kalziumeinstrom durch Piezo1 von großer Bedeutung (Yano et al. 2004). Die Aktivierung des ERK 1/2 Signalweges innerhalb der Zelle führt ebenfalls zur Proliferation der Zellen, kann aber auch Reaktionen wie Differenzierung oder Apoptose auslösen (Zhang et al. 2023). Die Migration der Keratinozyten betreffend gibt es derzeit widersprüchliche Forschungsergebnisse, da auf der einen Seite eine Blockierung von Piezo1, sowohl durch Piezo1-*Knockdown* als auch durch GsMTx4, zu einer verminderten Zellmigration *in vivo* führt, andere Forschungsergebnisse zeigen jedoch eine vermehrte Migration nach Piezo1-*Knockdown* (He et al. 2022). Daher scheinen weitere Untersuchungen zu der Rolle von Piezo1 in der Wundheilung notwendig.

1.4 ADAM-Proteasen

Eine besondere Bedeutung in Wundheilungs- bzw. Entzündungsprozessen haben die ADAM-Proteasen, da sie viele Adhäsionsmoleküle, Zytokin-Rezeptoren und Wachstumsfaktoren freisetzen können (Novak 2004). Auf molekularer Ebene betrachtet sind ADAM-Proteasen Transmembranproteine mit einer extrazelluläre Multidomänenregion, einer Transmembransequenz und einer zytoplasmatischen-Domäne. Im Detail besteht die extrazelluläre Multidomänenregion aus einer Prodomäne, darauffolgend die Metalloproteinase-, die Desintegrin-, und cysteinreiche Domäne (Abbildung 2). Im Säugetiergenom wurden bisher rund 40 verschiedene ADAM-Proteasen identifiziert, von denen 22 im menschlichen Genom nachgewiesen werden konnten (Chou et al. 2020, 2020).

Funktionell spielen sie eine wichtige Rolle bei der proteolytischen Freisetzung anderer Transmembranproteine, dem sogenannten *shedding*, als auch bei Zelladhäsions- und Zellfusionsprozessen. Das *shedding* ist ein wichtiger, an der Zellmembran ablaufender Prozess, durch den Transmembranproteine wie Wachstumsfaktoren (HB-EGF, TGF α , AREG) und Zytokine (TNF α) in ihre lösliche Form überführt werden. Zusätzlich gibt es eine Reihe von Zelloberflächenrezeptoren (TNFR-1), welche ebenfalls durch *shedding* von der Membran gelöst werden (Novak 2004; Sternlicht und Sunnarborg 2008). Laut aktueller Literatur sind sowohl ADAM10 als auch ADAM17 in Anwesenheit ihrer Prodomäne inaktiv, weshalb diese abgespalten werden muss, bevor sie ihre proteolytische Funktion ausüben können (Di Domenico und Giordano 2017). Zudem können ADAM-Proteasen, aufgrund ihrer Funktion bei der Aktivierung von Wachstumsfaktoren eine zentrale Rolle in der Entstehung von Krebs spielen (Duffy et al. 2011; Pruessmeyer und Ludwig 2009).

Da die zuvor erwähnten Proteine alle durch ADAM10 oder ADAM17 freigesetzt werden, liegt in dieser Arbeit ein besonderer Fokus auf speziell diesen beiden ADAM-Proteasen. ADAM17 wird auch als TACE (*Tumor Necrosis Factor Alpha Converting Enzyme*) bezeichnet, da es in der Lage ist, das membrangebundene TNF α in eine lösliche Form zu überführen (Giebeler & Zigrino 2016).

Die Bedeutung von ADAM17 zeigt sich deutlich in ADAM17-*Knockout*-Mäusen, welche nicht lebensfähig sind und schwere epitheliale Anomalien aufweisen. Die Epithelanomalien äußern sich in Defekten in der Haut, der Hornhaut, den Haaren, als auch in der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse, dem Magen und dem Darm (Peschon et al. 1998)

Für ADAM17 wurden bislang mehr als 80 Substrate identifiziert, im Verlauf dieser Arbeit werden, aufgrund ihrer Bedeutung bei der dermalen Wundheilung, die folgenden

Substrate untersucht: Amphiregulin (AREG), Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor (HB-EGF), Interleukin 6-Rezeptor (IL6-R), Interleukin-8 (IL8), Transforming growth factor α (TGF α), Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR-1) (Calligaris et al. 2021; Lorenzen et al. 2016). Die verstärkte Freisetzung von EGFR-Liganden führt zu einer erhöhten Zellproliferation, Invasion und Migration, wodurch ADAM17 eine Schlüsselrolle in der Tumorentstehung und -progression von EGFR-abhängigen Tumoren einnimmt. (Wang et al. 2022; Sahin et al. 2004). Eine zentrale Rolle in der Forschung nimmt daher der Phorbol-12-myristat-13-acetat, (PMA) als pharmakologischer Aktivator von ADAM17 ein, obwohl PMA ADAM17 nicht direkt aktiviert, sondern über die Protein-Kinase C (PKC), welche dann dazu führt, dass ADAM17 aktiviert wird. (Lorenzen et al. 2016; Kveiborg et al. 2011). Laut aktuellen Studien scheint ADAM17 außerdem ebenfalls eine wichtige Rolle in der Wundheilung zu spielen (Zhu et al. 2021). Betrachtet man die Aminosäureabfolge von ADAM17 findet man nur eine geringe Übereinstimmung mit anderen Proteasen aus der ADAM-Familie. Die größte Ähnlichkeit in der Sequenz lässt sich mit knapp 30 % bei ADAM10 finden (Gooz 2010; Rennekampff et al. 2024).

Die Bedeutung von ADAM10 zeigt sich ebenfalls deutlich in ADAM10-*Knockout*-Mäusen, welche bereits am 9 Tag der Embryogenese auf Grund von multiplen Defekten im entstehenden zentralen Nervensystem und im Herz-Kreislauf-System versterben (Hartmann et al. 2002). Weiter verdeutlichen aktuelle Studien die Relevanz von ADAM10, da es eine positive Rolle in der Behandlung von Alzheimer zu spielen scheint (Yuan et al. 2017). Aktuelle Forschungsergebnisse unterstreichen die zentrale Rolle von ADAM10 welches in der Lage ist, die Notch-Signalübertragung zu modulieren und dadurch entscheidend zur Zelldifferenzierung beiträgt, insbesondere bei angeborenen und erworbenen Immunzellen. Über diesen Mechanismus kann ADAM10 indirekt Einfluss auf die Tumorentstehung und -progression nehmen. Aktuelle Studien untersuchen hier vor allem die Bedeutung von ADAM10 als prognostischen Marker in der Behandlung von Glioblastomen (Smith et al. 2020; Lambrecht et al. 2018), daher ist hier ebenfalls ein pharmakologischer Aktivator, in diesem Fall der Kalzium-Ionophor Ionomycin von großer Bedeutung für die Forschung. Ionomycin wirkt, indem es Kalzium selektiv bindet und durch die Zellmembran transportiert, was dann zu einer Kalzium-abhängigen Aktivierung von ADAM10 führt (Gharzia et al. 2024). Da ADAM10 ubiquitär in Säugetierzellen exprimiert wird, wurden auch hier bereits mehr als 40 Substrate identifiziert. Darunter sind auch einige Substrate, die ebenfalls durch ADAM17 abgespalten werden können. Daher wird der Fokus in dieser Arbeit auf die Untersuchung der folgenden entzünd-

lichen Mediatoren und Wachstumsfaktoren gelegt: *Fractalkine* (CX3CL1), *C-X-C Motif Chemokine Ligand 16* (CXCL16), HB-EGF, IL-6R (Dreymueller et al. 2012). Zusammenfassend sind also sowohl ADAM17 als auch ADAM10 wichtige Proteasen für die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, welche an den EGF-Rezeptor binden (Sahin et al. 2004).

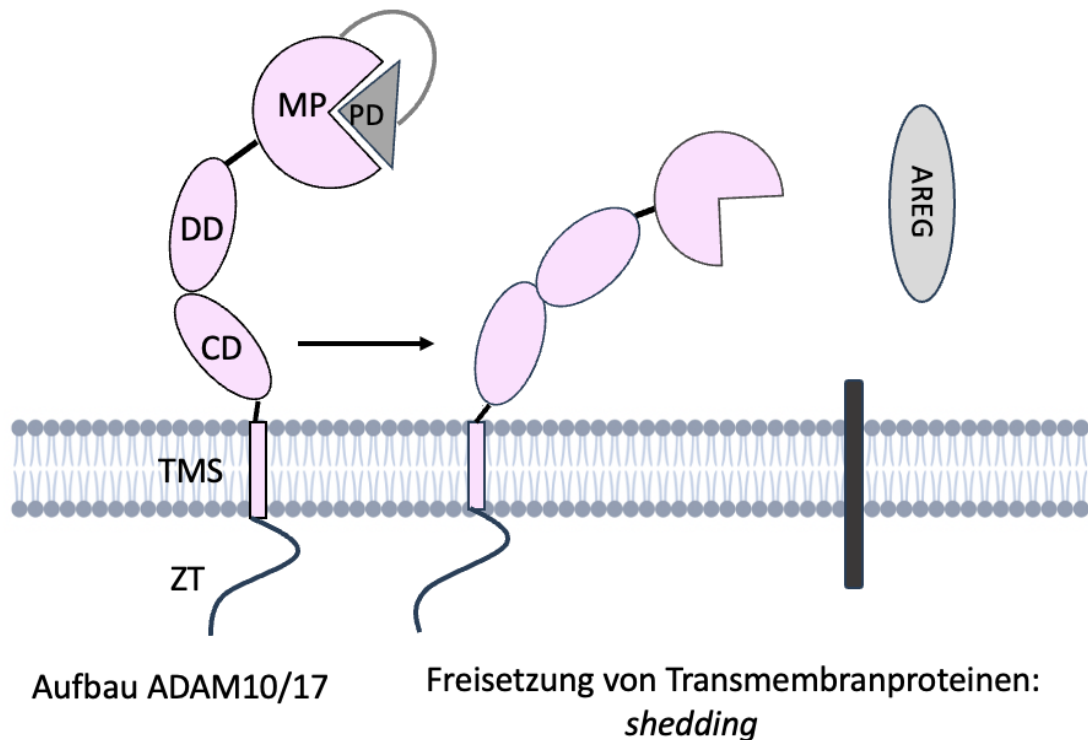


Abbildung 2: Aufbau ADAM10/17

ADAM10/17 bestehen aus einer zyttoplasmatischen Domäne (ZT) gefolgt von einer Transmembransequenz (TMS), einer cysteinreichen Domäne (CD), einer Desintegrin Domäne (DD) und schlussendlich einer Metalloproteinase Domäne (MP) mit einer Prodomäne (PD). Die Prodomäne muss abgespalten werden, damit ADAMs ihre proteolytische Funktion ausüben können das sogenannte „shedding“.

1.5 EGF-Rezeptor

Der EGF-Rezeptor ist das wohl repräsentativste Mitglied der Familie der transmembranen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen zu der allerdings neben dem EGF-Rezeptor (ErbB1) noch ErbB2, ErbB3 und ErbB4 gehören (Olayioye et al. 2000; Kumar et al. 2008). In Keratinozyten führt die Bindung eines EGFR-Liganden zur Dimerisierung des Rezeptors und anschließend zur Aktivierung von Signalwegen, welche innerhalb der Keratinozyten zelluläre Reaktionen wie Differenzierung, Migration und Proliferation auslösen (Peus et al. 1997; Iordanov et al. 2002). Inhibieren lässt sich der EGF-Rezeptor durch den chimären monoklonalen Maus-Mensch-Antikörper Cetuximab (Shigeta et al. 2013), welcher auch klinisch Anwendung findet beispielsweise in der Behandlung des Plattenepithel Karzinoms im Kopf- und Hals-Bereich oder des Kolorektalen Karzinoms (Agarwal et al. 2019;

Park et al. 2019). Die Relevanz des EGF-Rezeptors wird besonders deutlich bei EGFR-*Knockdown*-Mäusen, welche, sofern sie überleben, eine schwerwiegende epidermale Atrophie, sowie eine extrem niedrige Keratinozyten-Proliferationsrate aufweisen (Mietinen et al. 1995). Die Familie der transmembranen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen spielt außerdem eine übergeordnete Rolle in der Therapie von verschiedenen Krebsarten, wie Brustkrebs, dem nicht kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) und dem Glioblastom, da es hier zu einer Deregulierung der Kinase-Aktivität des Rezeptors kommt (Kumar et al. 2008). In Säugetieren sind insgesamt sieben EGFR-Liganden bekannt (AREG, Betacellulin (BTC), EGF, Epigen (EPGN), Epiregulin (EREG), HB-EGF und TGF α) (Harris et al. 2003), von denen mehrere von Keratinozyten exprimiert werden (AREG, BTC, EREG, HB-EGF, TGF α) (Stoll et al. 2010). EGFR-Liganden sind sowohl in der Lage an der gleichen Zelle, welche sie freisetzt zu wirken (autokrin), als auch an einer benachbarten Zelle (parakrin) (Schneider et al. 2008). Die Freisetzung dieser Wachstumsfaktoren erfolgt mithilfe von Metalloproteinasen, wie zuvor bereits erläutert wurde, wodurch sie erst in die Lage versetzt werden, an den EGF-Rezeptor zu binden (Sanderson et al. 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde insbesondere die Freisetzung von AREG untersucht. AREG bekam seinen Namen durch die Erkenntnis, dass es in der Lage ist, in seiner Funktion als Ligand am EGF-Rezeptor, Krebszelllinien sowohl zu hemmen als auch zu stimulieren (Shoyab et al. 1988), weshalb es seitdem eine wichtige Rolle in der Forschung hat. Neben seiner Rolle in der Krebstherapie, spielt AREG außerdem eine wichtige Rolle bei entzündlichen Hauterkrankungen, da es bspw. im Rahmen der Psoriasis überexprimiert wird. Zusätzlich zur Überexpression von AREG zeigt sich bei Psoriasis auch eine verstärkte Expression der Wachstumsfaktoren HB-EGF und TGF α (Elder et al. 1989; Cook et al. 1992; Stoll & Elder 1998), welche daher auch Bestandteil dieser Arbeit sind.

2 Zielsetzung

Im Fokus dieser Arbeit steht, die bestehenden Erkenntnisse aus unserer Arbeitsgruppe in Bezug auf die Aktivierung des mechanosensitiven Ionenkanals Piezo1 und der damit einhergehenden Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren durch die ADAM10/17-Proteasen in Keratinozyten fortzuführen. Es konnte bereits in Vorarbeiten von Johanna Jakob gezeigt werden, dass es im Zuge der Piezo1-Aktivierung in Keratinozyten zu einer verstärkten ADAM10/17-abhängigen Freisetzung des Wachstumsfaktors Amphiregulin (AREG) kommt (Jakob unveröffentlichte Daten). Sowohl der genaue Signalweg hinter der AREG-Freisetzung als auch die autokrinen Effekte des freigesetzten AREGs bleiben jedoch ungeklärt. Diese Arbeit widmet sich daher der Beantwortung von zwei übergeordneten Fragestellungen:

- 1.) Wie ist die EGFR-Signalübertragung in der Piezo1-ADAM-Achse involviert?
- 2.) Findet in diesem Kontext auch eine entzündliche Reaktion statt?

In diesem Zusammenhang ergab sich die zentrale Hypothese, dass die EGFR-Signalübertragung einen Einfluss auf die Piezo1-ADAM-Achse hat. Für die Überprüfung dieser Hypothese wird zunächst untersucht, welchen Einfluss die Abwesenheit von fetalem bovinem Serum (FBS) auf die AREG-Freisetzung in HaCaT-Zellen (spontan immortalisierte humane Keratinozyten Zelllinie) hat. Zusätzlich wird geprüft, ob die Abwesenheit von FBS ebenfalls einen Einfluss auf das Genexpressionsprofil der HaCaT-Zellen hat und wie diese die Freisetzung von entzündlichen Molekülen, wie IL-8 beeinflusst. In einem nächsten Schritt wird die Fragestellung adressiert, ob die beobachteten Effekte durch Rekonstitution von einzelnen rekombinanten Wachstumsfaktoren aufgehoben werden können, um so die Beteiligung der EGFR-Signalübertragung zu zeigen. Abschließend werden die Ergebnisse der HaCaT-Zellen validiert, indem die Experimente mit N/TERT-1-Zellen wiederholt werden, da diese ebenfalls immortalisierte Keratinozyten Zelllinie nach heutigem Stand der Forschung als physiologisch relevanter gilt (Smits et al. 2017). Zumal es nicht ohne weiteres möglich ist, das Medium dieser Zellen ohne Wachstumsfaktoren herzustellen, wird der inhibitorische EGFR-Antikörper Cetuximab verwendet, um die Beteiligung des EGFR-Signalweges zu zeigen. Methodisch wird im Verlauf der Arbeit vor allem auf Sandwich-ELISAs zurückgegriffen, um die Quantität der Proteine im Überstand der Zellen zu bestimmen und auf qPCRs um die Veränderung der Genexpression zu quantifizieren.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Zellen

Tabelle 1: Zellen

<i>Zelltyp</i>	<i>Herkunft</i>
HaCaT-Zellen	CVCL_0038; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Marcin Moch, Institut und Lehrstuhl für zelluläre und molekulare Anatomie, Uniklinik RWTH Aachen
N/TERT-1-Zellen	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jos P.H. Smits Department of Dermatology, Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Radboud University Medical Center

3.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 2: Zellkulturmedien und Zusätze

<i>Zellkulturmedien</i>	<i>Anbieter</i>
DMEM+/+	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, DE)
- 500 ml DMEM	
- 50 ml FBS	
- 5 ml Penicillin/Streptomycin	
DMEM-/+	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, DE)
- 500 ml DMEM	
- 5 ml Penicillin/Streptomycin	
EpiLife+/+	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
- 500 ml EpiLife	
- 5 ml Supplement für humanes Keratinozyten Wachstum	
- 5 ml Penicillin/Streptomycin	

3.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

<i>Name</i>	<i>Anbieter</i>
Accutase	PanBiotech (Aidenbach, DE)
BM Blue POD Substrate	Hoffmann-La Roche AG (Basel, CH)
DMSO	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)
Ethanol	Merk (Darmstadt, DE)

3.1.4 Geräte

Tabelle 4: Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Anbieter</i>
IncuCyte™ ZOOM	Essen Biosciences (Hertfordshire, UK)
CFX Connect Real-Time PCR System	Bio-Rad (Hercules, USA)
Mikroskop DMIL	Leica (Wetzlar, DE)
NanoDrop Spectrophotometer ND 1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, DE)
SpectraMax iD3	Molecular Devices (San Jose, USA)
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH & Co KG (Wertheim, DE)
Sterile Werkbank Hera Safe KS 12	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Thermo Mixer C	Eppendorf (Hamburg, DE)
Wasserbad	Memmert GMBH + Co. KG (Büchenbach, DE)
Zentrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg, DE)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg, DE)

3.1.5 Stimulatoren und Inhibitoren

Tabelle 5: Stimulatoren und Inhibitoren

<i>Name</i>	<i>Anbieter</i>
AREG	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Cetuximab	Apotheke des Universitätsklinikum der RWTH Aachen
GI 254023X	GlaxoSmithKline (Brentford, UK)
GW 280264X	Tocris (Minneapolis, USA)
rekombinantes humanes TGF- α	PeptoTech (New Jersey, USA)
Yoda1	Tocris (Minneapolis, USA)

3.1.6 Kits

Tabelle 6: Kits

<i>Kit</i>	<i>Anbieter</i>
Human Amphiregulin DuoSet Elisa	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Human IL-6 R alpha DuoSet Elisa	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Human IL-8/CXCL8 DuoSet Elisa	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Human sTNFRI/TNFRSF1A DuoSet Elisa	R&D Systems (Minneapolis, USA)
RNeasy Mini Kit	Quiagen (Venlo, NE)

3.1.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Puffer und Lösungen

<i>Puffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
PBS	150 mM NaCl 120 mM KCL 10 nM Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Reagent diluent (ELISA)	PBS 1% BSA
ELISA-Waschpuffer	PBS 0,5 % Tween

3.1.8 Primer

Tabelle 8: Primer

<i>Primer</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>	<i>Annealing-Temperatur</i>
<i>hAREG_for</i>	GAC CTC AAT GAC ACC TAC TC	59 °C
<i>hAREG_rev</i>	ACT ACC TGT TCA ACT CTG AC	59 °C
<i>hCYC1_for</i>	AGC TAT CCG TGG TCT CAC C	59 °C
<i>hCYC1_rev</i>	CCG CAT GAA CAT CTC CCC ATC	59 °C
<i>hCXCL16_for</i>	TGT CTA TAC TAC ACG AGG TTC CA	60 °C
<i>hCXCL16_rev</i>	AGC ATG TCC ACA TTC TTT GAG	60 °C

<i>hCX3CL1_for</i>	GGT TAG GCA TTG TGG GAA GG	60 °C
<i>hCX3CL1_rev</i>	AGA TGG GAG TAT GTT GGT GG	60 °C
<i>hGAL7_for</i>	CTG TTG AAG ACC ACC TCC GAZ	61 °C
<i>hGAL7_rev</i>	CTG TTG AAG ACC ACC TCC GAC	61 °C
<i>hHBEGF_for</i>	GCT CTT TCT GGC TGC AGT TCT	60 °C
<i>hHBEGF_rev</i>	CAA GTC ACG GAC TTT CCG GT	60 °C
<i>hIL1B_for</i>	CAC CTG TAC GAT CAC TGA ACT G	63 °C
<i>hIL1B_rev</i>	CAC CAC TTG TTG CTC CAT ATC C	63 °C
<i>hIL-6_for</i>	GTGTGAAAGCAGCAAAGAG	57 °C
<i>hIL-6_rev</i>	AAGTCTCCTCATTGAATCCA	57 °C
<i>hIL6R_for</i>	GTG AGG AAG TTT CAG AAC AG	56 °C
<i>hIL6R_rev</i>	CAT GGA CAC TAT GTA GAA AGA G	56 °C
<i>hIL8_for</i>	GAC ATA CTC CAA ACC TTT CC	60 °C
<i>hIL8_rev</i>	AAC TTC TCC ACA ACC CTC	60 °C
<i>hIL17R_for</i>	CTT GTG CCT GAC TGT GAG	59 °C
<i>hIL17R_rev</i>	CTG GTA ATG GGT AGA TTC GT	59 °C

<i>hIL18_for</i>	CCT GGA ATC AGA TTA CTT TGG	56 °C
<i>hIL18_rev</i>	GGG TGC ATT ATC TCT ACA GTC	56 °C
<i>hMCPI_for</i>	ATG AAA GTC TCT GCC GCC	57 °C
<i>hMCPI_rev</i>	CTT CTT TGG GAC ACT TGC T	57 °C
<i>hTGFalpha_for</i>	GAG AAC AGC ACG TCC CCG	64 °C
<i>hTGFalpha_rev</i>	CCA GAA TGG CAG ACA CAT GC	64 °C
<i>hTNF_for</i>	TGA GCA CTG AAA GCA TGA TCC	60 °C
<i>hTNF_rev</i>	CGA GAA GAT GAT CTG ACT GCC	60 °C
<i>hTfR1_for</i>	CTTCAATCACACTCAGTTTCCACCA	59 °C
<i>hTfR1_rev</i>	CAGTCTCCTTCCATATTCCCAAACAG	59 °C

3.1.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Ausgewählte Verbrauchsmaterialien

<i>Produkt</i>	<i>Anbieter</i>
Falcon Tubes (15 ml / 50 ml)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
Filter pipette tips Tip One (qPCR)	Starlab (Merenschwand, CH)
Nunc-Immuno™ Plate (ELISA)	Nunc A/S (Roskilde, DK)
PCR Reaktions-Tubes (200 µl)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
Pipettenspitzen (10 µl / 200 µl / 1000 µl)	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH (Hamburg, DE)
Reaktions-Tubes (1,5 ml - 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
Serologische Pipetten (10 ml)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
T75 Zellkulturflasche	Greiner bio-one (Kremsmünster, AT)
Zellkulturschalen (Ø 10 cm)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
6-Well-Platten	Falcon, Corning Incorporated (New York, USA)
12-Well-Platten	Greiner bio-one (Kremsmünster, AT)
24-Well-Platten	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
qPCR-Platten	BIO Plastics (Landgraaf, NL)

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Im Verlauf dieser Arbeit wurden sowohl HaCaT-Zellen als auch N/TERT-1-Zellen verwendet. Beide Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ konstanter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für das sterile Arbeiten und Passagieren der Zellen wurde die Werkbank Hera Safe KS 12 verwendet.

Die HaCaT-Zellen wurden in 10 cm-Zellkulturschalen und in DMEM kultiviert, welches zuvor mit 50 ml FBS und 5 ml Penicillin/Streptomycin versetzt wurde (DMEM (+/+)). Die Zellen wurden passagiert, nachdem sie für zwei Tage konfluent gewachsen sind, indem sie zunächst zwei Mal mit 10 ml PBS gewaschen wurden. Nachdem zweiten Waschen wurden die Zellen für 20 min mit PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von der Platte abgelöst, indem sie mit 2 ml Accutase für 10 min erneut inkubiert wurden. Um die Reaktion der Accutase abzustoppen wurden 8 ml vorgewärmtes DMEM (+/+) hinzugegeben und die Zellsuspension in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt, um anschließend bei 250 g für 3 min zentrifugiert zu werden. Im nächsten Schritt wurde das Zellpellet mit frischem vorgewärmten DMEM (+/+) resuspendiert und die Zellen entweder in 10 cm-Zellkulturschalen weiter kultiviert oder für Experimente ausgesät.

