

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Joachim Windolf

# **Der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf den TGF- $\beta$ - und den Wnt-Signalweg in Fibroblasten**

## Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
**Annika Wientges**

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

Zweitgutachterin: Priv. Doz. Dr. med. Jennifer Schiefer





## Zusammenfassung

Übermäßige Vernarbungen im Rahmen profibrotischer Erkrankungen, wie hypertropher Narben und Keloide, beruhen zumeist auf einer genetischen Prädisposition für eine pathologische Wundheilung, die im Rahmen von Verletzungen der Haut, darunter auch chirurgische Inzisionen, zu Tage tritt. Kennzeichen dieser Erkrankungen sind u.a. eine Dysregulation der Fibroblastenproliferation, -differenzierung, -migration und -apoptose sowie eine erhöhte Syntheserate von Komponenten der extrazellulären Matrix, insbesondere Kollagen Typ I und Fibronectin. Eine entscheidende Rolle in der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten sowie den anderen genannten fehlgesteuerten Prozessen spielt die übermäßige Aktivierung des TGF- $\beta$  (*Transforming-Growth-Factor-beta*)-Signalweges während des Wundheilungsprozesses mit fehlender Inaktivierung nach Verschluss des Defektes. Als Marker für diese Differenzierung wird derzeit *alpha-Smooth-Muscle-Actin* ( $\alpha$ SMA) verwendet. Im Rahmen von Vorarbeiten der auch mein Forschungsprojekt betreuenden Forschungsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Fibroblasten, die mittels TGF- $\beta$  zur Differenzierung zu Myofibroblasten und somit zur vermehrten Synthese von  $\alpha$ SMA angeregt wurden, bei zusätzlicher Inkubation mit CO<sub>2</sub> signifikant weniger  $\alpha$ SMA produzierten, als die ohne das Gas inkubierte Vergleichsgruppe. Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmals untersucht werden, ob dieser Effekt auf einer Beeinflussung der TGF- $\beta$ - und/oder der Wnt-Signalkaskade durch das CO<sub>2</sub> beruht, was auf neue Ansatzpunkte für innovative Therapieoptionen zur Behandlung sklerotischer Erkrankungen der Haut hinweisen könnte.

Mit meinen Ergebnissen konnte ich neben der signifikanten Inhibition von  $\alpha$ SMA lediglich eine weitere signifikant veränderte Proteinexpressionsrate durch den Einsatz von CO<sub>2</sub> darstellen. Dies war die Erhöhung der relativen Phospho-SMAD2-Konzentration, was zusammen mit den Befunden weiterer Proteine dieses Signalweges für eine Aktivierung statt für die erwartete Hemmung der Signalkaskade spricht. Zudem konnte ich teilweise auch eine Erhöhung der Proteinexpression der Inhibitoren des Signalweges, SMAD7 und SMURF2, darstellen, sodass ich die These ableiten konnte, dass CO<sub>2</sub> eine ambivalente Wirkung auf den TGF- $\beta$ -Signalweg ausübt. Auf den weiteren Untersuchungsschwerpunkt, das Protein  $\beta$ -Catenin als zentrales Element des Wnt-Signalwegs, zeigte CO<sub>2</sub> keine signifikante Wirkung. Zusätzlich zu diesen beiden Signalwegen wurden noch die MAP-Kinase-Kaskade, welche die beiden bereits genannten Signalkaskaden beeinflussen kann, und ED-A Fibronectin, eine Spleißvariante des Fibronectins, untersucht. Zum ersteren Punkt ließ sich feststellen, dass die relative Konzentration von pErk1/2 unter CO<sub>2</sub>-Einfluss leicht stieg, was einen Hinweis darauf lieferte, dass auch dieser Signalweg positiv durch CO<sub>2</sub> beeinflusst werden könnte. Die ED-A-Fibronectin-Konzentration sank teilweise unter CO<sub>2</sub>-Behandlung, allerdings, wie der Großteil meiner Ergebnisse, waren die Veränderungen auch hier nicht signifikant. Damit lässt sich zusammenfassen, dass die Ergebnisse meiner Arbeit Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung von Komponenten unterschiedlicher Signalwege durch CO<sub>2</sub> geben, dies aber an einer weiteren, größeren

Stichprobe untersucht werden sollte, um die aus meinen Ergebnissen abgeleiteten Aussagen zu bestätigen.

## Summary

Excessive fibrosis in the context of pro-fibrotic diseases, e.g. hypertrophic scars and keloids, is caused most times by genetic predisposition for pathological wound healing that is revealed after skin injuries, among them surgical incisions. Indicators of those diseases are dysregulations of proliferation, differentiation, migration and apoptosis of fibroblasts combined with increased synthesis of components of the extracellular matrix, in particular collagen type I and fibronectin. A key role in the process of the differentiation of fibroblasts to myofibroblasts and the other pathological mechanisms is the increased activation of the  $\text{tgf-}\beta$ -pathway while wound healing combined with the loss of inactivation of this pathway when the healing is completed. Alpha-smooth-muscle-actin is used currently as a marker for the described differentiation. Previous studies, done by the research group, that also supervised my project, showed that fibroblasts, activated by incubation with  $\text{tgf-}\beta$  to produce higher levels of  $\alpha$ -sma, expressed significantly less  $\alpha$ -SMA than the control group by additionally incubation with  $\text{CO}_2$ . Now we wanted to analyze with this study if this effect is founded by an influencing of the  $\text{tgf-}\beta$ - or the wnt-pathway by  $\text{CO}_2$ , because new knowledge of the molecular mechanisms could lead to innovative therapies.

My results showed other than the significant inhibition of  $\alpha$ -sma just one more significant difference by the incubation with  $\text{CO}_2$ . This was the increase of the relative phospho-Smad2 concentration that indicates, in combination with the results of other proteins of the  $\text{tgf-}\beta$ -pathway, an activation instead of the expected inhibition of that pathway by  $\text{CO}_2$ . On top of that I was able to partly detect an increase of the inhibitors of the  $\text{tgf-}\beta$ -pathway  $\text{smad7}$  and  $\text{smurf2}$ , so I can conclude that  $\text{CO}_2$  has an ambivalent influence on the pathway. Another analyzed parameter was  $\beta$ -catenin, the main protein of the wnt-pathway. This one didn't change significantly by incubation with  $\text{CO}_2$ . Moreover I studied the map-Kinase cascade, because it is able to influence the already mentioned pathways, and ED-A fibronectin, a splice variant of fibronectin. In case of the first mentioned point I could detect a slightly increase of the relative concentration of  $\text{perk1/2}$  by incubation with  $\text{CO}_2$ , so we can conclude that this pathway could be activated as well by the gas. The concentration of ED-A fibronectin decreased when the cells were treated with  $\text{CO}_2$ , but this wasn't significant like most of my results. All in all the following statement can be recorded: Because of the reported results we can conclude that  $\text{CO}_2$  may have influences on the analyzed pathways, but it is necessary to verify the results by testing a larger sample.

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatosis-Poliposis-Coli
ATP	Adenosintriphosphat
BCA-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
BSA	bovines Serumalbumin
CBP	<i>Creb-Binding-Protein</i>
CCN2	<i>Cellular-Communication-Network-Factor 2</i>
CK1	Casein-Kinase 1
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Co-SMAD	<i>Common-Mediator-SMAD</i>
CREB	<i>cAMP-Response-Element-Binding-Protein</i>
DAPK	<i>Death-Associated-Protein-Kinase</i>
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ED A-Fibronectin	Extra-Domänen-A-beinhaltendes Fibronectin
e.g.	<i>exempli gratia</i>
EGF	<i>Epidermal-Growth-Factor</i>
ERK	<i>Extracellular-Signal-Regulated-Kinase</i>
FCS	fetales Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast-Growth-Factor</i>
GRB2	<i>Growth-Factor-Receptor-Bound-Protein 2</i>
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
GSK3 $\beta$ -Komplex	Axin/Glycogen-Synthase-Kinase-3- $\beta$ -Komplex
h	Stunde
HRP	<i>Horseradish-Peroxidase</i>
IDH	Isocitratdehydrogenase
IL	Interleukin
LAP	Latenz-assoziiertes Protein
LEF/TCF	<i>T-Zell-Faktor/Lymphoid-Enhancer-Binding-Factor-Protein</i>
LRP	<i>Low-Density-Lipoprotein-Related-Protein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated-Protein-Kinase</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloprotease
ncRNA	nicht kodierende RNA

NF-AT	<i>Nuclear-Factor-of-Activated-T-Cells</i>
nm	Nanometer
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived-Growth-Factor</i>
pERK	<i>Phospho-Extracellular-Signal-Regulated-Kinase</i>
PAI1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
pSMAD	<i>Phospho-Small-Mothers-Against-Decapentaplegic</i>
RAF	<i>Rat-Fibrosarcoma</i>
RAT	<i>Rat-Sarcoma</i>
RBP	RNA-bindendes Protein
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
R-SMAD	Rezeptor-reguliertes-SMAD
SARA	<i>SMAD-Anchor-for-Receptor-Activation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sFRP	<i>Secreted-Frizzled-Related-Protein</i>
SHP2	<i>Small-Heterodimer-Partner 2</i>
SMAD	<i>Small-Mothers-Against-Decapentaplegic</i>
SMURF	SMAD-Ubiquitin-regulierender-Faktor
SOP	<i>Standard Operating Procedures</i>
SOS	<i>Son-of-Sevenless</i>
TBST	<i>Tris-Buffered-Saline with Tween20</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming-Growth-Factor-beta</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor-Necrosis-Factor-alpha</i>
TSC	<i>Tuberositas-Sclerosis-Complex</i>
u.a.	unter anderem
V	Volt
Wnt	Kombination aus Wingless und Int1
WTX	Wilms-Tumor-Suppressor-Gen
$\alpha$ SMA	<i>alpha-Smooth-Muscle-Aktin</i>
$\beta$ -TrCP	<i><math>\beta</math>-Transducin-Repeats-Protein</i>
$\mu$ l	Mikroliter

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Aufbau und Eigenschaften der Haut .....	1
1.2	Die <i>Epidermis</i> .....	2
1.3	<i>Dermis</i> und <i>Subcutis</i> .....	3
1.4	Wundheilung .....	4
1.5	Hypertrophe Narben und Keloide .....	8
1.6	Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und deren Eigenschaften.....	12
1.7	Der TGF- $\beta$ -Signalweg .....	15
1.8	Der Wnt-Signalweg.....	17
1.9	Der MAP-Kinase-Signalweg .....	21
1.10	Einfluss von CO <sub>2</sub> auf die Myofibroblastendifferenzierung .....	24
2	Ziele der Arbeit.....	25
3	Material und Methoden.....	26
3.1	Material .....	26
3.1.1	Verbrauchsmaterial .....	26
3.1.2	Mehrfach verwendbares Material.....	27
3.1.3	Geräte .....	28
3.1.4	Substanzen und Lösungen .....	29
3.1.5	Medien, Puffer und Lösungen .....	30
3.1.6	Antikörper & KIT-Systeme .....	30
3.1.7	Software.....	31
3.2	Methoden .....	32
3.2.1	Verwendete Zellen.....	32
3.2.2	Isolierung von Fibroblasten .....	32
3.2.3	Subkultivierung von Fibroblasten .....	33
3.2.4	<i>Kryokonservierung</i> von Fibroblasten .....	33
3.2.5	Auftauen von Fibroblasten .....	34
3.2.6	Bestimmung der Zellzahl mittels Hämocytometer .....	34
3.2.7	Behandlung von Fibroblasten mit CO <sub>2</sub> .....	35

3.2.8	Gewinnung der behandelten Zellen .....	36
3.2.9	Proteinbestimmung .....	36
3.2.10	Gelelektrophorese .....	38
3.2.11	<i>Western Blotting</i> .....	39
3.2.12	Antikörperinkubation und -detektion.....	40
3.2.13	Statistische Auswertung .....	42
4	Ergebnisse .....	43
4.1	Der Einfluss von CO <sub>2</sub> auf die Expression von $\alpha$ -SMA.....	45
4.2	Der Einfluss von CO <sub>2</sub> auf Komponenten des TGF- $\beta$ -Signalweges.....	45
4.3	Der Einfluss von CO <sub>2</sub> auf Inhibitoren des TGF- $\beta$ -Signalweges.....	48
4.4	Der Einfluss von CO <sub>2</sub> auf den $\beta$ -Catenin-Signalweg.....	50
4.5	Der Einfluss von CO <sub>2</sub> auf die Expression von ED-A Fibronectin als Bestandteil der extrazellulären Matrix .....	51
4.6	Der Einfluss von CO <sub>2</sub> auf den MAP-Kinase-Weg.....	51
5	Diskussion.....	54
5.1	Kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse.....	60
5.2	Kernaussagen der Arbeit .....	63
6	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	64
	Danksagung .....	

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien .....	26
Tabelle 2 Auflistung des verwendeten Materials.....	27
Tabelle 3 Auflistung der verwendeten Geräte .....	28
Tabelle 4 Auflistung der verwendeten Substanzen und Lösungen .....	29
Tabelle 5 Auflistung der verwendeten Medien, Puffer und Lösungen .....	30
Tabelle 6 Auflistung der verwendeten Antikörper und KIT-Systeme.....	30
Tabelle 7 Auflistung der verwendeten Software.....	31
Tabelle 8 Übersicht der verschiedenen Versuchsansätze .....	35
Tabelle 9 Pipettierschema für BSA-Standardproben .....	37
Tabelle 10 Übersicht über die Antikörperbehandlung der Membranen .....	41

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau der Haut.....	2
Abbildung 2 Ablauf der physiologischen Wundheilung.....	8
Abbildung 3 Myofibroblastendifferenzierung .....	14
Abbildung 4 Der TGF- $\beta$ -Signalweg .....	17
Abbildung 5 Der Wnt-Signalweg .....	20
Abbildung 6 Der MAPK-Signalweg.....	23
Abbildung 7 Darstellung der Western Blot-Membranen .....	44
Abbildung 8 Relative Expression von $\alpha$ -SMA in Fibroblasten nach Behandlung mit CO <sub>2</sub> .....	45
Abbildung 9 Relative Expression von Phospho-SMAD2 in Fibroblasten nach Behandlung mit CO <sub>2</sub> .....	46
Abbildung 10 Relative Expression von SMAD2 in Fibroblasten nach Behandlung mit CO <sub>2</sub> .....	47
Abbildung 11 Relative Expression von SMAD3 in Fibroblasten nach Behandlung mit CO <sub>2</sub> .....	47
Abbildung 12 Relative Expression von SMAD4 in Fibroblasten SMAD4 nach Behandlung mit CO <sub>2</sub> .....	48
Abbildung 13 Relative Expression von SMAD7 in Fibroblasten nach Behandlung mit CO <sub>2</sub> .....	49
Abbildung 14 Relative Expression von SMURF2 in Fibroblasten nach Behandlung mit CO <sub>2</sub> .....	50
Abbildung 15 Relative Expression von $\beta$ -Catenin in Fibroblasten nach Behandlung mit CO <sub>2</sub> .....	50
Abbildung 16 Relative Expression von ED-A Fibronektin in Fibroblasten nach Behandlung mit CO <sub>2</sub> .....	51
Abbildung 17 Relative Expression von Erk1/2 in Fibroblasten nach Behandlung mit CO <sub>2</sub> .....	52
Abbildung 18 Relative Expression von pErk1/2 in Fibroblasten nach Behandlung mit CO <sub>2</sub> .....	52

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Eigenschaften der Haut

Die Haut (*Cutis*) bildet zusammen mit der Unterhaut (*Subcutis*) die Hautdecke und besitzt beim Menschen eine Ausdehnung von ca. 2 m<sup>2</sup>. Die *Cutis* wird in die oberflächlich gelegene *Epidermis* und die sich darunter befindende *Dermis* (siehe Abschnitte 1.2 und 1.3) unterteilt. Die Grenzfläche dieser beiden Schichten zueinander wird vergrößert, indem sich dermale Papillen in die *Epidermis* vorschieben, welche von epidermalen Reteleisten umgeben werden, sodass es zu einer Verzahnung von *Dermis* und *Epidermis* kommt. Dabei ist die Ausdehnung dieser Papillen abhängig von der Lokalisation am Körper.

Es wird zwischen zwei Hauttypen unterschieden, der Leistenhaut und der Felderhaut. Erstere findet sich lediglich an Hand- und Fußsohlen und weist als Hautanhangsgebilde Schweißdrüsen, aber keine Talgdrüsen und keine Haare auf. Namensgebend sind die in Leisten angeordneten Zellen, deren Verlauf genetisch festgelegt ist und somit ein individuelles Kennzeichen jedes Menschen darstellt. Die Felderhaut bedeckt den restlichen Körper, also eine weitaus größere Fläche als die Leistenhaut. Sie weist sowohl Haare als auch Schweiß- und Talgdrüsen auf.

Zu den Hautanhangsgebilden gehören neben den bereits genannten Haaren, Schweißdrüsen und Talgdrüsen auch noch die Nägel.

Das größte menschliche Organ übernimmt vielfältige Aufgaben. Dazu gehört der Schutz vor mechanischen, thermischen, chemischen und mikrobiellen Schädigungen, der Schutz vor Wasserverlust, die Regulation der Körpertemperatur sowie die Sinneswahrnehmung von Berührung, Schmerz, Vibrationen und Temperatur (Benninghoff 2004).

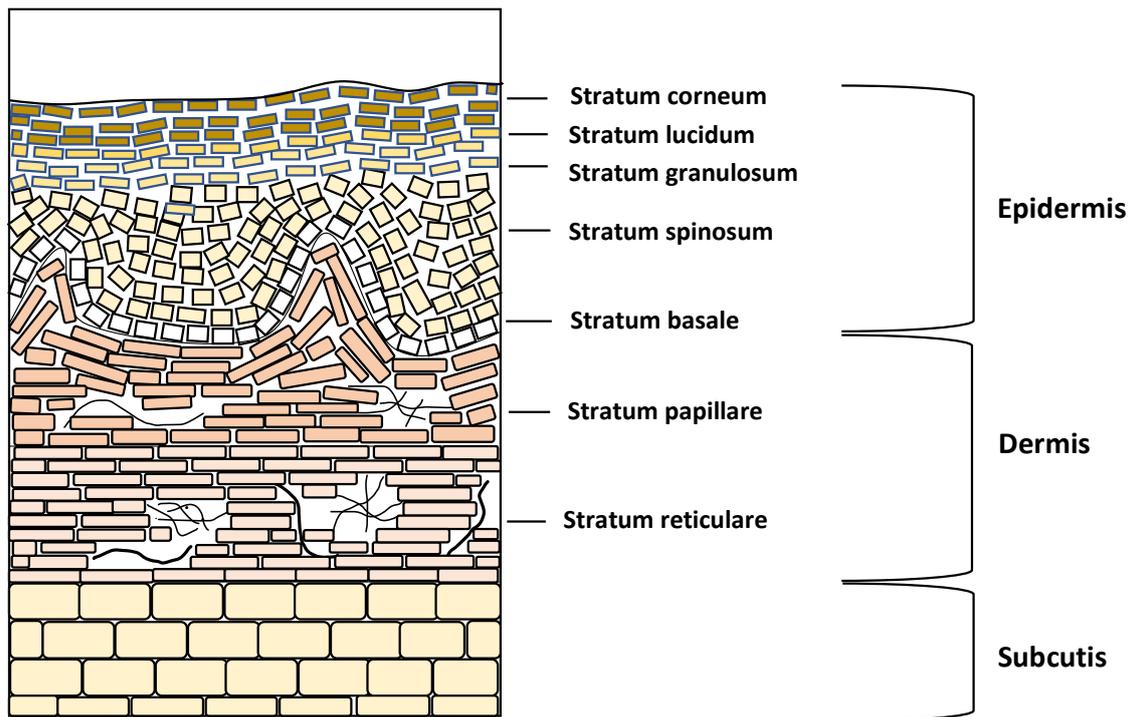


Abbildung 1 Aufbau der Haut

Gezeigt ist der schematische Aufbau der Haut. Unterschieden werden dabei die Schichten *Epidermis*, *Dermis* und *Cutis*. Erstere lässt sich wiederum in bis zu fünf *Strata* unterteilen, welche von außen nach innen lauten: *Stratum corneum*, *Stratum lucidum*, *Stratum granulosum*, *Stratum spinosum* und *Stratum basale*. Die *Dermis* hingegen lässt sich in nur zwei Lagen unterteilen, das *Stratum papillare* und das *Stratum reticulare*.

## 1.2 Die *Epidermis*

Die oberste Schicht der Haut, die *Epidermis*, besteht zum größten Teil aus Keratinozyten, die ein mehrschichtig verhornendes Plattenepithel bilden. Sie ist je nach Körperregion zwischen 0,05 mm bis 1 mm dick und lässt sich in vier bis fünf *Strata* unterteilen.

Die innerste Schicht der *Epidermis* ist das *Stratum basale*, welches aus einer Lage kubischer Zellen besteht. Hier befinden sich die Stammzellen der Keratinozyten, die etwa 10 % der Basalzellen ausmachen und aus denen durch mitotische Teilung die sich ausdifferenzierenden Zellen der weiter außen liegenden Schichten hervorgehen. Die Zellen des *Stratum basale* sitzen der Basalmembran, welche die *Epidermis* von der *Dermis* trennt, direkt auf. Die nächste Ebene bildet das zwei- bis fünfzellige *Stratum spinosum*, das zusammen mit dem *Stratum basale* zum *Stratum germinativum* zusammengefasst wird. Darauf folgt das *Stratum granulosum*, das ca. 3 Zellschichten breit ist. Hier sind die Keratinozyten bereits im Vergleich zu den Zellen des *Stratum basale* deutlich abgeflacht und sie weisen *Keratingranula* auf, welchen im Verhornungsprozess eine entscheidende Rolle zukommt. Auf das *Stratum granulosum* folgt das *Stratum lucidum*, eine stark

lichtbrechende Schicht, die einen Übergang zwischen *Stratum granulosum* und dem außen liegenden *Stratum corneum* darstellt. Dieses *Stratum* ist abhängig von der Körperregion unterschiedlich breit ausgebildet und ist besonders in der Leistenhaut stark ausgeprägt. Im *Stratum lucidum* gehen die Zellkerne und die Zellorganellen der Keratinozyten zugrunde, sodass sich in der äußersten Schicht, dem *Stratum corneum*, nur noch avitale „Zellen“ befinden, die lediglich aus Keratinfilamenten und einer Matrix, umgeben von einer verdickten Zellmembran, bestehen. Diese toten Hornzellen haben die Form von polygonalen Plättchen und sind ca. 0,5 µm breit und ca. 30-40 µm lang. Das *Stratum corneum* besteht an der Felderhaut aus ca. 15-25 Zellschichten, an der Leistenhaut aus ca. 100 Zellschichten. Die äußersten Zellen des *Stratum corneum* werden kontinuierlich abgeschilfert und durch nachrückende, darunter liegende Zellen ersetzt. Dabei steht die Anzahl der verloren gehenden Hornplättchen in gesunder Haut in einem Gleichgewicht mit der Neubildung von Zellen durch mitotische Teilung der Stammzellen in der Basalschicht. Am Rumpf dauert es ca. vier Wochen, bis die durch Mitose neu entstandenen Keratinozyten vom *Stratum basale* bis ins *Stratum corneum* vorgedrungen sind und dort als ausdifferenzierte Hornplättchen abgeschilfert werden.

Neben den Keratinozyten kommen in der *Epidermis* noch Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen vor, welche zusammen ca. 10 % aller Zellen dieser Schicht ausmachen. Melanozyten sitzen der Basalmembran direkt auf und verzweigen sich dendritisch zwischen die benachbarten Keratinozyten. Das in ihnen enthaltene Melanin ist ein wesentlicher Faktor für die Färbung des menschlichen Hautkolorits und schützt besonders das Genom der Basalzellen vor Schädigung durch die kurzwellige UVB-Strahlung. Langerhans-Zellen finden sich bevorzugt im *Stratum spinosum* mit einer Dichte von ca. 500 Langerhans-Zellen pro mm<sup>2</sup>. Sie liegen einzeln, in regelmäßigen Abständen zwischen den Keratinozyten und kontrollieren mit ihren langen Ausläufern als Teil des Immunsystems die Umgebung auf Erreger. Dabei besteht ihre Aufgabe in der *Endozytose* von Antigenen und deren Präsentation gegenüber T-Zellen nach Wanderung in die Lymphknoten (Benninghoff 2004; Welsch 2002).

### **1.3 Dermis und Subcutis**

Unter der *Epidermis* befindet sich die *Dermis*, welche durch die Basalmembran von der von der über ihr liegenden Deckschicht getrennt wird und sich in das *Stratum papillare* und das *Stratum reticulare* unterteilen lässt. Das *Stratum papillare* unterscheidet sich vom darunter gelegenen *Stratum reticulare* dadurch, dass es im Verhältnis zu zweitem

zellreicher ist. Zwischen den Zellen befinden sich schmale Kollagenfasern vom Kollagen Typ III sowie ein dichtes Netz von dünneren, elastischen Fasern. Das *Stratum papillare* ist nach seinen papillenförmigen, in die Epidermis ragenden Ausziehungen benannt, von denen jede mit einer Kapillarschlinge ausgestattet ist. Zudem enthält es viele freie Nervenendigungen zur Wahrnehmung von Schmerz und Juckreiz und ist der Ort, an dem viele kutane Entzündungsprozesse stattfinden. Das *Stratum reticulare* hingegen ist im Vergleich dazu eher zellarm und beherbergt dicke, wellige, in einem Gitter angeordnete Kollagenfasern, überwiegend vom Kollagen Typ I, sowie dicke elastische Fasern. Durch diese Faseranordnung entsteht die reversible Dehnbarkeit und die zeitgleich vorliegende Reißfestigkeit der Haut.

Die unter der *Dermis* liegende *Subcutis* beinhaltet, je nach Lokalisation am Körper und Ernährungszustand des einzelnen Menschen, eine unterschiedliche Menge an Fettgewebe, in das die epifaszial verlaufenden Leitungsbahnen eingebettet sind. Das Fettgewebe dient neben der Wärmeisolierung und Energiespeicherung auch dem Schutz der darunter liegenden Strukturen vor Druck. Darüber hinaus erfüllt die *Subcutis* durch ihre Bindegewebssepten (*Retinaculae cutis*) die Aufgabe der Fixierung der Hautdecke an den tiefer gelegenen Strukturen. Ihre Architektur bestimmt somit auch das mögliche Ausmaß der Verschiebung der *Subcutis* gegenüber der unter ihr liegenden Schicht (Benninghoff 2004).

## 1.4 Wundheilung

Der Prozess der Wundheilung setzt ein, sobald ein Gewebedefekt entsteht. Dieser kann traumatisch oder auch entzündliche Ursachen haben. Man unterscheidet grundsätzlich zwei Arten der Wundheilung, die Regeneration und die Reparatur.

Erstere zeichnet sich dadurch aus, dass es zu einer Wiederherstellung des ursprünglichen Gewebezustandes kommt, was auch *Restitutio ad integrum* bzw. vollständige Wundheilung genannt wird. Nachdem der zugrunde liegende Auslöser beseitigt bzw. die traumatische Schädigung beendet ist und somit keine weiteren Entzündungsmediatoren mehr freigesetzt werden, kommt es bei der Regeneration zu einer vollständigen Auflösung des *Exsudates*, welches über die Lymphbahnen und zum Teil auch über die Blutgefäße abtransportiert wird. Das im *Exsudat* enthaltene Fibrin wird hierbei durch Plasminogen gespalten, welches zuvor durch Makrophagen aktiviert wurde. Diese Zellen beseitigen zudem die vorhandenen Zelltrümmer mittels *Phagozytose*. Zum Schluss kommt es bei der Regeneration zu einer kompletten Wiederherstellung der Parenchymstruktur

mit den organtypischen Zellen. Im Falle des Epithels wird die Regeneration auch als Reepitelialisierung bezeichnet.

Bei der Reparation hingegen, auch Organisation genannt, ist die Menge der untergegangenen Zellen zu groß bzw. der Körper nicht fähig, das *Exsudat* vollständig zu entfernen. Dadurch kommt es nicht zur Wiederherstellung der ursprünglichen Gewebeverhältnisse, sondern zur Defektfüllung durch kollagenes Bindegewebe und somit zur Bildung einer Narbe.

Der Wundheilungsprozess der Haut wird in drei bis vier Phasen unterteilt, welche aber nicht stringent nacheinander ablaufen, sondern sich zeitlich überlappen.

Der Vorgang beginnt mit der Entzündungsphase, welche in den ersten 48 bis 72 h abläuft. Dabei kommt es direkt nach Entstehung des Gewebeschadens durch die Verletzung von Gefäßen zu Anreicherungen von Blut im Defekt, welches durch Koagulation zusammen mit Fibrin den primären Verschluss der Wunde ermöglicht. Stabilisiert wird das Gebilde durch die Verknüpfung des Fibrins mit Komponenten der extrazellulären Matrix über das Glykoprotein Fibronectin. Gleichzeitig wird durch die Nekrose der verletzten Zellen und den Koagulationsvorgang *via Chemokine* und *Interleukine*, wie IL-6 und IL-8, eine Entzündungsreaktion mit Rekrutierung von *neutrophilen* Granulozyten und Makrophagen aus dem umliegenden Gewebe getriggert.

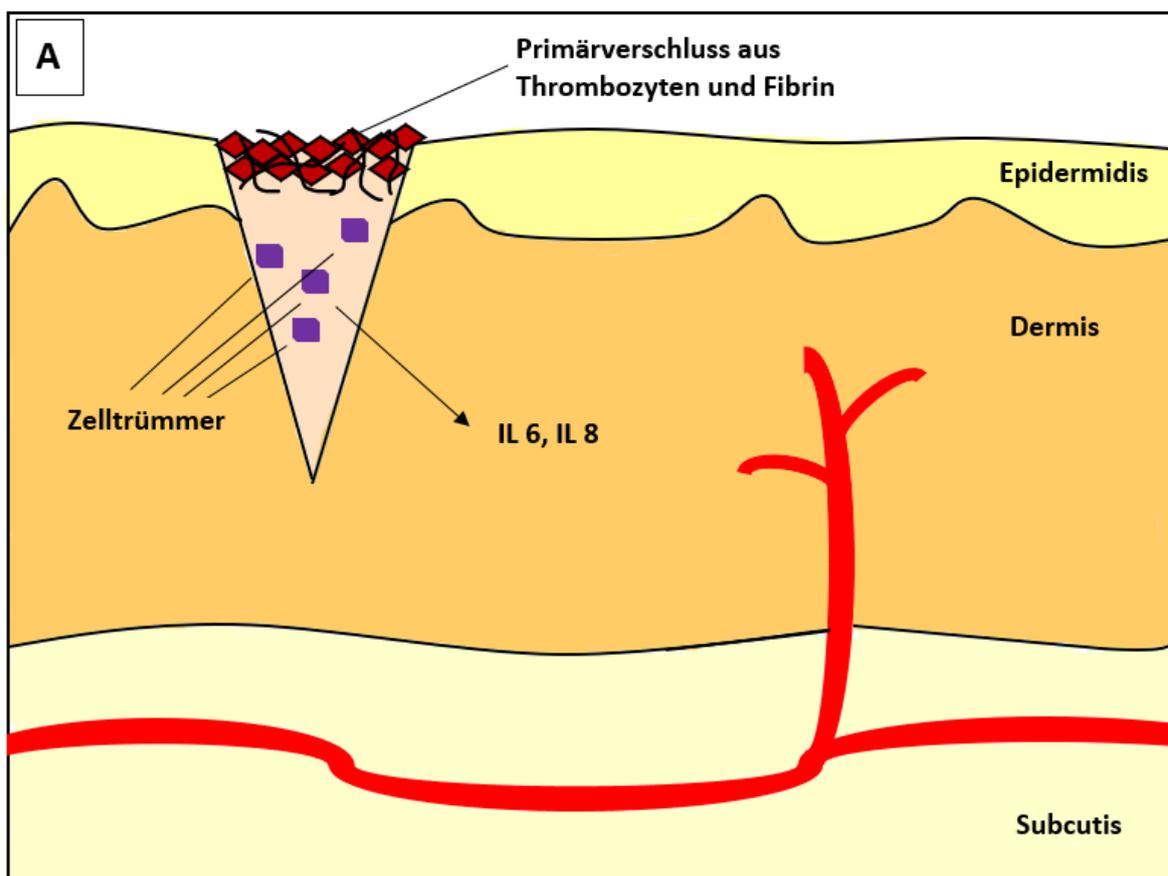
Damit ist der Übergang zur resorptiven Phase geschaffen. Diese ist gekennzeichnet durch die Einwanderung von *neutrophilen* Granulozyten und Makrophagen in den geschädigten Bereich mit der darauffolgenden Resorption des *Exsudats* durch diese Zellen. Neben dem beschriebenen Abbau beginnt gleichzeitig der Aufbau des Granulationsgewebes, welches aus eingewanderten Zellen, darunter Fibroblasten, sowie einer Prokollagen-, Elastin-, Proteoglykan- und Hyaluronsäure-reichen extrazellulären Matrix besteht. Der Prozess beginnt an den Wundrändern und setzt sich kontinuierlich ins Zentrum des Defektes fort. Zusätzlich wird der Verschluss der Wunde durch Kontraktion der Wundränder unterstützt, was durch die Aktinfilamente der Myofibroblasten, welche sich aus Fibroblasten differenziert haben, ermöglicht wird. Zudem kommt es zur Neubildung von Kapillaren sowie zur Migration von Zellen der basalen Epithelschicht zwischen das neu entstehende Granulationsgewebe und die deckende Schicht aus koagulierte Blut.

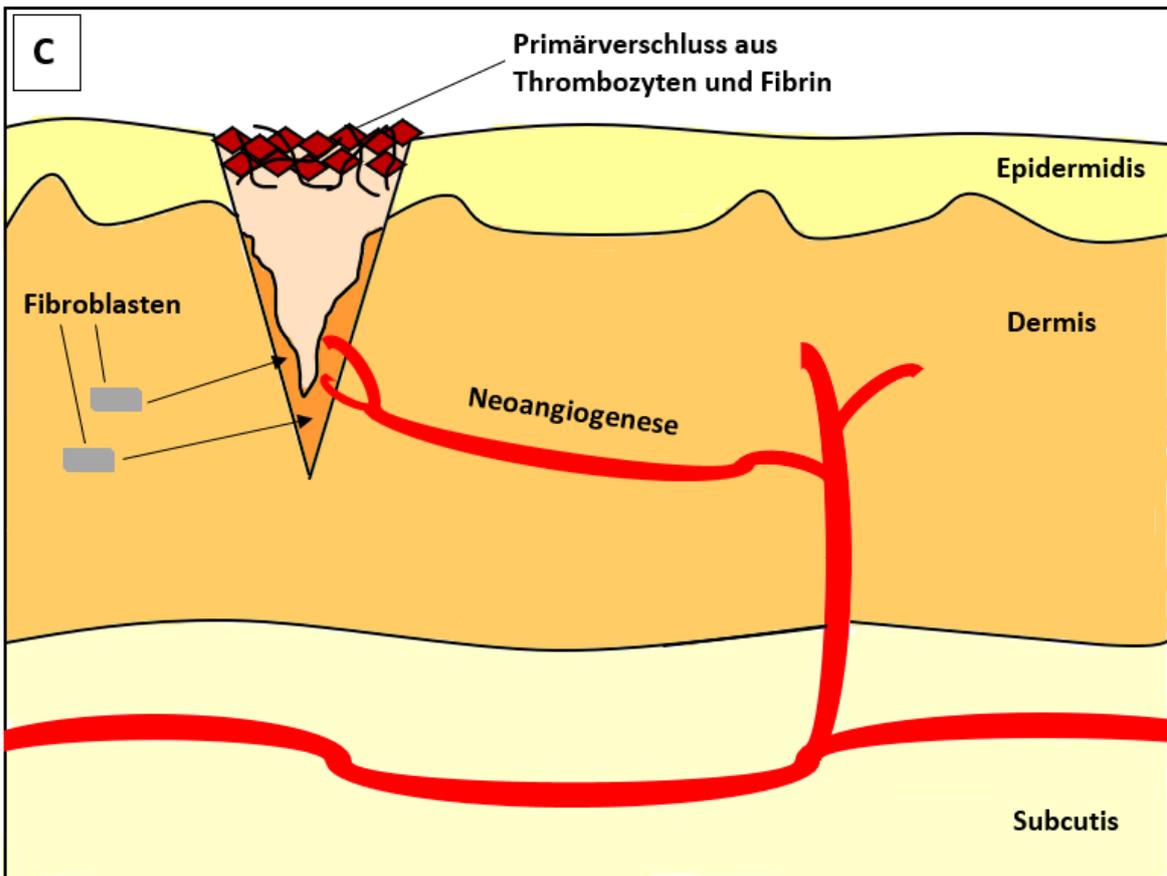
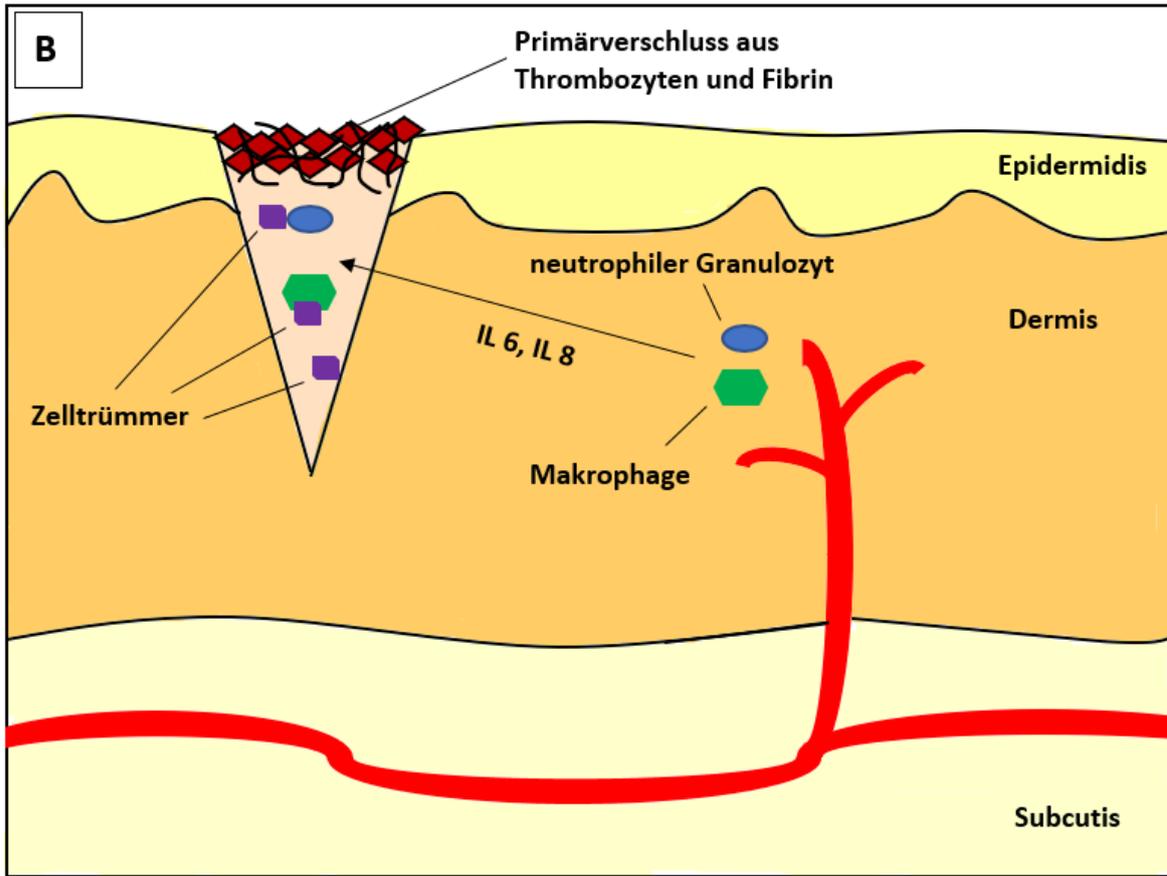
Der Beginn der Granulationsgewebebildung markiert den Übergang in die reparative Phase. Diese erstreckt sich über Wochen bis Monate, da das primär gebildete Granulationsgewebe nicht bestehen bleibt, sondern in reifes Narbengewebe umgeformt wird. Ein entscheidender Aspekt ist hierbei das mehrheitliche Ersetzen des zunächst

produzierten Kollagen Typ III durch Kollagen Typ I. Dies ist ein wichtiger Vorgang, um eine mechanisch widerstandsfähige Narbe zu generieren.

Die letzte Phase der Wundheilung stellt die Reepithelisierung dar. Diese beginnt bereits während der reparativen Phase mit der Einwanderung der ersten basalen Epithelzellen. Aus diesen entstehen mit der Zeit durch Mitose und Differenzierung die restlichen Schichten der Epidermis, sodass sich am Ende wieder ein mehrschichtig verhornendes Plattenepithel ausgebildet hat. Beendet wird der Prozess der Reepithelisierung durch Abwurf des restlichen Blutschorfes.

Die entstandene Narbe unterscheidet sich aber von der ursprünglichen Haut durch die Tatsache, dass sie keine Reteleisten, keine Hautanhangsgebilde und keine Melanozyten beinhaltet. Der Prozess der Wundheilung wird durch viele verschiedenen Moleküle und Signalwege reguliert, wie z. B. TGF- $\beta$ , *Mitogen-activated-Protein-(MAP-)* Kinasen und Matrix-Metallo-Proteasen, die zudem untereinander interagieren. (Böcker 2012; Wolfram u. a. 2009; Slemm und Kirschner 2006; Berman, Maderal, und Raphael 2017).





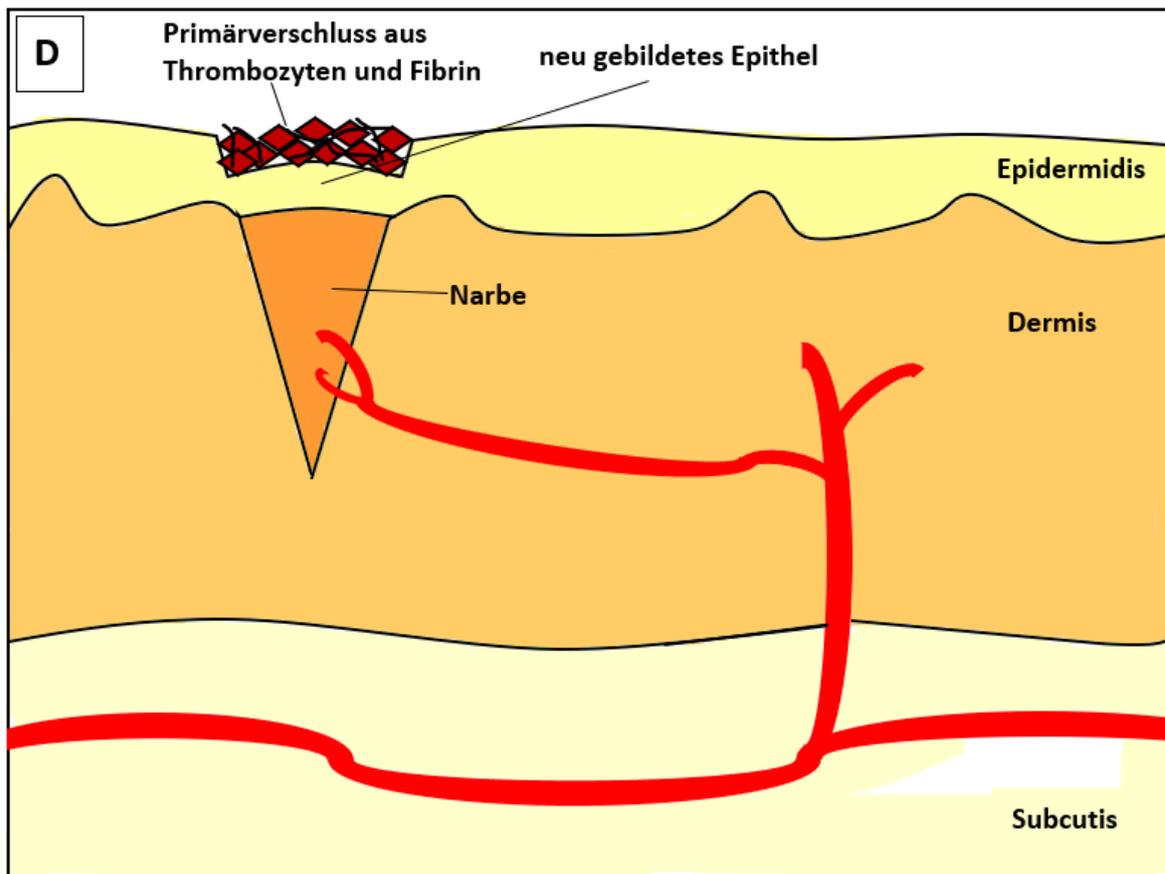


Abbildung 2 Ablauf der physiologischen Wundheilung

Gezeigt wird die schematische Darstellung der physiologischen Wundheilung.

**A:** Entzündungsphase: Der primäre Verschluss des Defektes wird durch Thrombozytenaggregation und Fibrin gewährleistet. Gleichzeitig werden aus den verletzten Zellen innerhalb des Defektes Botenstoffe wie IL (Interleukin) 6 und IL 8 freigesetzt.

**B:** Resorptive Phase: Durch die Entzündungsmediatoren angelockt, migrieren Zellen des Immunsystems, wie neutrophile Granulozyten und Makropagen in den Bereich des Defektes und beginnen die Zelltrümmer zu *phagozytieren*.

**C:** Reparative Phase: Parallel zur fortschreitenden Resorption des *Exsudates* beginnt der Aufbau von neuem Gewebe, unter anderem von Fibroblasten, die die auch die Komponenten der extrazellulären Matrix synthetisieren, und Endothelzellen, die für die Neuaussprossung von Gefäßen sorgen. Dabei beginnt der Prozess an den Wundrändern und setzt sich kontinuierlich bis ins Zentrum des Defektes fort.

**D:** Phase der Reepithelisierung: Diese beginnt mit der Einwanderung der ersten basalen Epithelzellen. Aus diesen bildet sich dann das neue mehrschichtig verhornende Plattenepithel. Am Ende dieses Prozesses kann dann der Primärverschluss aus Schorf abgeworfen werden.