Im späteren Verlauf der Arbeit wurden N/TERT-1-Zellen verwendet, welche in T75-Zellkulturflaschen und EpiLife kultiviert wurden, ergänzt mit 5 ml Supplement für humanes Keratinozyten-Wachstum und 5 ml Penicillin/Streptomycin (EpiLife (+/+)). Die N/TERT-1-Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 90% passagiert, indem sie zunächst mit PBS gewaschen wurden und anschließend mit 3 ml Accutase für 10 min inkubiert wurden. Auch hier wurde die Reaktion der Accutase mit 7 ml DMEM (+/+) abgestoppt, allerdings wurde das Zellpellet anschließend noch zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen und im Anschluss zentrifugiert, um das im DMEM vorhandenen Kalzium auszuwaschen. Abschließend wurden die Zellen mit frischen vorgewärmten EpiLife (+/+) resuspendiert und entweder weiter kultiviert oder für Experimente ausgesät.

3.2.2 Bestimmung der Lebendzahl

Die Anzahl der lebenden Zellen wurde mit einem Hämozytometer bestimmt (Zählkammer nach Neubauer). Bevor die Bestimmung der Lebendzahl durchgeführt werden konnte, wurde die Zellsuspension 1:1 mit 0,4 % Trypanblau verdünnt. Nachdem 10 µl der verdünnten Zellsuspension in das Hämozytometer gegeben wurde, wurden die Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Tote Zellen, welche unter dem Mikroskop blau erscheinen, da der Farbstoff durch die Membran toter Zellen gelangt, wurden bei der Zählung ausgeschlossen.

3.2.3 Auftauen von Zellen

Um die Zellen, welche langfristig im Stickstofftank aufbewahrt werden, aufzutauen, wurde das Gefrieröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Direkt nach dem Erwärmen wurde der Inhalt des Gefrieröhrchens in eine Petri-Schale mit vorgewärmtem Medium überführt. Nach dem Adhären der Zellen wurde ein Medium Wechsel durchgeführt, um tote Zellen und das DMSO, welches in einer hohen Konzentration im Einfriermedium vorliegt, zu entfernen.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolation

Im Zuge der quantitativen PCR (qPCR) wurde die RNA zunächst isoliert und anschließend mittels reverser Transkriptase in complementary DNA (cDNA) umgeschrieben. Die RNA-Isolation dient der Detektion und Quantifizierung messenger RNA (mRNA). Für die Durchführung der RNA-Isolation wurde das RNeasy mini kit genutzt.

Nach Entnahme der Überstände wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit je 350 µl RLT-Puffer lysiert. Hierfür wurde entweder das 12- oder 24-Well-Format genutzt. Um die Lysate zu homogenisieren wurden QiaShredder-Säulen verwendet. Die RNA-Isolation wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

3.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Um die RNA-Konzentration der einzelnen Proben zu ermitteln, wurde der ND-100 genutzt. Sowohl die RNA-Konzentration als auch die Quotienten der optischen Dichte wurden mittels Spektrometrie gemessen. Die Quotienten der optischen Dichte wurden genutzt, um die Reinheit der Proben zu überprüfen. Bei Werten unter 2,0 bei OD_{260/280} und Werten unter 2,0-2,2 bei OD_{260/230} wurde von einer Verunreinigung der Probe ausgegangen.

3.3.3 cDNA-Synthese

Für die Umschreibung der isolierten mRNA in cDNA mittels reverser Transkriptase wurde der PrimeScript™ RT Master Mix genutzt.

Die RNA-Konzentration wurde auf 500 ng pro Probe festgelegt. Für die cDNA-Synthese wurden die Proben für 15 min bei 37 °C im Thermomixer C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Proben für 5 s auf 85 °C erhitzt wurden. Anschließend wurden die Proben 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und direkt für die qPCR genutzt oder zunächst bei -20 °C gelagert.

3.3.4 Etablierung der qPCR-Primer

Die optimale Temperatur für die Anlagerung von Primern wird auch als Annealing-Temperatur bezeichnet. Diese wurde mit Hilfe einer Gradienten-qPCR bestimmt. Als Template für die Gradienten-qPCR wurde eine Mischung aus der cDNA von allen verwendeten Proben genutzt.

Die Zusammensetzung des Mastermixes für die Gradienten-qPCR wird in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Master Mix für die Gradienten-PCR

<i>Bestandteil</i>	<i>Menge</i>
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	50 µl
Nuklease-freies Wasser	29 µl
Forward Primer	5,5 µl
Reverse Primer	5,5 µl
Template cDNA	10 µl
Gesamt	100 µl

Anschließend wurde eine Temperatur-Gradienten-qPCR durchgeführt. Die hier verwendeten Temperaturen sind in Tabelle 11 aufgeführt. Die Annealing-Temperatur wurde anhand der Signalstärke des entstehenden Produktes festgelegt.

Tabelle 11: Ablaufprotokoll für Gradienten-qPCR

<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
95°C	5 min
95°C	10 s
55-65 °C	10 s x25
72 °C	15 s
4 °C	∞

3.3.5 Auswahl der Referenzgene

Um die Expression der einzelnen Gene beurteilen zu können, wurden diese in Korrelation zu sogenannten Referenzgenen gemessen. Wichtig bei der Auswahl der Referenzgene war, dass diese in den einzelnen Proben gleichermaßen exprimiert wurden.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qPCRs wurden die zwei Referenzgene CYC1 (Cytochrome c1) und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet.

3.3.6 qPCR

Die PCR ist ein Verfahren, welches für die Amplifikation von Nukleinsäuren verwendet wird. Im Vergleich zur PCR, kann im Rahmen der qPCR die cDNA, und somit indirekt die mRNA, quantifiziert werden.

Hierfür wird der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR® Green verwendet, welcher unspezifisch in die doppelsträngige DNA interkaliert und dabei fluoresziert. Diese Fluoreszenz wird im Anschluss an jeden Zyklus durch den PCR Cycler gemessen wird. Das hier gemessene Signal verhält sich proportional zur entstandenen Produktmenge.

Für jede Probe wurden Duplikate mit je 9 µl Master Mix und je 1 µl der cDNA-Probe auf die qPCR-Platten aufgetragen. Die Zusammensetzung des hier verwendeten Mastermixes wird in Tabelle 12 dargestellt.

Der Ablauf des im qPCR Cycler verwendeten Programms ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 12: Master Mix für die qPCR

<i>Bestandteil</i>	<i>Menge</i>
iTaq™ Universal SYBR® Green Super-mix	5 µl
Nuklease freies Wasser	2,9 µl
Forward Primer	0,55 µl
Reverse Primer	0,55 µl
Gesamt	9 µl

Tabelle 13: Ablaufprotokoll für die qPCR

<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	
95 °C	5 min	
95 °C	10 s	
Primer spezifisch	10 s	
72°C	15 s	44 x
95 °C	5 min	
65 °C	1 min	
65-97 °C (0,11 °C/ s)	5 min	
4 °C	∞	

3.3.7 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist eine Methode, welche im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde, um Proteine im Zellkulturüberstand zu detektieren und zu quantifizieren. Bei dem hier verwendeten ELISA handelte es sich um einen sogenannten Sandwich-ELISA, welcher genutzt wurde, um AREG, IL6, IL-6R, TNFR1 und IL8 im Zellkulturüberstand zu detektieren. Hierfür wurden spezifische Kits der Firma R&D Systems (Tabelle 6) verwendet.

Für die Durchführung der Experimente, welche für den ELISA genutzt wurden, wurden pro 12-Well-Platte pro Well 200.000 Zellen ausgesät (bzw. pro 24-Well-Platte pro Well 100.000 Zellen) und anschließend 2 Tage inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden die Überstände entnommen und bei 4 °C und 1000 g für 5 min zentrifugiert, bevor sie bei -20 °C gelagert wurden.

Der ELISA wurde entsprechend den folgenden Vorgaben des Herstellers durchgeführt: Zunächst wurde der Capture-Antikörper in PBS gelöst und anschließend auf die Nunc-immuno MicroWell Platte (96-Well Platte) aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Platte zunächst drei Mal mit dem ELISA-Waschpuffer gewaschen und anschließend für 2 h bei RT mit Reagent Diluent geblockt, um unspezifisches Binden an die Platte zu vermeiden.

Die Platte wurde erneut drei Mal gewaschen bevor jeweils Duplikate der Proben und einer Standardreihe aufgetragen wurden, welche für 2 h bei RT inkubiert wurden. Die Standardreihe entsprach einer in Medium angesetzten seriellen Verdünnungsreihe, von sieben Konzentrationen des untersuchten Proteins und einer Negativkontrolle, nur aus Medium

bestehend. Im Anschluss daran wurde erneut gewaschen, bevor der Detection-Antikörper, gelöst in Reagent Diluent, aufgetragen wurde. Nach 2h Inkubation erfolgte ein erneuter Waschschrift bevor, Meerettich-Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin, ebenfalls gelöst in Reagent Diluent für 20 min aufgetragen wurde. Anschließend erfolgte ein letzter Waschschrift, bevor BM Blue POD Substratlösung hinzugegeben wurde, welches in dieser Reaktion als chromogenes Substrat verwendet wurde. Beendet wurde die Reaktion durch die Zugabe von 2 M H_2SO_4 , bevor die Absorption durch den SpectraMax iD3 gemessen wurde.

3.4 Statistische Auswertung

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen quantitativen Daten, werden als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Zur Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung wurden Daten aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten genutzt. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SAS 9.4 und der GLIMMIX-Prozedur durchgeführt, wofür ein Code genutzt wurde, welcher von Dr. Aaron Babendreyer erstellt und zur Verfügung gestellt wurde. Bei der Analyse der Daten wurde mit einer *generalized mixed model analysis* gearbeitet. Für die Verteilung der Daten wurde nach Beurteilung von analytischen Residual-Plots entweder eine Normal- oder eine Lognormal-Verteilung angenommen. Durch die Nutzung von analytischen Tools wie dem covtest Statement oder dem Shapiro-Wilk-Test wurde zudem untersucht, ob die Daten einzelnen Daten-Sets homoskedat waren und eine parametrische Analyse zulässig war. Von einer statistischen Signifikanz wurde ausgegangen bei einem p-Wert $< 0,5$. Der Code, welcher für die Datenauswertung verwendet wurde, wird im Anhang zur Verfügung gestellt.

4 Ergebnisse

4.1.1 Einfluss von FBS auf die ADAM-Aktivität und die Freisetzung von Wachstumsfaktoren

Wie bereits in der Zielsetzung erwähnt, haben frühere Arbeiten, innerhalb unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass es nach Piezo1-Aktivierung durch Yoda1 zu einer gesteigerten Aktivität von ADAM10 und ADAM17 in Keratinozyten kommt (Grannemann 2023; Blaschke 2022). Es konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass es im Zuge dieser gesteigerten Aktivität von ADAM10/17 zu einer gesteigerten Freisetzung des Wachstumsfaktors AREG kommt. Der genaue Signalweg dahinter bleibt allerdings unklar (Jakob unveröffentlichte Daten). Um die Hypothese zu überprüfen, dass eventuell Wachstumsfaktoren im für die Zellkulturverwendeten FBS einen Einfluss auf die Piezo1-ADAM-Achse haben, wurden die HaCaT-Zellen zunächst entweder 24 h in Medium ohne FBS kultiviert oder erhielten nur während der Stimulation mit Yoda1 ein FBS-freies Medium (-/+ FBS und +/- FBS). Es wurde ebenfalls getestet, wie die Zellen reagieren, wenn sie sowohl 24 h vor der Stimulation in FBS-freiem Medium kultiviert werden als auch in FBS-freiem Medium stimuliert werden (-/- FBS). Als Positiv-Kontrolle wurden die Zellen vor dem Stimulieren in Medium mit FBS kultiviert und ebenfalls in Medium mit FBS stimuliert (+/+ FBS). Sofern nicht anders angegeben wurden die verwendeten Konzentrationen auf Basis der unveröffentlichten Arbeit von Johanna Jakob ausgewählt (Jakob unveröffentlichte Daten). Die Ergebnisse ergaben, dass die AREG-Freisetzung nur in der Gruppe signifikant erniedrigt wurde, in der die HaCaT-Zellen 24 h vor und während der Stimulation in FBS-freiem Medium kultiviert wurden (Abbildung 3). Hier zeigte sich eine signifikante Reduzierung der AREG-Freisetzung sowohl mit DMSO als auch unter Yoda1-Stimulation, jeweils im Vergleich zur Kontrolle mit FBS. Daraus lässt sich schließen, dass die Abwesenheit von FBS einen Einfluss auf die Piezo1-ADAM-Achse hat, unter der Voraussetzung, dass die Zellen 24 h vor und während der Stimulation ohne FBS kultiviert wurden.

In weiteren Experimenten ohne FBS, wurden die Zellen daher sowohl 24 h vor der Stimulation als auch während der Stimulation in FBS-freiem Medium kultiviert.

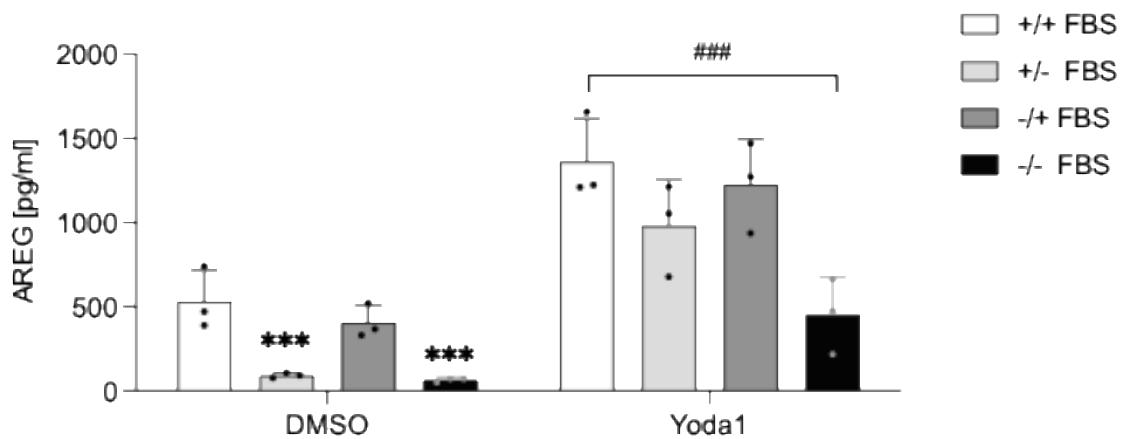


Abbildung 3: FBS-Abhängigkeit der Yoda1-induzierten AREG-Freisetzung

Die AREG-Freisetzung wurde mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert. Die HaCaT-Zellen wurden für 4 h mit Yoda1 (10 μ M) stimuliert und entweder sowohl 24h vor der Stimulation in FBS kultiviert als auch während der Stimulation mit Yoda1/DMSO in FBS kultiviert (+/+), 24h vor der Stimulation nicht in FBS kultiviert und nur während der Stimulation mit Yoda1/DMSO (-/+), 24 vor der Stimulation in FBS kultiviert und während der Stimulation mit Yoda1/DMSO nicht in FBS kultiviert (+/-) oder sowohl vor der Stimulation nicht in FBS kultiviert als auch während der Stimulation mit Yoda1/DMSO nicht in FBS kultiviert. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten. Statistische Unterschiede zur DMSO-Kontrolle mit FBS (DMSO, (+/+) FBS) sind durch Sterne gekennzeichnet (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,001).

Im nächsten Schritt sollten die gemachten Beobachtungen, die darauf hinweisen, dass die Aktivierung von Piezo1 in Keratinozyten mit einer verstärkten, ADAM10- und ADAM17-abhängigen Freisetzung von Amphiregulin einhergeht, bestätigt werden. Die ADAM10- und ADAM17-abhängige Freisetzung wurde bereits durch die Verwendung des ADAM10-Inhibitors GI254023X (GI) und des ADAM10/17-Inhibitors GW280264X (GW) gezeigt (Jakob unveröffentlichte Daten). Um die folgenden Experimente zu vereinfachen, wurde lediglich der ADAM10/17-Inhibitor GW verwendet. Zusätzlich erfolgte eine erneute Validierung des Effekts der Abwesenheit von FBS, indem die HaCaT-Zellen 24 h vor der Stimulation und während der Stimulation in FBS-freiem Medium kultiviert wurden. Die Daten bestätigen die unveröffentlichten Daten von Johanna Jakob (Jakob unveröffentlichte Daten), indem sie eine signifikant verstärkte AREG-Freisetzung nach Yoda1-Stimulation und eine Hemmung dieses Effektes durch GW zeigten. Damit ist die AREG-Freisetzung, wie bereits beschrieben, von ADAM10 und ADAM17 abhängig (Abbildung 4). Darüber hinaus zeigte sich erneut eine signifikant verminderte AREG-Freisetzung in der Abwesenheit von FBS.

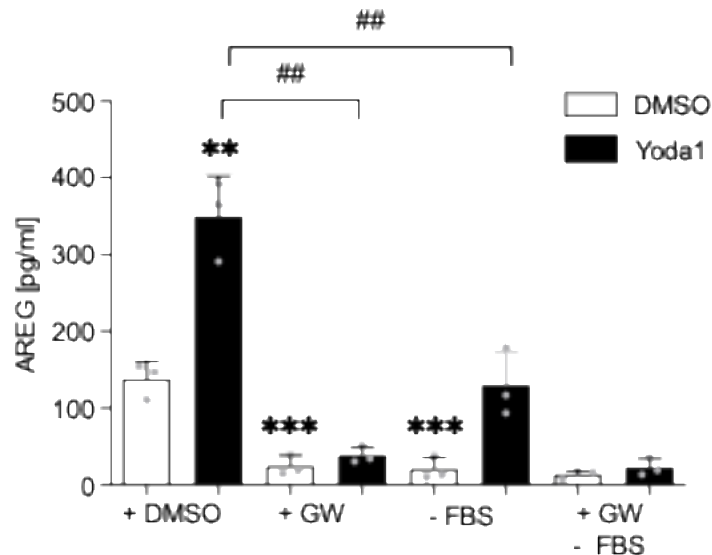


Abbildung 4: AREG- Freisetzung nach FBS-freier Kultivierung und ADAM10/17-Inhibierung

Die AREG-Freisetzung wurde mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert. Die HaCaT-Zellen wurden für 4 h mit Yoda1 (10 μ M) und GW (10 μ M) stimuliert. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten. Statistische Unterschiede zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,001).

4.1.2 Einfluss von FBS auf Piezo1-abhängige Genexpressionsprofile von Wachstumsfaktoren

Zur weitergehenden Überprüfung der Hypothese, dass die EGFR-Signalübertragung einen Einfluss auf die Piezo-ADAM-Achse hat, wurde die mRNA-Expression von *AREG* in der Abwesenheit von FBS in den HaCaT-Zellen untersucht. Die Ergebnisse zeigten wie erwartet eine signifikant erhöhte mRNA-Expression nach Yoda1-Stimulation und eine erniedrigte mRNA-Expression von *AREG* nach Inhibition mit GW (Abbildung 5a). Die mRNA-Expression nach Yoda1-Stimulation in der Abwesenheit von FBS war wieder erwarten allerdings tendenziell erhöht, obwohl die AREG-Freisetzung signifikant vermindert war (Abbildung 4). Die DMSO-Kontrolle war in der Abwesenheit von FBS, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle mit FBS, allerdings ebenfalls signifikant vermindert.

Zur vertieften Untersuchung der EGFR-Signalübertragung wurde anschließend die mRNA-Expression weiterer Wachstumsfaktoren analysiert. Die HaCaT-Zellen zeigten ein ähnliches Genexpressionsprofil des Wachstumsfaktors *HBEGF* (HB-EGF) wie bei *AREG* (Abbildung 5b und Abbildung 5a). Die mRNA-Expression war ebenfalls signifikant erhöht nach Yoda1-Stimulation und wurde signifikant vermindert durch den Inhibitor GW. Die mRNA-Expression nach Yoda1-Stimulation war in der Abwesenheit von FBS hier ebenfalls erhöht, obwohl auch die DMSO-Kontrolle in der Abwesenheit von FBS signifikant vermindert war, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle mit FBS. Für *TGFA*

(TGF α) hingegen zeigten die HaCaT-Zellen ein divergentes Genexpressionsprofil, da weder die Genexpression durch Stimulation mit Yoda1 gesteigert war noch die Genexpression durch Zugabe von GW signifikant vermindert wurde. Hervorzuheben ist hier allerdings, dass die *TGFA*-Genexpression in der DMSO-Kontrolle in Abwesenheit von FBS im Vergleich zur DMSO-Kontrolle mit FBS ebenfalls signifikant vermindert war (Abbildung 5c).

Zusammenfassend spricht die herabgesetzte Genexpression der Gene *AREG*, *HBEGF* und *TGFA* in der DMSO-Kontrolle ohne FBS ebenfalls dafür, dass die Abwesenheit von FBS bzw. die EGFR-Signalübertragung eine Rolle bei der durch die Piezo1-ADAM-Achse induzierten Genexpression von Wachstumsfaktoren spielt.

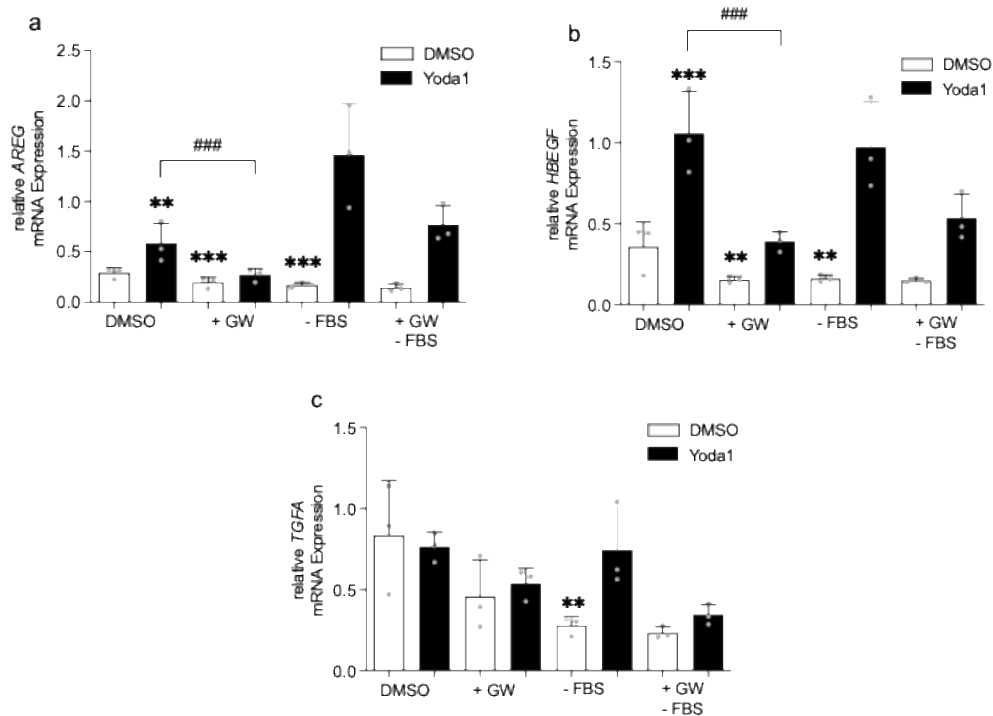


Abbildung 5: mRNA-Expression von Wachstumsfaktoren nach FBS-freier Kultivierung und ADAM10/17-Inhibierung

Die *AREG* (a), *HBEGF* (b), *TGFA* (c) mRNA-Expression wurden mittels qPCR bestimmt. Die HaCaT-Zellen wurden für 4h mit Yoda1 (10 μ M) und GW (10 μ M) stimuliert. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten.

Die Expression wurde auf die Referenz Gene *CYCL1* und *GAPDH* bezogen. Statistische Unterschiede zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$).

4.1.3 Einfluss von FBS auf die ADAM-Aktivität und die Freisetzung von Entzündungsmediatoren

Nachfolgend wurde überprüft, ob es auch zu einer Piezo1-vermittelten Freisetzung von Entzündungsmediatoren in HaCaT-Zellen kam und ob hier die Abwesenheit von FBS ebenfalls einen Einfluss hatte. Aktuelle Studien belegen, dass die Formulierung von FBS die Freisetzung von Entzündungsmediatoren beeinflusst (Liu et al. 2023). Hierfür wurde zunächst die IL-8-Freisetzung im Überstand der HaCaT-Zellen nach Yoda1-Stimulation, mit und ohne FBS kultiviert, quantifiziert.