## 1.5 Hypertrophe Narben und Keloide

*Hypertrophe* Narben und *Keloide* stellen Beispiele für profibrotische Erkrankungen der Haut dar. Sie zeichnen sich durch eine abnorme Wundheilung mit fehlerhafter Regulierung der daran beteiligten Prozesse aus. Das entstehende, übermäßige Narbengewebe kann die Betroffenen neben dem kosmetischen Aspekt besonders durch Druckgefühl, Juckreiz und Schmerzen beeinträchtigen (Nemeth 1993; Wolfram u. a. 2009). Bei beiden Krankheitsbildern ist eine genetische Prädisposition bekannt. Dabei

wurden sowohl autosomal dominante als auch autosomal rezessive Erbgänge beschrieben, deren Auswirkungen aber erst sichtbar werden, wenn die Haut der Patienten verletzt wird. Dies kann durch Traumata, darunter auch chirurgische Inzisionen, oder Entzündungen geschehen (English und Shenefelt 1999; Nemeth 1993).

Neben diesen Gemeinsamkeiten gibt es aber auch zahlreiche Unterschiede zwischen den beiden Erkrankungsbildern. Als ersten Punkt ist hier die höhere Prävalenz der Patienten mit *hypertrophen* Narben gegenüber denjenigen mit *Keloiden* zu nennen (Wolfram u. a. 2009). Als Zweites ist zu nennen, dass erstere erhaben sind, sich aber auf das Areal der Verletzung beschränken, während sich *Keloide* über die ursprüngliche Wundfläche hinaus in gesundes Gewebe ausdehnen, wobei sie sich ebenfalls über das Hautniveau erheben (English und Shenefelt 1999; Slemm und Kirschner 2006). Histologisch fallen bei *hypertrophen* Narben Typ III-Kollagenbündel auf, die sich flach bis wellig darstellen und größtenteils parallel zur Hautoberfläche angeordnet sind (English und Shenefelt 1999; Slemm und Kirschner 2006), sowie knotige Strukturen, die  $\alpha$ -SMA-exprimierende Myofibroblasten, Blutgefäße und feine Kollagenfasern beinhalten (English und Shenefelt 1999; Slemm und Kirschner 2006; Ehrlich und Desmouliere 1994). In mikroskopischen Schnitten von *Keloiden* finden sich hingegen keine Kollagenbündel, sondern Typ I- und Typ III-Kollagenfasern liegen gemischt in Schichten übereinander und es ist keine Ausrichtung zur Oberfläche erkennbar (English und Shenefelt 1999; Wolfram u. a. 2009). Ein weiterer Unterschied ist die Dauer des Zeitraumes zwischen dem Auftreten des Defektes und der Entstehung der krankhaften Narbe. *Hypertrophe* Narben bilden sich schnell nach Verletzung der Haut aus, während sich *Keloide* eher Monate bis Jahre nach dem auslösenden Trauma entwickeln (Nemeth 1993; Wolfram u. a. 2009; Berman, Maderal, und Raphael 2017). Der nächste Gegensatz besteht darin, dass *hypertrophe* Narben im Laufe der Zeit häufig eine Regression zeigen, während *Keloide* oftmals ohne Stopp oder Regression immer weiter wachsen (English und Shenefelt 1999). Zudem zeigt sich im Fall von *hypertrophen* Narben häufig eine Verbesserung nach der Durchführung einer operativen Korrektur, während *Keloide* nach ihrer Exzision oftmals sogar ausgeprägter rezidivieren (Nemeth 1993). Bevorzugte Lokalisationen am Körper, an denen sich *hypertrophe* Narben bilden, sind Bereiche mit Falten, wobei gerade ein rechtwinkliger Verlauf der Verletzung zu einer dieser Falten die Entstehung von *hypertrophen* Narben begünstigt. Grund dafür ist, dass in diesem Fall bei Bewegungen vermehrt Spannung auf die Narbe ausgewirkt wird, was die Wundheilung beeinflusst (English und Shenefelt 1999). *Keloide* hingegen findet man selten im Bereich von Falten,

sondern gehäuft in Bereichen mit hohem Melanozytenvorkommen (English und Shenefelt 1999). Sie treten deshalb verstärkt an Ohrläppchen, Schultern und in der *sternalen* Kerbe auf und sind an Fußsohlen oder Handflächen hingegen kaum zu finden (English und Shenefelt 1999; Slemp und Kirschner 2006; Nemeth 1993). Außerdem kommen *Keloide* bei Menschen mit schwarzer Hautfarbe häufiger vor als bei anderen Hauttypen (Nemeth 1993), während die Hautfarbe bei *hypertrophen* Narben keinen Risikofaktor darstellt (Wolfram u. a. 2009). Hormone sind im Falle von *Keloiden* ebenfalls als Einflussfaktoren nachgewiesen worden. So tritt diese Hauterkrankung verstärkt während oder zeitlich eng nach der Pubertät und bei Frauen gehäuft in der Schwangerschaft und nur selten in der Menopause auf (English und Shenefelt 1999; Nemeth 1993). Auch bei Patienten mit Akromegalie wurden vermehrt *Keloide* beschrieben (Nemeth 1993).

Wie bereits zu Beginn erwähnt, kommt es bei beiden Krankheitsbildern zu einem überschießenden Wundheilungsprozess. Dieser ist dadurch gekennzeichnet, dass es zu einer Überproduktion von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  und PDGF (*Platelet-Derived-Growth-Factor*) kommt, welche eine Persistenz der Wundheilung mit fehlerhafter Herunterregulierung der beteiligten Zellen nach Wundverschluss bedingen (Slemp und Kirschner 2006; Berman, Maderal, und Raphael 2017). In der Erforschung von *Keloiden* konnte zudem eine erhöhte Proliferationsrate der Fibroblasten in den Wunden der betroffenen Patienten sowie eine gesteigerte Sensitivität dieser Zellen bezüglich TGF- $\beta$  und PDGF verglichen mit Fibroblasten gesunder Personen identifiziert werden (English und Shenefelt 1999; Berman, Maderal, und Raphael 2017). Außerdem ist die Apoptoserate bei Fibroblasten innerhalb von *Keloiden* verringert (Luo u. a. 2001). Des Weiteren zeigt sich bei beiden Krankheitsbildern eine verstärkte Kollagensynthese, wobei innerhalb von *Keloiden* sogar noch größere Mengen dieses Bestandteils der extrazellulären Matrix synthetisiert werden als in Bereichen von *hypertrophen* Narben. In Arealen von *Keloiden* ist die Kollagenproduktion zwanzigmal größer als in normalem Gewebe und dreimal höher als in *hypertrophen* Narben (English und Shenefelt 1999). Dabei ist das Verhältnis von Typ I- zu Typ III-Kollagen stark zugunsten von ersterem verschoben (Berman, Maderal, und Raphael 2017). Im Falle der *Keloide* konnte zudem gezeigt werden, dass die Abschaltung der Synthese von Typ I-Kollagen ineffizient ist, was ein Grund für das erhöhte Kollagenvorkommen darstellen könnte (Slemp und Kirschner 2006). Außerdem besteht bei diesem Krankheitsbild eine stärkere Vernetzung der Kollagenmoleküle unter einander (S. M. D. Luo u. a. 2001) Ein zweiter Grund für die hohen Kollagenmengen besteht darin, dass bei beiden Krankheitsbildern auch eine

verminderte Synthese matrixabbauender Enzyme, wie z.B. MMPs (Matrix-Metallo-Proteasen) vorliegt (Slemp und Kirschner 2006). Zusammengefasst lässt sich somit festhalten, dass bei beiden Krankheitsbildern ein vermehrtes Vorkommen von Fibroblasten, einhergehend mit einer gesteigerten Kollagensynthese dazu führt, dass sich im Bereich des Defektes mehr neues Gewebe während des Wundheilungsvorgangs bildet als bei Menschen mit unauffälliger Narbenbildung.

Um der Entstehung von *Keloiden* und *hypertrophen* Narben präventiv entgegen zu wirken, bestehen, neben der grundsätzlichen Vermeidung von Wunden soweit möglich, lediglich die Optionen die Wundfläche möglichst gering zu halten und beim Verlauf des Defektes darauf zu achten, dass dieser keine Falten überquert, um die Spannung auf die Wundränder zu reduzieren (Berman, Maderal, und Raphael 2017; Slemp und Kirschner 2006). Es versteht sich von selbst, dass dies nur bei chirurgischen Inzisionen planbar und somit auf eine Vielzahl von Wunden nicht anwendbar ist. Deswegen kommt einer wirksamen Therapie bereits entstandener *Keloide* und *hypertrophen* Narben eine umso größere Bedeutung zu. Zurzeit existieren zahlreiche Therapieansätze, die teilweise auch kombiniert Anwendung finden, deren Erfolgsraten aber in einigen Fällen in der Literatur sehr unterschiedlich dargestellt werden. Für die Behandlung von *hypertrophen* Narben gibt es die Möglichkeit, chirurgisch das übermäßige Narbengewebe zu exzidieren und mittels Z- oder W-Plastik die neue Wunde zu verschließen, um die Spannung, die auf die Wundränder wirkt, zu reduzieren und die Richtung des Wundverlaufes zu verändern (English und Shenefelt 1999; Berman, Maderal, und Raphael 2017). Bestehen größere Defekte, können Hauttransplantate verwendet werden, um den Zug auf die Wundränder zu minimieren (Wolfram u. a. 2009). Beides bewirkt aber, besonders im Falle der *Keloide*, oft eine Verschlimmerung der Situation, da die neue Verletzung wieder die Kollagensynthese stimuliert (English und Shenefelt 1999; Wolfram u. a. 2009), sodass die chirurgische Exzision im Falle von *Keloiden* nicht die beste Therapiemöglichkeit darstellt und, wenn sie doch angewendet wird, mit adjuvanten Maßnahmen, wie Druck auf die Wunde, eine Injektion von Kortikosteroiden oder einer radiologischen Bestrahlung, kombiniert werden sollte (English und Shenefelt 1999). Im Falle von *Keloiden* wies eine kompressive postoperative Therapie eine deutlich verminderte Rezidivrate in verschiedenen Studien auf (Berman, Maderal, und Raphael 2017). Die Anwendung von *topischen* Kortikosteroiden zeigte sich in anderen Studien hingegen auch als alleinige Therapie bei beiden Krankheitsbildern effektiv, wobei aber auch gegensätzliche Studien vorliegen, die nur einen geringen Nutzen dieser Therapieoption beschreiben (Berman,

Maderal, und Raphael 2017). Studien mit postoperativer Bestrahlung ergaben ebenfalls positive Ergebnisse (Berman, Maderal, und Raphael 2017), während unter alleiniger Bestrahlung keine signifikante Besserung nachgewiesen werden konnte (English und Shenefelt 1999). Außerdem gibt es noch die Möglichkeiten der Kryochirurgie, die *topische* Anwendung von Silikongelen sowie von Bleomycin, die in verschiedenen Studien gute Resultate zeigten (English und Shenefelt 1999; Berman, Maderal, und Raphael 2017). Des Weiteren gibt es Therapieansätze, die die intraläsionale Injektion von 5-Fluorouracil oder Imiquimod 5 %, die beide gegen die erhöhte Kollagenproduktion wirken, beinhalten. Allerdings zeigten verschiedene Studien unterschiedliche Ergebnisse bezüglich ihrer Wirksamkeit (Slemp und Kirschner 2006; Berman, Maderal, und Raphael 2017). Versuche mit Interferonen konnten aufgrund fehlender signifikanter Wirksamkeit und häufigen Nebenwirkungen nicht überzeugen (Berman, Maderal, und Raphael 2017). Ein weiterer neuer Ansatz besteht in der Verwendung von synthetisch hergestellten RNAs. Diese sollen über Vektoren in die Zielzellen eingeschleust werden und dort an die Promotorregionen der Zielgene andocken, um so die Synthese bestimmter Proteine, insbesondere von Komponenten der extrazellulären Matrix, zu regulieren. Aber auch hier kann noch keine abschließende Einschätzung bezüglich der Nebenwirkungen und somit der Sicherheit dieser Verfahren getroffen werden (Zhang u. a. 2020).

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die bestehenden Therapiemöglichkeiten, auch in Kombination, oft nur suboptimale Ergebnisse liefern und mit leichten Begleiterscheinungen, wie z.B. *Erythembildung* oder Hypopigmentierung, teilweise aber auch mit gravierenden Nebenwirkungen, wie Schmerzen oder erhöhtes Entartungsrisiko, einhergehen können. Dies setzt die *Compliance* herab, was wiederum den primär möglichen positiven Effekt auf das überschüssige Narbengewebe herabsenkt (Slemp und Kirschner 2006; English und Shenefelt 1999; Nemeth 1993). Dementsprechend wären neue Therapieansätze mit einer besseren Wirksamkeit und geringeren Nebenwirkungsrate wünschenswert.

## **1.6 Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und deren Eigenschaften**

Im Gewebe ruhende Fibroblasten können durch diverse Stimuli, darunter Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ , PDGF und TNF- $\alpha$  (*Tumor-Necrosis-Factor-alpha*), zur Differenzierung zu Myofibroblasten angeregt werden. Weitere Forschungsergebnisse geben aber auch Hinweise darauf, dass es deutlich mehr potenzielle Ursprünge für

Myofibroblasten gibt. Mögliche Quellen stellen demnach Zellen der Neuralleiste, zirkulierende CD34-positive Fibroblasten aus dem Knochenmark sowie lokal im Gewebe vorhandene Zellen wie Perizyten und Endothelzellen dar (Rao u. a. 2017).

Myofibroblasten zeichnen sich dadurch aus, dass sie sowohl Eigenschaften von Fibroblasten als auch von Zellen der glatten Muskulatur besitzen. Einerseits sezernieren sie, genau wie Fibroblasten, Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen Typ I, Fibronectin und Proteoglykane, wobei die Syntheseleistung von Myofibroblasten höher ist als die der Fibroblasten. Andererseits exprimieren Myofibroblasten aber auch kontraktile Proteine, wie  $\alpha$ -SMA, welche man sonst in den Zellen glatter Muskulatur findet und die der Kontraktion der Wundränder dienen (Penke und Peters-Golden 2019).

Obwohl die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten häufig als ein einzelner Schritt dargestellt wird, ist die Umwandlung ein mehrschrittiger Prozess mit fließenden Übergängen zwischen den sich nur leicht unterscheidenden *Phenotypen* der einzelnen Stadien. Zum Beispiel zeigte sich, dass durch inflammatorische Zytokine Fibroblasten zunächst zu Zellen differenziert werden, die kein  $\alpha$ -SMA exprimieren. Dafür produzieren diese Zellen  $\beta$ - und  $\gamma$ -zytoplasmatische Aktine, welche es ihnen erleichtern in Wunden zu migrieren, sowie neben Kollagen Typ I auch ED- (*extra domain*) A Fibronectin, welches zusammen mit den Aktinen die Wundkontraktion herbeiführt. Diese, auch *Proto-Myofibroblasten* genannten Zellen, können durch anhaltende profibrotische Signalwirkung sowie durch mechanischen Stress, ausgelöst durch das *Remodeling* der extrazellulären Matrix, das die *Proto-Myofibroblasten* selbst herbeiführen, weiter zu  $\alpha$ -SMA-exprimierenden Myofibroblasten differenziert werden (Penke und Peters-Golden 2019; Hinz 2007).

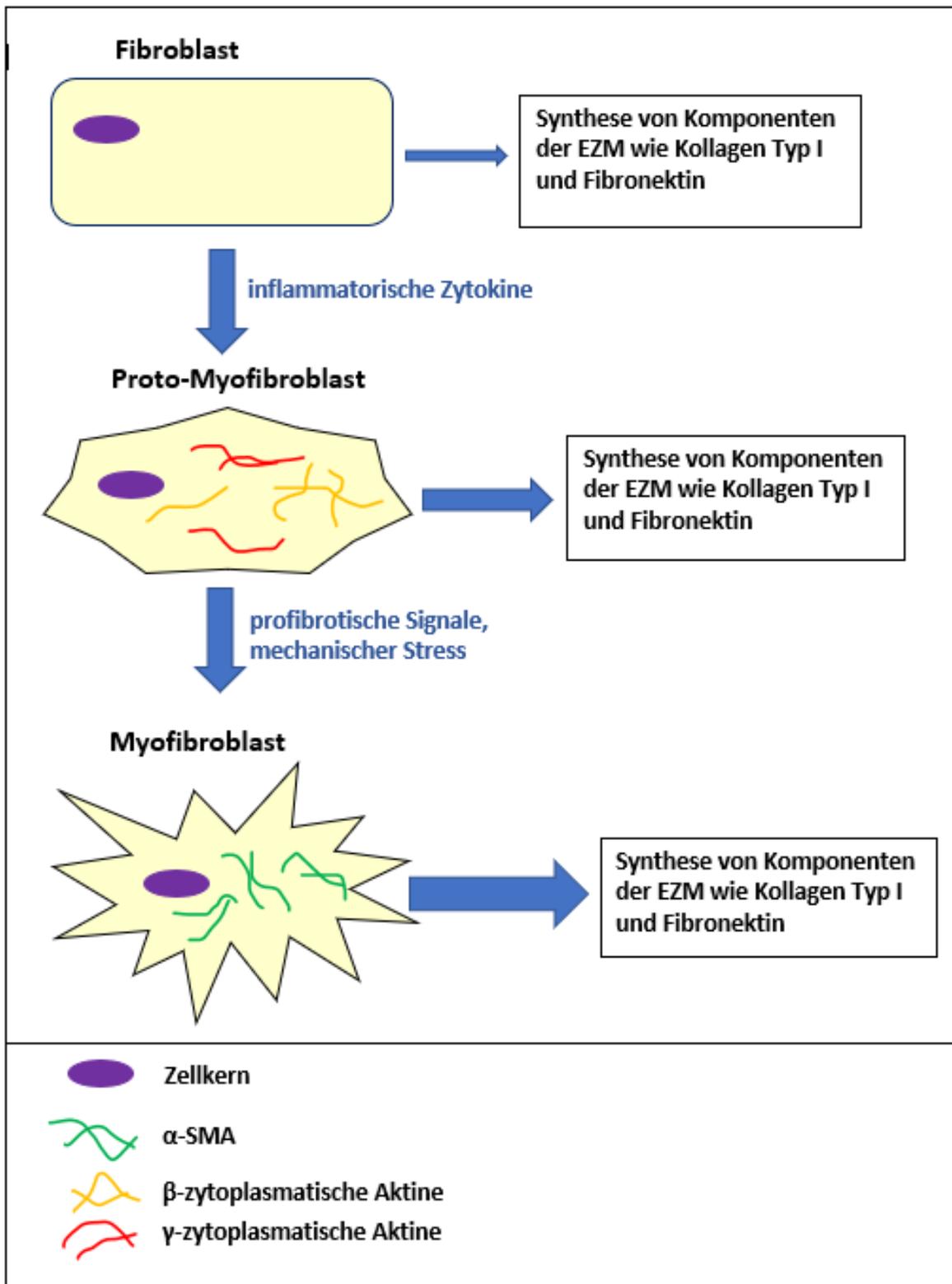


Abbildung 3 Myofibroblastendifferenzierung

Dargestellt ist die Transdifferenzierung eines Fibroblasten zu einem Myofibroblasten über das Zwischenstadium des Proto-Myofibroblasten, welcher bereits kontraktile Fasern wie der Myofibroblast besitzt, der aber noch nicht das charakteristische Kennzeichen des Myofibroblasten, die Expression von  $\alpha$ -SMA (alpha-Smooth-Muscle-Aktin) zeigt. Zudem nimmt die Syntheserate von Komponenten der extrazellulären Matrix mit fortschreitender Differenzierung zu.

## 1.7 Der TGF- $\beta$ -Signalweg

Die Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalweges spielt eine bedeutende Rolle im Rahmen der Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Migration von Zellen. Daher ist diese Signalkaskade auch entscheidend an Wundheilungsprozessen, aber auch an profibrotischen Erkrankungen beteiligt. Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass die TGF- $\beta$ -Konzentration in fibrotischem Gewebe erhöht ist, sondern auch, dass in den Zellkernen der dort zu findenden Myofibroblasten vermehrt SMAD- (*Small-Mothers-Against-Decapentaplegic*) Proteine vorkommen. Eine Inhibition des Signalweges unterdrückt die fibrosierenden Prozesse in betroffenem Gewebe aber nicht vollständig, woraus sich schließen lässt, dass der fibrotische Umbau auch durch weitere Signalwege induziert wird (Leask und Abraham 2004; Piersma, Bank, und Boersema 2015).

Die Aktivierung des Signalweges beginnt damit, dass TGF- $\beta$ , welches unter homöostatischen Bedingungen durch Latenz-assoziierte-Proteine (LAPs) und latente TGF- $\beta$ -Bindungsproteine blockiert und an Proteine der extrazellulären Matrix, wie Fibrillin und Fibronectin, gebunden wird, durch proteolytische Spaltung von diesem Bindungskomplex gelöst wird (Leask und Abraham 2004; Zilberberg u. a. 2012; Tzavlaki und Moustakas 2020). Neueren Erkenntnissen zufolge kann die Freisetzung des TGF- $\beta$ , zumindest teilweise, auch mechanisch bewirkt werden, indem die Bindungskomplexe an passende Integrin-Rezeptoren andocken, die über intrazelluläre Brücken mit den Aktin-Bestandteilen des Zytoskeletts verbunden sind. Dadurch können Zugkräfte generiert werden, die die TGF- $\beta$ -Bindungskomplexe aufbrechen können (Tzavlaki und Moustakas 2020). Die freigesetzten TGF- $\beta$ -Moleküle, welche über Disulfidbrücken verbundene Dimere darstellen, können daraufhin eine Bindung mit zwei TGF- $\beta$ -Typ1-Rezeptoren und zwei TGF- $\beta$ -Typ2-Rezeptoren eingehen, welche beide als Serin/Threonin-Proteinkinase fungieren. Hierdurch kommt es zur Phosphorylierung der Serin-reichen Juxtamembran-Domäne der TGF- $\beta$ -1-Rezeptoren durch die TGF- $\beta$ -2-Rezeptoren, wodurch erstere in die Lage versetzt werden, sowohl SMAD-bindende Proteine wie SARA (*SMAD-Anchor-for-Receptor-Activation*) anzulagern, als auch SMAD-Proteine selbst zu binden und zu phosphorylieren. Zu diesen sogenannten R-SMADs (Rezeptor-regulierte-SMADs) gehören SMAD2 und SMAD3, die nach ihrer Phosphorylierung mit SMAD4 Komplexe bilden, welche in den Zellkern translozieren und zusammen mit weiteren regulierenden Proteinen, darunter p300 und Creb-*Binding*-Protein (CBP), an entsprechende DNA-Motive der Zielgene, den sogenannten SMAD-bindenden-Elementen, andocken und damit die

Transkription der Zielgene regulieren. Zu diesen Zielgenen gehören unter anderem Kollagen Typ I, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI1), *Cellular-Communication-Network-Factor 2* (CCN2) und Elastin. Zudem wird die Expression der ED-A-Spleißvariante des Fibronektins durch TGF- $\beta$  induziert, welche wiederum die Syntheseraten von Kollagen Typ I und  $\alpha$ -SMA durch TGF- $\beta$  steigert (Leask und Abraham 2004; Piersma, Bank, und Boersema 2015; Tzavlaki und Moustakas 2020). Neben der Transkription von Genen beeinflussen die SMAD-Proteine aber auch die posttranskriptionelle Phase. Über RNA-bindende Proteine (RBP) sowie nicht kodierende RNA (ncRNA) modulieren sie die Stabilität, die Translation und das Spleißen von RNA (Tzavlaki und Moustakas 2020). Inhibiert wird der TGF- $\beta$ -Signalweg unter anderem durch die Verbindung aus SMAD7 und dem SMAD-Ubiquitin-regulierender-Faktor2 (SMURF2) oder durch den Axin/Glycogen-Synthase-Kinase3- $\beta$ -Komplex (GSK3 $\beta$ ). Beide können die SMAD-Proteine bzw. die TGF- $\beta$ -Rezeptor-Komplexe blockieren und sie durch *Ubiquitinierung* für die Degradation im Proteasom markieren (Piersma, Bank, und Boersema 2015; Tzavlaki und Moustakas 2020).

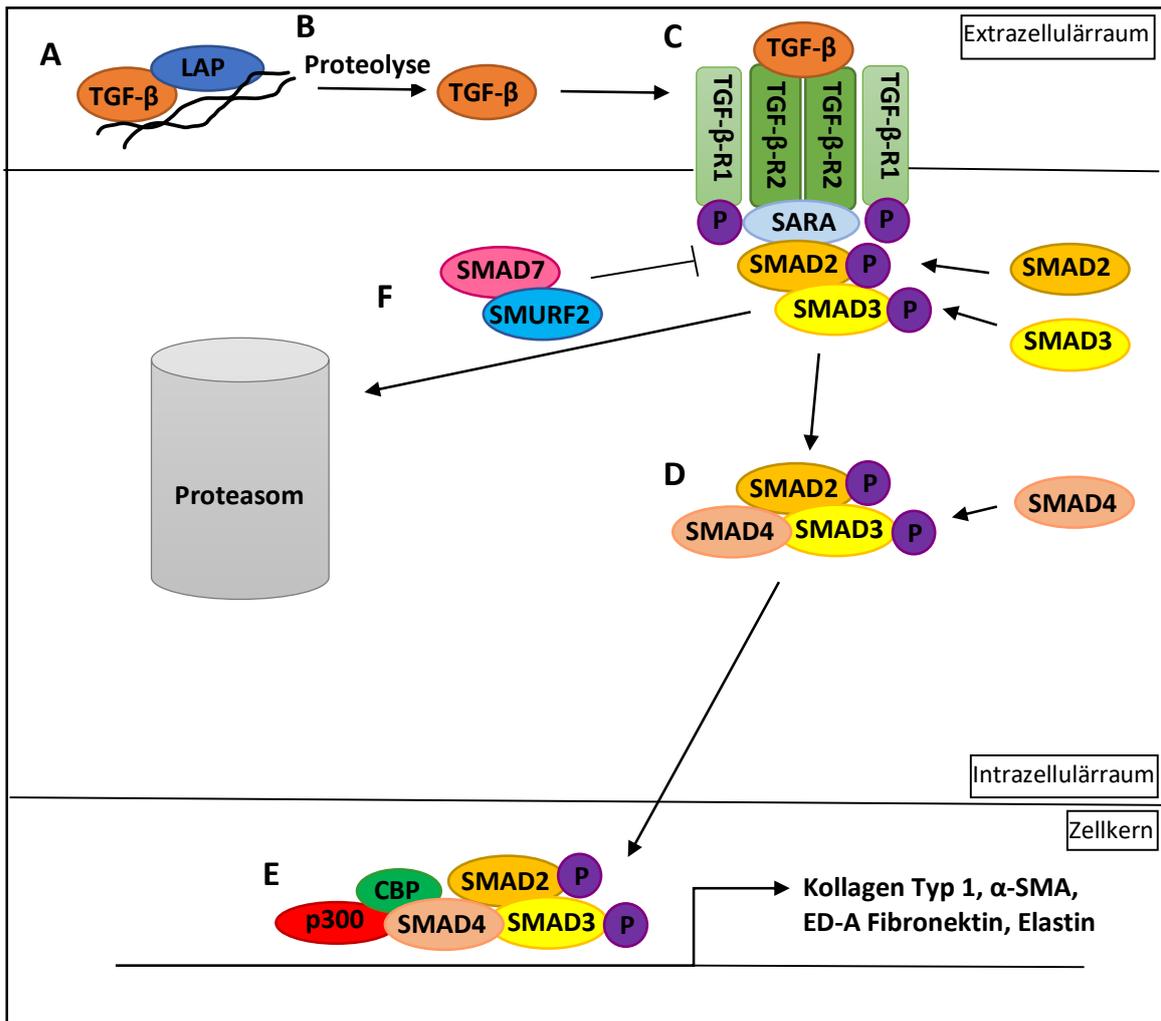


Abbildung 4 Der TGF- $\beta$ -Signalweg

Abgebildet ist die grafische Darstellung des TGF- $\beta$ -Signalweges.

A: TGF- $\beta$  (*Transforming-Growth-Factor-beta*) wird unter homöostatischen Bedingungen über Latenz-assoziierte-Proteine an der extrazellulären Matrix verankert.

B: Durch Proteolyse kann aus dem Komplex das TGF- $\beta$  freigesetzt werden.

C: Das freigesetzte TGF- $\beta$  kann nun eine Bindung mit je zwei TGF- $\beta$ -Typ1-Rezeptoren und zwei TGF- $\beta$ -Typ2-Rezeptoren bilden. Daraufhin kommt es zur Phosphorylierung der Typ1-Rezeptoren durch die Typ2-Rezeptoren und zur Anlagerung von SMAD (*Small-Mothers-Against-Decapentaplegic*)-bindenden Proteinen wie SARA (*SMAD-Anchor-for-Receptor-Activation*). Der Komplex bindet und phosphoryliert nun SMAD2 und SMAD3.

D: Das Dimer aus phosphoryliertem SMAD2 und SMAD3 kann anschließend SMAD4 binden.

E: Der SMAD-Komplex wandert in den Zellkern, wo er sich mit anderen Transkriptionsfaktoren wie p300 und CBP (*Creb-Binding-Protein*) an die Zielgene, darunter Kollagen Typ I,  $\alpha$ -SMA (*alpha-Smooth-Muscle-Actin*) und Elastin, anlagert und deren Expression induziert.

F: Komplexe aus SMAD7 und SMURF2 können als Gegenspieler den Signalweg inhibieren, indem sie den Rezeptorkomplex und die phosphorylierten SMAD-Proteine *ubiquitinieren* und sie dadurch für den Abbau im Proteasom markieren.

## 1.8 Der Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist ein essenzieller Bestandteil der embryonalen Entwicklung, da er eine wichtige Rolle bezüglich Zellerhalt, Zellerneuerung und Zelleruntergang von

Stammzellen und frühen *Progenitorzellen* einnimmt. Eine Dysregulation kommt aber auch im Rahmen vieler profibrotischer Erkrankungen sowie Tumoren vor. Dabei zeigt sich im Falle der Wnt-Signalkaskade, genau wie beim TGF- $\beta$ -Signalweg, dass seine Inhibition die profibrotische Entwicklung nicht vollständig verhindert, sodass man hier schlussfolgern muss, dass auch diese Signalkaskade nur ein Baustein in der Entwicklung und dem Voranschreiten profibrotischer Erkrankungen ist (Piersma, Bank, und Boersema 2015; S. M. D. Luo u. a. 2001).

Das zentrale Protein des Wnt-Signalweges ist das  $\beta$ -Catenin, welches, solange die Signalkaskade nicht aktiviert wird, durch den  $\beta$ -Catenin-Destruktionskomplex, bestehend aus Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3), Casein-Kinase 1 (CK1), *Disheveled*, Axin, *Adenomatosis-poliposis-coli* (APC), Wilms-Tumor-Suppressor-Gen (WTX) und  $\beta$ -*Transducin-Repeats*-Protein ( $\beta$ -TrCP), gebunden wird. In diesem Zustand phosphorylieren GSK3 und CK1  $\beta$ -Catenin an einer Serie von N-terminalen Serin/Threonin-Resten, woraufhin das  $\beta$ -Catenin *ubiquitiniert* und im Proteasom degradiert wird (Piersma, Bank, und Boersema 2015; Clevers und Nusse 2012).

Die Aktivierung des Signalweges erfolgt durch die Bindung von Wnt-Liganden an *Frizzled*-Rezeptoren, wobei die Struktur von Liganden und Rezeptoren es ermöglicht, dass sowohl mehrere Wnt-Moleküle an einen Rezeptor binden können, als auch, dass ein Ligand sich gleichzeitig an mehrere benachbarte Rezeptoren anlagern kann (Clevers und Nusse 2012). Die aktivierten Rezeptoren gehen daraufhin eine Bindung mit *Low-Density-Lipoprotein-Related*-Proteinen (LRP) 5 bzw. 6 ein, was wiederum zu einer Phosphorylierung von LRP5 bzw. LRP6 durch die GSK3- bzw. CK1-Proteine führt. In dieser Form sind sie nun fähig den  $\beta$ -Catenin-Destruktionskomplex zu binden und an mehreren Serinresten zu phosphorylieren, wodurch  $\beta$ -Catenin nicht länger von seinem Destruktionskomplex *ubiquitiniert* und abgebaut wird. Es wandert in den Zellkern und kann zusammen mit Co-Faktoren wie T-Zell-Faktor/*Lymphoid-Enhancer-Binding*-Faktor-Protein (LEF/TCF), p300, *cAMP-Response-Element-Binding*-Protein (CREB) sowie *Creb-Binding-Protein* (CBP) an die DNA der Zielgene binden (Clevers und Nusse 2012; Piersma, Bank, und Boersema 2015). Zu den Zielgenen, deren Transkriptionsrate durch die Anwesenheit von  $\beta$ -Catenin im Zellkern erhöht wird, gehören unter anderem Fibronectin, MMP7, PAI1, Twist sowie Snail, welche alle auch im Rahmen von profibrotischen Erkrankungen vermehrt vorkommen (Cisternas, Vio, und Inestrosa 2014; Yan, kui, und Ping 2014; Guo u. a. 2012).

Neben der Regulation von Zielgenen durch die kanonische Aktivierung der Signalkaskade beeinflussen Komponenten des Wnt-Signalweg auch weitere Signalkaskaden, wie z. B.

den TGF- $\beta$ -Signalweg. In Anwesenheit von Wnt und der damit verbundenen Inhibition der GSK3 werden die SMAD-Proteine stabilisiert. Andersherum kommt es bei alleiniger Aktivierung der TGF- $\beta$ -Signalkaskade durch die GSK3 zur Phosphorylierung in der *Linker*-Region von aktiviertem SMAD3, wodurch dieses inaktiviert und zum Abbau freigegeben wird. Außerdem wirken Inhibitoren des TGF- $\beta$ -Signalweges, wie SMAD7 und SMURF2, auch modulierend auf die Wnt-Signalkaskade. Eine gleichzeitige Aktivierung beider Signalwege kann wiederum eine verstärkte Transkription ihrer Zielgene nach sich ziehen, da pSMAD3 zum einen die Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern begünstigt und sich zum anderen durch synchrone Anlagerung von pSMAD3 und  $\beta$ -Catenin sowie T-Zell-Faktor bzw. *Lymphoid-Enhancer-Binding-Factor-Protein* an den Promoter der Zielgene deren Transkriptionsrate erhöht (K. Luo 2017).

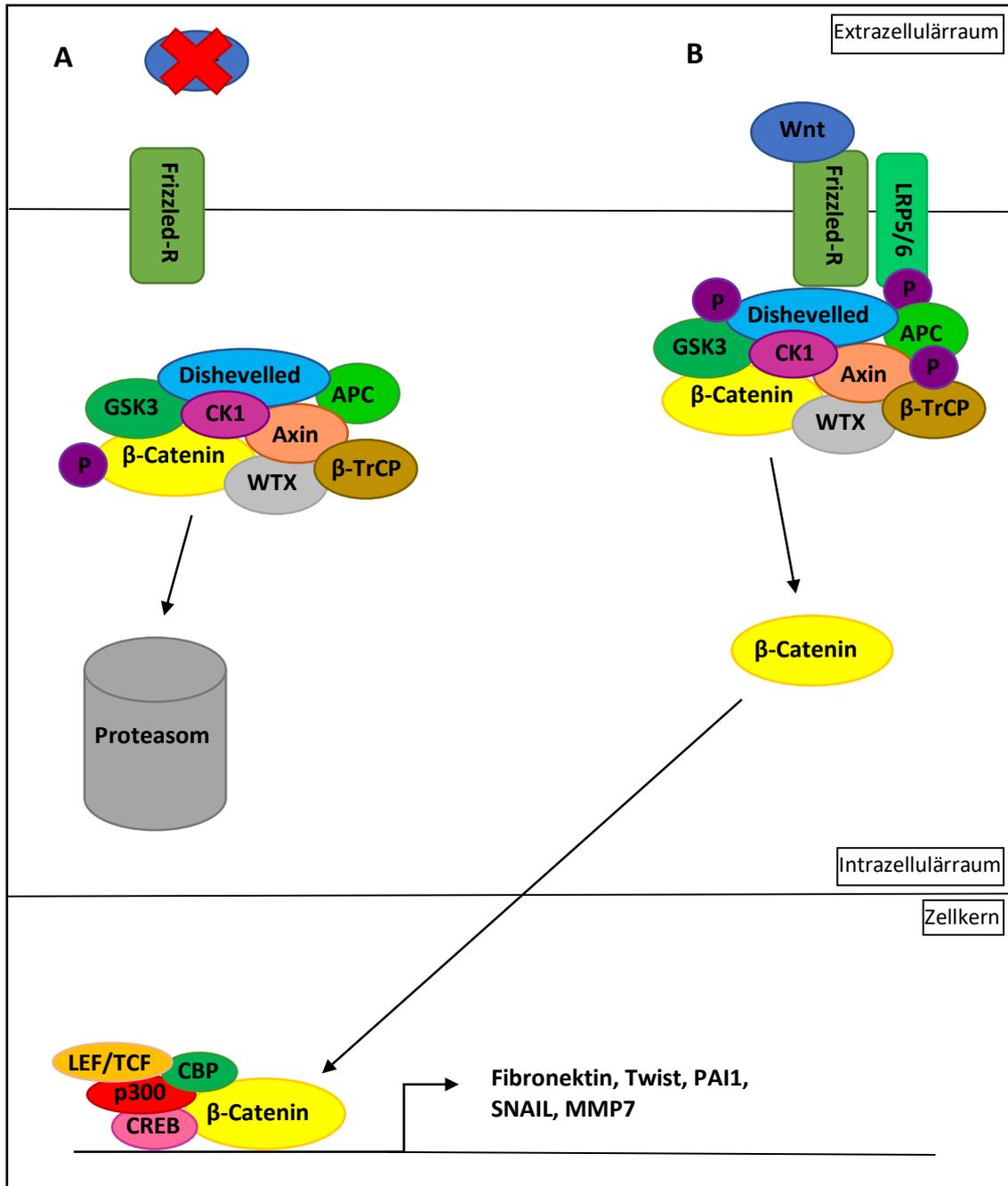


Abbildung 5 Der Wnt-Signalweg

Abgebildet ist die grafische Darstellung des Wnt (*Wingless*)-Signalweges.

A: In Abwesenheit von Liganden des Wnt-Signalweges wird das zentrale Protein dieser Signalkaskade, das  $\beta$ -Catenin, durch den  $\beta$ -Catenin-Destruktionskomplex, bestehend aus Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3), Casein-Kinase 1 (CK1), *Dishevelled*, Axin, *Adenomatosis-poliposis-coli* (APC), Wilms-Tumor-Suppressor-Gen und  $\beta$ -*Transducin-repeats*-Protein ( $\beta$ -TrCP) gebunden, phosphoryliert, ubiquitiniert und somit für den Abbau im Proteasom freigegeben.

B: Durch die Bindung von Wnt-Liganden an *Frizzled*-Rezeptoren gehen diese eine Bindung mit LRP (*Low-Density-Lipoprotein-Related-Protein*) 5 bzw.6 ein. Dies führt zu einer Phosphorylierung von LRP5/6 durch den Destruktionskomplex mit anschließender Bindung des Destruktionskomplexes an den Rezeptorkomplex. Durch die Bindung des Destruktionskomplexes an den Rezeptorkomplex wird das  $\beta$ -Catenin aus dem Destruktionskomplex freigesetzt. Es kann nun in den Zellkern wandern und dort mit Co-Faktoren wie p300, CREB (*cAMP-Response-Element-Binding-Protein*), CBP (*Creb-Binding-Protein*) und LEF/TCF (*T-Zell-Faktor/Lymphoid-Enhancer-Binding-Faktor-Protein*) an die DNA der Zielgene binden und

deren Expression induzieren. Zu diesen Zielgenen gehören u.a. Fibronectin, TWIST, SNAIL, PAI1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1) und MMP7 (Matrixmetalloprotease 7).

## 1.9 Der MAP-Kinase-Signalweg

Der Mitogen-Activated-Protein-(MAP)-Kinase-Signalweg beginnt mit der Bindung von Liganden darunter z.B. EGF (*Epidermal-Growth-Factor*) und FGF (*Fibroblast-Growth-Factor*) an Wachstumsfaktor-Rezeptoren, (Guan 1994). Dadurch kommt es zu *Dimerisierung* dieser Rezeptoren, was wiederum zur *Autophosphorylierung* durch ihre *intrinsische* Tyrosinkinase-Aktivität führt. Die phosphorylierten Rezeptordimere sind nun fähig, weitere Proteine, wie z.B. GRB2 (*Growth-Factor-Receptor-Bound-Protein 2*) und SHP2 (*Small-Heterodimer-Partner 2*), eine Tyrosin-Kinase-Phosphatase, zu binden, welche wiederum SOS (*Son-of-Sevenless*) aktivieren (Guan 1994; Najafi, Ahmadi, und Mortezaee 2019). Aktiviertes SOS führt zu einer Umwandlung von RAS- (*Rat-Sarcoma*) Guanosin-Diphosphat in RAS-Guanosin-Triphosphat, welches dafür verantwortlich ist, dass RAF (*Rat-Fibrosarcoma*) Richtung Membran *transloziert*, *dimerisiert* und aktiviert wird (Cargnello und Roux 2011; Najafi, Ahmadi, und Mortezaee 2019). RAF ist eine Seronin/Threonin-Kinase, die wiederum die MAPK (*Mitogen-Activated-Protein-Kinase*), auch MEK (MAPK/ERK-Kinase) genannt, aktiviert, indem sie diese phosphoryliert. Am Ende der Kette aus Kinasen wird ERK (*Extracellular-Signal-Regulated-Kinase* durch die aktivierte MAPK phosphoryliert und somit aktiviert (Najafi, Ahmadi, und Mortezaee 2019; Cargnello und Roux 2011). Zu den Substraten von ERK zählen sowohl Proteine im Zytoplasma, z.B. die *Death-Associated-Protein-Kinase* (DAPK) oder der *Tuberositas-Sclerosis-Complex* (TSC) 2, als auch Transkriptionsfaktoren im Zellkern wie NF-AT (*Nuclear-Factor-of-Activated-T-cells*), c-fos oder c-myc (Guan 1994; Cargnello und Roux 2011).

Der MAP-Kinase-Signalweg dient der Regulation der Expression verschiedenster Gene, welche entscheidend für die Vorgänge der Mitose, der Differenzierung, der Apoptose, des Überlebens, der Migration sowie des Metabolismus von Zellen sind (Cargnello und Roux 2011). Außerdem beeinflusst die Aktivierung dieses Signalweges weitere Signalkaskaden, darunter den TGF- $\beta$ -Signalweg (Unahabhokha u. a. 2015). Dabei kann es, je nach Zelltyp und Aktivierung weiterer Signalwege, zu einer aktivierenden oder inhibierenden Wirkung auf Komponenten des TGF- $\beta$ -Signalweges durch den MAPK-Signalweg kommen (K. Luo 2017). Zum Beispiel kann die Aktivierung der MAPK zu einer Phosphorylierung in der *Linker-Region* von SMAD4 führen, wodurch die Akkumulation der SMAD-Proteine im Zellkern verstärkt wird. Andere Phosphorylierungen in der *Linker-Region* der SMAD-Proteine durch MAPK können aber auch die *Ubiquitinierung* und somit den Abbau der

SMAD-Proteine begünstigen (Tzavlaki und Moustakas 2020). Anders herum wird aber auch die MAPK-Signalkaskade durch TGF- $\beta$ -Signalweg beeinflusst, z.B. über die, wenn auch schwache Affinität, des TGF- $\beta$ -Typ1-Rezeptors gegenüber Tyrosinen, wodurch er die Fähigkeit besitzt, Proteine wie Grb2 oder SOS zu phosphorylieren (Tzavlaki und Moustakas 2020).

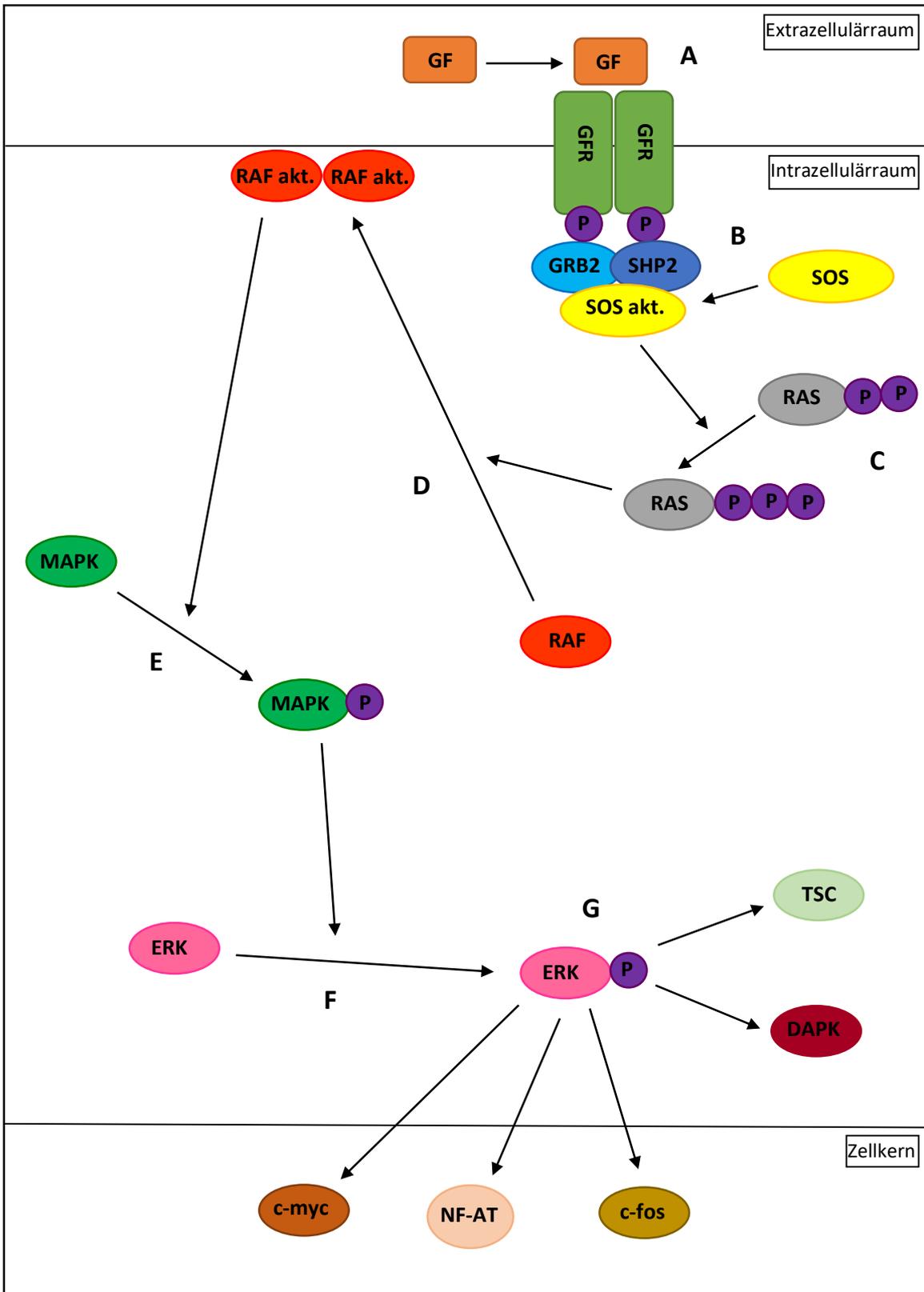


Abbildung 6 Der MAPK-Signalweg

Abgebildet ist die grafische Darstellung des MAPK-Signalweges.