Die Ergebnisse zeigten, dass es im Zuge einer Yoda1-Stimulation zu einer signifikant vermehrten Freisetzung von IL-8 in den HaCaT-Zellen kam, was dafürspricht, dass die Stimulation von Piezo1 ein entzündliches Geschehen auslösen könnte (Abbildung 6). Außerdem verdeutlichten die Ergebnisse eine signifikant verminderte Freisetzung durch den Inhibitor GW, was auf eine Beteiligung von ADAM10 und ADAM17 hindeutete. Weiter zeigten die Daten eine nahezu komplette Inhibition der IL-8 Freisetzung bei Abwesenheit von FBS, welche deutlich unter der basalen Freisetzung lag.

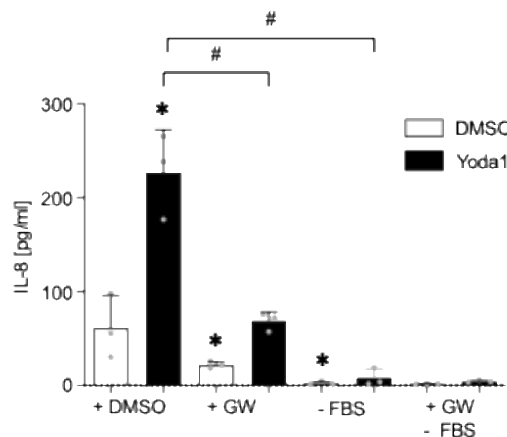


Abbildung 6: IL-8 Freisetzung nach FBS-freier Kultivierung und ADAM10/17-Inhibierung

Die IL-8 Freisetzung wurde mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert. Die HaCaT-Zellen wurden für 4 h mit Yoda1 (10 μ M) und GW (10 μ M) stimuliert. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten. Statistische Unterschiede zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$).

Da der Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R) und der Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1 (TNFR1) eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion von Entzündungsmediatoren spielen und ebenfalls, wie bereits erwähnt, ADAM10/17-Substrate sind (Calligaris et al. 2021; Lorenzen et al. 2016; Dreytmueller et al. 2012) wurden ihre Konzentrationen im Überstand mittels ELISA analysiert.

Die Daten deuten darauf hin, dass es im Zuge einer Yoda1-Stimulation zu einer signifikant vermehrten Freisetzung von TNFR1 kam, welche durch die Abwesenheit von FBS und den ADAM10/17-Inhibitor GW signifikant verringert wurde (Abbildung 7a). Auch bei IL-6R kam es nach Yoda1 Stimulation zu einer vermehrten Freisetzung, welche durch GW und der Abwesenheit von FBS signifikant verringert wurde, allerdings in abgeschwächter Ausprägung (Abbildung 7b)

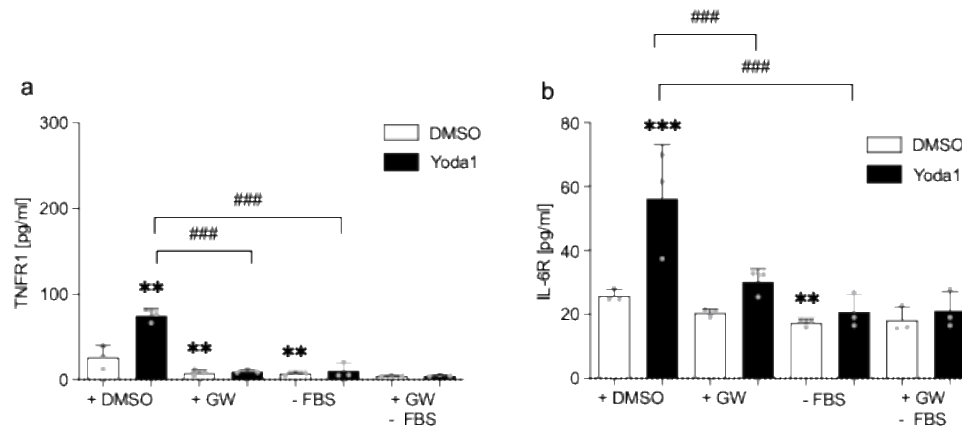


Abbildung 7: TNFR1 und IL-6R- Freisetzung nach FBS-freier Kultivierung und ADAM10/17 Inhibierung

Die TNFR1 und IL-6R-Freisetzung wurde mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert. Die HaCaT-Zellen wurden für 4h mit Yoda1 (10 μ M) und GW (10 μ M) stimuliert. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten. Statistische Unterschiede zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$).

4.1.4 Einfluss von FBS auf Piezo1-abhängige Genexpressionsprofile von Entzündungsmediatoren

Abschließend wurde untersucht, ob die beobachteten Veränderungen in der Freisetzung von IL-8 auf Ebene der Genexpression nachweisbar waren (Abbildung 6a) und wie die Piezo1- Aktivierung und die Abwesenheit von FBS das Genexpressionsprofil von anderen Entzündungsmediatoren beeinflusst wurde (Abbildung 8b, c, d). Hierbei waren *CXCL8* (IL-8), *IL6* (IL-6), *IL1B* (IL-1 β) und *LGALS7* (Galectin 7) von großem Interesse, da sie laut Literatur eine Rolle bei entzündlichen Hauterkrankungen spielen (Chen et al. 2021; Cai et al. 2019). Auffällig dabei war, dass das Genexpressionsprofil von *CXCL8* (Abbildung 8a) dem Genexpressionsprofil von *AREG* ähnelte, da die mRNA-Expression durch die Aktivierung von Piezo1 signifikant erhöht wurde und durch GW signifikant erniedrigt wurde. Die mRNA-Expression nach Yoda1-Stimulation in der Abwesenheit von FBS war hier ebenfalls tendenziell erhöht, obwohl die IL-8-Freisetzung signifikant erniedrigt wurde (Abbildung 6). Die mRNA-Expression von *IL1B* wurde durch GW und die Abwesenheit von FBS signifikant erniedrigt, allerdings in einem geringeren Ausmaß.

Auch war die mRNA-Expression nicht erhöht nach Yoda1-Stimulation und der Abwesenheit von FBS (Abbildung 8b). Die mRNA-Expression von *IL-6* wurde ebenfalls durch die Stimulation von Piezo1 signifikant erhöht, allerdings im Gegensatz zu *CXCL8* und *IL-1B* nicht durch GW verringert und auch die Abwesenheit von FBS schien hier nur einen geringen Effekt zu haben (Abbildung 8c). Die mRNA-Expression von *LGALS7* hingegen war weder durch Yoda1 stimulierbar noch durch GW inhibierbar. Ausschließlich die Abwesenheit von FBS führte zu einer Steigerung der mRNA-Expression (Abbildung 8d). Zusammenfassend zeigten die vorliegenden Daten, dass die Aktivierung von Piezo1 zu einer entzündlichen Reaktion in HaCaT-Zellen führt, welche auch auf Ebene der Genexpression nachweisbar ist. Weiter deuten die Daten darauf hin, dass IL-8 und IL-1 β indirekt durch ADAM10/17 reguliert wurden.

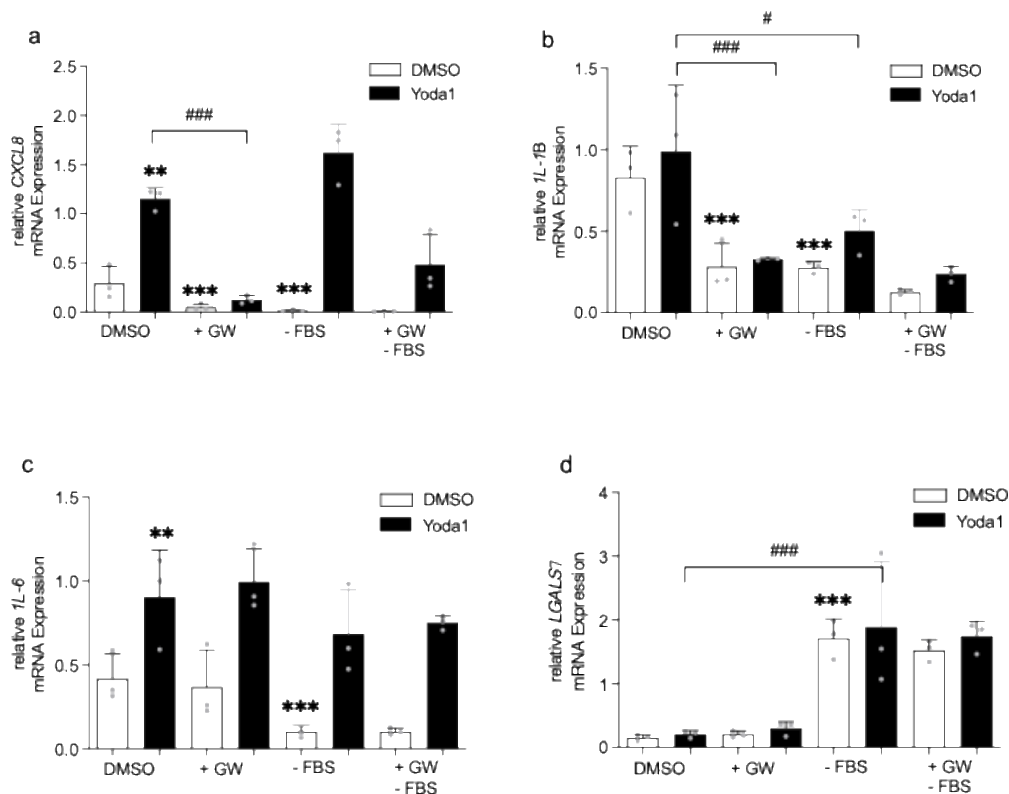


Abbildung 8: mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren nach FBS-freier Kultivierung und ADAM10/17-Inhibierung

Die *CXCL8* (a), *IL-1B* (b), *IL-6* (c), *LGALS7* (d) mRNA-Expression wurden mittels qPCR bestimmt. Die HaCaT-Zellen wurden für 4 h mit Yoda1 (10 μ M) und GW (10 μ M) stimuliert. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten.

Die Expression wurde auf die Referenz Gene *CYC1* und *GAPDH* bezogen. Statistische Unterschiede zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$).

4.2 Rekonstitution einzelner Wachstumsfaktoren und der Einfluss auf die ADAM-Aktivität

Da laut aktuellem Stand der Forschung die Formulierung und Wirkung von FBS auf die Zellen noch nicht abschließend geklärt werden konnte, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit analysiert, ob die beobachteten Effekte durch Rekonstitution von einzelnen rekombinanten Wachstumsfaktoren aufgehoben werden können (Lee et al. 2022; Liu et al. 2023).

4.2.1 Rekonstitution von TGF α und der Einfluss auf die ADAM-abhängige Freisetzung von AREG und IL-8

Um die Hypothese weiter zu überprüfen, dass die EGFR-Signalübertragung einen Einfluss auf die Piezo1-ADAM-Achse hat, wurden die HaCaT-Zellen zunächst wieder 24 h in FBS-freiem Medium kultiviert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen des Wachstumsfaktors TGF α substituiert und zeitgleich mit Yoda1 stimuliert. Nachfolgend wurde die Freisetzung von AREG und IL-8 mittels ELISA analysiert (Abbildung 9). Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Anstieg der AREG-Freisetzung bei einer Zugabe ab 3 ng/ml TGF α zum FBS-freien Medium (Abbildung 7a). Die IL-8 Freisetzung nach Yoda1-Stimulation stieg tendenziell bereits ab 1 ng TGF α pro ml an (Abbildung 9b). Allerdings war der Yoda1-induzierte Anstieg erst bei einer zugegebenen Menge von 10 ng/ml TGF α signifikant erhöht. Aus diesem Grund wurden in weiteren Experimenten 10 ng TGF α pro ml eingesetzt.

Zusammenfassend bestärken die Daten dieser TGF α -Konzentrationsreihe die Annahme, dass die EGFR-Signalübertragung einen Einfluss auf die Piezo-ADAM-Achse hat und sowohl für die Freisetzung von AREG als auch für die IL-8-Freisetzung wichtig ist.

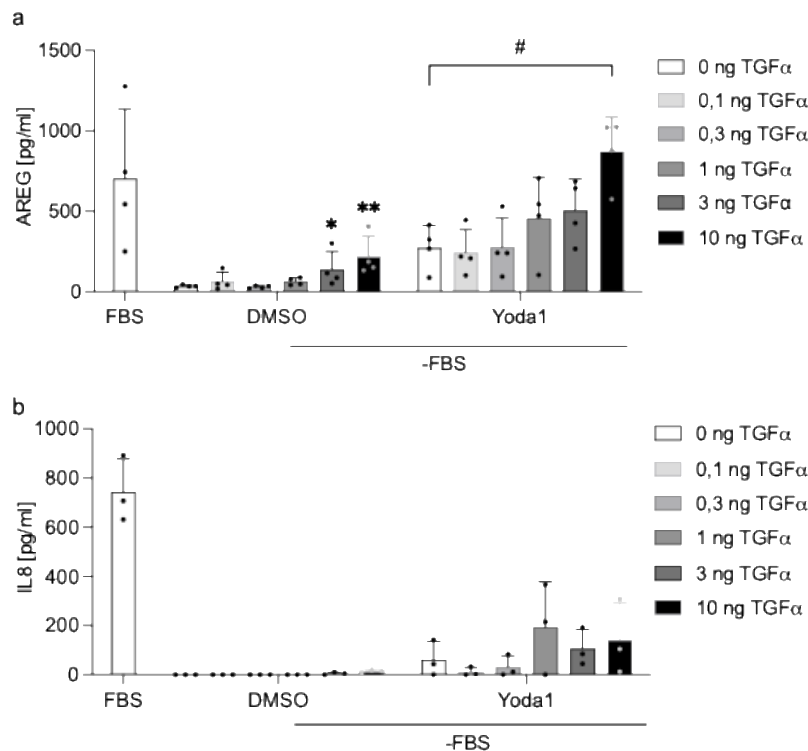


Abbildung 9: Freisetzung von AREG und IL-8 nach FBS-freier Kultivierung und Rekonstitution mit TGFα

Die AREG und IL-8-Freisetzung wurde mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert. Die HaCaT-Zellen wurden mit TGFα rekonstituiert (die Konzentrationen des TGFα sind jeweils pro ml angegeben) und für 4 h mit Yoda1 (10 μM) stimuliert. Die Konzentrationen des TGFα sind jeweils pro ml angegeben. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei bzw. vier unabhängigen Experimenten. Statistische Unterschiede zur DMSO 0 ng TGFα-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$).

4.2.2 Einfluss der TGFα-Rekonstitution auf Piezo1-abhängige Genexpressionsprofile

Anschließend wurde auch in dieser Versuchsreihe das Genexpressionsprofil von *AREG*, *HBEGF* und *TGFA* analysiert, um zu überprüfen, ob die beobachteten Veränderungen in der Freisetzung auch auf transkriptioneller Ebene nachweisbar waren (Abbildung 10).

Die Daten der Genexpressionsprofile sowohl von *AREG* (Abbildung 10a) und *HBEGF* (Abbildung 10b) als auch von *TGFA* (Abbildung 10c) zeigen eine Steigerung der mRNA-Expression nach Zugabe von TGFα auch im Vergleich zur Kontrolle mit FBS. Diese Ergebnisse deuteten auf einen positiven Rückkopplungs-Mechanismus von *AREG*, *HBEGF* und *TGFA* hin, durch welchen das bereits freigesetzte AREG autokrin die Expression von Wachstumsfaktoren weiter steigern könnte.

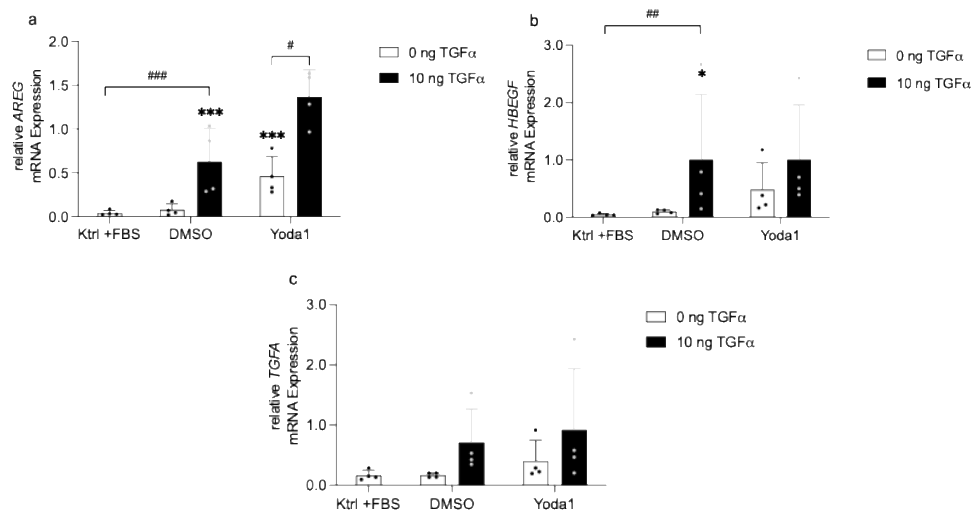


Abbildung 10: mRNA-Expression von *AREG*, *HBEGF* und *TGFA* nach FBS-freier Kultivierung und Rekonstitution mit TGF α

Die *AREG*, *HBEGF* und *TGFA* mRNA-Expression wurden mittels qPCR quantifiziert. Die HaCaT-Zellen wurden mit TGF α rekonstituiert (die Konzentrationen des TGF α sind jeweils pro ml angegeben) und für 4 h mit Yoda1 (10 μ M) stimuliert. Die Konzentrationen des TGF α sind jeweils pro ml angegeben. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von vier unabhängigen Experimenten. Die Expression wurde auf die Referenz Gene *CYC1* und *GAPDH* bezogen. Statistische Unterschiede zur DMSO 0 ng TGF α -Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$).

Abschließend wurden in dieser Versuchsreihe erneut die Genexpressionsprofile der Entzündungsmediatoren untersucht, um zu analysieren, ob auch auf transkriptioneller Ebene ein Zusammenhang zwischen Wachstumsfaktoren und der Freisetzung von Entzündungsmediatoren nachweisbar war. Die Ergebnisse zeigten sowohl für *CXCL8* (Abbildung 11a) und *IL-1B* (Abbildung 11b) als auch *IL-6* (Abbildung 11c) eine deutliche Steigerung der mRNA-Expression nach Hinzugabe von 10 ng/ml TGF α , was erneut auf einen Zusammenhang zwischen Wachstumsfaktoren und der Freisetzung Entzündungsmediatoren hindeutet, welcher auch auf transkriptioneller Ebene sichtbar wurde. Des Weiteren wurde auch wieder eine Zunahme in der *CXCL8* mRNA-Expression nach Zugabe von Yoda1 beobachtet (Abbildung 11a), wodurch abermals eine Entzündungsreaktion nach Piezo1 Stimulation in den HaCaT-Zellen deutlich wird.

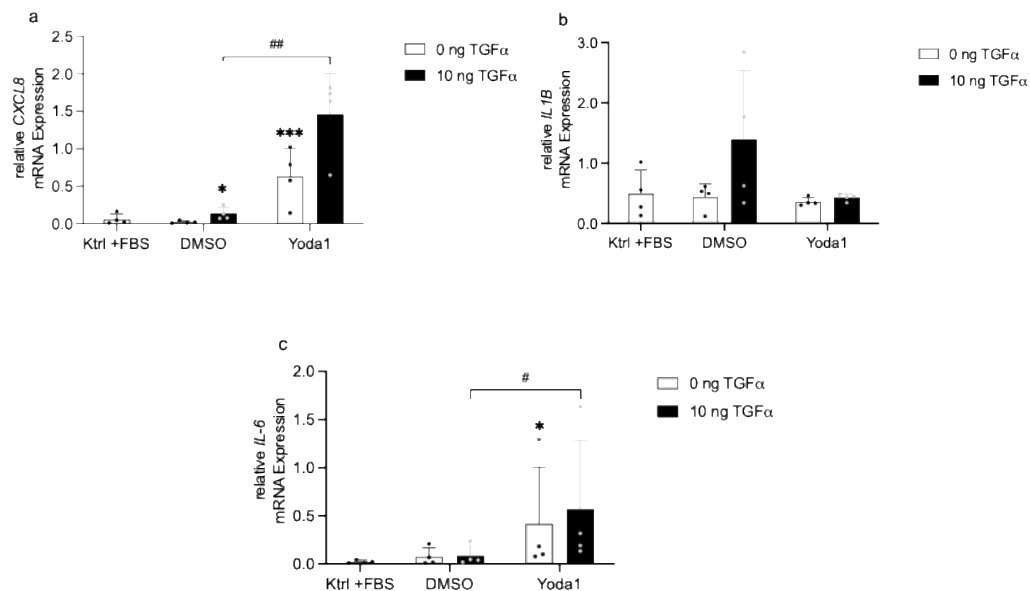


Abbildung 11: mRNA-Expression von CXCL8, IL-1B und IL-6 nach FBS freier Kultivierung und Rekonstitution mit TGFα

Die CXCL8, IL-1B und IL-6 mRNA-Expression wurden mittels qPCR quantifiziert. Die HaCaT-Zellen wurden mit TGFα rekonstituiert (die Konzentrationen des TGFα sind jeweils pro ml angegeben) und für 4 h mit Yoda1 (10 μM) stimuliert. Die Konzentrationen des TGFα sind jeweils pro ml angegeben. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von vier unabhängigen Experimenten. Die Expression wurde auf die Referenz Gene *CYCI* und *GAPDH* bezogen. Statistische Unterschiede zur DMSO 0 ng TGFα-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,001).

4.2.3 Rekonstitution von AREG und der Einfluss auf die ADAM-abhängige Freisetzung von IL-8

In einer nächsten Versuchsreihe wurden die HaCaT-Zellen anstatt mit TGFα mit AREG rekonstituiert, nachdem sie 24 h in FBS freiem Medium bzw. mit FBS kultiviert wurden, um einen möglichen Rückkopplungs-Mechanismus von Wachstumsfaktoren weiter zu untersuchen. Da ein AREG-ELISA nach Hinzugabe von AREG nicht möglich war, wurde hier zunächst nur die Freisetzung von IL-8 analysiert (Abbildung 12). Die Daten zeigten tendenziell mehr IL-8 Freisetzung je mehr AREG hinzugegeben wurde, allerdings nur in der Gruppe mit FBS. In der Gruppe, in der die Zellen 24 h ohne FBS kultiviert wurden, wurde kein IL-8, bzw. nur sehr wenig IL-8 freigesetzt. Somit decken sich die Ergebnisse mit der IL-8 Freisetzung nach TGFα Substitution, da hier ohne Yoda1-Stimulation trotz TGFα Substitution auch keine Freisetzung stattfand (Abbildung 9b).

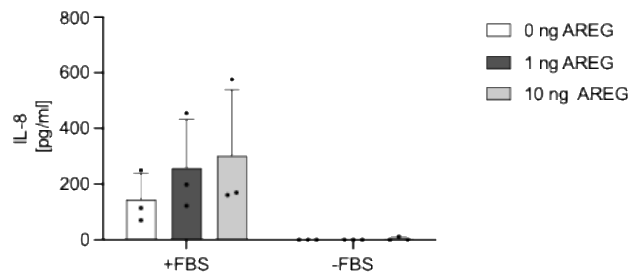


Abbildung 12: Freisetzung von IL-8 nach FBS-freier Kultivierung und Rekonstitution mit AREG

Die IL-8-Freisetzung wurde mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert. Die HaCaT-Zellen wurden für 4 h mit AREG rekonstituiert. Die Konzentrationen von AREG sind jeweils pro ml angegeben. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten. Statistische Unterschiede zur 0 ng AREG-Kontrolle (+FBS) sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$).

4.2.4 Einfluss der AREG-Rekonstitution auf Piezo1-abhängige Genexpressionsprofile

Anschließend wurden genau wie in der Versuchsreihe zuvor wieder qPCRs durchgeführt, um zu analysieren, wie die Substitution von AREG das Genexpressionsprofil der HaCaT-Zellen moduliert. Die Analyse der AREG-mRNA-Expression (Abbildung 13a) zeigte eine dosisabhängige signifikante Steigerung in Abhängigkeit von der Menge des zugegebenen AREG. In der Gruppe der Zellen, welche 24 h ohne FBS kultiviert wurden, zeigte sich im Vergleich, eine signifikant ausgeprägtere dosisabhängige Steigerung der mRNA-Expression. Während das Genexpressionsprofil von *HBEGF* (Abbildung 13b) dem Genexpressionsprofil von *AREG* sehr ähnelte, zeigte das Genexpressionsprofil von *TGFA* (Abbildung 13c) lediglich eine dosisabhängige signifikante Steigerung in der Gruppe der Zellen, welche 24 h ohne FBS kultiviert wurden.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse genau wie die Daten, welche in Abbildung 10 dargestellt werden, ebenfalls auf einen positiven Rückkopplungs-Mechanismus durch die Induktion und Freisetzung weiterer Wachstumsfaktoren hin.