A: Die Bindung von Liganden (z.B. *Epidermal-Growth-Factor*) an *Growth-Factor-Rezeptoren* (GFR) führt zu deren *Dimerisierung* und *Autophosphorylierung*.

B: Der aktivierte Rezeptorkomplex kann nun GRB2 (*Growth-Factor-Receptor-Bound-Protein 2*) und SHP2 (*Small-Heterodimer-Partner 2*) binden, die dann wiederum SOS (*Son-of-Sevenless*) aktivieren.

C: Das aktivierte SOS wandelt RAS (*Rat-Sarcoma*)-Guanosin-Diphosphat in RAS-Guanosin-Triphosphat um.

D: Das RAS-Guanosin-Triphosphat aktiviert daraufhin RAF (*Rat-Fibrosarcoma*), das zur Zellmembran transloziert und dimerisiert.

E: Das aktivierte RAF phosphoryliert dann die MAPK (*Mitogen-activated-Protein-Kinase*).

F: Die MAPK phosphoryliert wiederum ERK (*Extracellular-Signal-Regulated-Kinase*).

G: Aktiviertes ERK wirkt als Zielkinase dieses Signalweges und beeinflusst sowohl Faktoren im Zellkern, darunter *c-fos*, *c-myc* und NF-AT (*Nuclear-Factor-of-Activated-T-Cells*) als auch Proteine im Zytoplasma wie TSC (*Tuberositas-Sclerosis-Complex*) und DAPK (*Death-Associated-Protein-Kinase*).

## 1.10 Einfluss von CO<sub>2</sub> auf die Myofibroblastendifferenzierung

Im Rahmen von vorangegangenen, noch nicht publizierten Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Suschek im molekularbiologischen Forschungslabor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten, die mit CO<sub>2</sub>-haltigem Medium behandelt wurden, signifikant weniger  $\alpha$ -SMA exprimiert haben als solche, die mit CO<sub>2</sub>-freiem Kontrollmedium behandelt wurden. Da  $\alpha$ -SMA, wie oben bereits erwähnt, einen Marker für Myofibroblasten darstellt (Penke und Peters-Golden 2019), lässt sich daraus ableiten, dass in den mit CO<sub>2</sub> inkubierten Kulturen signifikant weniger Fibroblasten eine Differenzierung zu Myofibroblasten durchlaufen. Es konnte aber bis *dato* noch nicht aufgeklärt werden, welche Signalwege für diese Inhibition verantwortlich sind.

## 2 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den molekularen Inhibierungsmechanismus der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten mittels CO<sub>2</sub> weiter zu charakterisieren. Dabei sollen folgende Fragestellungen analysiert werden:

1. Der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf die  $\alpha$ -SMA-Proteinexpression als Marker der Myofibroblastendifferenzierung
2. Der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf die TGF- $\beta$ -induzierte Signalkaskade
3. Der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf die Wnt-induzierte Signalkaskade
4. Der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf die Interaktionen der TGF- $\beta$ -, Wnt- und MAPK-Signalwege

Die durch diese Arbeit erlangten Erkenntnisse sollten der Aufklärung der an der Inhibition der Myofibroblastendifferenzierung durch CO<sub>2</sub> beteiligten Signalwege und Moleküle dienen und somit als Grundlage für neue therapeutische Ansätze bei profibrotischen Erkrankungen dienen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 1 Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien**

1,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
10 ml Spritze (inject®)	Braun, Melsungen, Deutschland
10 ml Stripette™	Corning, New York, USA
15 ml Röhrchen (cellstar®)	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
175 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche (cellstar®)	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
20 ml Spritze (inject®)	Braun, Melsungen, Deutschland
25 ml Stripette™	Corning, New York, USA
5 ml Stripette™	Corning, New York, USA
50 ml Röhre	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
50 ml Spritze (Original Perfusor®)	Braun, Melsungen, Deutschland
6-well-Kulturplatte (cellstar®)	Braun, Melsungen, Deutschland
75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche (cellstar®)	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-well- Kulturplatte (cellstar®)	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
BD Eclipse™ Sicherheitsinjektionskanülen (0,8 mm x 40 mm)	BD, Heidelberg, Deutschland
Blotting-Filterpapier	Invitrogen, Carlsbad, USA
CO <sub>2</sub> -Prüfröhrchen (Gastec Prüfröhrchen Nr.2L Kohlendioxid CO <sub>2</sub> )	Gastec Cooperation, Fukayanaka, Japan
Feather-Disposable-Scalpel (Feather®)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Folie (Adhesive Film for Microplates)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Glaspasteurpitten (ISO 7712)	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim, Deutschland
Handschuhe Größe M (Micro-Touch® Blue Nitril)	Ansell GmbH, München, Deutschland
Kryoröhrchen (Cryo.s™ 2ml)	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Microcellulose-Blotting-Membran (Porengröße 0,2 µm)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Gel (4-20 %, 15-well-comb)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Perfusionsschlauch Typ IV-Standard-PVC (Original Perfusor® Line)	Braun, Melsungen, Deutschland
Petrischale (TC-Schale 100 mm x 20 mm)	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
Petrischale (145 mm x 20 mm, cellstar®)	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl/20 µl, TipOne®)	Star Lab, Hamburg, Deutschland

Pipettenspitzen (200 µl, TipOne®)	Star Lab, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (1000 µl, TipOne®)	Star Lab, Hamburg, Deutschland
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Professional™, Koblenz-Rheinhafen, Deutschland
Schülke wipen	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Steriler Filter (0,22 µm, Millex-GS)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vernichtungsbeutel (200 mm x 300 mm)	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
Whatman-Papier	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zellsieb (100 µm, Falcon®)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zellschaber (14 mm)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

### 3.1.2 Mehrfach verwendbares Material

**Tabelle 2 Auflistung des verwendeten Materials**

100 ml Becherglas (Duran® Schott)	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
100 ml Messzylinder	Brand GmbH & Co.KH, Wertheim, Deutschland
1000 ml Flasche	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
1000 ml Messzylinder	VWR, Darmstadt, Deutschland
250 ml Becherglas (Fisherbrand)	Thermo Fischer Scientific GmbH & Co.KG, Dreieich, Deutschland
250 ml Flasche	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
500 ml Becherglas	VWR, Darmstadt, Deutschland
Casting Frames	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Kartusche	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Gefrierbehälter (Mr. Frosty™ Cryo 1 Grad C Nalgene™)	Thermo Fischer Scientific GmbH & Co.KG, Dreieich, Deutschland
Gelkammer (Mini PROTEAN® Tetra Cell) mit Öffner für die Gele	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Kämme (15er)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mini Cell Buffer-Dam	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul-Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Probenständer (Alu Rack 1.5)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
SodaStreamer mit Flasche (SodaStream® Easy)	Sodastream GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland

### 3.1.3 Geräte

Tabelle 3 Auflistung der verwendeten Geräte

Abzug	Wangenstein Laboreinrichtungen GmbH & Co.KG, Wangen, Deutschland
Autoklav	Thermo Fischer Scientific GmbH & Co.KG, Dreieich, Deutschland
Blotter (Bio Rad Trans-Blot® Turbo™ Transfer System)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Brutschrank (Hera Cell, Heraeus)	Thermo Fischer Scientific GmbH & Co.KG, Dreieich, Deutschland
Eisschrank -80 Grad C (Heraeus)	Thermo Fischer Scientific GmbH & Co.KG, Dreieich, Deutschland
Eisschrank -20 Grad C (Liebherr Economy)	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Geldokumentationsanlage (Chemi Doc™ MP Imaging System)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Heizbad (Lauda Aqualine AL12)	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Heizblock (Dry Bath)	Thermo Fischer Scientific GmbH & Co.KG, Dreieich, Deutschland
Kühlschrank	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Magnetrührer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Mikroskop Zeiss Axiowert 40	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Multiplattenlesegerät Victor™ V Multilabel Counter Modell 1420	Perkin Elmer, Waltham, USA
Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Probenentnahmepumpe für Gase (Gastec GV 100)	Gastec Cooperation, Fukayanaka, Japan
Saugpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Sonifiziergerät (U P50 H Ultrasonic Processor Hielscher Ultrasound Technology)	Hielscher Ultrasonic GmbH, Teltow, Deutschland
Taschenrechner	Lyreco Deutschland GmbH, Barsinghausen, Deutschland
Taumelrollenmischer (Cat RM5 und Cat RM 10W)	M. Zippere GmbH, Ballrechten-Dottingen, Deutschland
Stoppuhr (Oregon Scientific)	Bresser GmbH, Rhede, Deutschland
Vortexer (Art. No. 444-1372)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Waage (Adventurer-Pro)	Ohaus Europe GmbH, Naenikon, Schweiz
Werkbank (Euroflow EFSE)	Clean Air by Baker, Utrecht, Niederlande
Zentrifuge (Mini Spin®)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (Heraeus Fresco 17)	Thermo Fischer Scientific GmbH & Co.KG, Dreieich, Deutschland

### 3.1.4 Substanzen und Lösungen

Tabelle 4 Auflistung der verwendeten Substanzen und Lösungen

2-Mecaptoethanol (Sigma Aldrich®)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS) (Sigma Aldrich®)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Clarity™ Western ECL Substrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Flasche	Linde Aktiengesellschaft, Pullach, Deutschland
Dispase II	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich®)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco`s Phosphate-Buffered Saline (DPBS) (10x, w/o Ca <sup>2+</sup> und Ma <sup>2+</sup> )	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Dulbecco`s Phosphate-Buffered Saline (DPBS) (ohne Ca <sup>2+</sup> und Ma <sup>2+</sup> ) (Sigma Aldrich®)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Entwicklerlösung (Immobilon® Forte Western HRP Substrat) (Millipore Corporation)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (Spritzflasche 500 ml, Nalgene™)	Thermo Fischer Scientific GmbH & Co.KG, Dreieich, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS) (Sera Plus)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Hepes ((2-Hydroxyethyl)piperazin-2-ethanesulfonsäure) (Sigma Aldrich®)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Human Transforming-Growth-Factor-beta 1 (TGFβ-1)	PeproTech Deutschland, Hamburg, Deutschland
Kollagenase Typ IV	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver (Blotting grade, fettarm)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Roti®-Western-Marker	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS, Trometamol)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA 10x	Biowest, Nuaille, Frankreich
Tween® 20 (Sigma Aldrich®)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Wasser (Ampuwa® Spüllösung)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Wasser (entionisiert)	Otto-Fischer GmbH & Co.KG, Saarbrücken, Deutschland

### 3.1.5 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 5 Auflistung der verwendeten Medien, Puffer und Lösungen

Dispaselösung	9,5 ml PBS 0,5 ml Hepes 0,02 g Dispase II steril filtriert
Laemmli-Puffer Gelöst in Aqua dest.	250 mM Tris 40 % Glycerol 8 % SDS 0,1 % Bromphenolblau
Laufpuffer 10x	30,3 g Tris (kein PH einstellen) 144,2 g Glycin 10 g SDS ad 1000 ml Aqua dest.
Kollagenaselösung	20 ml DPBS (w/o Ca <sup>2+</sup> und Ma <sup>2+</sup> ) 0,04 g Kollagenase I 0,3 g BSA steril filtriert
RIPA-Puffer nach Abcam	50 mM Tris (pH =8) 150 mM NaCl 1 % NP-40 0,5 % Natriumdeoxycholat 0,1 % SDS
Tris-Buffered-Saline (TBS) 10x	12,1 g Tris (pH = 7,5) 87,7 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest.
Transferpuffer 25x	36,4 g Tris (kein PH einstellen) 180 g Glycin ad 1000 ml Aqua dest.
Zellkulturmedium (Dulbecco`s modified eagle medium (DMEM) 1x Gibco)	Thermo Fischer Scientific GmbH & Co.KG, Dreieich, Deutschland

### 3.1.6 Antikörper & KIT-Systeme

Tabelle 6 Auflistung der verwendeten Antikörper und KIT-Systeme

Anti-GAPDH-Rhodamin-Antikörper	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Anti-Western Precision Plus Protein™ All Blue Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Kaninchen-Antikörper gegen humanes β-Catenin (#16051)	Abcam®, Cambridge, United Kingdom
Kaninchen-Antikörper gegen humanes Erk1/2 (p44/42 MAPK) (#9102)	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main, Deutschland
Kaninchen-Antikörper gegen humanes Phospho-ERK1/2 (p-p44/42 MAPK) (#9101)	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main, Deutschland
Kaninchen-Antikörper gegen humanes Phospho-SMAD2 (Ser 465, Ser 467) (#44-244G)	Thermo Fischer Scientific GmbH & Co.KG, Dreieich, Deutschland
Kaninchen-Antikörper gegen humanes Phospho-SMAD3 (Ser 423, Ser 425) (#44-246G)	Thermo Fischer Scientific GmbH & Co.KG, Dreieich, Deutschland

Kaninchen-Antikörper gegen humanes SMAD2 (D43B4) (#5339)	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main, Deutschland
Kaninchen-Antikörper gegen humanes SMAD3 (#9513)	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main, Deutschland
Kaninchen-Antikörper gegen humanes SMAD4 (#GTX112980)	Genetex Inc., Irvine, USA
Kaninchen-Antikörper gegen humanes SMURF2 (D8B8) (#12024)	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main, Deutschland
Maus-Antikörper gegen humanes alpha-Smooth-Muscle-Actin (#7818)	Abcam®, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Maus-Antikörper gegen humanes Fibronectin (#6328)	Abcam®, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Maus-Antikörper gegen humanes SMAD7 (#MAB2029)	R&D Systems Inc., Minneapolis, Kanada
Pierce™ BCA Protein Assay Kit (#23225)	Thermo Fischer Scientific GmbH & Co.KG, Dreieich, Deutschland
TGX Stain-Free™ Fast Cast™ Acrylamide Kit 12%	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

### 3.1.7 Software

**Tabelle 7 Auflistung der verwendeten Software**

GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien
Image Lab 6.0	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Word Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Workout 2.0	Dazdaq Ltd., Brighton, Vereinigtes Königreich
Zotero	Corporation for Digital Scholarship, Wien, Österreich

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Verwendete Zellen

Die Fibroblasten, welche für diese Arbeit verwendet wurden, stammen aus der Bauchhaut humaner Spender. Die Spender bzw. ihre gesetzlichen Vormunde haben nach einer Aufklärung gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität (Fallnummer 3634) in die Verwendung des Gewebes zu Forschungszwecken eingewilligt.

Die Zellen stammen alle von Spenderinnen mit einem Durchschnittsalter von 39,25 Jahren (Median = 35,5 Jahre).

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Fibroblasten in *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 10 % Hepes und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

### 3.2.2 Isolierung von Fibroblasten

Das aus der Bauchhaut stammende Gewebe wurde für den Transport in sterile Tüten verpackt und gekühlt.

Im Labor angekommen wurde zunächst die Haut vom darunter liegenden Fettgewebe getrennt. Danach wurde die Haut in 0,5 cm x 0,5 cm große Stücke geteilt und über Nacht in einem 50 ml *Falcon* mit 10 ml Dispaselösung (Zusammensetzung: siehe Abschnitt 3.1.5) bei 4 °C auf dem Taumelroller inkubiert, um die *Epidermis* von der *Dermis* zu trennen.

Am nächsten Tag wurde das Falcon zuerst im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde nach 10 min durch Zugabe von eiskaltem PBS gestoppt. Dann erfolgte die manuelle Trennung von *Dermis* und *Epidermis* mittels Pinzetten, wobei die *Dermis* in ein neues 50 ml *Falcon* überführt wurde. Dazu wurden 20 ml Kollagenaselösung (Zusammensetzung: siehe Abschnitt 3.1.5) gegeben und das Falcon danach 60 min bei 37 °C auf dem Taumelroller inkubiert. Kollagenase Typ 1 spaltet die interzelluläre Matrix und trennt somit die einzelnen Zellen aus dem Zellverbund. Nach Ablauf der Stunde wurde das Gemisch durch ein Teflonsieb mit einer Porengröße von 100 µm in eine Petrischale gestrichen und mit PBS nachgespült. Der Inhalt der Petrischale wurde in ein neues *Falcon* überführt und dieses 5 min bei 350 x g zentrifugiert, um die Zellen vom restlichen Inhalt zu trennen. Die Zellen wurden daraufhin in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt und 15 ml Zellkulturmedium (Zusammensetzung siehe Abschnitt 3.1.5) sowie 15 µl Amphotericin

zugegeben. Nach einer Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, in der die Zellen adhären werden konnten, wurde das Medium durch neues ausgewechselt.

### **3.2.3 Subkultivierung von Fibroblasten**

Um die adhären Fibroblasten subkultivieren zu können, mussten diese zunächst vom Untergrund des Kulturbehältnisses abgelöst werden. Dazu wurde zuerst das alte Medium abgesaugt und danach das Kulturgefäß mit PBS gewaschen, um Reste des Mediums vollständig zu entfernen. Nachdem auch das PBS wieder entfernt worden war, wurden 9 ml einfach konzentriertes Trypsin zugegeben und das Kulturgefäß für 5 min bis maximal 10 min im Brutschrank inkubiert. Trypsin ist ein Enzym, das bei 37 °C sein Wirkoptimum besitzt und die Zellen vom Kulturgefäßuntergrund löst, bei zu langer Anwendung aber die Zellmembran schädigt und somit die Zellen absterben lässt. Deshalb musste spätestens nach ca. 10 Minuten der Prozess durch Zugabe von mindestens 9 ml FCS-haltigem Medium beendet werden. Vorher wurde jedoch mikroskopisch geprüft, ob sich auch genug Zellen abgelöst hatten. Die freien Zellen erschienen im Mikroskop rund und bewegten sich bei leichtem Verschieben des Kulturgefäßes unabhängig von dessen Boden, während noch adhären Zellen weiterhin lang gestreckt erschienen und sich nicht gegenüber dem Untergrund verschieben ließen. Hatten sich durch das Trypsin nicht genug Zellen abgelöst, mussten nach Zugabe des FCS-haltigen Mediums noch mit einem Zellspatel mechanisch weitere Zellen vom Boden des Kulturgefäßes getrennt werden. Danach wurde der gesamte Inhalt des Kulturgefäßes in ein 50 ml *Falcon* überführt und dieses für 5 min bei 350 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet je nach Zielgefäßzahl mit einer definierten Menge Medium resuspendiert und in die neuen Zellkulturgefäße überführt.

### **3.2.4 Kryokonservierung von Fibroblasten**

Für die *Kryokonservierung* wurde zunächst das Medium aus dem Zellkulturgefäß abgesaugt und dieses mit PBS gespült. Nachdem auch das PBS entfernt wurde, wurden auch hier, wie bei einer Subkultivierung, 9 ml Trypsin hinzugegeben, das Ganze wieder für 5 min bis 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und danach unter dem Mikroskop begutachtet, bevor die Reaktion mit FCS-haltigem Medium abgestoppt wurde. Der Inhalt des Zellkulturgefäßes wurde in ein 50 ml *Falcon* überführt und dieses für 5 min bei 350 x g zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde eisgekühltes Einfriermedium hinzugegeben. Dieses bestand aus FCS mit 10 % DMSO, wobei die Gesamtmenge des

eingesetzten Einfriermediums von der Größe des Zellpellets und somit von der Anzahl der füllbaren *Kryoröhrchen* abhing. DMSO wird verwendet, um die Kristallbildung während des Gefrierprozesses zu unterdrücken, welche die Zellen schädigen würde. Es ist allerdings bei Raumtemperatur giftig für Zellen, weshalb es nur eisgekühlt zu den Zellen gegeben werden darf und die Weiterverarbeitung der mit DMSO versetzten Zellen zügig erfolgen sollte. Nach dem Befüllen der *Kryoröhrchen* wurden diese bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Eisschrank eingefroren und erst am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff transferiert, um den Gefrierprozess schonender zu gestalten.

### **3.2.5 Auftauen von Fibroblasten**

Beim Auftauen der Fibroblasten musste aufgrund des im Einfriermediums enthaltenen DMSO genauso zügig gearbeitet werden wie bei der *Kryokonservierung*. Nach Entnahme des *Kryoröhrchens* aus dem Stickstoff wurde dieses langsam in der Hand erwärmt, bis das Einfriermedium sich fast komplett verflüssigt hatte. Dann wurde der Inhalt in ein vorher bereits bereitgestelltes und mit Medium befülltes Kulturgefäß pipettiert und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $5\text{ }\%$   $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag, nachdem die Zellen über Nacht Zeit gehabt hatten, adhärent zu werden, wurde das Medium gewechselt, um das Einfriermedium zu entfernen.

### **3.2.6 Bestimmung der Zellzahl mittels Hämozytometer**

Zur Bestimmung der Zellzahl mussten die Zellen zunächst, wie bei der *Subkultivierung* (siehe Abschnitt 3.2.3), vom Kulturgefäßboden getrennt werden. Nachdem die Zellen in einem *Falcon* zentrifugiert und der Überstand abgenommen worden war, wurden die Zellen mit Medium *resuspendiert*. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren, um die Zellen möglichst gleichmäßig zu verteilen, wurden aus dem *Falcon*  $10\text{ }\mu\text{l}$  in ein *Well* einer 96-*Well*-Platte überführt und mit  $10\text{ }\mu\text{l}$  Trypanblau gemischt. Trypanblau wird zur Bestimmung der *Zellviabilität* verwendet. Da es nur von *nekrotischen* Zellen aufgenommen wird, gelingt somit eine Unterscheidung der abgestorbenen von den lebenden Zellen, sodass es später möglich ist, nur letztere zu zählen.

Danach musste das *Hämozytometer* vorbereitet werden, indem das Deckplättchen nach Anhauchen korrekt auf die Kammer des *Hämozytometers* aufgesetzt wurde. Den richtigen Sitz erkennt man am Erscheinen der Newton'schen Ringe.

Dann wurde die vorbereitete Zellsuspension aus dem *Well* der 96-*Well*-Platte unter das Deckgläschen pipettiert, wobei Kapillarkräfte dafür sorgten, dass die Kammer vollständig

gefüllt wurde. Als nächstes wurde die Kammer unter dem Mikroskop ausgewertet, indem alle nicht blau angefärbten Zahlen in den vier großen Quadraten gezählt und diese Summe durch vier dividiert wurde. Da die Kammer ein definiertes Volumen besitzt, konnte man nun die Konzentration im *Falcon* errechnen, indem man das Divisionsergebnis mit dem Verdünnungsfaktor (in diesem Fall war der Verdünnungsfaktor 2) und dann noch mit dem Faktor  $10^4$  multiplizierte. Das errechnete Ergebnis, das die Einheit Anzahl pro ml besaß, konnte man nun zum korrekten Verdünnen der Zellsuspension benutzen, um eine definierte Zielkonzentration wieder aussäen zu können. Dies war zum Beispiel für das Befüllen der 6-Well-Platten, die für meine Versuche verwendet wurden, nötig.

### 3.2.7 Behandlung von Fibroblasten mit CO<sub>2</sub>

Für meine CO<sub>2</sub>-Versuche wurden zunächst Fibroblasten mit einer Anzahl von  $10^5$  Zellen pro *Well* in 1,5 ml Nährmedium pro *Well* auf 6-Well-Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Am zweiten Tag folgte dann die erste Behandlung mit dem Gas. Dazu wurde das Medium von den Platten abgesaugt und durch 4 ml Versuchsmedium ersetzt. Dieses bestand aus *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM), versetzt mit 10 % HEPES und 2 % Penicillin/Streptomycin, das für alle CO<sub>2</sub>-positiven Platten mittels *SodaStreamer* mit CO<sub>2</sub> angereichert wurde. Die CO<sub>2</sub>-Anreicherung wurde mit Gastec-Prüfröhrchen nachgewiesen. Das Versuchsmedium blieb auf den CO<sub>2</sub>-positiven Platten für 15 min bzw. 60 min, auf den CO<sub>2</sub>-negativen Platten ebenfalls 15 min. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Medium von diesen Platten wieder abgesaugt und durch 1,5 ml Nährmedium ersetzt, welches 0 ng/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml bzw. 5 ng/ml TGF-β enthielt (siehe Tabelle 8).

Mit diesem Medium wurden die Platten über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Am dritten und vierten Tag wurde der Vorgang von Tag zwei wiederholt und am fünften Tag wurden die Zellen geerntet (siehe Abschnitt 3.2.8).

#### Tabelle 8 Übersicht der verschiedenen Versuchsansätze

Dargestellt wird, welche Platten mit CO<sub>2</sub> behandelt wurden, wie lange das Versuchsmedium auf den Platten belassen wurde und welche TGF-β-Konzentration das Medium enthielt, welches nach Absaugen der Versuchslösung in die *Wells* pipettiert wurde.

Plattennummer	CO <sub>2</sub>	Verweildauer des Versuchsmediums	TGF β-Konzentration
1	positiv	15 min	0 ng/ml

2	positiv	15 min	1 ng/ml
3	positiv	15 min	3 ng/ml
4	positiv	15 min	5 ng/ml
5	positiv	60 min	0 ng/ml
6	positiv	60 min	1 ng/ml
7	positiv	60 min	3 ng/ml
8	positiv	60 min	5 ng/ml
9	negativ	15 min	0 ng/ml
10	negativ	15 min	1 ng/ml
11	negativ	15 min	3 ng/ml
12	negativ	15 min	5 ng/ml

### 3.2.8 Gewinnung der behandelten Zellen

Zur Gewinnung der Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und die *Wells* mit PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurde 1 ml Trypsin pro *Well* zugegeben und die Platten für 9 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde das Ablösen der Zellen vom Kulturgefäßboden mikroskopisch geprüft und die Reaktion mit der gleichen Menge FCS-haltigen Mediums abgestoppt. Noch adhärenzte Zellen wurden mit einem Zellspatel mechanisch abgelöst. Der Inhalt der *Wells* wurde in *Falcons* überführt und bei 350 x g für 5 min zentrifugiert. Ab dem Zeitpunkt der Übertragung der Zellen aus den *Wells*, wurden die Proben auf Eis gekühlt, um eine *Denaturierung* der Proteine zu verhindern. Nach dem Zentrifugieren wurde der flüssige Inhalt der *Falcons* abgesaugt und die Zellen nach *Resuspendieren* in 1000 µl PBS in Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden erneut für drei Minuten zentrifugiert und danach der Überstand abgenommen. Zuletzt wurden die Zellen, je nach Größe des *Pellet*, mit einer definierten Menge Ripa-Puffer bedeckt und bei -80 °C eingefroren.

### 3.2.9 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels eines *Bicinchoninsäure-Assay* (BCA-Assay), welcher wie folgt ablief:

In einem ersten Schritt fand die sogenannte Biuret-Reaktion statt, bei der im Kit enthaltene  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in einem alkalischen Milieu Chelat-Komplexe mit drei oder mehr Aminosäureresten bildeten. Dabei wurde das  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, welches im zweiten Schritt mit der Bicinchoninsäure reagierte. Bei diesem Vorgang bildeten jeweils zwei Moleküle der Bicinchoninsäure mit einem  $\text{Cu}^+$ -Ion einen Chelat-Komplex. Diese Komplexe

stellten sich violett dar und besaßen ein Absorptionsmaximum für Licht der Wellenlänge 562 nm, wobei ihre Absorptionsfähigkeit ca. hundertmal stärker war als die der zunächst durch die Biuridreaktion entstandenen Zwischenprodukte. Durch Absorptionsmessungen konnte nun die Menge an gebildeten Komplexen und somit die Menge an Proteinen durch Vergleich der Absorption einer Probe mit den Werten der Standardkurve, welche aus den gemessenen Werten bekannter Proteinkonzentrationen erstellt wurde, bestimmt werden („protein-assay-technical-handbook.pdf“, o. J.; „BCA Assay - DE“ o. J.).

Bei der praktischen Durchführung wurden die Zellen zunächst langsam aufgetaut und danach durchgängig auf Eis verarbeitet, um einer *Denaturierung* der Proteine vorzubeugen.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen, um die *intrazellulären* Proteine freizusetzen.

Dann wurden je 4 µl Probe mit 20 µl PBS in ein neues Reaktionsgefäß überführt und daraus jeweils ein doppelter Ansatz mit 10 µl pro *Well* in eine 96-*Well*-Platte gegeben. Ebenfalls im doppelten Ansatz wurden auf diese 96-*Well*-Platte jeweils 10 µl der Lösungen mit den Standardproteinkonzentration pipettiert. Das Pipettierschema zur Herstellung dieser Standardproteinkonzentration wird in Tabelle 9 dargestellt.

Danach wurde die 96-*Well*-Platte mit einer Folie verschlossen und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Folie entfernt, die Platte mittels dem Multiplattenlesegerät Victor™ analysiert und aus den gemessenen Konzentrationen mit Hilfe der Standardkurve die Proteinkonzentrationen errechnet.

**Tabelle 9 Pipettierschema für BSA-Standardproben**

**Dargestellt wird wie viel BSA-Lösung mit welchem Volumen PBS für jede Standardprobe gemischt wird und welche Konzentration sich daraus ergibt.**

Standardprobe	Konzentration (µg/µl)	BSA-Standard (µl)	PBS (µl)
A	2	300	0
B	1,5	375	125
C	1,0	325	325
D	0,75	175 von B	175
E	0,5	325 von C	325
F	0,25	325 von E	325
G	0,125	325 von F	325
H	0,025	100 von G	400

I (Blank)	0	0	400
-----------	---	---	-----

### 3.2.10 Gelelektrophorese

Das Ziel der Gelelektrophorese bestand darin, Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen, womit sie die Vorarbeit für das später erfolgende *Western Blotting* und die darauffolgende Detektion der Proteine mittels Antikörper darstellte.

Dafür mussten die Proben, welche wieder auf Eis gekühlt verarbeitet wurden, zunächst gemäß ihren vorher bestimmten Proteinkonzentrationen mit Wasser so weit verdünnt werden, dass von jeder Probe 12 µl mit einer Konzentration von 20 µg/µl vorlagen. Dazu wurden dann je 5 µl Laemmli-Puffer pipettiert, welcher β-Mercaptoethanol enthielt. Dieser Alkohol reduzierte in den Proteinen vorhandene Disulfidbrücken und führte somit zu einer linearen Ausrichtung der Aminosäureketten („2-Mercaptoethanol M3148“ o. J.). Nach zweiminütigem Zentrifugieren wurden die Proben für 5 min bei 95 °C erhitzt, was zusammen mit dem Laemmli-Puffer bewirkte, dass das im Laufpuffer enthaltene SDS (Natriumdodecylsulfat) an die Proteine binden konnte. Das SDS wiederum diente dazu, die Proteine gleichmäßig negativ zu laden („Sodium dodecyl sulfate L3771“ o. J.), damit sich später nach Anlegen der Spannung alle Proteine Richtung Anode bewegten. Außerdem führten die sich abstoßenden negativen Ladungen dazu, dass die Anordnung der einzelnen Proteine als lineare Aminosäureketten unterstützt wurde. Die Menge an gebundenem SDS war dabei proportional zum molekularen Gewicht der Proteine, denn im Regelfall band 1 g Protein ca. 1,4 g SDS.

Die Auftrennung nach Größe erfolgte dann durch das Polycrylamid in den Gelen, welches ein Hindernis für die langgestreckten Proteine darstellte. Umso länger das Protein, desto stärker die Behinderung des Vorankommens, sodass kleine Proteine schneller Richtung Anode vordrangen.

Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene Arten von Polycrylamidgelen verwendet:

Zum einen wurden Gele mit einem 12-prozentigen Polycrylamidanteil im Trenngel genutzt, welche vor Verwendung selbst gegossen werden mussten. Diese Gele bestanden aus zwei Komponenten. Zunächst wurde das bereits genannte Trenngel, welches später der Auftrennung des Proteingemisches diente, nach Anleitung des Kits in die vorher zusammen gesetzte Vorrichtung zur Herstellung der Gele gegossen und mit Ethanol überschichtet, um eine glatte, blasenfreie Oberkante zu generieren. Nachdem es nach ca. 20 min ausgehärtet war, wurde dann das Ethanol verworfen, das Sammelgel hergestellt und über dem Trenngel eingefüllt. Das Sammelgel diente später dazu, die in die Taschen

pipettierten Proben einheitlich an der Grenze zum Trenngel zu sammeln. Nach weiteren 20 min zur Aushärtung des Sammelgels konnten die Gele verwendet oder für ca. drei Tage feucht eingewickelt im Kühlschrank bei 4 ° C gelagert werden.

Die andere Sorte Gele, die eingesetzt wurde, waren vorgefertigte Gradientengele mit einer Polycrylamidkonzentration von 4-20 %. Diese Gele besaßen zum einen den Vorteil, dass die unterschiedlichen Banden sich schärfer abgrenzten, da der in Laufrichtung zunehmende Polycrylamidanteil eine präzisere Auftrennung der Proteine ermöglichte. Der andere Vorteil bestand darin, dass auch Proteine mit höherem Molekulargewicht ausreichend aufgetrennt wurden, um ihre Banden auswerten zu können.

Nach dem Zusammenbau der Kammer und dem Einfüllen des Laufpuffers wurden die Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurde eine Tasche mit einem Proteinstandard befüllt, der später das Identifizieren einzelner Banden anhand ihres Molekulargewichtes ermöglichte. Nach dem Schließen des Deckels wurde bei den selbst gegossenen Gelen zunächst eine Spannung von 80 V angelegt, um die Proben an der Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel zu konzentrieren. Nach Übertritt der Proben in das Trenngel, konnte die Spannung auf 130 V bis 150 V erhöht werden. Da die Gradientengele keinen Sammelgelanteil besitzen, konnte hier direkt mit einem höheren Spannungswert begonnen werden. Wenn der Laemmli-Puffer, welcher auch ein gutes Visualisierungsmittel darstellte, das Gel am unteren Rand verlassen hatte, wurde der Lauf beendet und die Gele aus der Vorrichtung herausgelöst.

### **3.2.11 Western Blotting**

Das Prinzip des *Western Blottings* bestand darin, mittels einer angelegten Spannung die vorher in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Mikrozellulosemembran zu übertragen, um später mittels Antikörperfärbungen spezifische Proteine zu detektieren.

Dazu wurden zunächst die Gele vorsichtig von den sie einfassenden Plastik- bzw. Glasplatten getrennt und mittels Geldokumentationsanlage fotografiert. Die Gele wurden dabei stets in Transferpuffer feucht gehalten. Dann wurde die *Blotting*-Kammer in folgender Reihenfolge befüllt: Auf den Boden der Kammer, der die Anode darstellte, wurde zunächst *Whatman*-Papier gelegt. Darüber wurde dann die *Blotting*-Membran, das Gel, erneut *Whatman*-Papier und oben als Abschluss die Kathode angeordnet. Vorher waren auch das *Whatman*-Papier und die *Blotting*-Membran mit Transferpuffer befeuchtet worden. An das Gerät wurde für 20 min eine Spannung von 25 V angelegt, um

die Proteine durch ihre Ladung Richtung Anode zu transportieren und so auf die Membran zu transferieren. Nach Beendigung des *Blottings* wurden die Membran und das Gel erneut in der Dokumentationsanlage abgelichtet, um die korrekte Übertragung der Proteine zu überprüfen. Danach wurde die Membran geblockt, indem sie in einem *Falcon* mit einer fünfprozentigen BSA (*bovines* Serumalbumin)-Lösung für eine Stunde auf dem Taumelroller inkubiert wurde. Anschließend konnte der erste Antikörper zugegeben oder die Membran über Nacht in TBS bei 4 °C im Kühlschrank lichtgeschützt gelagert werden.

### **3.2.12 Antikörperinkubation und -detektion**

Um die Proben hinsichtlich der Konzentrationen der zu untersuchenden Proteine auswerten zu können, mussten diese mit Antikörpern markiert und diese Markierungen detektiert werden. Jedes Protein wurde einzeln markiert und detektiert, erst danach wurde die betreffende Membran mit dem Erstantikörper für das nächste Protein behandelt.

Dazu wurden zunächst die geblockten Membranen mit dem jeweiligen Erstantikörper (siehe Tab. 10) für das zu untersuchende Protein über Nacht bei 4 °C in einem *Falcon* auf dem Taumelroller inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie drei Mal für jeweils fünf Minuten mit TBST gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurden die Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem passenden Zweitantikörper, welcher an den vorher verwendeten Erstantikörper bindet, inkubiert. Dieser Zweitantikörper (siehe Tab. 10) wurde mit einer Verdünnung von 1:1000 in TBST zugeben.

Wenn die Membranen das erste Mal mit einem Zweitantikörper behandelt wurden, wurde zusätzlich noch der Antikörper gegen den Proteinstandard zugegeben. Nach Ablauf der 60 min Inkubationszeit wurden dann wieder drei Mal jeweils fünf Minuten lang mittels TBST-Lösung ungebundene Antikörper entfernt, bevor die Membranen mit HRP-Substrat behandelt und die Immunfloreszenz mittels Dokumentationsanlage aufgenommen wurde. Die Immunfluoreszenz stammt dabei aus der Reaktion der an den Zweitantikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase (HRP) mit dem zugegebenen Substrat.

Nach der Detektion konnte die Membran erneut mit einem Erstantikörper für ein weiteres Protein behandelt oder in TBS über wenige Tage lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt werden.

Die aufgenommenen Bilder wurden mit dem Programm Image Lab 6.0 ausgewertet.

**Tabelle 10 Übersicht über die Antikörperbehandlung der Membranen**

Aufgelistet werden die detektierten Proteine, welche Erst- und Zweitantikörper jeweils verwendet wurden, sowie die Verdünnung des Erstantikörpers.

Protein	Ursprungsspezies des Erstantikörpers	Verdünnung des Erstantikörpers	Zweitantikörper
$\alpha$ -SMA	Maus	1:2000 in 5 % BSA	Ziegen- <i>anti</i> -Maus-Antikörper
$\beta$ -Catenin	Kaninchen	1:5000 in 5 % BSA	Ziegen- <i>anti</i> -Kaninchen - Antikörper
ED-A Fibronektin	Maus	1:2000 in 5 % BSA	Ziegen- <i>anti</i> -Maus-Antikörper
ERK1/2	Kaninchen	1:1000 in 5 % BSA	Ziegen- <i>anti</i> -Kaninchen - Antikörper
Phospho-ERK1/2	Kaninchen	1:1000 in 5 % BSA	Ziegen- <i>anti</i> -Kaninchen - Antikörper
Phospho-SMAD2	Kaninchen	1:1000 in 5 % BSA	Ziegen- <i>anti</i> -Kaninchen - Antikörper
SMAD2	Kaninchen	1:1000 in 5 % BSA	Ziegen- <i>anti</i> -Kaninchen - Antikörper
SMAD3	Kaninchen	1:1000 in 5 % BSA	Ziegen- <i>anti</i> -Kaninchen - Antikörper
SMAD4	Kaninchen	1:1000 in 5 % Milch-Pulverlösung	Ziegen- <i>anti</i> -Kaninchen - Antikörper
SMAD7	Maus	1:100 in 5 % BSA	Ziegen- <i>anti</i> -Maus-Antikörper
SMURF2	Kaninchen	1:1000 in 5 % Milch-pulverlösung	Ziegen- <i>anti</i> -Kaninchen -

			Antikörper
--	--	--	------------

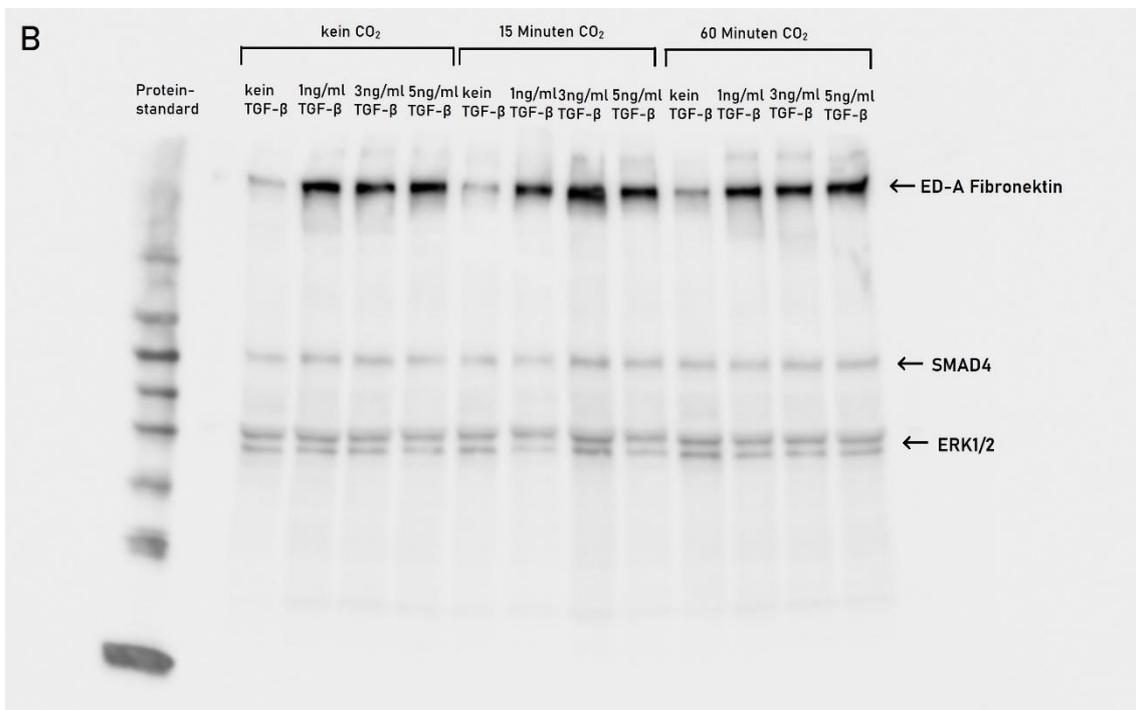
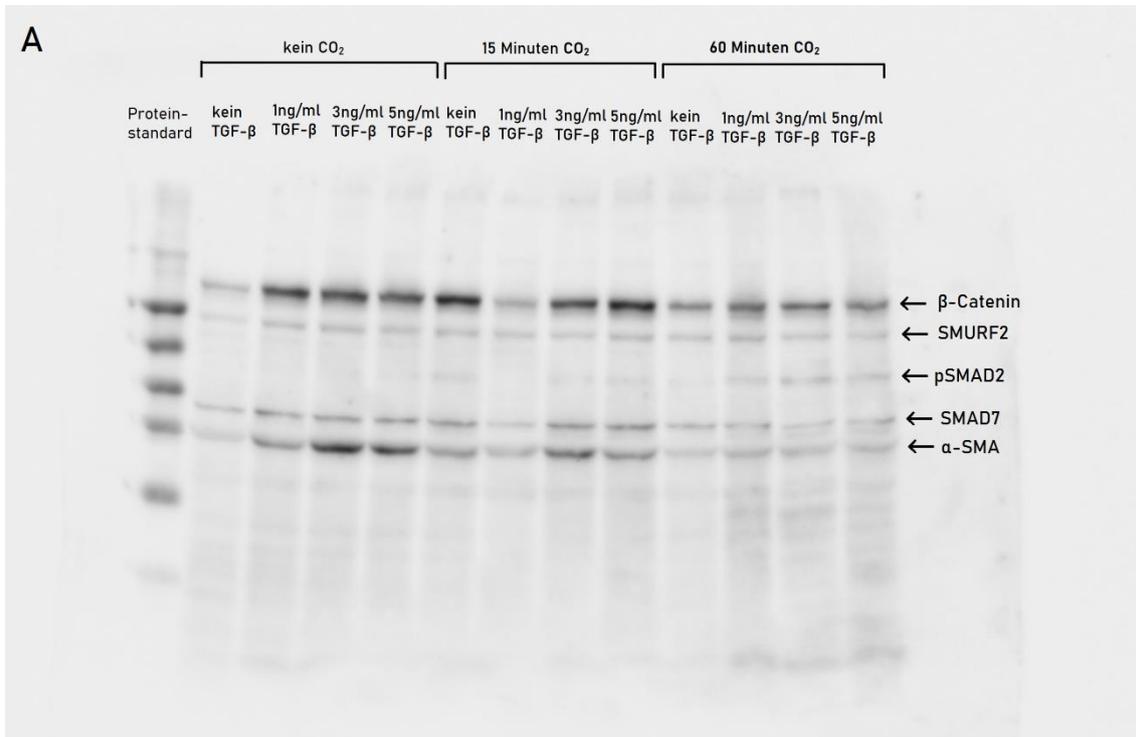
### 3.2.13 Statistische Auswertung

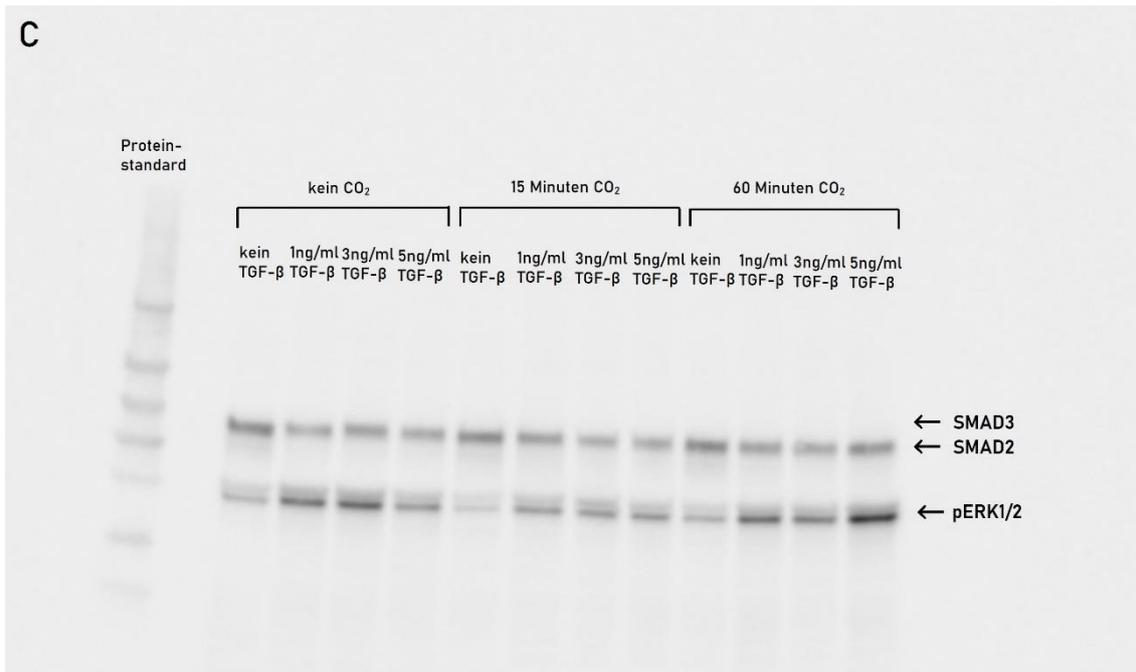
Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5.0. Als statistische Tests wurden *Two-way-Anovas* verwendet, wobei je nach Fragestellung, entweder die Rohdaten oder auf die Kontrolle normierte Daten verwendet wurden. Teilweise mussten die Daten vorher logarithmiert werden, um eine Normalverteilung, die eine Voraussetzung für einen *Anova* darstellt, zu ermöglichen.