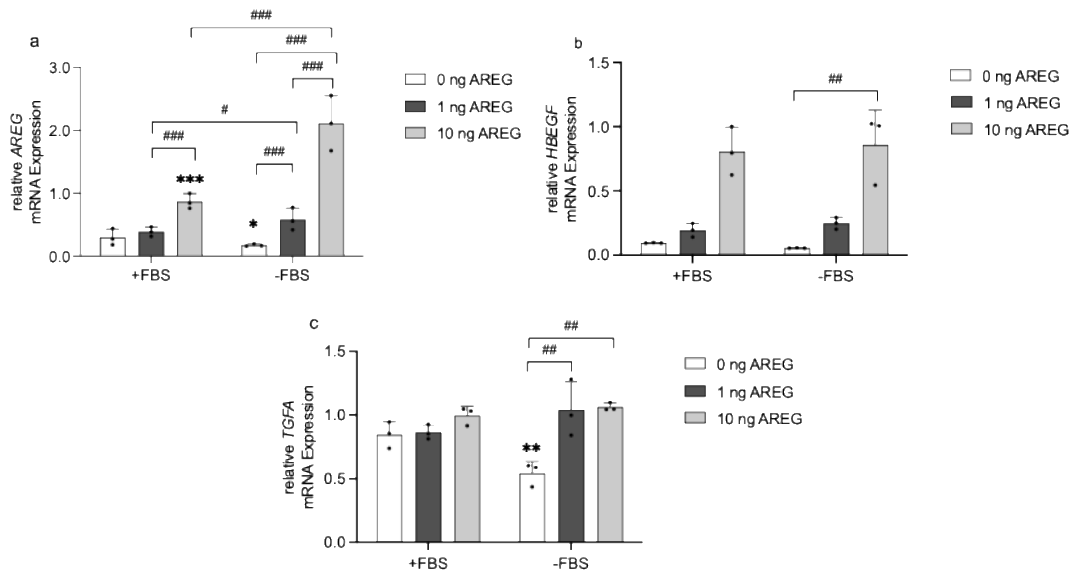


Abbildung 13: mRNA-Expression von *AREG*, *HBEGF* und *TGFα* nach EGFR-Inhibierung und Rekonstitution mit AREG

Die *AREG*, *HBEGF* und *TGFα* mRNA-Expression wurden mittels qPCR quantifiziert. Die HaCaT-Zellen wurden für 4 h mit AREG rekonstituiert. Die Konzentrationen von AREG sind jeweils pro ml angegeben. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten. Die Expression wurde auf die Referenzgene *CYC1* und *GAPDH* bezogen. Statistische Unterschiede zur 0 ng AREG-Kontrolle (+FBS) sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$).

In einem nächsten Schritt wurde anschließend auch in dieser Versuchsreihe die mRNA-Expression von *CXCL8*, *IL-1B* und *IL-6* analysiert (Abbildung 14). Die Ergebnisse des Genexpressionsprofils von *CXCL8* (Abbildung 14a) ähneln dem Genexpressionsprofil von *AREG* (Abbildung 13a) sehr stark und zeigen eine dosisabhängige signifikante Steigerung sowohl für die Gruppe der Zellen, welche mit FBS kultiviert wurden, als auch für die Gruppe der Zellen, welche in Abwesenheit von FBS kultiviert wurden, obwohl nur eine Freisetzung von IL-8 in der Gruppe der Zellen erfolgte, welche mit FBS kultiviert wurden. Während das Genexpressionsprofil von *IL-6* (Abbildung 14c) dem von *CXCL8* sehr ähnelte, zeigte die mRNA-Expression von *IL-1B* (Abbildung 14b) ausschließlich eine tendenziell dosisabhängige Steigerung in Abhängigkeit von AREG in der Gruppe, welche mit FBS kultiviert wurde.

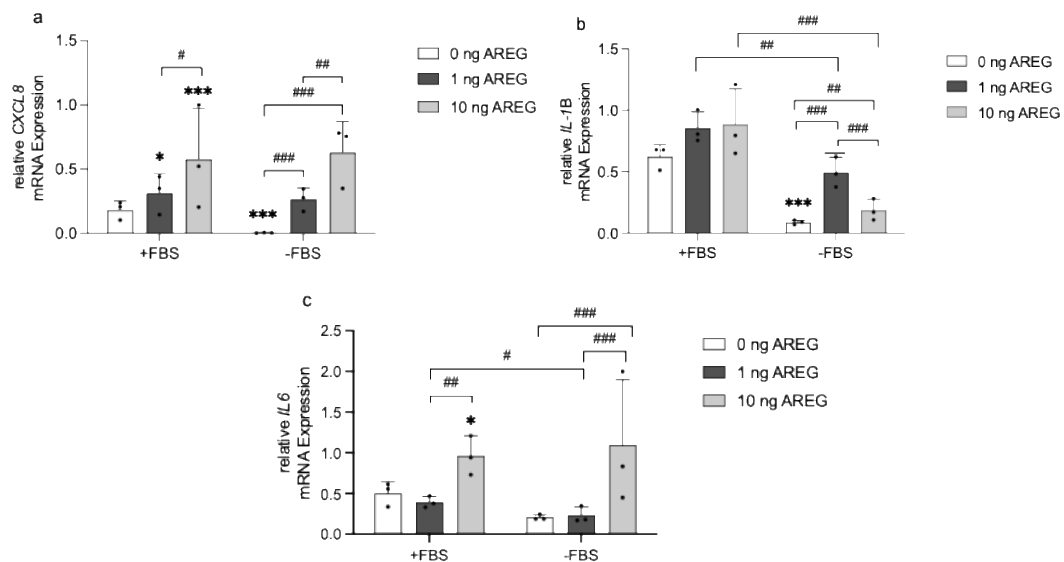


Abbildung 14: mRNA-Expression von *CXCL8*, *IL-1β* und *IL-6* nach FBS-freier Kultivierung und Rekonstitution mit AREG

Die *CXCL8*, *IL-1β* und *IL-6* mRNA-Expression wurden mittels qPCR quantifiziert. Die HaCaT-Zellen wurden für 4 h mit AREG rekonstituiert. Die Konzentrationen von AREG sind jeweils pro ml angegeben. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten. Die Expression wurde auf die Referenz Gene *CYCI* und *GAPDH* bezogen. Statistische Unterschiede zur 0 ng AREG-Kontrolle (+FBS) sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$).

4.3 Regulierung der Yoda1-induzierten Antwort durch Inhibition des EGF-Rezeptors

Um abschließend den Einfluss EGFR-Signalübertragung in der Piezo1-ADAM-Achse beweisen zu können, wurde Cetuximab verwendet. Bei Cetuximab handelt es sich um einen chimären monoklonalen Antikörper, welcher den EGFR hemmt (Maiello et al. 2007).

4.3.1 Regulierung der AREG-Freisetzung durch eine Cetuximab Konzentrationsreihe

Zunächst wurde Cetuximab in unterschiedlichen Konzentrationen getestet, gefolgt von einer Analyse, ob eine Zugabe von Cetuximab, sowohl 24 h vor der Stimulation als auch während der Stimulation mit Yoda1 erforderlich war (+/+) oder ob eine Zugabe von Cetuximab entweder nur während der Stimulation (-/+) oder nur 24 h vorher ausreichend war (+/-). Die Ergebnisse zeigten eine dosisabhängige signifikant verminderte Freisetzung von AREG, sowohl unstimuliert als auch nach Yoda1-Stimulation, wobei die Zugabe von 10.000 ng pro ml die größte Wirkung zeigte (Abbildung 15a). Des Weiteren zeigten die

Ergebnisse eine signifikant verminderte Freisetzung in unstimulierten und mit Yoda1 stimulierten Zellen nach Zugabe von Cetuximab 24 h vor der Stimulation und während der Stimulation (Abbildung 15b). Daher wurde im weiteren Verlauf der Versuchsreihe mit einer Konzentration von 10.000 ng Cetuximab pro ml und einer Zugabe von Cetuximab sowohl 24 h vor der Stimulation als auch während der Stimulation gearbeitet.

Zusammenfassend belegen die vorliegenden Daten abschließend einen Einfluss der EGFR-Signalübertragung auf die Piezo1-ADAM-Achse in HaCaT-Zellen.

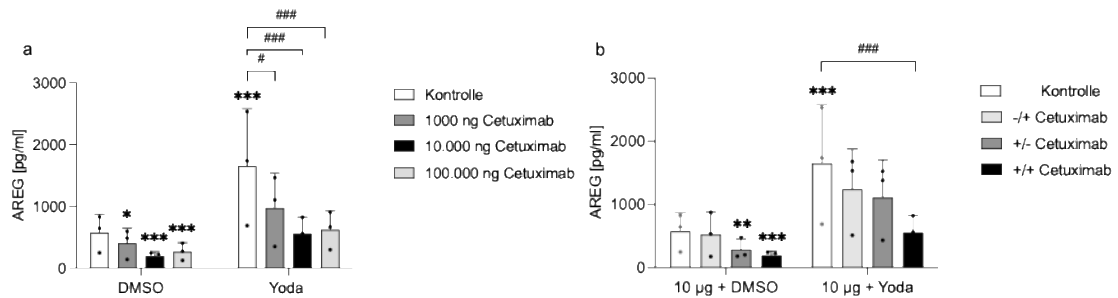


Abbildung 15: Freisetzung von AREG nach Inhibierung durch Cetuximab

Die AREG-Freisetzung wurde mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert. Die HaCaT-Zellen wurden für 4 h mit Yoda1 (10 µM) stimuliert. Die Zugabe von Cetuximab (10.000 ng pro ml) erfolgte wie angegeben in unterschiedlichen Konzentrationen und 24h vor und während der Stimulation mit Yoda1/DMSO (+/+), nur 24h vor Stimulation mit Yoda1/DMSO (+/-), nur während der Stimulation mit Yoda1/DMSO (-/+) oder weder 24h vor der Stimulation noch während der Stimulation mit Yoda1/DMSO (Kontrolle). Die Konzentrationen von Cetuximab sind jeweils pro ml angegeben. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten. Statistische Unterschiede zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$).

4.3.2 Regulierung des Genexpressionsprofil von Wachstumsfaktoren durch Cetuximab

Anschließend wurden auch in dieser Versuchsreihe wieder qPCRs durchgeführt, um den Einfluss von Cetuximab auch auf transkriptioneller Ebene beurteilen zu können. Für alle drei getesteten Wachstumsfaktoren war die Yoda1-induzierte Genexpression durch Zugabe von Cetuximab wieder auf das Basalniveau reduziert. (Abbildung 16).

Die vorliegenden Daten zeigen daher, dass die EGFR-Signalübertragung wichtig für die Piezo1-vermittelte Geninduktion von Wachstumsfaktoren ist.

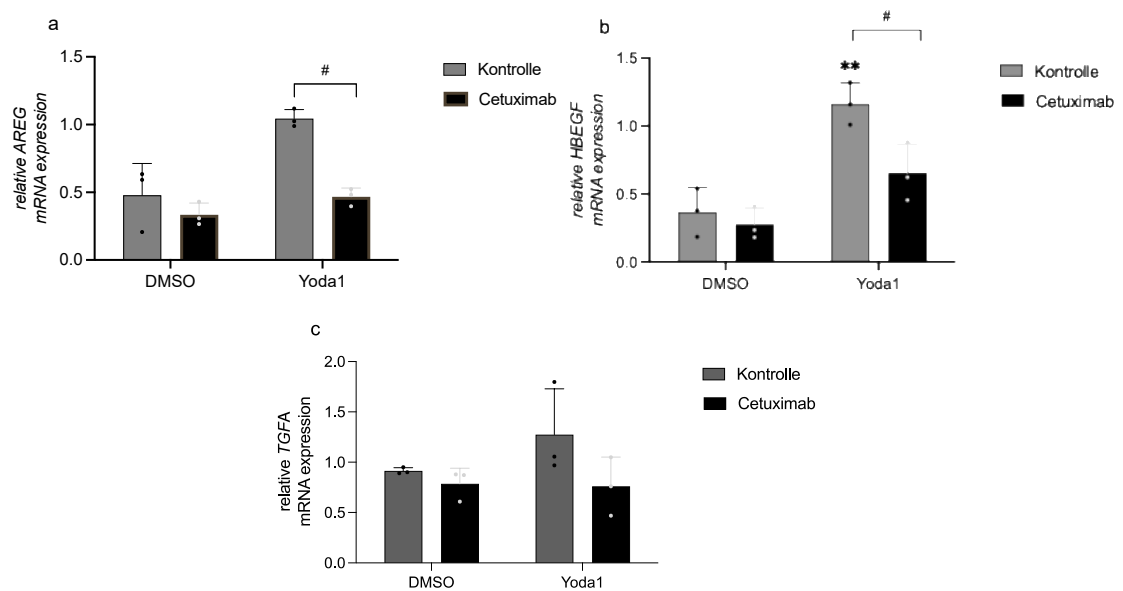


Abbildung 16: mRNA-Expression von *AREG*, *HBEGF* und *TGFα* nach Inhibition durch Cetuximab

Die *AREG*, *HBEGF* und *TGFα* mRNA-Expression wurden mittels qPCR quantifiziert. Die HaCaT-Zellen wurden für 4 h mit Yoda1 (10 μ M) stimuliert. Die Zugabe von Cetuximab (10.000 ng pro ml) erfolgte 24 h vor und während der Stimulation mit DMSO/Yoda1 oder weder vor noch während der Stimulation mit DMSO/Yoda1 (Kontrolle). Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten. Die Expression wurde auf die Referenz Gene *CYC1* und *GAPDH* bezogen. Statistische Unterschiede zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$).

4.3.3 Regulierung der Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch Cetuximab

Um ebenfalls noch einmal den Einfluss der EGFR-Signalübertragung auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren beweisen zu können, wurde die IL-8 Freisetzung mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert. Die Daten zeigten, eine signifikante Abnahme der durch Yoda1 stimulierten IL-8 Freisetzung nach Zugabe von Cetuximab, was abschließend beweist, dass die IL-8 Freisetzung zu einem großen Teil von der EGFR-Signalübertragung abhängig ist (Abbildung 17).

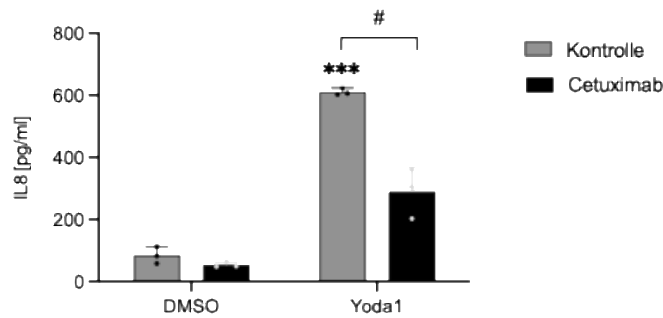


Abbildung 17: Freisetzung von IL-8 nach Inhibierung durch Cetuximab

Die IL-8 Freisetzung wurde mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert. Die HaCaT-Zellen wurden für 4 h mit Yoda1 (10 μ M) stimuliert. Die Zugabe von Cetuximab (10.000 ng pro ml) erfolgte 24 h vor und während der Stimulation oder weder vor noch während der Stimulation (Kontrolle). Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten. Statistische Unterschiede zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$).

4.3.4 Regulierung des Genexpressionsprofils von Entzündungsmediatoren durch Cetuximab

Um zu beurteilen ob die in Abbildung 17 beobachteten Effekte auch auf transkriptioneller Ebene nachweisbar waren, wurden abschließend qPCRs von *CXCL8*, *IL-1B* und *IL-6* durchgeführt. Tendenziell ergab sich eine Abnahme der Yoda1-induzierten mRNA-Expression nach Zugabe von Cetuximab für sowohl *CXCL8* (Abbildung 18a) als auch *IL-1 β* und *IL-6* (Abbildung 18b und Abbildung 18c). Die mRNA-Expression von *IL-1B* zeigte sogar eine Reduktion auf basaler Ebene. Zusammenfassend deuteten die Ergebnisse auf eine EGFR-vermittelte Induktion der Entzündungsreaktion durch Yoda1 hin, die auch auf transkriptioneller Ebene andeutungsweise sichtbar ist.

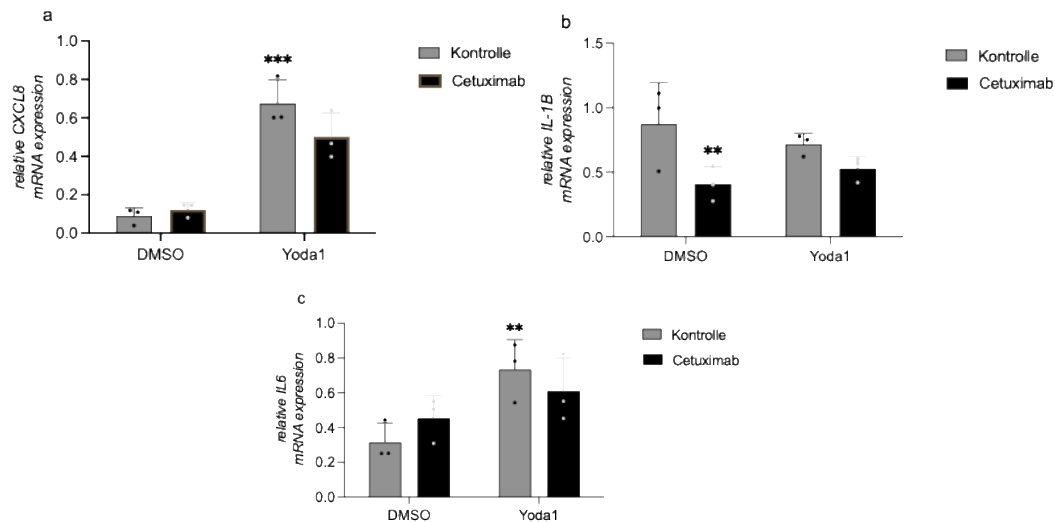


Abbildung 18: mRNA-Expression von *CXCL8*, *IL-1B* und *IL-6* nach Inhibition durch Cetuximab
 Die *CXCL8*, *IL-1B* und *IL-6* mRNA-Expression wurden mittels qPCR quantifiziert. Die HaCaT-Zellen wurden für 4 h mit Yoda1 (10 μ M) stimuliert. Die Zugabe von Cetuximab (10.000 ng pro ml) erfolgte 24 h vor und während der Stimulation oder weder vor noch während der Stimulation (Kontrolle). Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten. Die Expression sind auf die Referenzgene *CYC1* und *GAPDH* bezogen. Statistische Unterschiede zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$).

4.4 Regulierung der Yoda1-induzierten Antwort durch Inhibition des EGF-Rezeptors und gleichzeitiger Rekonstitution mit AREG

In der nachfolgenden Versuchsreihe wurden die HaCaT-Zellen sowohl 24 h ohne FBS kultiviert, mit Cetuximab behandelt als auch mit AREG rekonstituiert. Es wurde geprüft, ob die Wirkung von Yoda1 nach der Rekonstituierung von AREG durch Cetuximab erneut gehemmt werden konnte. Da in vorangegangenen Versuchen gezeigt wurde, dass eine AREG-Konzentration von 10 ng/ml den größten Effekt erzielte, wurden die nachfolgenden Versuche mit dieser Konzentration durchgeführt. Die dargestellten Effekte nach DMSO-Zugabe und Yoda1-Stimulation mit HaCaT-Zellen, welche in Medium mit FBS kultiviert wurden, dienten als Kontrolle. Im Folgenden werden nur die Effekte durch die gleichzeitige Zugabe von AREG und Cetuximab beschrieben. Die Effekte durch die Stimulation mit Yoda in FBS und in FBS freier Kultivierung bereits in Kapitel 4.1 beschrieben wurden dienen sie hier nur zur Veranschaulichung.

4.4.1 Regulierung der Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch Cetuximab und gleichzeitiger Rekonstitution mit AREG

Da ein AREG-ELISA nach der Zugabe von AREG nicht möglich war, wurde hier zunächst ein IL-8 ELISA durchgeführt, um die Freisetzung von IL-8 zu analysieren (Abbildung 19). HaCaT-Zellen, welche 24 h ohne FBS kultiviert wurden, zeigten eine geringfügige Steigerung der IL-8 Freisetzung durch AREG. Diese geringfügige Steigerung war signifikant vermindert durch die Zugabe von Cetuximab. HaCaT-Zellen, welche 24 h mit FBS kultiviert wurden, zeigten, wie erwartet, eine deutliche Steigerung der IL-8 Freisetzung durch Yoda 1 und auch hier deutet sich eine tendenzielle Reduktion des Effektes durch Cetuximab an. Die Daten weisen daher erneut auf eine EGFR-abhängige Freisetzung von IL-8 hin, da auch durch Zugabe von exogenem AREG, wie auch bei Zugabe von exogenem TGF α , die Abwesenheit von FBS teilweise kompensiert wurde.

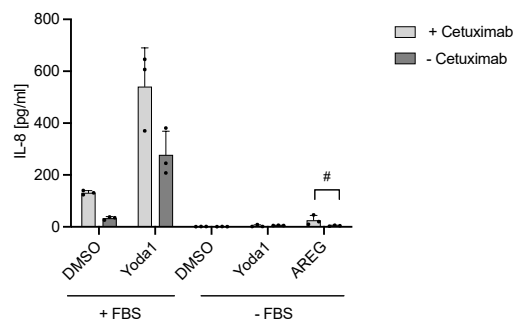


Abbildung 19: Freisetzung von IL-8 nach Inhibierung durch Cetuximab und Rekonstitution mit AREG

Die AREG-Freisetzung wurde mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert. Die HaCaT-Zellen wurden für 4 h mit Yoda1 (10 μ M), DMSO und AREG (10.000 pg pro ml) stimuliert. Die Zugabe von Cetuximab (10.000 ng pro ml) erfolgte 24 h vor und während der Stimulation. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten. Statistische Unterschiede zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$).

4.4.2 Regulierung des Genexpressionsprofils von Wachstumsfaktoren durch Cetuximab und gleichzeitiger Rekonstitution mit AREG

In einem nächsten Schritt wurden auch in dieser Versuchsreihe erneut qPCRs von *AREG*, *HBEGF* und *TGF α* durchgeführt, um den Einfluss von Cetuximab und die gleichzeitige Rekonstitution mit AREG auf transkriptioneller Ebene beurteilen zu können.

Zusammenfassend kam es durch die Zugabe von AREG generell zu einer tendenziellen Induktion und somit Rekonstitution, die durch Zugabe von Cetuximab wieder aufgehoben werden konnte (Abbildung 20).

Die Ergebnisse zeigten daher die zentrale Bedeutung der EGFR-Signalübertragung für die Piezo1-vermittelte mRNA-Induktion von Wachstumsfaktoren, da auch hier durch Zugabe von AREG, die Abwesenheit von FBS kompensiert wurde.

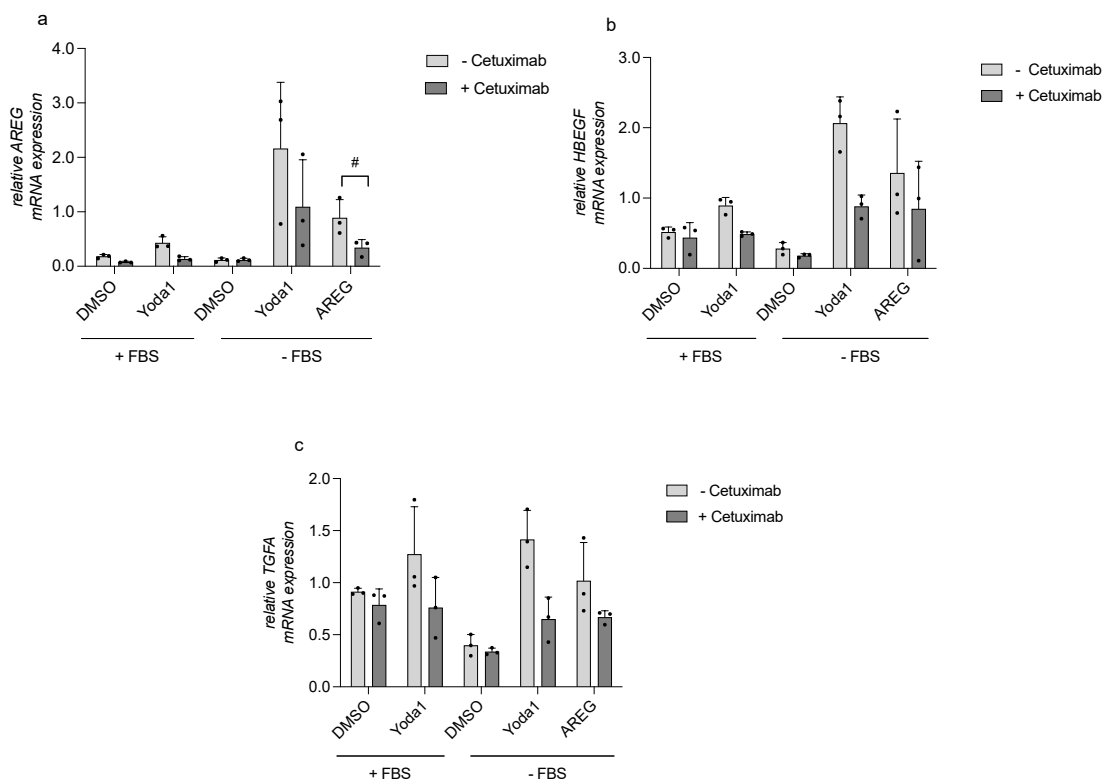


Abbildung 20: Genexpression von *AREG*, *HBEGF* und *TGFA* nach Inhibierung durch Cetuximab und Rekonstitution mit AREG

Die *AREG*, *HBEGF* und *TGFA* mRNA-Expression wurden mittels qPCR quantifiziert. Die HaCaT-Zellen wurden für 4h mit Yoda1 (10 μ M), DMSO und AREG (10 ng pro ml) stimuliert. Die Zugabe von Cetuximab (10.000 ng pro ml) erfolgte 24 h vor und während der Stimulation. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten. Die Expression wurde auf die Referenzgene *CYC1* und *GAPDH* bezogen. Statistische Unterschiede zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$).