Das statistische Vorgehen wurde am 10.05.2019 mit Herrn Dr. Robert Langner vom Institut für systemische Neurowissenschaften und Medizin im Rahmen einer statistischen Beratung besprochen.

In den Diagrammen wird jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

## 4 Ergebnisse





**Abbildung 7 Darstellung der Western Blot-Membranen**

Um alle gewünschten Proteine detektieren zu können, war für jeden Spender die Anfertigung von drei Gelen und dementsprechend drei *Blots* (hier A,B und C) nötig, um Überlagerungen der Banden von Proteinen mit ähnlichem Molekulargewicht zu vermeiden. Neben den unterschiedlichen Versuchsansätzen wurde jeweils eine Tasche pro Blot mit einem Proteinstandard befüllt, um die entstehenden Banden sicher identifizieren zu können. Zu beachten gilt in den Abb. B und C, dass ERK1/2 und pERK1/2 jeweils aus zwei Untereinheiten mit unterschiedlichem Molekulargewicht bestehen, die beide durch den Antikörper markiert wurden, weshalb sie sich als Doppelbanden darstellen. Zudem sollte in Bezug auf Abb. C erwähnt werden, dass die Banden von SMAD3 in meinen Versuchen grundsätzlich sehr schwach waren, weshalb sie nur bei langer Belichtungszeit sichtbar wurden. Da die anderen beiden Proteine dann aber überbelichtet zur Darstellung kommen, wurde hier zur besseren Übersicht ein Bild mit kürzerer Belichtungszeit gewählt.

#### 4.1 Der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf die Expression von $\alpha$ -SMA

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wird  $\alpha$ -SMA als Marker für die Myofibroblastendifferenzierung verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von  $\alpha$ -SMA durch die Behandlung mit CO<sub>2</sub> in zuvor mit TGF- $\beta$  inkubierten Fibroblasten supprimiert wird. Auch bei den von mir durchgeführten Versuchen zeigte sich diese Entwicklung, wie in Abb. 8 dargestellt. Die Behandlung mit TGF- $\beta$  in verschiedenen Konzentrationen führte zu einem signifikanten Anstieg der  $\alpha$ -SMA-Konzentration in den nicht CO<sub>2</sub>-behandelten Zellen. Wurden mit TGF- $\beta$  aktivierte Fibroblasten aber zusätzlich mit CO<sub>2</sub>-haltiger Lösung inkubiert, verringerte sich der Anstieg der  $\alpha$ -SMA-Konzentration durch den Wachstumsfaktor deutlich, was einer verminderten Differenzierung zu Myofibroblasten entspricht.

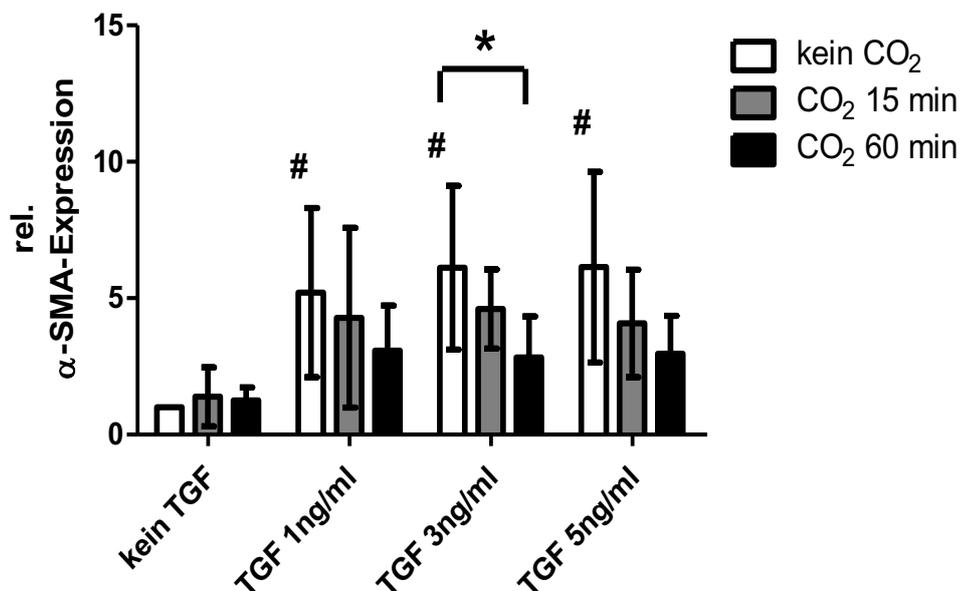


Abbildung 8 Relative Expression von  $\alpha$ -SMA in Fibroblasten nach Behandlung mit CO<sub>2</sub>

Humane Fibroblasten wurden über drei Tage hinweg täglich zunächst mit CO<sub>2</sub>-haltigem Versuchsmedium für 15 min oder 60 min bzw. mit CO<sub>2</sub>-freiem Versuchsmedium für 15 min behandelt und danach jeweils über Nacht in Medium mit einer TGF- $\beta$ -Konzentration von 0 ng/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml oder 5 ng/ml inkubiert. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme von  $\alpha$ -SMA ( $p < 0,05$ ) in jeder TGF- $\beta$ -Konzentrationsuntergruppe (#), im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne TGF- $\beta$  sowie eine signifikante Abnahme von  $\alpha$ -SMA ( $p < 0,05$ ) in der Untergruppe der mit einer TGF- $\beta$ -Konzentration von 3 ng/ml behandelten Zellen beim Vergleich 0 min CO<sub>2</sub> gegenüber 60 min CO<sub>2</sub> (\*).

#### 4.2 Der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf Komponenten des TGF- $\beta$ -Signalweges

Um den Signalweg der Inhibition zu identifizieren, wurden Komponenten des TGF- $\beta$ -Signalweges untersucht. Dabei zeigte sich neben der zu erwartenden Zunahme des phosphorylierten SMAD2 durch Behandlung mit TGF- $\beta$  auch eine Zunahme des pSMAD2

durch CO<sub>2</sub>, sowohl in nicht mit TGF-β aktivierten Fibroblasten als auch in denen, die mit dem Wachstumsfaktor inkubiert wurden (Abb. 9). Dieses Ergebnis spricht somit für eine Aktivierung des TGF-β-Signalweges durch CO<sub>2</sub>, statt für dessen Inhibition.

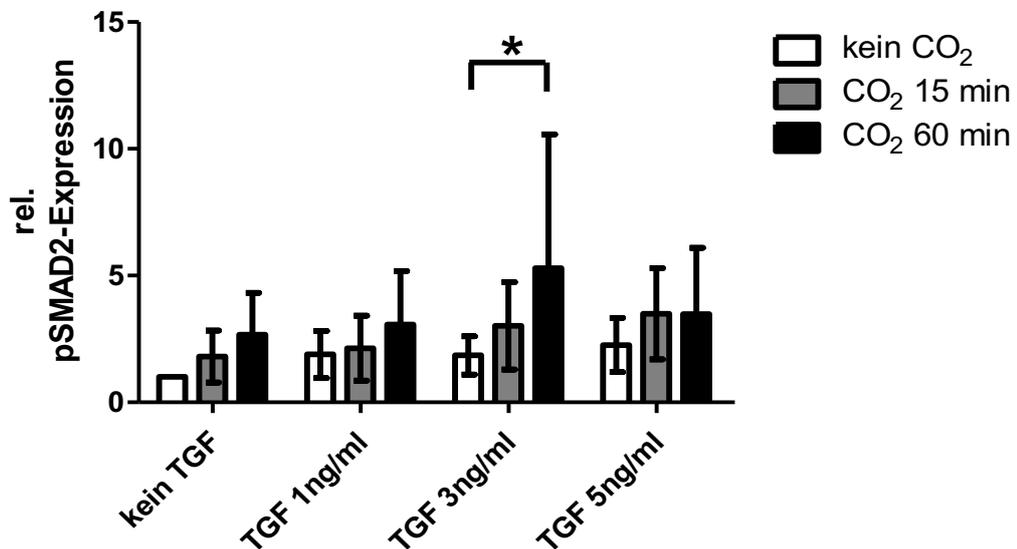


Abbildung 9 Relative Expression von Phospho-SMAD2 in Fibroblasten nach Behandlung mit CO<sub>2</sub>

Humane Fibroblasten wurden an drei aufeinander folgenden Tagen mit CO<sub>2</sub>-haltigen oder CO<sub>2</sub>-freiem Medium behandelt und danach jeweils in Medium inkubiert, welches mit TGF-β in einer Konzentration von 0 ng/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml bzw. 5 ng/ml versetzt wurde. In der Auswertung mittels *Western Blot* zeigte sich eine Erhöhung der relativen Phospho-SMAD2-Konzentration durch Zugabe von TGF-β, aber auch durch die Behandlung mit CO<sub>2</sub>. Eine kombinierte Behandlung mit CO<sub>2</sub> und TGF-β ergab ebenfalls einen Anstieg der relativen Phospho-SMAD2-Konzentration. (\* = signifikante Zunahme der über drei Tage jeweils 60 min mit CO<sub>2</sub> behandelten Fibroblasten zur nicht mit CO<sub>2</sub> behandelten Vergleichsgruppe in der Subgruppe der mit 3 ng/ml TGF-β inkubierten Fibroblasten (p = 0,05))

Schaut man sich die Ergebnisse der anderen untersuchten Proteine des TGF-β-Signalweges an, erkennt man im Falle von SMAD2 und SMAD3 (Abb. 10 und Abb. 11) keine nennenswerte Änderung unter CO<sub>2</sub>-Einfluss. Die relative Konzentration von SMAD4 (Abb. 12) hingegen stieg in allen TGF-β-Subgruppen außer bei 5 ng/ml TGF-β unter Inkubation mit CO<sub>2</sub> an. Signifikant war diese Zunahme allerdings nicht. Die einzige signifikante Veränderung, die sich registrieren ließ, war der Abfall der relativen SMAD3-Konzentration unter TGF-β-Einfluss.

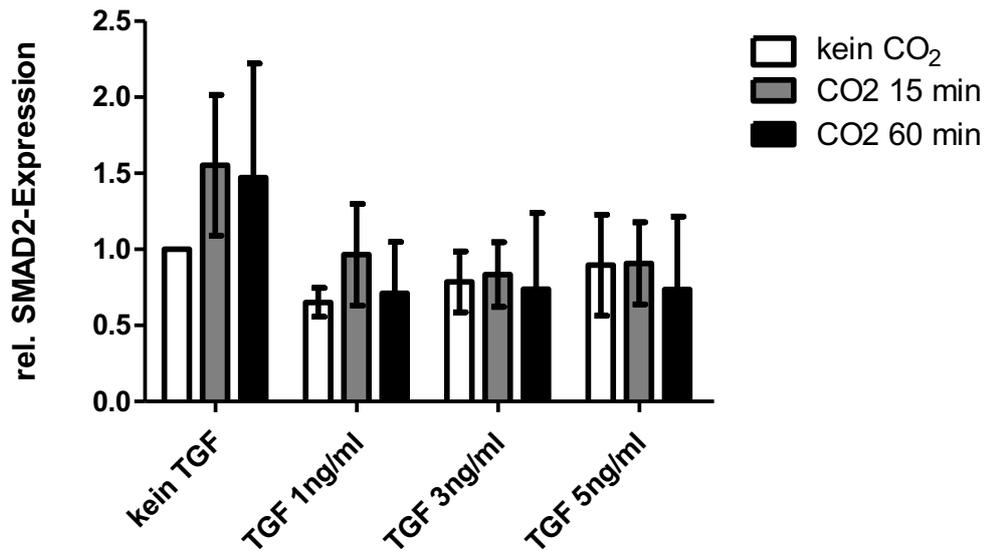


Abbildung 10 Relative Expression von SMAD2 in Fibroblasten nach Behandlung mit CO<sub>2</sub>

Humane Fibroblasten wurden über drei Tage mit CO<sub>2</sub>-haltigem oder CO<sub>2</sub>-freiem Versuchsmedium behandelt und danach mit TGF-β-haltigem Medium mit einer Konzentration von 0 ng/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml bzw. 5 ng/ml inkubiert. Dargestellt ist die gemessene relative SMAD2-Konzentration, welche keine signifikante Änderung durch CO<sub>2</sub>- und/oder TGF-β-Behandlung zeigt.

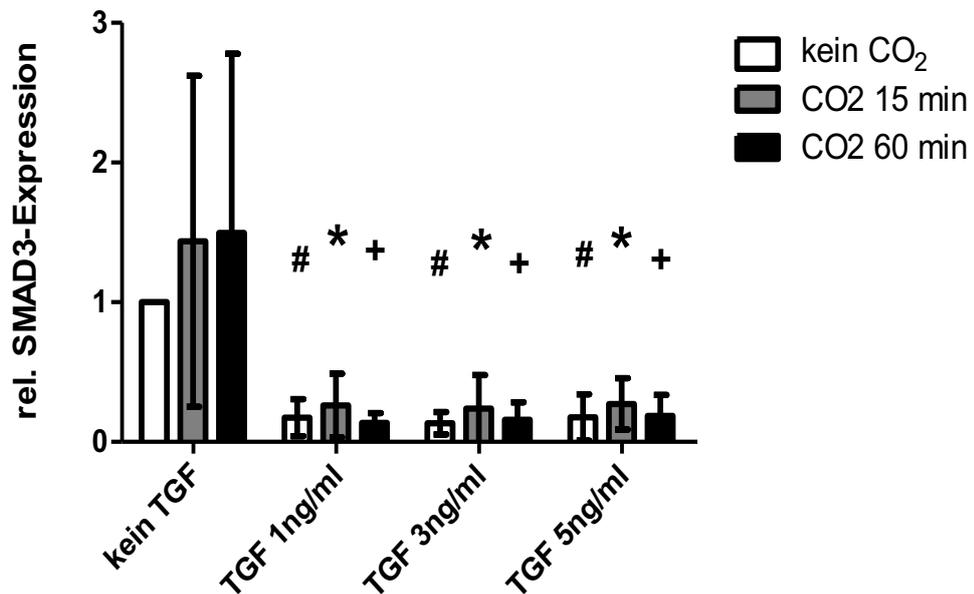


Abbildung 11 Relative Expression von SMAD3 in Fibroblasten nach Behandlung mit CO<sub>2</sub>

Mit oder ohne CO<sub>2</sub> bzw. TGF-β behandelte humane Fibroblasten wurden hinsichtlich ihrer relativen SMAD3-Konzentration analysiert. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme der relativen SMAD3-Konzentration bei allen eingesetzten TGF-β-Konzentrationen im Vergleich zu den ohne den Wachstumsfaktor inkubierten Zellen, sowohl in der Subgruppe ohne CO<sub>2</sub> (#), als auch in den Subgruppen 15 min CO<sub>2</sub> (\*) und 60 min CO<sub>2</sub> (+) (jeweils p = 0,05).

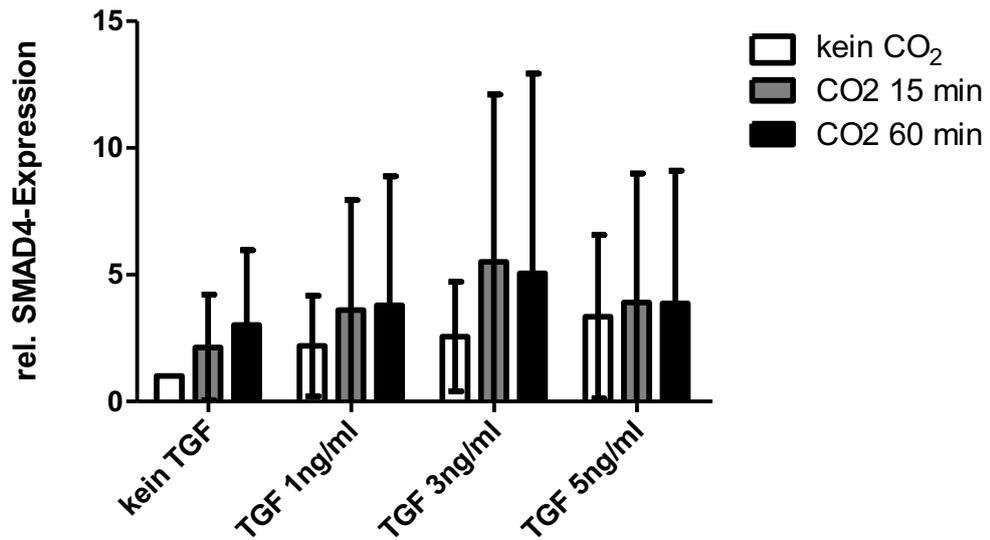


Abbildung 12 Relative Expression von SMAD4 in Fibroblasten SMAD4 nach Behandlung mit CO<sub>2</sub>

Humane Fibroblasten, die mit CO<sub>2</sub> und/oder TGF-β an drei aufeinander folgenden Tagen behandelt wurden, wurden mittels *Western Blot* hinsichtlich ihrer relativen SMAD4-Expression untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen nachgewiesen werden.

### 4.3 Der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf Inhibitoren des TGF-β-Signalweges

Neben den R-SMADs SMAD2 und SMAD3 sowie dem Co-SMAD SMAD4 wurden auch die Inhibitoren SMAD7 und SMURF2 untersucht (Abb. 13 und Abb. 14).

SMAD7 zeigte keine signifikante Änderung durch CO<sub>2</sub>- und/oder TGF-β-Behandlung. Allerdings stellte sich bei allen eingesetzten TGF-β-Konzentrationen, inklusive den nicht mit dem Wachstumsfaktor behandelten Zellen, eine, wenn auch sehr geringe, Erhöhung der relativen SMAD7-Konzentration bei den 15 min mit CO<sub>2</sub> inkubierten Zellen gegenüber den nicht CO<sub>2</sub> ausgesetzten Fibroblasten dar. Wurden die Zellen aber 60 Minuten mit dem Gas behandelt, fiel die exprimierte relative SMAD7-Konzentration wieder geringer aus als in den Vergleichsgruppen der 15 min mit CO<sub>2</sub>-Lösung inkubierten Zellen.

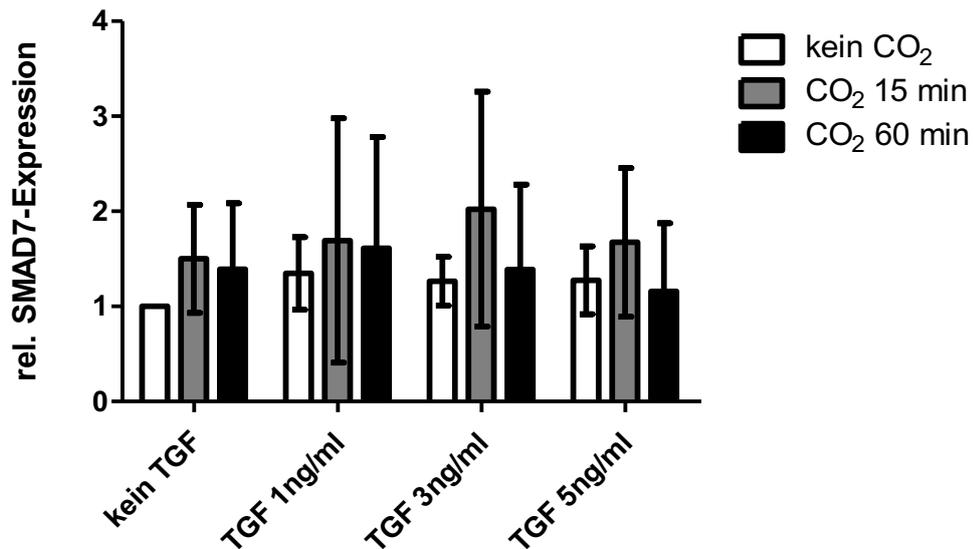


Abbildung 13 Relative Expression von SMAD7 in Fibroblasten nach Behandlung mit CO<sub>2</sub>

Dargestellt ist die relative SMAD7-Konzentration von humanen Fibroblasten die mit TGF-β der Konzentrationen 0 ng/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml bzw. 5 ng/ml sowie mit für 15 min bzw. 60 min oder ohne CO<sub>2</sub> behandelt wurden. Es zeigten sich keine signifikanten Änderungen durch die Behandlung mit dem Wachstumsfaktor, CO<sub>2</sub> oder einer Kombination von beidem gegenüber den unbehandelten Zellen. Allerdings stieg die relative SMAD7-Konzentration durch die Inkubation mit CO<sub>2</sub> für 15 min gegenüber den nicht CO<sub>2</sub> ausgesetzten Zellen in allen TGF-β-Subgruppen an. Wurden sie 60 min inkubiert, fiel die relative Konzentration aber wieder niedriger aus als bei 15 min.

Die relative SMURF2-Konzentration änderte sich ebenfalls nicht signifikant durch die Behandlung mit TGF-β und/oder mit CO<sub>2</sub>. Aber es kam bei allen TGF-β-Konzentrationen mit Ausnahme von 5 ng/ml zu einer Zunahme von SMURF2 durch die Behandlung mit CO<sub>2</sub>, wobei diese Erhöhung der relativen Konzentration bei der Inkubationszeit von 60 min in CO<sub>2</sub>-haltigem Medium stärker ausfiel als bei 15 min.