4.4.3 Regulierung des Genexpressionsprofil von Entzündungsmediatoren durch Cetuximab und gleichzeitiger Rekonstitution mit AREG

Abschließend wurden in dieser Versuchsreihe ebenfalls qPCRs von *CXCL8*, *IL-1B* und *IL-6* durchgeführt, um die mRNA-Expression dieser Gene zu analysieren. Die Ergebnisse zeigen für *CXCL8* eine signifikant verminderte mRNA-Expression nach Rekonstitution mit AREG und gleichzeitiger Inhibierung durch Cetuximab im Vergleich zur Kontrolle mit Cetuximab, da auch hier die Rekonstitution mit exogenem AREG die Effekte von der Abwesenheit von FBS teilweise aufhob (Abbildung 21a). Das Genexpressionsprofil von *IL-1B* zeigte ebenfalls eine tendenziell verminderte mRNA-Expression nach Rekonstitution mit AREG und gleichzeitiger Inhibierung durch Cetuximab (Abbildung 21b).

Schlussfolgernd belegten diese Ergebnisse erneut, dass die mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren EGFR vermittelt ist.

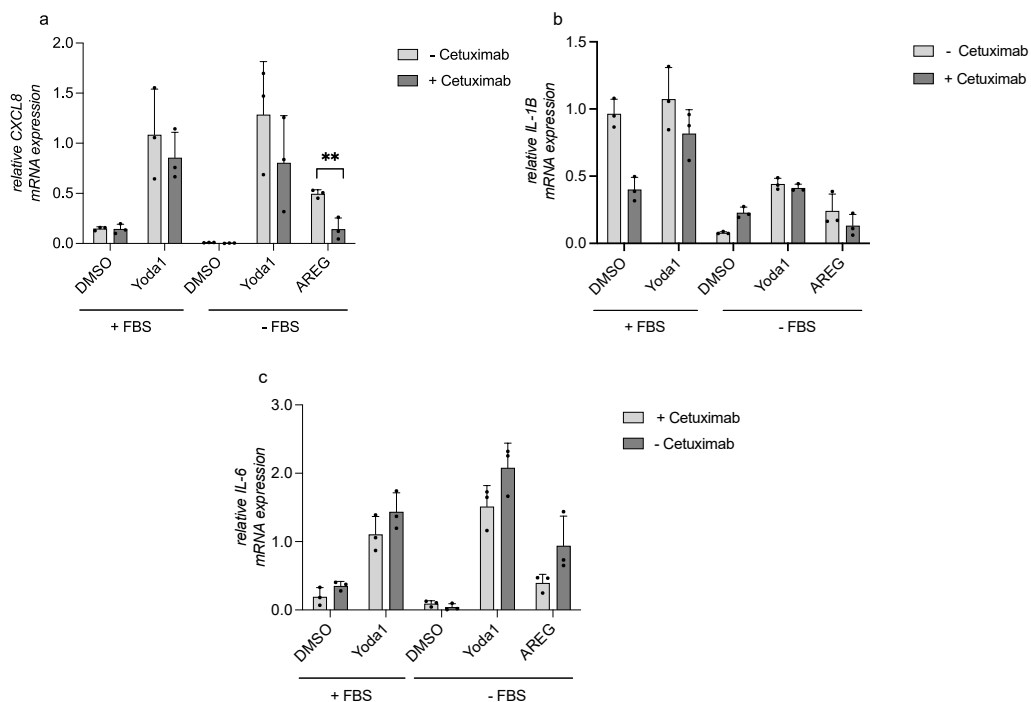


Abbildung 21: Genexpression von *CXCL8*, *IL-1B* und *IL-6* nach Inhibierung durch Cetuximab und Rekonstitution mit AREG

Die *CXCL8*, *IL-1B* und *IL-6* mRNA-Expression wurden mittels qPCR quantifiziert. Die HaCaT-Zellen wurden für 4 h mit Yoda1 (10 μ M), DMSO und AREG (10 ng pro ml) stimuliert. Die Zugabe von Cetuximab (10.000 ng pro ml) erfolgte 24 h vor und während der Stimulation. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten. Die Expression wurde auf die Referenzgene *CYC1* und *GAPDH* bezogen. Statistische Unterschiede zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$)

4.5 Validierung der Ergebnisse durch N/TERT-1-Zellen

In einer abschließenden Versuchsreihe sollten die zuvor mit HaCaT-Zellen generierten Daten mittels N/TERT-1-Zellen validiert werden, da diese ebenfalls immortalisierte Keratinozyten Zelllinie nach heutigem Stand der Forschung als physiologisch relevanter gilt (Smits et al. 2017).

Da es aufgrund der Zusammensetzung des Mediums nicht ohne weiteres möglich war die Zellen FBS-frei zu kultivieren, wurde hier stattdessen direkt Cetuximab verwendet, um die EGFR-Signalübertragung zu inhibieren.

4.5.1 Regulierung der AREG und IL-8 Freisetzung durch Cetuximab in N/TERT-1-Zellen

Abschließend sollte auch in N/TERT-1-Zellen bestätigt werden, dass es im Zuge der Piezo1-Aktivierung zu einer verstärkten ADAM10- und -17 abhängigen Freisetzung von AREG und IL-8 kommt. Dies wurde mit Hilfe des ADAM10/17 Inhibitors GW ermittelt. Zudem wurde untersucht, ob auch in den N/TERT-1-Zellen ein Einfluss der EGFR-Signalübertragung auf die Piezo1-ADAM-Achse nachweisbar ist. Piezo1-Stimulation ergab zunächst eine verstärkte Freisetzung von AREG und IL-8. Beide Prozesse wurden durch die Inhibition von ADAM10/17 mittels GW signifikant vermindert und sind daher von der Aktivität von ADAM10/17 abhängig (Abbildung 22a) (Abbildung 22b). Zudem zeigte sich auch hier der Einfluss der EGFR-Signalübertragung für die Freisetzung von AREG und IL-8, da sowohl die AREG als auch die IL-8 Freisetzung nach Inhibierung durch Cetuximab signifikant vermindert waren. Die kombinierte Inhibition durch GW und Cetuximab führte zur stärksten Reduktion der AREG und IL-8 Freisetzung in den N/TERT-1-Zellen.

Zusammenfassend bestätigen die vorliegenden Daten, die zuvor erhobenen Ergebnisse der HaCaT-Zellen.

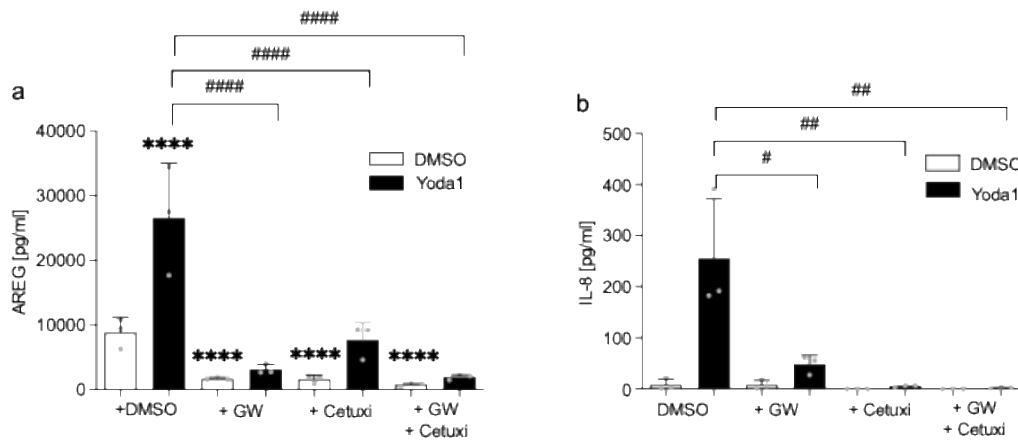


Abbildung 22: Freisetzung von AREG und IL-8 nach Inhibierung durch Cetuximab

Die AREG und IL-8 Freisetzung wurde mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert. Die N/TERT-1-Zellen wurden für 4 h mit Yoda1 (10 μ M) stimuliert. Die Zugabe von Cetuximab (10.000 ng pro ml) erfolgte 24 h vor und während der Stimulation. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten. Statistische Unterschiede zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$) Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$).

4.5.2 Regulierung des Genexpressionsprofils von Wachstumsfaktoren durch Cetuximab in N/TERT-1-Zellen

In einem nächsten Schritt wurden qPCRs von *AREG*, *HBEGF* und *TGFA* durchgeführt, um den Einfluss von Cetuximab und GW auch auf transkriptioneller Ebene beurteilen zu können. Das Genexpressionsprofil von *AREG* zeigte nach Yoda1-Stimulation eine signifikante Induktion der Genexpression, wie bei den HaCaT-Zellen auch. Weiter deuten die Daten interessanterweise zwar auf eine signifikant verminderte mRNA-Expression nach Inhibition von Cetuximab hin, allerdings wird auf transkriptioneller Ebene kein Effekt durch GW deutlich (Abbildung 23a). Bei dem Genexpressionsprofil von *HBEGF* (Abbildung 23b) wurde auch auf transkriptioneller Ebene der Effekt von GW und Cetuximab deutlich, in beiden Fällen zeigte sich eine signifikant verminderte mRNA-Expression. Für *TGF α* deutete sich auf transkriptioneller Ebene zwar ein Effekt von GW deutlich aber nicht von Cetuximab an (Abbildung 23c).

Zusammenfassend weisen die Genexpressionsprofile von *AREG* und *HBEGF* auf einen Einfluss der EGFR-Signalübertragung auf die Piezo-ADAM-Achse hin.

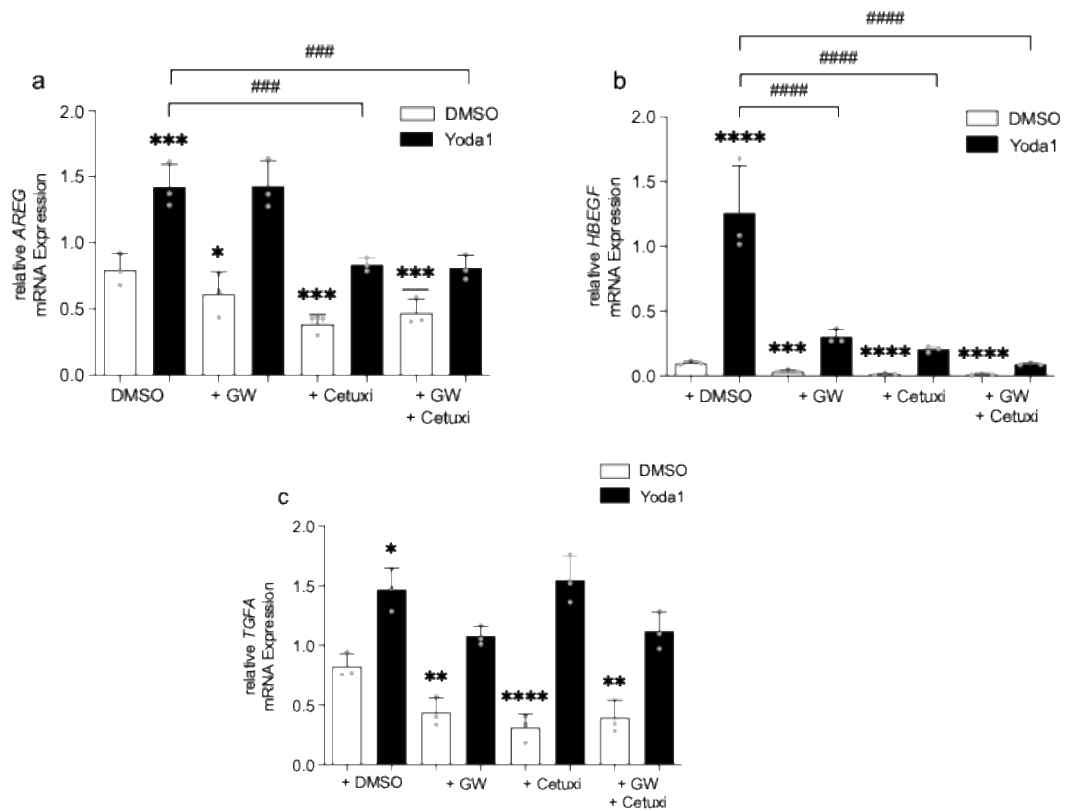


Abbildung 23: Genexpression von *AREG*, *HBEGF* und *TGFA* nach Inhibierung durch Cetuximab
 Die *AREG*, *HBEGF* und *TGFA* mRNA-Expression wurden mittels qPCR quantifiziert. Die N/TERT-1-Zellen wurden für 4 h mit Yoda1 (10 μ M) stimuliert. Die Zugabe von Cetuximab (10.000 ng pro ml) erfolgte 24 h vor und während der Stimulation. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten. Die Expression wurde auf die Referenz Gene *CYC1* und *GAPDH* bezogen. Statistische Unterschiede zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$) Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$).

4.5.3 Regulierung des Genexpressionsprofils von Entzündungsmediatoren durch Cetuximab in N/TERT-1-Zellen

Als letzter Schritt wurden auch die Genexpressionsprofile von *CXCL8*, *IL-1B* und *IL-6* analysiert, um zu überprüfen, ob die für die Freisetzung der Proteine beobachteten Effekte auch auf transkriptioneller Ebene nachweisbar waren. Für *CXCL8*, genau wie bei den HaCaT-Zellen, war eine Zunahme der mRNA-Expression nach Yoda1-Stimulation sowie eine tendenziell verminderte mRNA-Expression sowohl nach Inhibition durch GW als auch Inhibition durch Cetuximab erkennbar (Abbildung 24a). Das Genexpressionsprofil von *IL-1B* ähnelte dem von *CXCL8* und zeigte ebenfalls eine hier sogar signifikant verminderte mRNA-Expression nach Inhibition durch GW und Cetuximab (Abbildung 24b). Lediglich das Genexpressionsprofil von *IL-6* zeigte, genau wie bei den HaCaT-Zellen, keine verminderte mRNA-Expression nach GW, stattdessen nur durch bei Inhibition durch Cetuximab (Abbildung 24c). Zusammenfassend bestätigten diese Ergebnisse, die zuvor erhobenen Daten der HaCaT-Zellen. Auch auf transkriptioneller Ebene, wurde die Entzündungsreaktion nach Piezo1 Stimulation deutlich, sowie zumindest für *CXCL8* und *IL-1B* die EGFR vermittelte mRNA-Expression.

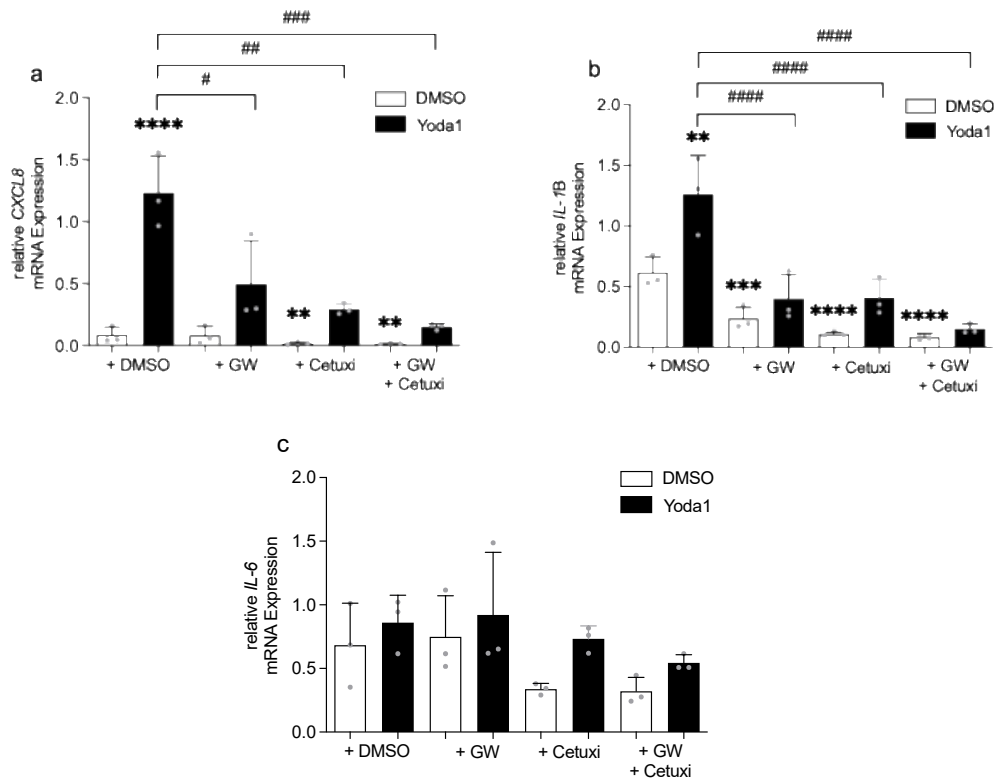


Abbildung 24: Genexpression von CXCL8, IL-1B und IL-6 nach Inhibierung durch Cetuximab

Die CXCL8, IL-1B und IL-6 mRNA-Expression wurden mittels qPCR quantifiziert. Die N/TERT-1 wurden für 4h mit Yoda1 (10 µM) stimuliert. Die Zugabe von Cetuximab (10.000 ng pro ml) erfolgte 24 h vor und während der Stimulation. Die Daten sind als Mittelwert + SD dargestellt und stammen von drei unabhängigen Experimenten. Die Expression wurde auf die Referenz Gene *CYC1* und *GAPDH* bezogen. Statistische Unterschiede zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$) Statistische Unterschiede zwischen Gruppen sind durch Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$).

5 Diskussion

5.1 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren

In dieser Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass es bei Piezo1-Aktivierung von Keratinozyten zu einer vermehrten Freisetzung von Wachstumsfaktoren kommt. Die Piezo1-Aktivierung wird in dieser Arbeit durch Yoda1-Stimulation initiiert. Auf diese Weise wird eine mechanische Stimulation der Zelle über den Mechanosensor Piezo1 nachgestellt (Syeda et al. 2015). Für die Beantwortung der Frage, warum und wie es bei Keratinozyten nach Piezo1-Aktivierung überhaupt zu einer vermehrten Freisetzung von Wachstumsfaktoren kommt, gibt es bereits Hinweise in der Literatur. Einerseits kommt es durch die Öffnung des nicht selektiven Kationenkanals Piezo1 zu einem vermehrten Einstrom von Kalzium in die Zelle, was zu einer Aktivierung des ERK1/2 Signalweges führt (Sugimoto et al. 2023) wodurch eine vermehrte Freisetzung von Wachstumsfaktoren initiiert wird (Shi et al. 2002). Zum anderen kann der vermehrte Einstrom von Kalzium in die Zelle zur Aktivierung von ADAM-Proteasen führen, welche dann vermehrt Wachstumsfaktoren von der Zelloberfläche abspalten und in löslicher Form freisetzen (Horiuchi et al. 2007). Es ist zu vermuten, dass die Zelle auf die mechanische Stimulation mit einer vermehrten Freisetzung von Wachstumsfaktoren reagiert, um eine bei mechanischer Belastung erfolgte Gewebeschädigung durch Stimulation der Zellproliferation zu beheben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Hypothese untersucht, inwieweit die im FBS enthaltenen Wachstumsfaktoren einen Einfluss auf die Piezo1-vermittelte ADAM-Aktivierung haben. Beispielhaft hierfür wurde vor allem der Wachstumsfaktor AREG untersucht. Bei der Untersuchung dieser Hypothese konnte gezeigt werden, dass in der Abwesenheit von FBS keine Freisetzung von AREG nach Piezo1-Aktivierung in den Keratinozyten stattfindet. Ursache hierfür könnte eine verminderte mRNA-Expression von *AREG* sein. Allerdings zeigte sich hier sogar eine gesteigerte mRNA-Expression, sowohl bei den HaCaT-Zellen als auch bei den N/TERT-1-Zellen. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Bestandteile im FBS enthalten sein könnten, welche die Zellen für die Freisetzung von Wachstumsfaktoren benötigen. Die Frage, welcher spezifischer Bestandteil vom FBS für die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und damit für die Proliferation verantwortlich sein könnte, war über einen langen Zeitraum Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Untersuchungen. Aktuelle Studien gehen davon aus, dass Keratinozyten exogene Wachstumsfaktoren benötigen, um endogene zusätzliche Wachstumsfaktoren freizusetzen (Gstraunthaler & Lindl 2017). Diese Erkenntnis korreliert mit den im

Rahmen dieser Doktorarbeit erhobenen Daten, da auch hier nachgewiesen werden konnte, dass nachdem die Zellen in der Abwesenheit von FBS mit $TGF\alpha$ rekonstituiert wurden, es erneut zu einer AREG-Freisetzung kam. Dies konnte sowohl in den HaCaT-Zellen als auch in den N/TERT-1-Zellen nachgewiesen werden. Allerdings war die AREG-Freisetzung nach $TGF\alpha$ -Rekonstitution und in Abwesenheit von FBS reduziert im Vergleich zur AREG-Freisetzung nach Kultivierung der Zellen in FBS. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass im FBS neben mehreren Wachstumsfaktoren auch noch andere Bestandteile enthalten sind, welche für die Freisetzung der Wachstumsfaktoren und damit für die Proliferation der Zellen verantwortlich sein könnten. Laut aktueller Literatur könnte die Proliferation von Keratinozyten ebenfalls von Steroidhormonen beeinflusst werden, welche im FBS enthalten sind (Verdier-Sevrain et al. 2004; Lee et al. 2022). Auch der Insulin ähnliche Wachstumsfaktor (IGF), welcher ebenfalls im FBS enthalten ist und zur Gruppe der Peptidhormone gehört, könnte einen Einfluss auf die Freisetzung der Wachstumsfaktoren und somit auf die Proliferation der Keratinozyten haben (Kim & Kim 2005; Lee et al. 2022). Eine weitere alternative Erklärung für die verminderte AREG-Freisetzung nach $TGF\alpha$ -Rekonstitution im Vergleich zu den in FBS kultivierten Zellen, wäre eine verlangsamte AREG-Freisetzung nach Kultivierung ohne FBS. Weiter deuten die im Rahmen dieser Doktorarbeit erhobenen Daten darauf hin, dass nicht nur Wachstumsfaktoren benötigt werden, um Wachstumsfaktoren zu produzieren, sondern, dass für AREG sogar ein autokriner Aktivierungsmechanismus besteht. So führt die Aktivierung des EGF-Rezeptors durch AREG zu einer erhöhten Genexpression von *AREG*, was dann wiederum zu einer vermehrten Freisetzung dieses Liganden führt, es besteht also ein positiver Rückkopplungsmechanismus. Ein solche autokriner Aktivierungsmechanismus konnte sowohl in den HaCaT-Zellen als auch in den N/TERT-1-Zellen nachgewiesen werden. Dieses Erkenntnis wurde bereits in anderen zellulären Systemen beschrieben (Castillo et al. 2006). Interessanterweise zeigen die im Rahmen dieser Doktorarbeit gewonnen Daten, dass durch eine Aktivierung des EGF-Rezeptors durch AREG, sowohl die Genexpression von *AREG* als auch von *HB-EGF* nicht aber von $TGF\alpha$ stimuliert werden kann. Andersherum führt eine Aktivierung des EGF-Rezeptors durch $TGF\alpha$ zu einer gesteigerten Genexpression von sowohl *AREG* als auch *HB-EGF* als auch $TGF\alpha$. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass $TGF\alpha$ eine größere Wirksamkeit als anderen EGF-Liganden zugesprochen wird (Schreiber et al. 1986) als auch eine kurzzeitige Bindung und eine ebenso rasche Abspaltung (McCole et al. 2002). AREG hingegen führt zu einer schwächeren und langanhaltenden Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und somit zu einer schwächeren und länger anhaltenden Aktivierung des Rezeptors (Ro-

epstorff et al. 2009). Dies könnte dazu führen, dass die stärkere Geninduktion von TGF α ausreicht, um die Schwelle für die TGF α -Transkription zu überschreiten und somit zu einer erhöhten Genexpression führt, aber auf der anderen Seite die schwächere Geninduktion von AREG nicht ausreicht, um die Schwelle für die TGF α -Transkription zu überschreiten. Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die unterschiedlichen Intensitäten in der Aktivierung des EGF-Rezeptors der Zelle ermöglichen, präzise auf externe Stimuli zu reagieren, um beispielsweise eine gezielte Aktivierung von zentralen Signaltransduktionskaskaden wie RAS-RAF-MEK-ERK oder PI3K-AKT-Signalwege auszulösen.

Um abschließend noch einmal die Rolle der Wachstumsfaktoren und der EGFR-Signalübertragung zu verdeutlichen wurde der monoklonale Antikörper Cetuximab verwendet. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit erworbenen Daten zeigen eine deutliche verminderte Geninduktion nach Cetuximab, sowohl für AREG, HBEGF als auch TGF α . Interessanterweise wurde die Geninduktion von AREG durch Cetuximab stärker gehemmt als die Geninduktion von TGF α . Hierfür wären verschiedene Ursachen denkbar. Erstens wäre es denkbar, dass TGF α eine höhere Affinität zum EGF-Rezeptor aufweist und damit stärker und effizienter als AREG an den Rezeptor bindet und daher die Wirksamkeit von Cetuximab herabgesetzt wird (Shoyab et al. 1989). Eine zweite mögliche Erklärung wäre, dass die Aktivierung durch TGF α zu einer schnellen Internalisierung und Degradation des EGF-Rezeptors führt, während die Aktivierung durch AREG zu einem eher langsameren Recycling des Rezeptors führt, infolgedessen der Rezeptor länger auf der Zelloberfläche erhalten bleibt und erneut aktiviert werden kann oder bspw. durch Cetuximab geblockt werden kann. Cetuximab hat nach einer Aktivierung durch AREG also mehr Zeit um den Rezeptor anschließend zu blockieren. Hierfür lassen sich ebenfalls Hinweise in der Literatur finden (Holzinger 2021). Eine dritte mögliche Erklärung wäre, dass durch AREG vermittelte EGFR-Aktivierung ausgelöste Signalkaskaden in einem höheren Ausmaß von der kontinuierlichen EGFR-Aktivierung abhängig sind als Signalkaskaden, welche durch TGF α vermittelt werden. Dadurch, dass die EGFR-Aktivierung durch AREG langfristiger wirkt als die EGFR-Aktivierung durch TGF α , hat eine Blockierung durch Cetuximab stärkere Auswirkungen (Boryana Andreeva David 2024).

Im direkten Vergleich der beiden Zelllinien der HaCaT-Zellen und der N/TERT-1-Zellen ist besonders auffällig, dass N/TERT-1-Zellen wesentlich mehr AREG freisetzen als HaCaT-Zellen, obwohl beide Zelllinien sich sonst in ihren Reaktionsmustern sehr ähneln. Hierfür kämen unterschiedliche Ursachen in Betracht. Zum einen könnte es daran liegen, dass N/TERT-1-Zellen primären humanen Keratinozyten in ihrem Verhalten sehr nah

kommen und primäre humane Keratinozyten ebenfalls viel AREG freisetzen (Smits et al. 2017; Jakob unveröffentlichte Daten). Zum anderen könnte es sein, dass die AREG-Promotorregion der HaCaT-Zellen stärker methyliert ist, während die Promotorregion der N/TERT-1-Zellen aktiver ist und dadurch mehr AREG freigesetzt werden kann. Die Regulierung der AREG-Freisetzung durch Methylierung des Promotors konnte bereits für andere Zellsysteme nachgewiesen werden (Bormann 2014). Eine andere Erklärung könnte sein, dass bereits die basale Freisetzung von AREG durch ADAM10 und ADAM17 in den N/TERT-1-Zellen höher ist als in den HaCaT-Zellen. Für die basale Aktivität von ADAM10 und 17 gibt es ebenfalls Hinweise in der Literatur (Asai et al. 2003). Die basale Aktivität könnte in den N/TERT-1-Zellen höher sein auf Grund der stärkeren Expression von ADAM10 und 17. Transkriptomische Analysen von HaCaT-Zellen (GSE37361) und N/TERT-1-Zellen (GSE50568) lassen diese Vermutung wahrscheinlich erscheinen, auch wenn die Daten mit unterschiedlichen Systemen erhoben worden sind. So weisen im Vergleich der Daten N/TERT-1-Zellen ein 10-fach stärkeres Signal auf (White et al. 2014). Ein weiterer Erklärungsansatz wäre ein stärker ausgeprägter negativer Rückkopplungsmechanismus in den HaCaT-Zellen, welcher bei einer hohen AREG-Konzentration im Medium der HaCaT-Zellen zu einer verminderten AREG-Freisetzung führt. Negative Rückkopplungsmechanismen des EGF-Rezeptors wurden in der Vergangenheit bereits beschrieben (Avraham & Yarden 2011).

Während durch FBS der Zelle externe Substanzen zugeführt werden, blockiert der Inhibitor GW gezielt Signalwege in der Zelle selbst, indem die proteolytische Aktivität von ADAM10 und 17 inhibiert wird. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit erworbenen Daten in den HaCaT-Zellen deuten darauf hin, dass diese Inhibition von ADAM10 und 17 durch GW einen größeren Einfluss auf die Freisetzung von AREG zu haben scheint als die Abwesenheit von FBS. Da es bei den N/TERT-1-Zellen nicht ohne weiteres möglich war die Zellen FBS frei zu kultivieren wurde hier Cetuximab verwendet, um den EGFR-Rezeptor zu hemmen. Auch bei den N/TERT-1-Zellen zeigte die Inhibierung von ADAM 10 und 17 einen größeren Effekt als die Inhibierung des EGFR-Rezeptors durch Cetuximab. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen, wie bereits erwähnt, inhibiert GW direkt ADAM10 und 17 (Hundhausen et al. 2003), was zur Folge hat, dass AREG nicht mehr freigesetzt werden kann und auf der Zellmembran verbleibt. Weiter deutet die starke Inhibition von ADAM10 und 17 durch GW in den vorliegenden Daten darauf hin, dass die gesamte Freisetzung von AREG durch die proteolytische Abspaltung von ADAM10 und 17 geregelt wird und andere Freisetzungsmechanismen ausgeschlossen werden können. Die Abwesenheit von FBS hingegen hat nur einen indirekten Effekt,

da der Zelle von extern keine Wachstumsfaktoren mehr zugeführt werden, welche den EGF-Rezeptor aktivieren. Zum anderen fehlen den Zellen durch die Abwesenheit von FBS einige Wachstumsfaktoren und Zytokine, welche unter normalen Umständen ADAM17 aktivieren (Murphy 2008), allerdings weisen ADAM-Proteasen auch in der Abwesenheit von externen Stimuli eine konstitutive Basalaktivität auf (Berasain et al. 2009). Weiter kann ADAM17 auch in der Abwesenheit von FBS durch andere Stimulatoren aktiviert werden. Zum einen wird ADAM17 durch oxidativen Stress aktiviert (Brill et al. 2009), zum anderen, wie auch die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen, durch mechanischen Stress (Grannemann 2023). Auch lassen sich in der Literatur Hinweise dazu finden, dass hyperosmotischer Stress dazu führt, dass ADAM17 aktiviert wird (Fischer et al. 2004). Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die Freisetzung Wachstumsfaktoren nicht ausschließlich über externe Stimuli im FBS geregelt wird, weshalb die direkte Inhibition von ADAM10 und 17 einen größeren Einfluss auf die Freisetzung hat.

5.2 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren

Die zweite übergeordnete Fragestellung, welche im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht wurde, war, ob es im Zuge der mechanischen Aktivierung von Keratinozyten auch zu einer entzündlichen Reaktion kommt. Die vorliegenden Daten zeigen klar, dass eine mechanische Aktivierung mit einer entzündlichen Reaktion einhergeht. Dennoch scheint die Abwesenheit von FBS einen ebenso großen Einfluss auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren zu haben wie auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, da in der Abwesenheit von FBS auch kein IL-8 freigesetzt wird. Hierfür sind ebenfalls unterschiedliche Ursachen denkbar. Die wohl naheliegendste Erklärung wäre, dass für die Freisetzung von IL-8 zentrale Signalwege wie RAS-RAF-MEK-ERK und PI3K-AKT aktiviert werden müssen, wozu jedoch ausreichend Wachstumsfaktoren für die EGFR-Aktivierung nötig sind. In der Abwesenheit von FBS fehlen den Zellen diese Wachstumsfaktoren größtenteils, weshalb weder PI3K-AKT noch RAS-RAF-MEK-ERK aktiviert werden können (Bogucka et al. 2020; Zhang et al. 2014). Da aber in der Abwesenheit von FBS die Wachstumsfaktoren fehlen, welche initial benötigt werden, um eben genannte zentrale Signalkaskaden zu aktivieren, resultiert dies letztlich in einer verminderten IL-8-Freisetzung. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass in der Abwesenheit von FBS auch die Wachstumsfaktoren und Zytokine fehlen, welche unter physiologischen Bedingungen

ADAM10 und 17 aktivieren (Murphy 2008), wodurch es zu einer insgesamt noch geringeren Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren kommt. Besonders auffällig an den Daten, welche im Rahmen dieser Doktorarbeit erarbeitet wurden, ist auch, dass die Zellen nach Rekonstitution mit AREG oder TGF α und ohne mechanische Aktivierung keine IL-8 Freisetzung zeigen. Hierfür kommen auch unterschiedliche Ursachen in Frage. Zunächst einmal könnte es sein, dass die HaCaT-Zellen mehr Zeit für die Sekretion von IL-8 benötigen als die 4 h, welche im experimentellen Setting dieser Doktorarbeit angesetzt wurden, vor allem, nachdem die Zellen zuvor 24 h ohne FBS kultiviert wurden. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass während die mRNA-Expression von CXCL8 kurz nach Stimulation ansteigt, die Freisetzung von IL-8 erst nach 24 h einen signifikanten Unterschied aufweist (Kondo et al. 1993). Diesem Argument wäre allerdings entgegenzubringen, dass die im Rahmen dieser Doktorarbeit erworbenen Daten, schon 4 h nach mechanischer Aktivierung einen signifikanten Anstieg von IL-8 Freisetzung zeigen, obwohl sie zuvor ebenfalls 24 h in FBS-freiem Medium kultiviert wurden. Eine weitere Ursache könnte eine unzureichende Aktivierung durch AREG und TGF α der zentralen Signalkaskaden RAS-RAF-MEK-ERK und PI3K-AKT sein, welche für die Freisetzung von IL-8 verantwortlich sind. In der Literatur sind Hinweise darauf zu finden, dass verschiedene Wachstumsfaktoren den RAS-RAF-MEK-ERK in unterschiedlicher Intensität aktivieren (Liang & Chen 2001). Daher könnte es sein, dass die Zellen andere Wachstumsfaktoren, welche im FBS vorhanden sind, benötigen, um RAS-RAF-MEK-ERK in einer höheren Intensität zu aktivieren. Eine wieder andere Erklärung könnte sein, dass IL-8-mRNA zwar gebildet wird, aber der Zellstress, welcher aus der Abwesenheit von FBS entsteht, dafür sorgt, dass es nicht translatiert werden kann. Da IL-8 über sekretorische Vesikel freigesetzt wird, könnte dieser Mechanismus durch die Abwesenheit von FBS gestört sein (Shouib & Eitzen 2022).

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit erworbenen Daten zeigen überraschenderweise nicht nur einen deutlichen Effekt durch die Inhibition von ADAM10 und 17 auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, sondern ebenfalls auf die Freisetzung und die mRNA-Expression von Zytokinen wie IL-1 β und IL-8. Der Effekt durch die Inhibition von ADAM10 und 17 auf die beiden Zytokine muss allerdings getrennt voneinander betrachtet werden. IL-1 β muss erst proteolytisch gespalten werden, bevor es freigesetzt werden kann (Martín-Sánchez et al. 2016). Laut Literatur ist vor allem Caspase-1 für die proteolytische Spaltung von IL-1 β im Zytoplasma verantwortlich (Lamkanfi et al. 2004) allerdings gibt es außerdem Hinweise darauf, dass die Freisetzung von IL-1 β durch ADAM17 abhängige Signalwege moduliert wird (Sanchez-Guerrero et al. 2012). Daher könnten die im Rah-

men dieser Doktorarbeit erworbenen Daten auf eine Verbindung zwischen ADAM-Proteasen und IL-1 β hindeuten, wobei die vorliegenden Daten sich nur auf die Expression von IL-1 β beziehen. IL-8 hingegen wird durch sekretorische Vesikel freigesetzt und muss nicht erst proteolytisch gespalten werden (Stanley & Lacy 2010), daher ist hier ebenfalls eine direkte Beteiligung durch ADAM-Proteasen ausgeschlossen. Laut aktueller Literatur gibt es allerdings Hinweise darauf, dass ein unklarer Zusammenhang zwischen dem IL-8-Rezeptor (CXCR2) und ADAM17 besteht (Andrews & Gardiner 2015). Als Erklärungsansatz käme sowohl für die IL-1 β - als auch für IL-8-Freisetzung ein indirekter Effekt durch ADAM10 und 17 in Frage, welcher dann durch den ADAM10 und 17 Inhibitor GW inhibiert würde. Eine Erklärung für einen indirekten Effekt wäre, dass ADAM17 nachweislich TNF α proteolytisch abspaltet und TNF α zentrale Signalkaskaden wie RAS-RAF-MEK-ERK, PI3K-AKT und NF- κ B aktiviert, welche für die Freisetzung von IL-1 β und IL-8 verantwortlich sind. So könnte es durch eine Inhibition der Freisetzung von TNF α durch die Inhibition von ADAM10 und 17 gleichzeitig zu einer indirekten Inhibition der Freisetzung von IL-1 β und IL-8 kommen (Turner et al. 2007; Osawa et al. 2002). Die wohl naheliegendste Erklärung auf Grund der vorliegenden Daten wäre, dass wie bereits erläutert, die zentrale Signalkaskaden RAF-MEK-ERK und PI3K-AKT durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden, welche im Rahmen der Inhibition von ADAM10 und 17 nicht mehr proteolytisch von der Membran abgespalten werden können und dort verbleiben. Durch die Inhibition von ADAM10 und 17 wird Piezo1 trotzdem durch Yoda1 aktiviert, es kommt allerdings nicht mehr zur proteolytischen Freisetzung von Wachstumsfaktoren durch ADAM10 und 17, weil diese durch GW inhibiert werden. Infolgedessen kann es nicht mehr zu einer Aktivierung von EGFR kommen und es kommt zu keiner weiteren Aktivierung von ADAM10 und 17. Die zentralen Signalkaskaden RAF-MEK-ERK und PI3K-AKT werden nicht aktiviert und es kommt zu keiner Freisetzung von IL-8 und somit zusammenfassend zu dem indirekten Effekt durch die Inhibition von ADAM10 und 17 auf IL-8 und IL-1 β . Dieser Zusammenhang zeigt die Relevanz von ADAM10 und 17 in der Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Allerdings gibt es in der Literatur ebenfalls Hinweise darauf, dass es bei genetisch veränderten Mäusen mit ADAM17 *knockout* in Keratinozyten (A17 Δ KC) zu einer vermehrten neutrophilen Chemotaxis kommt, da das *Chemokin C-X-C motif chemokine ligand 1* (CXCL1) hochreguliert wird (Franzke et al. 2012), obwohl CXCL1 genau wie IL-1 β und IL-8 durch TNF α aktiviert wird (Lo et al. 2014). Dies steht im Kontrast zu vorherigen Überlegungen. Gründe hierfür könnten sein, dass es bei A17 Δ KC Mäusen zu großflächigen Defekten in

der epidermalen Barriere kommt und es daher zu einer starken entzündlichen Antwort bei den Mäusen kommt. Dieser Effekt ist bedingt durch die Tatsache, dass es sich bei *in vivo* Versuchen um ein komplexes Geschehen handelt, während in *in vitro* Versuchen, nur ein begrenzter Ausschnitt an Signalwegen betrachtet werden kann. Ein anderes Beispiel für die konträren Aussagen von *in vivo* und *in vitro* Versuchen ist die Regulierung der IL-8 Rezeptoren *C-X-C chemokine receptor type 1* (CXCR1) und *C-X-C chemokine receptor type 2* (CXCR2) in Entzündungsprozessen. Hier gibt es auf der eine Seite Hinweise in der Literatur darauf, dass es nach Bypass-Operationen zu einer verringerten Expression von CXCR2 kommt (Chishti et al. 2001) aber auf der anderen Seite konnte in *in vitro* Versuchen nachgewiesen werden, dass es nach der Stimulation mit dem Bakterium *Propionibacterium acnes* zu einer vermehrten Expression von CXCR1 und CXCR2 kommt (Yu et al. 2024).

5.3 Einfluss von FBS und GW auf die mRNA-Expression von Galectin-7

Bei Galectin-7 handelt es sich um ein nicht glykosyliertes Lektin, welches in epithelialen Zellen exprimiert wird (Sewgobind et al. 2021). Bei Stressantworten von Keratinozyten ist eine starke Regulation und Beteiligung von Galectin-7 gezeigt worden (Advedissian et al. 2017). Aus diesem Grund wurde die Expression von Galectin-7 ebenfalls untersucht. Die im Kontext dieser Dissertation erhobenen Daten zeigen deutlich, dass weder die Aktivierung von Piezo1 noch die Inhibition von ADAM10 und 17 einen Effekt auf die mRNA-Expression von Galectin-7 zu haben scheinen. Allerdings zeigt sich eine deutliche Zunahme der mRNA-Expression nach Kultivierung der Zellen in FBS-freiem Medium. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen gibt es Studien, welche darauf hindeuten, dass Galectin-7 vermehrt aufgrund einer Stressreaktion, im Rahmen einer von p53 induzierter Zell-Apoptose produziert wird (Sewgobind et al. 2021; St-Pierre 2021) Dies könnte auch bei einer FBS-freien Kultivierung der Fall sein, welche ebenfalls eine Stresssituation für die Zellen darstellt. Weiter gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass Galectin-7 die Proliferation von Keratinozyten durch den JNK/miR-203/p63-Signalweg hemmt (Chen et al. 2021). Dies könnte ebenfalls eine Erklärung für die Zunahme der mRNA-Expression sein, da in einer FBS-freien Kultivierung nachweislich weniger Proliferation stattfindet (Piletz et al. 2018). Zudem zeigt das Expressionsprofil von Galectin-7 gut die Spezifität der zuvor erhobenen Daten zur mRNA-Expression von AREG und CXCL8, da hier die Aktivierung von Piezo1 und die Inhibition von ADAM10 und 17 die mRNA-Expression reguliert hat.

5.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nach FBS-freier Kultivierung die Freisetzung von AREG stark herabgesetzt wurde. Dieser Effekt konnte teilweise, aber nicht vollständig durch die Rekonstitution mit TGF α und AREG aufgehoben werden. Hier könnte es interessant sein, eine Zeitkinetik durchzuführen, um abzuschätzen, ob die AREG-Freisetzung in Experimenten mit einer längeren Dauer als 4 h ansteigen würde. Außerdem wäre zur besseren Vergleichbarkeit der Daten eine Stimulation der Zellen mit Yoda1 nach AREG-Rekonstitution von großem Nutzen. Im gleichen Zug könnte ein Proteinnachweis von IL-1 β und HB-EGF mittels ELISA durchgeführt werden, um auch hier die Transkription mit der Freisetzung vergleichen zu können. Um zu überprüfen, warum der Effekt nach FBS-freier Kultivierung mit TGF α und AREG nur teilweise aufgehoben werden konnte, könnte man ebenfalls Experimente durchführen in denen man die Zellen nicht nur mit Wachstumsfaktoren substituiert, sondern ebenfalls mit Steroidhormonen und/oder IGF, da es Hinweise in der Literatur darauf gibt, dass diese ebenfalls für die Freisetzung von Wachstumsfaktoren verantwortlich sein könnten. Des Weiteren würde es Sinn machen im Rahmen der einzelnen Experimente ebenfalls Western Blots durchzuführen. Hier könnte überprüft werden, wie sich die Kultivierung ohne FBS und die Inhibition von ADAM10 und 17 durch GW auf zentrale Signalkaskaden wie RAS-RAF-MEK-ERK, PI3K-AKT und NF- κ B auswirken. Im Anschluss könnte die direkte Inhibition dieser Signalkaskaden untersucht werden und getestet werden, ob eben diese Signalkaskaden der Grund dafür sein könnten, dass in der Abwesenheit von FBS keine IL-8-Freisetzung stattfindet. Für die Beantwortung dieser Frage könnte ebenfalls eine IL-8-Zeitkinetik wertvoll sein, um zu überprüfen ob in der Abwesenheit von FBS die IL-8-Freisetzung nach mehr als 4 h stattfindet. In der Weiterführung des Forschungsprojektes könnten Kompressions- und Dehnungs- Versuche wichtig sein, um die Effekte von mechanischer Aktivierung von Keratinozyten zu verdeutlichen und mit den Effekten von Yoda1 zu vergleichen. In diesem Zusammenhang wäre es außerdem sinnvoll zusätzlich zu den Inhibitoren ebenfalls Knockdown-Zellen zu nutzen. Knockdown-Zellen könnten außerdem zielführend sein, um den Anteil von Piezo1 an der mechanisch induzierten Antwort zu bestimmen. Vergleichen könnte man diese Daten mit dem Anteil von anderen mechanisch aktivierbaren Ionenkanälen (e.g. TRP)

Um dem ganzen Projekt einen klinischen Bezug zu geben, könnte man langfristig gesehen, sowohl mechanische Aktivierung als auch die Effekte in der Abwesenheit von FBS, die Inhibition von ADAM10 und 17 durch GW, sowie ADAM10 und 17 und Piezo1-

Knockdowns an Hautäquivalenten testen, um in naher Zukunft den Effekt von lokal aufgetragenem GW an Hautmodellen testen zu können, da die im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Daten Hinweise darauf liefern, dass GW einen antiinflammatorischen Effekt haben könnte. Es könnte daher aufschlussreich sein, in einem so komplexen Modell wie einem Hautmodell, den Effekt durch die Inhibition durch ADAM10 und 17 von GW auf die AREG und die IL-8-Freisetzung zu untersuchen und wie dies die Wundheilung beeinflusst.

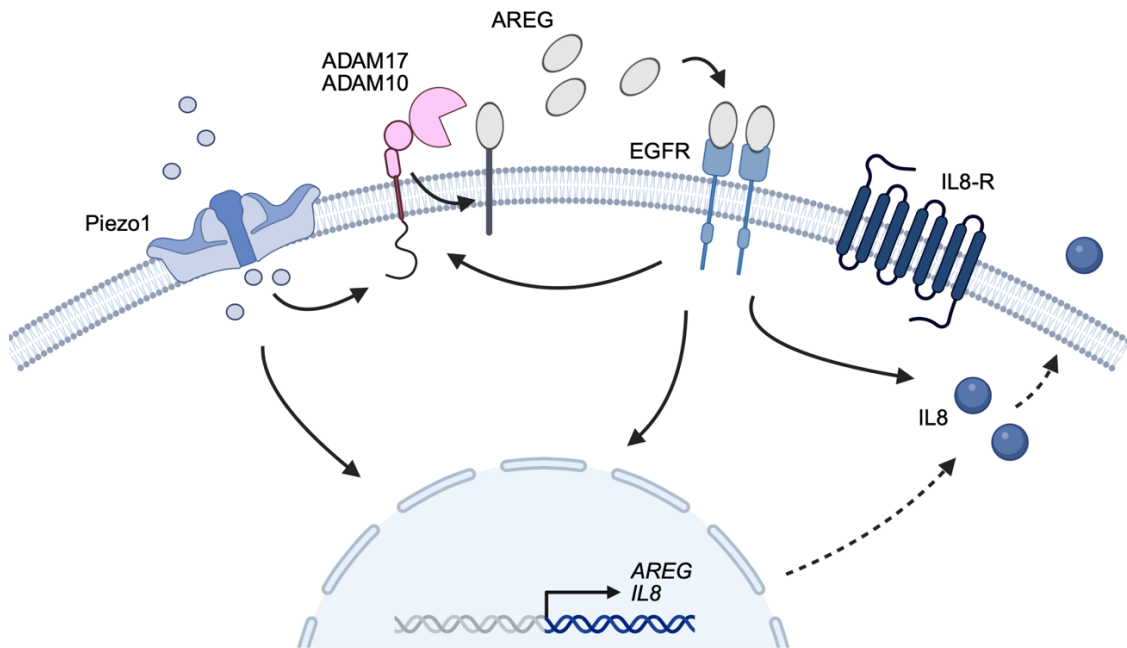


Abbildung 25: Schematischer Überblick der im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Signalwege in HaCaT-Zellen und N/TERT-1-Zellen

Bei Piezo1 Aktivierung durch Yoda1 kommt es zu einer ADAM10/17-abhängigen Freisetzung von AREG. Sowohl die AREG-Freisetzung als auch die IL-8-Freisetzung ist EGFR-vermittelt. Die Aktivierung von Piezo1 durch Yoda1 und die Inhibition des EGFR haben einen Einfluss auf das Genexpressionsprofil der Zellen. *Created with biorender.com*

6 Zusammenfassung

Die Haut hat nicht nur eine schützende Funktion, sondern macht es uns ebenfalls möglich unsere Umwelt wahrzunehmen, indem die Zellen in der Haut in der Lage sind mechanische Kräfte in biochemische Signale umzuwandeln. Den Zellen der Haut wird es so ermöglicht, präzise auf externe Stimuli zu reagieren. Daher sind Hautzellen in der Lage auf Druck mit Migration, Proliferation, Differenzierung bis hin zur Apoptose zu reagieren. Dies ist besonders für die Wundheilung entscheidend, da mechanische Schädigung zu den prädisponierenden Faktoren für Entzündungen zählt. Die Mechanotransduktion innerhalb der Zelle kann sowohl mehrere Signalwege als auch membranständige Proteasen aktivieren. So konnte bereits in Lungenepithelzellen gezeigt werden, dass der mechanosensitive Ionenkanal Piezo1 zu einer erhöhten Aktivität der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 führt. Dabei ist es allerdings bislang unklar, welche Rolle Wachstumsfaktoren und der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) bei der Piezo1-ADAM-Achse für eine Rolle spielen. Ziel dieser Arbeit ist es, den Zusammenhang der EGFR-Signalübertragung und der Piezo1-ADAM-Achse zu untersuchen und ob es in diesem Kontext auch zu einer entzündlichen Reaktion kommt.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen sowohl eine verminderte Freisetzung von Wachstumsfaktoren als auch von Entzündungsmediatoren in Abwesenheit von FBS, einem serumbasierten Zusatzstoff, welcher Wachstumsfaktoren enthält. Im späteren Verlauf der Arbeit konnte durch den Einsatz des monoklonalen Antikörpers Cetuximab eine EGFR-Signalübertragung in der Piezo1-ADAM-Achse bewiesen werden. Weiter zeigen die Ergebnisse eine Entzündungsreaktion nach Piezo1-Stimulation, dies wird besonders deutlich durch die vermehrte IL-8-Freisetzung. Auch deuten die Daten daraufhin, dass IL-8 und IL-1 β indirekt durch ADAM10/17 reguliert werden, da die Inhibition von ADAM10/17 einen Effekt auf IL-8 und IL-1 β zu haben scheint. Abschließend deuten die Daten daraufhin, dass die Wachstumsfaktoren TGF α und AREG einer positiven Rückkopplungsmechanismus unterliegen. Somit konnte gezeigt werden, dass Yoda1 zu einem mechanischen Reiz innerhalb der Hautzellen führt, welcher Piezo1 aktiviert und zu einer proteolytischen Freisetzung von AREG durch ADAM10/17 führt, was wiederum die EGFR-Signalübertragung aktiviert und eine IL-8-Sekretion auslöst. Diese Befunde liefern einen tieferen Einblick in den komplexen Mechanismus der Mechanotransduktion in der Haut und der damit verbundenen Entzündungsreaktion. Diese Daten könnten in Zukunft dazu dienen Therapiestrategien in entzündlichen Hautkrankheiten zu entwickeln.

7·Literaturverzeichnis

- Advedissian, Tamara; Deshayes, Frédérique; Viguier, Mireille (2017): Galectin-7 in Epithelial Homeostasis and Carcinomas. In: *International journal of molecular sciences* 18 (12). DOI: 10.3390/ijms18122760.
- Agarwal, Vijay; Subash, Anand; Nayar, Ravi C.; Rao, Vishal (2019): Is EGFR really a therapeutic target in head and neck cancers? In: *Journal of surgical oncology* 119 (6), S. 685–686. DOI: 10.1002/jso.25387.
- Andrews, Robert K.; Gardiner, Elizabeth E. (2015): Editorial: ADAMs control inflammation from afar. In: *Journal of leukocyte biology* 97 (3), S. 437–438. DOI: 10.1189/jlb.3CE1114-528R.
- Asai, Masashi; Hattori, Chinatsu; Szabó, Beáta; Sasagawa, Noboru; Maruyama, Kei; Tanuma, Sei-ichi; Ishiura, Shoichi (2003): Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. In: *Biochemical and biophysical research communications* 301 (1), S. 231–235. DOI: 10.1016/s0006-291x(02)02999-6.
- Avraham, Roi; Yarden, Yosef (2011): Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 12 (2), S. 104–117. DOI: 10.1038/nrm3048.
- Bae, Chilman; Sachs, Frederick; Gottlieb, Philip A. (2011): The mechanosensitive ion channel Piezo1 is inhibited by the peptide GsMTx4. In: *Biochemistry* 50 (29), S. 6295–6300. DOI: 10.1021/bi200770q.
- Baroni, Adone; Buommino, Elisabetta; Gregorio, Vincenza de; Ruocco, Eleonora; Ruocco, Vincenzo; Wolf, Ronni (2012): Structure and function of the epidermis related to barrier properties. In: *Clinics in dermatology* 30 (3), S. 257–262. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.007.
- Berasain, Carmen; Perugorria, Maria J.; Latasa, Maria Ujue; Castillo, Josefa; Goñi, Saioa; Santamaría, Mónica et al. (2009): The epidermal growth factor receptor: a link between inflammation and liver cancer. In: *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 234 (7), S. 713–725. DOI: 10.3181/0901-MR-12.
- Blaschke, Lea (2022): The role of mechanosensitive ion channels in the activation of ADAM proteases in keratinocytes. RWTH Aachen University, Aachen. Institute of Molecular Pharmacology.
- Bogucka, Katarzyna; Pompaiah, Malvika; Marini, Federico; Binder, Harald; Harms, Gregory; Kaulich, Manuel et al. (2020): ERK3/MAPK6 controls IL-8 production and chemotaxis. In: *eLife* 9. DOI: 10.7554/eLife.52511.
- Bormann, Felix (2014): The epigenetic regulation of the EGF-receptor ligands Amphiregulin and Epiregulin and its impact on the outcome of EGFR-targeted therapies.
- Boryana Andreeva David (2024): Die Rolle der Amphiregulin und Epiregulin Genexpression bei Oxaliplatin/Fluoropyrimidin plus Bevacizumab behandelten Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom – eine Analyse der Phase III AIO KRK-0207 Studie. Ludwig-Maximilians-Universität zu München, München.
- Brill, A.; Chauhan, A. K.; Canault, M.; Walsh, M. T.; Bergmeier, W.; Wagner, D. D. (2009): Oxidative stress activates ADAM17/TACE and induces its target recep-

- tor shedding in platelets in a p38-dependent fashion. In: *Cardiovascular Research* 84 (1), S. 137–144. DOI: 10.1093/cvr/cvp176.
- Cai, Yihua; Xue, Feng; Quan, Chen; Qu, Minye; Liu, Na; Zhang, Yuan et al. (2019): A Critical Role of the IL-1 β -IL-1R Signaling Pathway in Skin Inflammation and Psoriasis Pathogenesis. In: *The Journal of investigative dermatology* 139 (1), S. 146–156. DOI: 10.1016/j.jid.2018.07.025.
- Calligaris, Matteo; Cuffaro, Doretta; Bonelli, Simone; Spanò, Donatella Pia; Rossello, Armando; Nuti, Elisa; Scilabra, Simone Dario (2021): Strategies to Target ADAM17 in Disease: From its Discovery to the iRhom Revolution. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (4). DOI: 10.3390/molecules26040944.
- Castillo, Josefa; Erroba, Elena; Perugorria, María J.; Santamaría, Mónica; Lee, David C.; Prieto, Jesús et al. (2006): Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells. In: *Cancer research* 66 (12), S. 6129–6138. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0404.
- Chen, Hung-Lin; Lo, Chia-Hui; Huang, Chi-Chun; Lu, Meng-Ping; Hu, Po-Yuan; Chen, Chang-Shan et al. (2021): Galectin-7 downregulation in lesional keratinocytes contributes to enhanced IL-17A signaling and skin pathology in psoriasis. In: *The Journal of clinical investigation* 131 (1). DOI: 10.1172/JCI130740.
- Chishti, A. D.; Dark, J. H.; Kesteven, P.; Powell, H.; Snowden, C.; Shenton, B. K. et al. (2001): Expression of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 during cardiopulmonary bypass. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 122 (6), S. 1162–1166. DOI: 10.1067/mtc.2001.116559.
- Chou, Cheng-Wei; Huang, Yu-Kai; Kuo, Ting-Ting; Liu, Jing-Pei; Sher, Yuh-Pyng (2020): An Overview of ADAM9: Structure, Activation, and Regulation in Human Diseases. In: *International journal of molecular sciences* 21 (20). DOI: 10.3390/ijms21207790.
- Cook, P. W.; Pittelkow, M. R.; Keeble, W. W.; Graves-Deal, R.; Coffey, R. J.; Shipley, G. D. (1992): Amphiregulin messenger RNA is elevated in psoriatic epidermis and gastrointestinal carcinomas. In: *Cancer research* 52 (11), S. 3224–3227.
- Di Domenico, Marina; Giordano, Antonio (2017): Signal transduction growth factors: the effective governance of transcription and cellular adhesion in cancer invasion. In: *Oncotarget* 8 (22), S. 36869–36884. DOI: 10.18632/oncotarget.16300.
- Dreymueller, Daniela; Pruessmeyer, Jessica; Groth, Ester; Ludwig, Andreas (2012): The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. In: *European journal of cell biology* 91 (6-7), S. 472–485. DOI: 10.1016/j.ejcb.2011.09.003.
- Duffy, Michael J.; Mullooly, Maeve; O'Donovan, Norma; Sukor, Sumainizah; Crown, John; Pierce, Aisling; McGowan, Patricia M. (2011): The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer? In: *Clinical proteomics* 8 (1), S. 9. DOI: 10.1186/1559-0275-8-9.
- Elder, J. T.; Fisher, G. J.; Lindquist, P. B.; Bennett, G. L.; Pittelkow, M. R.; Coffey, R. J. et al. (1989): Overexpression of transforming growth factor alpha in psoriatic epidermis. In: *Science (New York, N.Y.)* 243 (4892), S. 811–814. DOI: 10.1126/science.2916128.
- Fang, Xiang-Zhi; Zhou, Ting; Xu, Ji-Qian; Wang, Ya-Xin; Sun, Miao-Miao; He, Ya-Jun et al. (2021): Structure, kinetic properties and biological function of mechanosensitive Piezo channels. In: *Cell & bioscience* 11 (1), S. 13. DOI: 10.1186/s13578-020-00522-z.

- Fischer, Oliver M.; Hart, Stefan; Gschwind, Andreas; Prenzel, Norbert; Ullrich, Axel (2004): Oxidative and Osmotic Stress Signaling in Tumor Cells Is Mediated by ADAM Proteases and Heparin-Binding Epidermal Growth Factor. In: *Molecular and cellular biology* 24 (12), S. 5172–5183. DOI: 10.1128/MCB.24.12.5172-5183.2004.
- Franzke, Claus-Werner; Cobzaru, Cristina; Triantafyllopoulou, Antigoni; Löffek, Stefanie; Horiuchi, Keisuke; Threadgill, David W. et al. (2012): Epidermal ADAM17 maintains the skin barrier by regulating EGFR ligand-dependent terminal keratinocyte differentiation. In: *The Journal of experimental medicine* 209 (6), S. 1105–1119. DOI: 10.1084/jem.20112258.
- Gharzia, Federico Guillermo; Aljohmani, Ahmad; Beck, Andreas; Philipp, Stephan E.; Yildiz, Daniela (2024): Regulation of ADAM10 activity through microdomain-dependent intracellular calcium changes. In: *Cell communication and signaling : CCS* 22 (1), S. 531. DOI: 10.1186/s12964-024-01891-5.
- Giebler, Nives; Zigrino, Paola (2016): A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions. In: *Toxins* 8 (4), S. 122. DOI: 10.3390/toxins8040122.
- Gooz, Monika (2010): ADAM-17: the enzyme that does it all. In: *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 45 (2), S. 146–169. DOI: 10.3109/10409231003628015.
- Grannemann, Caroline Christina Fee (2023): Mechanical activation of the metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 through mechanosensitive ion channels in epithelial cells. RWTH Aachen University.
- Grannemann, Caroline; Pabst, Alessa; Honert, Annika; Schieren, Jana; Martin, Christian; Hank, Sophia et al. (2023): Mechanical activation of lung epithelial cells through the ion channel Piezo1 activates the metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 and promotes growth factor and adhesion molecule release. In: *Bio-materials advances* 152, S. 213516. DOI: 10.1016/j.bioadv.2023.213516.
- Gstraunthaler, Gerhard; Lindl, Toni (2017): Auf der Suche nach brauchbaren Serumalternativen. In: *Biospektrum* 23 (6), S. 724–725. DOI: 10.1007/s12268-017-0843-z.
- Gudipaty, S. A.; Lindblom, J.; Loftus, P. D.; Redd, M. J.; Edes, K.; Davey, C. F. et al. (2017): Mechanical stretch triggers rapid epithelial cell division through Piezo1. In: *Nature* 543 (7643), S. 118–121. DOI: 10.1038/nature21407.
- Harris, Raymond C.; Chung, Eunkyung; Coffey, Robert J. (2003): EGF receptor ligands. In: *Experimental cell research* 284 (1), S. 2–13. DOI: 10.1016/s0014-4827(02)00105-2.
- Hartmann, Dieter; Strooper, Bart de; Serneels, Lutgarde; Craessaerts, Katleen; an Herremans; Annaert, Wim et al. (2002): The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. In: *Human molecular genetics* 11 (21), S. 2615–2624. DOI: 10.1093/hmg/11.21.2615.
- He, Jiahao; Shan, Shengzhou; Li, Qingfeng; Fang, Bin; Xie, Yun (2022): Mechanical Stretch Triggers Epithelial-Mesenchymal Transition in Keratinocytes Through Piezo1 Channel. In: *Frontiers in physiology* 13, S. 745572. DOI: 10.3389/fphys.2022.745572.

- Holzinger (2021): Vergleich der Stimulation und therapeutischen Inhibition des Epidermal Growth Faktor-Rezeptors (EGFR) im 2D- und 3D-Kulturmodell bei Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Ludwig-Maximilians-Universität zu München, München.
- Horiuchi, Keisuke; Le Gall, Sylvain; Schulte, Marc; Yamaguchi, Takafumi; Reiss, Karina; Murphy, Gillian et al. (2007): Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. In: *Molecular biology of the cell* 18 (1), S. 176–188. DOI: 10.1091/mbc.e06-01-0014.
- Horiuchi, Keisuke; Le Gall, Sylvain; Schulte, Marc; Yamaguchi, Takafumi; Reiss, Karina; Murphy, Gillian et al. (2007): Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. In: *Molecular biology of the cell* 18 (1), S. 176–188. DOI: 10.1091/mbc.e06-01-0014.
- Hundhausen, Christian; Misztela, Dominika; Berkhout, Theo A.; Broadway, Neil; Saffig, Paul; Reiss, Karina et al. (2003): The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. In: *Blood* 102 (4), S. 1186–1195. DOI: 10.1182/blood-2002-12-3775.
- Iordanov, Mihail S.; Choi, Remy J.; Ryabinina, Olga P.; Dinh, Thanh-Hoai; Bright, Robert K.; Magun, Bruce E. (2002): The UV (Ribotoxic) stress response of human keratinocytes involves the unexpected uncoupling of the Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling cascade from the activated epidermal growth factor receptor. In: *Molecular and cellular biology* 22 (15), S. 5380–5394. DOI: 10.1128/MCB.22.15.5380-5394.2002.
- Jaalouk, Diana E.; Lammerding, Jan (2009): Mechanotransduction gone awry. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (1), S. 63–73. DOI: 10.1038/nrm2597.
- Jakob, Johanna (unveröffentlichte Daten): Die Rolle mechanosensitiver Ionenkanäle bei der Wundheilung der Haut im Hinblick auf die Aktivierung von ADAM10 und ADAM17. RWTH Aachen University, Aachen.
- Kasina, S.; Scherle, P. A.; Hall, C. L.; Macoska, J. A. (2009): ADAM-mediated amphiregulin shedding and EGFR transactivation. In: *Cell Proliferation* 42 (6), S. 799–812. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2009.00645.x.
- Kim, H. J.; Kim, T-Y (2005): Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor-II in human keratinocytes, differential involvement of mitogen-activated protein kinases and feedback inhibition of protein kinase C. In: *The British journal of dermatology* 152 (3), S. 418–425. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2004.06397.x.
- Kondo, S.; Kono, T.; Sauder, D. N.; McKenzie, R. C. (1993): IL-8 gene expression and production in human keratinocytes and their modulation by UVB. In: *The Journal of investigative dermatology* 101 (5), S. 690–694. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12371677.
- Kumar, Amit; Petri, Edward T.; Halmos, Balazs; Boggon, Titus J. (2008): Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (10), S. 1742–1751. DOI: 10.1200/JCO.2007.12.1178.
- Kveiborg, Marie; Instrell, Rachael; Rowlands, Christina; Howell, Michael; Parker, Peter J. (2011): PKC α and PKC δ regulate ADAM17-mediated ectodomain shedding

- of heparin binding-EGF through separate pathways. In: *PloS one* 6 (2), e17168. DOI: 10.1371/journal.pone.0017168.
- Lambrecht, Bart N.; Vanderkerken, Matthias; Hammad, Hamida (2018): The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. In: *Nature reviews. Immunology* 18 (12), S. 745–758. DOI: 10.1038/s41577-018-0068-5.
- Lamkanfi, Mohamed; Kalai, Michael; Saelens, Xavier; Declercq, Wim; Vandenabeele, Peter (2004): Caspase-1 activates nuclear factor of the kappa-enhancer in B cells independently of its enzymatic activity. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (23), S. 24785–24793. DOI: 10.1074/jbc.M400985200.
- Laskow, Thomas; Langdon, Jacqueline; Sepehri, Sam; Davalos-Bichara, Marcela; Varadhan, Ravi; Walston, Jeremy (2024): Soluble TNFR1 has greater reproducibility than IL-6 for the assessment of chronic inflammation in older adults: the case for a new inflammatory marker in aging. In: *GeroScience* 46 (2), S. 2521–2530. DOI: 10.1007/s11357-023-01006-x.
- Lee, Da Young; Lee, Seung Yun; Yun, Seung Hyeon; Jeong, Jae Won; Kim, Jae Hyeon; Kim, Hyun Woo et al. (2022): Review of the Current Research on Fetal Bovine Serum and the Development of Cultured Meat. In: *Food science of animal resources* 42 (5), S. 775–799. DOI: 10.5851/kosfa.2022.e46.
- Liang, C. C.; Chen, H. C. (2001): Sustained activation of extracellular signal-regulated kinase stimulated by hepatocyte growth factor leads to integrin alpha 2 expression that is involved in cell scattering. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (24), S. 21146–21152. DOI: 10.1074/jbc.M010669200.
- Liu, Hailin; Hu, Jialing; Zheng, Qingcui; Feng, Xiaojin; Zhan, Fenfang; Wang, Xifeng et al. (2022): Piezo1 Channels as Force Sensors in Mechanical Force-Related Chronic Inflammation. In: *Frontiers in immunology* 13, S. 816149. DOI: 10.3389/fimmu.2022.816149.
- Liu, Shuai; Yang, Wei; Li, Yunlei; Sun, Changqing (2023): Fetal bovine serum, an important factor affecting the reproducibility of cell experiments. In: *Scientific reports* 13 (1), S. 1942. DOI: 10.1038/s41598-023-29060-7.
- Lo, Huey-ming; Lai, Tsung-hsuan; Li, Chih-hung; Wu, Wen-bin (2014): TNF- α induces CXCL1 chemokine expression and release in human vascular endothelial cells in vitro via two distinct signaling pathways. In: *Acta pharmacologica Sinica* 35 (3), S. 339–350. DOI: 10.1038/aps.2013.182.
- Lorenzen, Inken; Lokau, Juliane; Korpys, Yvonne; Oldefest, Mirja; Flynn, Charlotte M.; Künzel, Ulrike et al. (2016): Control of ADAM17 activity by regulation of its cellular localisation. In: *Scientific reports* 6, S. 35067. DOI: 10.1038/srep35067.
- Maiello, E.; Giuliani, F.; Gebbia, V.; Piano, A.; Agueli, R.; Colucci, G. (2007): Cetuximab: clinical results in colorectal cancer. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 18 Suppl 6, vi8-10. DOI: 10.1093/annonc/mdm216.
- Martín-Sánchez, F.; Diamond, C.; Zeitler, M.; Gomez, A. I.; Baroja-Mazo, A.; Bagnall, J. et al. (2016): Inflammasome-dependent IL-1 β release depends upon membrane permeabilisation. In: *Cell death and differentiation* 23 (7), S. 1219–1231. DOI: 10.1038/cdd.2015.176.
- McCole, Declan F.; Keely, Stephen J.; Coffey, Robert J.; Barrett, Kim E. (2002): Transactivation of the epidermal growth factor receptor in colonic epithelial

- cells by carbachol requires extracellular release of transforming growth factor- α . In: *The Journal of biological chemistry* 277 (45), S. 42603–42612. DOI: 10.1074/jbc.M206487200.
- Miettinen, P. J.; Berger, J. E.; Meneses, J.; Phung, Y.; Pedersen, R. A.; Werb, Z.; Derynck, R. (1995): Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. In: *Nature* 376 (6538), S. 337–341. DOI: 10.1038/376337a0.
- Moll, Ingrid; Roessler, Marion; Brandner, Johanna M.; Eispert, Ann-Christin; Houdek, Pia; Moll, Roland (2005): Human Merkel cells--aspects of cell biology, distribution and functions. In: *European journal of cell biology* 84 (2-3), S. 259–271. DOI: 10.1016/j.ejcb.2004.12.023.
- Murphy, Gillian (2008): The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. In: *Nature reviews. Cancer* 8 (12), S. 929–941. DOI: 10.1038/nrc2459.
- Murthy, Swetha E.; Dubin, Adrienne E.; Patapoutian, Ardem (2017): Piezos thrive under pressure: mechanically activated ion channels in health and disease. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 18 (12), S. 771–783. DOI: 10.1038/nrm.2017.92.
- Neagu, Monica; Constantin, Carolina; Jugulete, Gheorghita; Cauni, Victor; Dubrac, Sandrine; Szöllősi, Attila Gábor; Zurac, Sabina (2022): Langerhans Cells-Revisiting Their Role in Skin Pathologies. In: *Journal of personalized medicine* 12 (12). DOI: 10.3390/jpm12122072.
- Nickolls, Alec R.; O'Brien, Gabrielle S.; Shnayder, Sarah; Zhang, Yunxiao; Nagel, Maximilian; Patapoutian, Ardem; Chesler, Alexander T. (2022): Reevaluation of Piezo1 as a gut RNA sensor. In: *eLife* 11. DOI: 10.7554/eLife.83346.
- Nosyreva, Elena D.; Thompson, David; Syeda, Ruhma (2021): Identification and functional characterization of the Piezo1 channel pore domain. In: *The Journal of biological chemistry* 296, S. 100225. DOI: 10.1074/jbc.RA120.015905.
- Novak, Ulrike (2004): ADAM proteins in the brain. In: *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 11 (3), S. 227–235. DOI: 10.1016/j.jocn.2003.10.006.
- Olayioye, M. A.; Neve, R. M.; Lane, H. A.; Hynes, N. E. (2000): The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. In: *The EMBO journal* 19 (13), S. 3159–3167. DOI: 10.1093/emboj/19.13.3159.
- Olson, Michael F. (2022): Actin-Myosin Cytoskeleton Regulation and Function. In: *Cells* 12 (1). DOI: 10.3390/cells12010009.
- Osawa, Yosuke; Nagaki, Masahito; Banno, Yoshiko; Brenner, David A.; Asano, Takahiko; Nozawa, Yoshinori et al. (2002): Tumor necrosis factor α -induced interleukin-8 production via NF- κ B and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways inhibits cell apoptosis in human hepatocytes. In: *Infection and immunity* 70 (11), S. 6294–6301. DOI: 10.1128/IAI.70.11.6294-6301.2002.
- Park, Sang-Min; Hwang, Chae Young; Cho, Sung-Hwan; Lee, Daewon; Gong, Jeong-Ryeol; Lee, Soobeom et al. (2019): Systems analysis identifies potential target genes to overcome cetuximab resistance in colorectal cancer cells. In: *The FEBS journal* 286 (7), S. 1305–1318. DOI: 10.1111/febs.14773.
- Peschon, J. J.; Slack, J. L.; Reddy, P.; Stocking, K. L.; Sunnarborg, S. W.; Lee, D. C. et al. (1998): An essential role for ectodomain shedding in mammalian develop-

- ment. In: *Science (New York, N.Y.)* 282 (5392), S. 1281–1284. DOI: 10.1126/science.282.5392.1281.
- Peus, D.; Hamacher, L.; Pittelkow, M. R. (1997): EGF-receptor tyrosine kinase inhibition induces keratinocyte growth arrest and terminal differentiation. In: *The Journal of investigative dermatology* 109 (6), S. 751–756. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12340759.
- Piipponen, Minna; Li, Dongqing; Landén, Ning Xu (2020): The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. In: *International journal of molecular sciences* 21 (22). DOI: 10.3390/ijms21228790.
- Piletz, John E.; Drivon, Jennifer; Eisenga, John; Buck, Will; Yen, Sabrina; McLin, Megan et al. (2018): Human Cells Grown With or Without Substitutes for Fetal Bovine Serum. In: *Cell medicine* 10, 2155179018755140. DOI: 10.1177/2155179018755140.
- Pruessmeyer, Jessica; Ludwig, Andreas (2009): The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. In: *Seminars in cell & developmental biology* 20 (2), S. 164–174. DOI: 10.1016/j.semcdb.2008.09.005.
- Ranade, Sanjeev S.; Qiu, Zhaozhu; Woo, Seung-Hyun; Hur, Sung Sik; Murthy, Swetha E.; Cahalan, Stuart M. et al. (2014): Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (28), S. 10347–10352. DOI: 10.1073/pnas.1409233111.
- Rennekampff, Hans-Oliver; Tenenhaus, Mayer; Rennekampff, Isabelle; Alharbi, Ziyad (2024): Roles of Mechanosensitive Channel Piezo1 in Wound Healing and Scar Formation. In: *Life (Basel, Switzerland)* 14 (3). DOI: 10.3390/life14030377.
- Roepstorff, Kirstine; Grandal, Michael Vibo; Henriksen, Lasse; Knudsen, Stine Louise Jeppe; Lerdrup, Mads; Grøvdal, Lene et al. (2009): Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 10 (8), S. 1115–1127. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2009.00943.x.
- Rosenbaum, Tamara; Benítez-Angeles, Miguel; Sánchez-Hernández, Raúl; Morales-Lázaro, Sara Luz; Hiriart, Marcia; Morales-Buenrostro, Luis Eduardo; Torres-Quiroz, Francisco (2020): TRPV4: A Physio and Pathophysiologically Significant Ion Channel. In: *International journal of molecular sciences* 21 (11). DOI: 10.3390/ijms21113837.
- Sahin, Umut; Weskamp, Gisela; Kelly, Kristine; Zhou, Hong-Ming; Higashiyama, Shigeki; Peschon, Jacques et al. (2004): Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. In: *The Journal of cell biology* 164 (5), S. 769–779. DOI: 10.1083/jcb.200307137.
- Sanchez-Guerrero, Estella; Chen, Elya; Kockx, Maaike; An, Si-Wei; Chong, Beng H.; Khachigian, Levon M. (2012): IL-1beta signals through the EGF receptor and activates Egr-1 through MMP-ADAM. In: *PloS one* 7 (7), e39811. DOI: 10.1371/journal.pone.0039811.
- Saotome, Kei; Murthy, Swetha E.; Kefauver, Jennifer M.; Whitwam, Tess; Patapoutian, Ardem; Ward, Andrew B. (2018): Structure of the mechanically activated ion channel Piezo1. In: *Nature* 554 (7693), S. 481–486. DOI: 10.1038/nature25453.
- Schneider, Marlon R.; Werner, Sabine; Paus, Ralf; Wolf, Eckhard (2008): Beyond wavy hairs: the epidermal growth factor receptor and its ligands in skin biology and

- pathology. In: *The American journal of pathology* 173 (1), S. 14–24. DOI: 10.2353/ajpath.2008.070942.
- Schreiber, A. B.; Winkler, M. E.; Derynck, R. (1986): Transforming growth factor- α : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. In: *Science (New York, N.Y.)* 232 (4755), S. 1250–1253. DOI: 10.1126/science.2422759.
- Seegar, Tom C. M.; Killingsworth, Lauren B.; Saha, Nayanendu; Meyer, Peter A.; Patra, Dhabaleswar; Zimmerman, Brandon et al. (2017): Structural Basis for Regulated Proteolysis by the α -Secretase ADAM10. In: *Cell* 171 (7), 1638–1648.e7. DOI: 10.1016/j.cell.2017.11.014.
- Sewgobind, Nishant V.; Albers, Sanne; Pieters, Roland J. (2021): Functions and Inhibition of Galectin-7, an Emerging Target in Cellular Pathophysiology. In: *Biomolecules* 11 (11). DOI: 10.3390/biom11111720.
- Shi, Liang; Kishore, Raj; McMullen, Megan R.; Nagy, Laura E. (2002): Lipopolysaccharide stimulation of ERK1/2 increases TNF- α production via Egr-1. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 282 (6), C1205–11. DOI: 10.1152/ajpcell.00511.2001.
- Shigeta, Kohei; Hayashida, Tetsu; Hoshino, Yoshinori; Okabayashi, Koji; Endo, Takashi; Ishii, Yoshiyuki et al. (2013): Expression of Epidermal Growth Factor Receptor Detected by Cetuximab Indicates Its Efficacy to Inhibit In Vitro and In Vivo Proliferation of Colorectal Cancer Cells. In: *PloS one* 8 (6), e66302. DOI: 10.1371/journal.pone.0066302.
- Shirakata, Yuji; Kimura, Rina; Nanba, Daisuke; Iwamoto, Ryo; Tokumaru, Sho; Morimoto, Chie et al. (2005): Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. In: *Journal of cell science* 118 (Pt 11), S. 2363–2370. DOI: 10.1242/jcs.02346.
- Shouib, Rowayna; Eitzen, Gary (2022): Cdc42 regulates cytokine expression and trafficking in bronchial epithelial cells. In: *Frontiers in immunology* 13, S. 1069499. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1069499.
- Shoyab, M.; McDonald, V. L.; Bradley, J. G.; Todaro, G. J. (1988): Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (17), S. 6528–6532. DOI: 10.1073/pnas.85.17.6528.
- Shoyab, M.; Plowman, G. D.; McDonald, V. L.; Bradley, J. G.; Todaro, G. J. (1989): Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. In: *Science (New York, N.Y.)* 243 (4894 Pt 1), S. 1074–1076. DOI: 10.1126/science.2466334.
- Shutova, Maria S.; Boehncke, Wolf-Henning (2022): Mechanotransduction in Skin Inflammation. In: *Cells* 11 (13). DOI: 10.3390/cells11132026.
- Smith, Timothy M.; Tharakan, Anuj; Martin, Rebecca K. (2020): Targeting ADAM10 in Cancer and Autoimmunity. In: *Frontiers in immunology* 11, S. 499. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00499.
- Smits, Jos P. H.; Niehues, Hanna; Rikken, Gijs; van Vlijmen-Willems, Ivonne M. J. J.; van de Zande, Guillaume W. H. J. F.; Zeeuwen, Patrick L. J. M. et al. (2017): Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human

- epidermal models. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 11838. DOI: 10.1038/s41598-017-12041-y.
- Stanley, Amanda C.; Lacy, Paige (2010): Pathways for cytokine secretion. In: *Physiology (Bethesda, Md.)* 25 (4), S. 218–229. DOI: 10.1152/physiol.00017.2010.
- Sternlicht, Mark D.; Sunnarborg, Susan W. (2008): The ADAM17-amphiregulin-EGFR axis in mammary development and cancer. In: *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 13 (2), S. 181–194. DOI: 10.1007/s10911-008-9084-6.
- Stoll, S. W.; Elder, J. T. (1998): Retinoid regulation of heparin-binding EGF-like growth factor gene expression in human keratinocytes and skin. In: *Experimental dermatology* 7 (6), S. 391–397. DOI: 10.1111/j.1600-0625.1998.tb00339.x.
- Stoll, Stefan W.; Johnson, Jessica L.; Li, Yong; Rittié, Laure; Elder, James T. (2010): Amphiregulin carboxy-terminal domain is required for autocrine keratinocyte growth. In: *The Journal of investigative dermatology* 130 (8), S. 2031–2040. DOI: 10.1038/jid.2010.98.
- Stoll, Stefan W.; Johnson, Jessica L.; Bhasin, Ajay; Johnston, Andrew; Gudjonsson, Johann E.; Rittié, Laure; Elder, James T. (2010): Metalloproteinase-mediated, context-dependent function of amphiregulin and HB-EGF in human keratinocytes and skin. In: *The Journal of investigative dermatology* 130 (1), S. 295–304. DOI: 10.1038/jid.2009.211.
- St-Pierre, Yves (2021): Towards a Better Understanding of the Relationships between Galectin-7, p53 and MMP-9 during Cancer Progression. In: *Biomolecules* 11 (6). DOI: 10.3390/biom11060879.
- Sugimoto, Asuna; Iwata, Kokoro; Kurogoushi, Rika; Tanaka, Manami; Nakashima, Yumiko; Yamakawa, Yoshihito et al. (2023): C-terminus of PIEZO1 governs Ca²⁺ influx and intracellular ERK1/2 signaling pathway in mechanotransduction. In: *Biochemical and biophysical research communications* 682, S. 39–45. DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.09.080.
- Syeda, Ruhma; Xu, Jie; Dubin, Adrienne E.; Coste, Bertrand; Mathur, Jayanti; Huynh, Truc et al. (2015): Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. In: *eLife* 4. DOI: 10.7554/eLife.07369.
- Takahashi, Hidetoshi; Tsuji, Hitomi; Hashimoto, Yoshio; Ishida-Yamamoto, Akemi; Iizuka, Hajime (2009): CELL PROLIFERATION AND CYTOKINE INDUCTION BY TNF-alpha OF PSORIATIC KERATINOCYTES ARE NOT DIFFERENT FROM NORMAL KERATINOCYTES IN VITRO. In: *Indian journal of dermatology* 54 (3), S. 237–239. DOI: 10.4103/0019-5154.55631.
- Toft-Bertelsen, Trine L.; MacAulay, Nanna (2021): TRPing to the Point of Clarity: Understanding the Function of the Complex TRPV4 Ion Channel. In: *Cells* 10 (1). DOI: 10.3390/cells10010165.
- Turner, Neil A.; Mughal, Romana S.; Warburton, Philip; O'Regan, David J.; Ball, Stephen G.; Porter, Karen E. (2007): Mechanism of TNFalpha-induced IL-1alpha, IL-1beta and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: effects of statins and thiazolidinediones. In: *Cardiovascular Research* 76 (1), S. 81–90. DOI: 10.1016/j.cardiores.2007.06.003.
- Verdier-Sevrain, S.; Yaar, M.; Cantatore, J.; Traish, A.; Gilchrist, B. A. (2004): Estradiol induces proliferation of keratinocytes via a receptor mediated mechanism. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (11), S. 1252–1254. DOI: 10.1096/fj.03-1088fje.

- Wang, Yaohui; Wang, Weimin; Wang, Lingyan; Wang, Xiangdong; Xia, Jinglin (2012): Regulatory mechanisms of interleukin-8 production induced by tumour necrosis factor- α in human hepatocellular carcinoma cells. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 16 (3), S. 496–506. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01337.x.
- Wang, Kai; Xuan, Zixue; Liu, Xiaoyan; Zheng, Meiling; Yang, Chao; Wang, Haiyong (2022): Immunomodulatory role of metalloproteinase ADAM17 in tumor development. In: *Frontiers in immunology* 13, S. 1059376. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1059376.
- White, Elizabeth A.; Walther, Johanna; Javanbakht, Hassan; Howley, Peter M. (2014): Genus beta human papillomavirus E6 proteins vary in their effects on the transactivation of p53 target genes. In: *Journal of virology* 88 (15), S. 8201–8212. DOI: 10.1128/JVI.01197-14.
- Yano, Shoichiro; Komine, Mayumi; Fujimoto, Manabu; Okochi, Hitoshi; Tamaki, Kunihiro (2004): Mechanical stretching in vitro regulates signal transduction pathways and cellular proliferation in human epidermal keratinocytes. In: *The Journal of investigative dermatology* 122 (3), S. 783–790. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2004.22328.x.
- Yin, Jiayi; Zhang, Shiming; Yang, Chao; Wang, Yan; Shi, Bing; Zheng, Qian et al. (2022): Mechanotransduction in skin wound healing and scar formation: Potential therapeutic targets for controlling hypertrophic scarring. In: *Frontiers in immunology* 13, S. 1028410. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1028410.
- Yousef, Hani; Alhajj, Mandy; Fakoya, Adegbenro O.; Sharma, Sandeep (2024): StatPearls. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. Treasure Island (FL).
- Yu, Xiu-Qin; Mao, Jin-Zhu; Yang, Shu-Yun; Wang, Lu; Yang, Chang-Zhi; Huang, Lei et al. (2024): Autocrine IL-8 Contributes to Propionibacterium Acnes-induced Proliferation and Differentiation of HaCaT Cells via AKT/FOXO1/ Autophagy. In: *Current medical science* 44 (5), S. 1058–1065. DOI: 10.1007/s11596-024-2894-y.
- Yuan, Xiang-Zhen; Sun, Sen; Tan, Chen-Chen; Yu, Jin-Tai; Tan, Lan (2017): The Role of ADAM10 in Alzheimer's Disease. In: *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 58 (2), S. 303–322. DOI: 10.3233/JAD-170061.
- Zhang, Hong; Cao, Wenxuan; Zhuang, Yingzhu; Zhang, Hui; Hu, Haoyu; Shi, Chunying; Yang, Sumin (2023): Piezo1/ERK signaling pathway is activated in aortic VSMCs of patients with aortic dissection or aneurysm.
- Zhang, Erying; Feng, Xiaowei; Liu, Fei; Zhang, Peihua; Liang, Jie; Tang, Xudong (2014): Roles of PI3K/Akt and c-Jun Signaling Pathways in Human Papillomavirus Type 16 Oncoprotein-Induced HIF-1 α , VEGF, and IL-8 Expression and In Vitro Angiogenesis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. In: *PloS one* 9 (7), e103440. DOI: 10.1371/journal.pone.0103440.
- Zhao, Weiyu; Wei, Zeliang; Xin, Guang; Li, Yulong; Yuan, Jiyan; Ming, Yue et al. (2021): Piezo1 initiates platelet hyperreactivity and accelerates thrombosis in hypertension. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 19 (12), S. 3113–3125. DOI: 10.1111/jth.15504.
- Zhu, Wandu; Guo, Shihui; Homilius, Max; Nsubuga, Cissy; Wright, Shane H.; Quan, Dajun et al. (2022): PIEZO1 mediates a mechanothrombotic pathway in diabetes. In: *Science translational medicine* 14 (626), eabk1707. DOI: 10.1126/scitranslmed.abk1707.

Zhu, Guoqin; Liu, Jie; Wang, Yuan; Jia, Naixin; Wang, Weiyi; Zhang, Junhui et al.
(2021): ADAM17 Mediates Hypoxia-Induced Keratinocyte Migration via the
p38/MAPK Pathway. In: *BioMed research international* 2021, S. 8328216.
DOI: 10.1155/2021/8328216.

8 Anhang (SAS-Code)

```
PROC IMPORT
  OUT= WORK.DATA
  DATAFILE= "V:\Wissenschaftliche Mitarbeiter (PHAR)\AG Ludwig\Leo-
nie\Statistik\Excel für SAS\Daten_Diss_NTERT.xlsx"
  DBMS=EXCELCS
  REPLACE;
  RANGE="ELISA_IL-8$";
  SCANTEXT=YES;
  USEDATE=YES;
  SCANTIME=YES;

RUN;
%let prefix =Elisa_IL8;

ODS PDF FILE="V:\Wissenschaftliche Mitarbeiter (PHAR)\AG Ludwig\Leo-
nie\Statistik\&prefix._01_Data.pdf";

PROC SGPANEL DATA=data;
  PANELBY inhibitor / COLUMNS=4 LAYOUT=PANEL;

  VBOX change;
    *HBOX change;
    *SCATTER X=inhibitor Y=change;
    *HISTOGRAM change;
    *SERIES X=inhibitor Y=change; */

  TITLE 'Data representation';
RUN;
ODS PDF CLOSE;

ODS PDF FILE="V:\Wissenschaftliche Mitarbeiter (PHAR)\AG Ludwig\Leo-
nie\Statistik\&prefix._02_Distribution.pdf";
ODS ESCAPECHAR='^';

PROC GLIMMIX DATA=data PLOTS=RESIDUALPANEL;
  CLASS inhibitor;
  MODEL change = inhibitor / D=N DDFM=KR2;

  ODS SELECT FitStatistics Tests3 ResidualPanel;

  TITLE 'Normal Distribution';
RUN;

PROC GLIMMIX DATA=data PLOTS=RESIDUALPANEL;
  CLASS inhibitor;
  MODEL change = inhibitor / D=LogN DDFM=KR2;
  ODS SELECT FitStatistics Tests3 ResidualPanel;
  TITLE 'LogNormal Distribution';
RUN;
ODS PDF CLOSE;

ODS PDF FILE="V:\Wissenschaftliche Mitarbeiter (PHAR)\AG Ludwig\Leo-
nie\Statistik\&prefix._03_Blocking.pdf";
ODS ESCAPECHAR='^';
PROC GLIMMIX DATA=data PLOTS=RESIDUALPANEL;
  CLASS inhibitor experiment;
  *MODEL change = inhibitor / D=N DDFM=KR2;

  MODEL change=inhibitor / D=LogN DDFM=KR2;
  RANDOM experiment;
```

```

COVTEST 'Does it make sense to block?' ZEROG;

ODS SELECT Tests3 ResidualPanel CovTests;

TITLE 'Makes blocking sense?';
TITLE2 'If "Pr > ChiSq" < 0.05 blocking might make sense!';
*TITLE3 'with ^S={color=red}Normal ^S={}distribution!';
TITLE3 'with ^S={color=red}LogNormal ^S={}distribution!';
RUN;
ODS PDF CLOSE;

ODS PDF FILE="V:\Wissenschaftliche Mitarbeiter (PHAR)\AG Ludwig\Leo-
nie\Statistik\&prefix._04_Homogeneity.pdf";
ODS ESCAPECHAR='^';

PROC GLIMMIX DATA=data PLOTS=RESIDUALPANEL;
CLASS inhibitor experiment;
*MODEL change = inhibitor / D=N DDFM=KR2;
MODEL change=inhibitor / D=LogN DDFM=KR2;

RANDOM experiment / GROUP=inhibitor;

COVTEST 'Do I have to correct for heterogenous variances?' HOMOGE-
NEITY;

ODS SELECT Tests3 ResidualPanel CovTests;

TITLE 'Do I have to correct for heterogenous variances in group
inhibitor?';
TITLE2 'If "Pr > ChiSq" < 0.05 correction is necessary!';
*TITLE3 'with ^S={color=red}Normal ^S={}distribution!';
TITLE3 'with ^S={color=red}LogNormal ^S={}distribution!';
TITLE4 '^S={color=red}with ^S={} blocking!';
RUN;

PROC GLIMMIX DATA=data PLOTS=RESIDUALPANEL;
CLASS inhibitor experiment;
*MODEL change = inhibitor / D=N DDFM=KR2;
MODEL change=inhibitor / D=LogN DDFM=KR2;

RANDOM _RESID_ / GROUP=inhibitor;

COVTEST 'Do I have to correct for heterogenous variances?' HOMOGE-
NEITY;

ODS SELECT Tests3 ResidualPanel CovTests;

TITLE 'Do I have to correct for heterogenous variances in group
inhibitor?';
TITLE2 'If "Pr > ChiSq" < 0.05 correction is necessary!';
*TITLE3 'with ^S={color=red}Normal ^S={}distribution!';
TITLE3 'with ^S={color=red}LogNormal ^S={}distribution!';
TITLE4 '^S={color=red}without ^S={} blocking!';
RUN;
ODS PDF CLOSE;

PROC GLIMMIX DATA=data;
CLASS inhibitor experiment;
*MODEL change = inhibitor / D=N DDFM=KR2;

```

```

        MODEL change=inhibitor / D=LogN DDFM=KR2;          /* (Logarithmisch
normalverteilt) */

        *RANDOM experiment;

        *RANDOM _RESID_ / GROUP=inhibitor;
        RANDOM experiment / GROUP=inhibitor;

        OUTPUT OUT=resids RESID=r;

RUN;

ODS PDF FILE="V:\Wissenschaftliche Mitarbeiter (PHAR)\AG Ludwig\Leo-
nie\Statistik\&prefix._05_Normality.pdf";
ODS ESCAPECHAR='^';

PROC UNIVARIATE DATA=resids NORMALTEST;
    VAR r;

    ODS SELECT TestsForNormality;

    TITLE 'Are residuals normally distributed?';
    TITLE2 'p-value of Shapiro-Wilk test should be > 0.05';
    *TITLE3 'with ^S={color=red}Normal ^S={}distribution!';
    TITLE3 'with ^S={color=red}LogNormal ^S={}distribution!';
    TITLE4 '^S={color=red}with ^S={} blocking';
    *TITLE4 '^S={color=red}without ^S={} blocking';
    TITLE5 '^S={color=red}with ^S={} correction for heterogenous var-
iances';
    *TITLE5 '^S={color=red}without ^S={} correction for heterogenous
variances';

RUN;
ODS PDF CLOSE;

ODS EXCEL FILE="V:\Wissenschaftliche Mitarbeiter (PHAR)\AG Ludwig\Leo-
nie\Statistik\&prefix._06_single-tests_parametric.xlsx";
PROC GLIMMIX DATA=data;
    CLASS inhibitor experiment;

    *MODEL change = inhibitor / D=N DDFM=KR2;
    MODEL change=inhibitor / D=LogN DDFM=KR2;
    *RANDOM experiment;
    *RANDOM _RESID_ / GROUP=inhibitor;
    RANDOM experiment / GROUP=inhibitor;
    LSMEANS inhibitor / DIFF;

    ODS SELECT Diffs;

    TITLE 'p-values';
RUN;
ODS EXCEL CLOSE;

ODS PDF FILE="V:\Wissenschaftliche Mitarbeiter (PHAR)\AG Ludwig\Leo-
nie\Statistik\&prefix._07_p-Values.pdf";
ODS ESCAPECHAR='^';
DATA P_Values;
    INPUT RAW_P;

```

```

        DATALINES;
        0.0949
        0.8970
        0.0475
        0.0003
        0.0094
    ;
RUN;

DATA comparison_names;
    INFILE DATALINES DELIMITER='|';
    INPUT No Comparison $75.;
    DATALINES;
1|DMSO vs. DMSO + Cetuxi
2|DMSO vs. DMSO + GW
3|DMSO vs. Yoda1
4|Yoda1 vs. Yoda1 + Cetuxi
5|Yoda1 vs. Yoda1 + GW
    ;
RUN;

ODS LAYOUT GRIDDED COLUMNS=2 WIDTH=5in COLUMN_GUTTER=.1in;
ODS REGION width=4.5in;

PROC PRINT DATA=comparison_names NOOBS;

    *TITLE "List of Comparisons";
RUN;

ODS REGION width=4.5in;

PROC MULTTEST PDATA=P_Values BON HOCHBERG FDR;
    ODS SELECT pValues;

    TITLE 'Corrected p-Values';
    TITLE2 'The following settings were used:';
    *TITLE3 'with ^S={color=red}Normal ^S={}distribution!';
    TITLE3 'with ^S={color=red}LogNormal ^S={}distribution!';
    TITLE4 '^S={color=red}with ^S={} blocking';
    *TITLE4 '^S={color=red}without ^S={} blocking';
    TITLE5 '^S={color=red}with ^S={} correction for heterogenous vari-
ances';
    *TITLE5 '^S={color=red}without ^S={} correction for heterogenous
variances';
RUN;

ODS LAYOUT END;
ODS PDF CLOSE;

```

Danksagung

Zuallererst möchte ich an dieser Stelle Prof. Andreas Ludwig für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Unterstützung und das stets offene Ohr danken. Ein ganz großes Dankeschön gilt auch meinem Betreuer Dr. Aaron Babendreyer, der nicht nur stets die Geduld hatte, mir Abläufe kleinschrittig zu erklären, sondern auch in sonst jeder Hinsicht ein Betreuer war, wie man ihn sich nur wünschen kann. Also auch nochmal an dieser Stelle: Tausend Dank Aaron, ich hätte das ohne deine Unterstützung nicht geschafft.

Besonders dankbar bin ich für die Freundschaft mit Yunus Benli, welche in meiner Zeit im Labor entstanden ist und für die Unterstützung innerhalb meiner Arbeitsgruppe.

Auch meiner Familie gilt ein riesiges Dankeschön, vor allem meinem Vater Dr. Christian Gloria für seine Unterstützung und dafür, dass er immer an mich geglaubt hat. Auch meine beiden Geschwister Dr. Julian Gloria und Dr. Benedikt Gloria haben großartige Unterstützungsarbeit geleistet.

Abschließend möchte ich meiner besten Freundin Lara Haltrich und meinem Freund Friedrich Linnemann danken, dafür dass sie mich in jeder Phase meiner Doktorarbeit unterstützt, motiviert und inspiriert haben.

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten

- in dem *Institut für molekulare Pharmakologie* des Universitätsklinikums Aachen
und
- bei meinem direkten Betreuer, *Dr. Aaron Babendreyer, Institut für molekulare Pharmakologie*, des Universitätsklinikums Aachen,

hinterlegt sind.

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. 1 und § 11 Abs. 3 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, Leonie Gloria, an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation

„Einfluss des mechanosensitiven Ionenkanals Piezo1 auf die Mediator-Freisetzung in Keratinozyten“

dargestellten Ergebnisse erhoben habe:

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind.

	Leonie Gloria (Doktorandin)	Dr. Aaron Babendreyer (direkter Betreuer)	Prof. Andreas Ludwig (Doktorvater)	Summe (%)
Studienüberwachung		50	50	100
Studiendesign/Konzeption	60	20	20	100
Datenerhebung	100			100
Datenauswertung	90	10		100
Durchführung der Experimente in der Zellkultur HaCaT-, N/TERT-1-Zellen, ELISA und qPCR	100			100
Statistische Auswertung	80	20		100
Bereitstellung von Materialien		50	50	100
Interpretation der Datenauswertung	60	20	20	100

Unterschrift der Doktorandin

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Leonie Gloria

Unterschrift des Doktorvaters