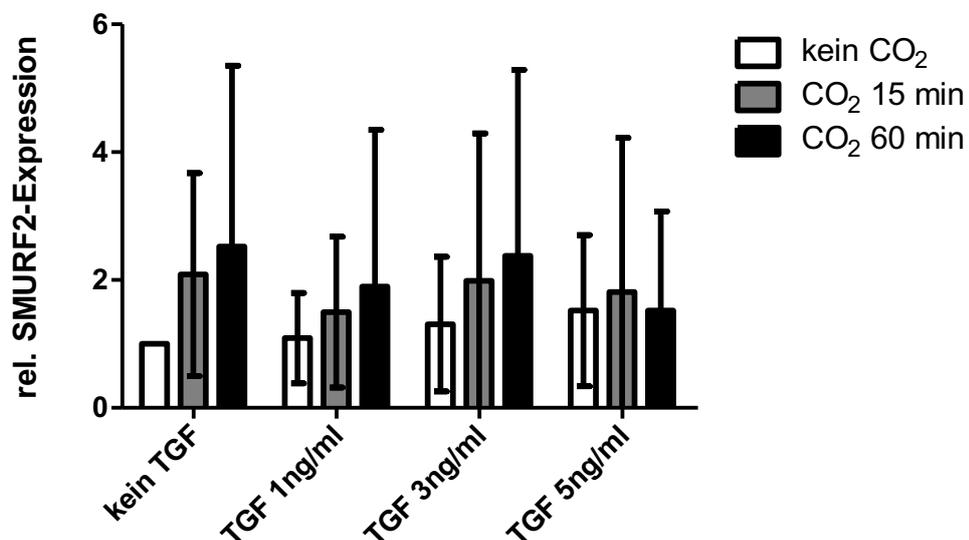


Abbildung 14 Relative Expression von SMURF2 in Fibroblasten nach Behandlung mit CO<sub>2</sub>

Humane Fibroblasten wurden für 15 min bzw. 60 min mit CO<sub>2</sub> oder 15 min ohne CO<sub>2</sub> sowie mit den dargestellten TGF- $\beta$ -Konzentrationen behandelt und danach mittels *Western Blot* hinsichtlich ihrer SMURF2-Konzentration ausgewertet. Es zeigte sich keine nennenswerte Änderung der relativen SMURF2-Konzentration durch Inkubation mit TGF- $\beta$ . Aber es kam zu einem Anstieg des untersuchten Proteins durch die Behandlung mit CO<sub>2</sub>, wobei diese Erhöhung bei 60 min Inkubation in CO<sub>2</sub>-haltigem Medium stärker ausfiel als bei 15 min. Dies geschah sowohl in der Subgruppe mit 0 ng/ml TGF- $\beta$ , als auch in denen mit 1 ng/ml und 3 ng/ml. In der Subgruppe der mit 5 ng/ml TGF- $\beta$  inkubierten Fibroblasten ergab sich eine leichte Erhöhung der relativen SMURF2-Konzentration durch 15 min Behandlung mit CO<sub>2</sub> gegenüber den unbehandelten Zellen. Allerdings kam es nach 60 min Behandlung mit CO<sub>2</sub> wieder zu einer Abnahme.

#### 4.4 Der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf den $\beta$ -Catenin-Signalweg

Zusätzlich zur TGF- $\beta$ -Signalkaskade wurde auch der Wnt-Signalweg untersucht (Abb. 15). Hierbei zeigten sich keine signifikanten Änderungen der relativen  $\beta$ -Catenin-Konzentration durch die Behandlung mit TGF- $\beta$  und/oder CO<sub>2</sub> über drei Tage. Allerdings kam es hier, ähnlich wie bei SMAD7, in allen TGF- $\beta$ -Subgruppen zu einer, wenn auch sehr geringen Zunahme der relativen  $\beta$ -Catenin-Konzentration nach 15 min CO<sub>2</sub>-Behandlung gegenüber den CO<sub>2</sub>-freien Zellkulturen und wiederum zu einem Abfall nach 60 min.

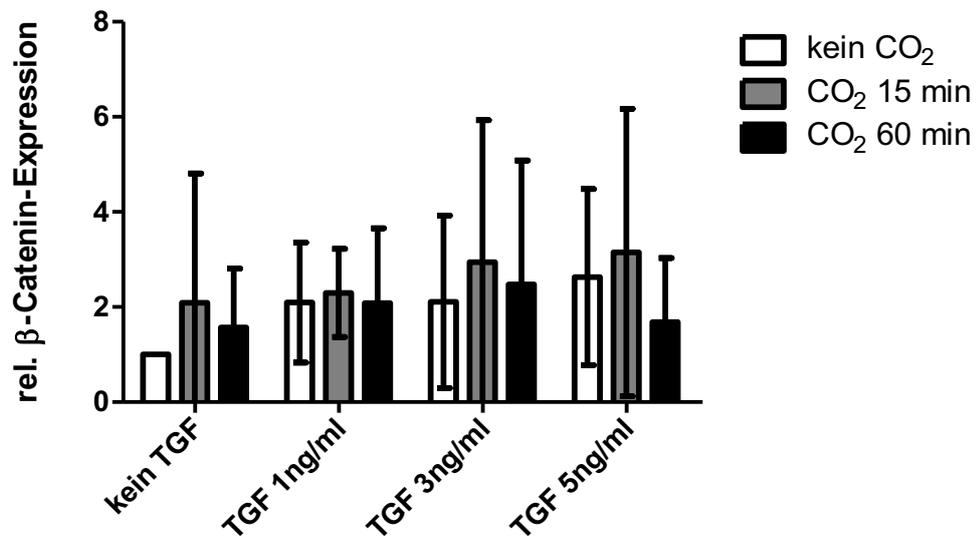


Abbildung 15 Relative Expression von  $\beta$ -Catenin in Fibroblasten nach Behandlung mit CO<sub>2</sub>

Humane Fibroblasten wurden über drei Tage mit CO<sub>2</sub>-haltigem Medium für jeweils 15 bzw. 60 min oder mit CO<sub>2</sub>-freiem Medium für 15 min behandelt und danach über Nacht mit TGF- $\beta$  der Konzentration 0 ng/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml bzw. 5 ng/ml inkubiert. Mittels *Western Blot* wurde die relative  $\beta$ -Catenin-Konzentration bestimmt. Diese zeigte keine signifikanten Veränderungen durch die Behandlung mit CO<sub>2</sub>, TGF- $\beta$  bzw. eine Kombination von beidem. Allerdings stellt sich in jeder TGF- $\beta$ -Subgruppe eine, wenn auch schwache, Erhöhung der relativen Konzentration von  $\beta$ -Catenin nach 15 min CO<sub>2</sub>-Behandlung gegenüber den ohne CO<sub>2</sub> kultivierten Zellen dar, aber wiederum eine Verringerung der Konzentration nach 60 min.

#### 4.5 Der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf die Expression von ED-A Fibronektin als Bestandteil der extrazellulären Matrix

Die Ergebnisse des nächsten untersuchten Proteins, dem ED-A Fibronektin, werden in Abb. 16 dargestellt. Wie erwartet wird dieser Bestandteil der extrazellulären Matrix als ein Zielprotein des kanonischen TGF- $\beta$ -Signalweges vermehrt exprimiert, wenn die Fibroblasten mit diesem Wachstumsfaktor inkubiert werden. Unter zusätzlichem CO<sub>2</sub>-Einfluss hingegen konnte keine signifikante Konzentrationsänderung nachgewiesen werden.

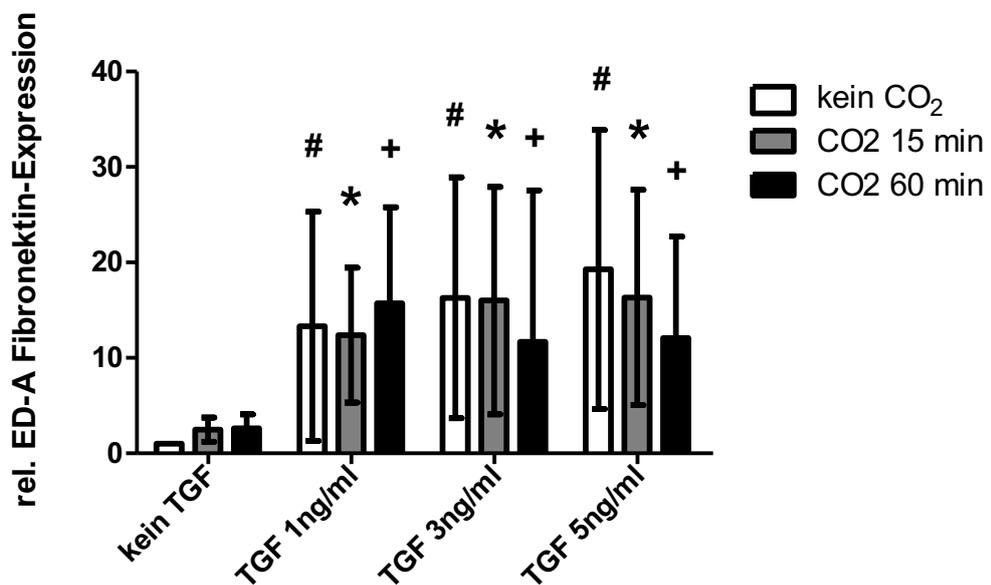


Abbildung 16 Relative Expression von ED-A Fibronektin in Fibroblasten nach Behandlung mit CO<sub>2</sub>

Humane Fibroblasten wurden über drei Tage mit den gezeigten TGF- $\beta$ -Konzentrationen und/oder CO<sub>2</sub> behandelt. Dargestellt sind die mittels *Western Blot* ermittelten Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Konzentrationen von ED-A Fibronektin. Dabei zeigt sich in jeder TGF- $\beta$ -Subgruppe bei den nicht mit CO<sub>2</sub> behandelten Zellen eine signifikante Zunahme der relativen ED A-Fibronektin-Konzentration gegenüber den Fibroblasten der Subgruppe 0 ng/ml TGF- $\beta$  (#) ( $p = 0,05$ ). Gleiches gilt für 15 min (\*) ( $p = 0,05$ ) und 60 min (+) ( $p = 0,05$ ) CO<sub>2</sub>-Behandlung. Es stellt sich aber keine signifikante Änderung durch die Inkubation mit CO<sub>2</sub>-haltigem Medium gegenüber einer Inkubation ohne CO<sub>2</sub> dar.

#### 4.6 Der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf den MAP-Kinase-Weg

Neben dem TGF- $\beta$ - und dem Wnt-Signalweg wurde auch der MAPK-Weg untersucht, der mit den beiden anderen in Wechselwirkung steht. Es zeigten sich allerdings keine signifikanten Änderungen des Proteins ERK1/2 unter TGF- $\beta$ - und/oder CO<sub>2</sub>-Einfluss (Abb. 17).

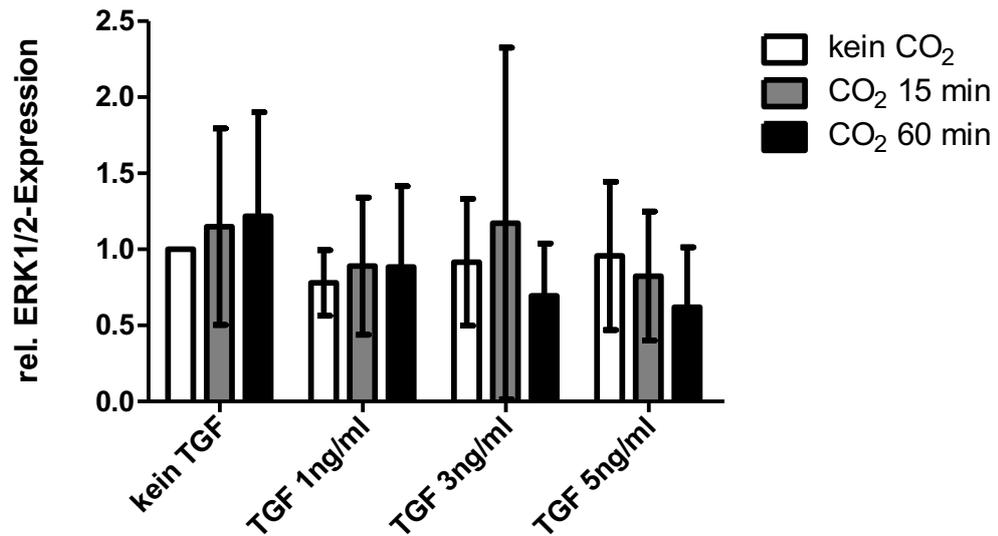


Abbildung 17 Relative Expression von Erk1/2 in Fibroblasten nach Behandlung mit CO<sub>2</sub>

Dargestellt ist die relative ERK1/2-Konzentration in humanen Fibroblasten nach dreitägiger Behandlung mit CO<sub>2</sub>-haltiger Lösung für jeweils 15 min oder 60 min bzw. mit CO<sub>2</sub>-freier Lösung für 15 min mit darauffolgender Inkubation über Nacht in TGF-β-haltigem Medium mit den Konzentrationen 0 ng/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml bzw. 5 ng/ml TGF-β. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede durch die Behandlung mit CO<sub>2</sub> und/oder TGF-β.

Wie in Abb. 18 dargestellt wurde auch die phosphorylierte Form des ERK1/2, das Phospho-ERK1/2, untersucht. Dabei zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede durch die Behandlung mit CO<sub>2</sub> und/oder TGF-β. Aber es kam zu einem Anstieg der relativen pERK1/2-Konzentration durch die Behandlung mit TGF-β bei allen eingesetzten TGF-β-Konzentrationen in allen CO<sub>2</sub>-Subgruppen.

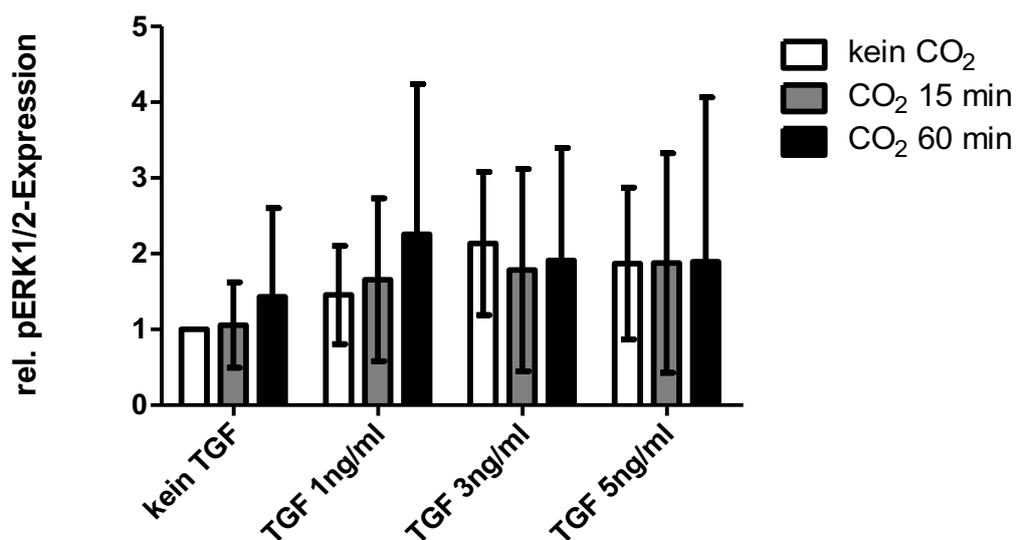


Abbildung 18 Relative Expression von pErk1/2 in Fibroblasten nach Behandlung mit CO<sub>2</sub>

Humane Fibroblasten wurden über drei Tage jeweils für 15 bzw. 60 min mit CO<sub>2</sub>-versetztem Medium bzw. für 15 min mit CO<sub>2</sub>-freiem Medium behandelt und anschließend über Nacht in TGF- $\beta$ -haltigem Medium mit den Konzentrationen 0 ng/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml bzw. 5 ng/ml TGF- $\beta$  inkubiert. Dargestellt sind die Ergebnisse der *Western Blot*-Analyse in Form der relativen Konzentrationen des pErk1/2 in den einzelnen Versuchsgruppen. Es ergaben sich keine signifikanten Änderungen durch die Behandlungen, aber es erhöhte sich die relative pERK1/2-Konzentration durch den Zusatz aller eingesetzter TGF- $\beta$ -Konzentrationen in allen CO<sub>2</sub>-Subgruppen.

## 5 Diskussion

Der regelrechte Wundverschluss stellt einen komplizierten Prozess dar, an dem eine Vielzahl von Zellen, z.B. Fibroblasten, Keratinozyten, Lymphozyten und Monozyten, beteiligt sind, deren Aktivität und Interaktionen durch Wachstumsfaktoren, wie TGF- $\beta$ , *Interleukine*, wie IL1 und IL6, sowie *Chemokine* gesteuert werden. Profibrotische Erkrankungen der Haut zeichnen sich dadurch aus, dass nach einer mechanischen, thermischen oder chemischen Schädigung der Heilungsprozess verstärkt angeregt wird, sodass Narben entstehen, die sich von der Haut abheben (*hypertrophe* Narben) bzw. zusätzlich die Grenzen des verletzten Areal überschreiten (*Keloide*) (Sm u. a. 2019; Wolfram u. a. 2009). Diese übermäßige Aktivierung des Wundverschlusses beruht auf dem Umstand, dass die Regulation der zuständigen molekularen Signalwege und somit auch ihre Wechselwirkungen aufeinander gestört sind. Es gibt reichlich Belege dafür, dass der TGF- $\beta$ -Signalweg einer dieser in diesem Zusammenhang dysregulierten Signalwege ist und ihm somit eine Schlüsselrolle bei der Manifestation von profibrotischen Erkrankungen in diversen Organen, darunter Herz, Lunge, Leber, Niere und Haut, zukommt (Yue u. a. 2017; A, M, und T 2018; F u. a. 2016; Y 2018; Berman, Maderal, und Raphael 2017; Yousefi u. a. 2020). Diese Schlüsselrolle des TGF- $\beta$ -Signalweges ergibt sich unter anderem aus dem Umstand, dass dieser Wachstumsfaktor entscheidend an der Bildung und der Aktivität von Myofibroblasten beteiligt ist (Hinz 2016), sodass es bei Aktivierung der TGF- $\beta$ -Signalkaskade zu einer erhöhten Proliferation und Migration von Fibroblasten in den Bereich des Defektes sowie zu einer verstärkten Differenzierung dieser Zellen zu Myofibroblasten kommt (Slomp und Kirschner 2006; Berman, Maderal, und Raphael 2017; Wolfram u. a. 2009), welche daraufhin gesteigerte Mengen von Komponenten der extrazellulären Matrix produzieren. Zu diesen verstärkt gebildeten Proteinen gehören Kollagen Typ I und Fibronectin (Sm u. a. 2019) sowie  $\alpha$ -SMA, das als gängiger Marker zur Identifikation von Myofibroblasten und zur Unterscheidung dieser Zellen von Fibroblasten verwendet wird (Hinz 2007). Auch bei meinen Versuchen ließ sich durch die Zugabe des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  zum Kulturmedium (analog zu einer erhöhten Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalweg bei profibrotischen Erkrankungen) eine signifikante Zunahme von  $\alpha$ -SMA und somit eine Steigerung der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten zeigen (Hinz 2016). Wurden diese Zellen nun zusätzlich der CO<sub>2</sub>-Lösung ausgesetzt, wurde vermindert  $\alpha$ -SMA exprimiert, wobei dieser Effekt stärker ausfiel, wenn in die Zellen länger mit CO<sub>2</sub> behandelt wurden. Das bedeutet, dass

das Gas die Differenzierung zu Myofibroblasten inhibiert. Die fehlende Signifikanz in den TGF- $\beta$ -Subgruppen 1 ng/ml und 5 ng/ml ist dabei am ehesten auf die geringe Anzahl ( $n = 8$ ) der untersuchten Spender zurückzuführen, denn auch hier ließ sich die gleiche deutliche Tendenz abbilden.

Schaut man sich nun die Ergebnisse der untersuchten Komponenten des TGF- $\beta$ -Signalweges an, erkennt man zunächst die erwartete Aktivierung des Signalweges durch Zusatz des Wachstumsfaktors zum Medium. Dies zeigt sich darin, dass die Konzentration der phosphorylierten Form des SMAD2, wenn auch nicht signifikant, ansteigt. Zudem nimmt auch die relative SMAD3-Konzentration signifikant ab, was vereinbar ist mit einer Zunahme der Phosphorylierung dieses Proteins bei Aktivierung des Signalweges, sodass die Konzentration der nicht phosphorylierten Form sinkt. Leider war es technisch nicht möglich das pSMAD3 selbst nachzuweisen, um diese These zu untermauern, da sich trotz Versuchen mit Antikörpern von zwei unterschiedlichen Firmen keine nachweisbaren Banden darstellen ließen. Bei profibrotischen Erkrankungen, bei denen sich ebenfalls erhöhte TGF- $\beta$ -Konzentrationen im Gewebe zeigen, lässt sich, analog zu meinen Versuchen, eine verstärkte Akkumulation von SMAD-Proteinen in den Zellkernen der Myofibroblasten innerhalb der Fibroseareale nachweisen (Piersma, Bank, und Boersema 2015). Eine weitere durch TGF- $\beta$  induzierte Veränderung innerhalb meiner Versuche war die Zunahme von SMAD4, auch wenn dieser Anstieg nicht signifikant war. Da SMAD4 nicht aus einer Vorform gebildet wird, wie es bei pSMAD2 und pSMAD3 der Fall ist, wäre ein Erklärungsansatz für den Anstieg der Konzentration, dass es bei Inkubation mit dem Wachstumsfaktor zu einer erhöhten Genexpression von SMAD4 kommt.

Wurden die aktivierten Zellen während meiner Versuche nun zusätzlich CO<sub>2</sub> ausgesetzt, kam es nicht, wie erwartet, zu einem gegenläufigen Effekt in Bezug auf die Proteine der TGF- $\beta$ -Signalkaskade. Tatsächlich stieg bei meinen Versuchen die relative Konzentration des pSMAD2 sowohl in der Subgruppe ohne TGF- $\beta$ -Zusatz als auch bei allen Gruppen mit TGF- $\beta$ -Zugabe unter CO<sub>2</sub>-Einfluss an. Im Falle der Subgruppe mit 3 ng/ml TGF- $\beta$  war der Anstieg bei den 60 min behandelten Zellen gegenüber den CO<sub>2</sub>-freien sogar signifikant. Auch die Konzentration von SMAD4 stieg unter Behandlung mit dem Gas. Diese Ergebnisse sprechen somit für eine Aktivierung des Signalweges durch CO<sub>2</sub> statt für eine Inhibition.

Schaut man nun auf die Ergebnisse der Inhibitoren des TGF- $\beta$ -Signalweges, sieht man aber durchaus auch einen gegenläufigen Effekt durch die Anwesenheit von CO<sub>2</sub>. Denn hier zeigte sich ein Anstieg der relativen SMURF2-Konzentration in allen TGF- $\beta$ -

Subgruppen, inklusive der der nicht aktivierten Zellen, bei Vorhandensein des Gases. Dabei stellte sich diese Auswirkung umso deutlicher dar, je länger die Fibroblasten mit CO<sub>2</sub> behandelt wurden, mit Ausnahme der Subgruppe unter 5 ng/ml TGF-β und 60 min CO<sub>2</sub>-Behandlung. Daraus lässt sich schließen, dass durch den CO<sub>2</sub>-Einfluss auch die Gegenspieler des TGF-β-Signalweges induziert werden.

Beim zweiten untersuchten Inhibitor, SMAD7, zeigte sich dann aber ein leicht anderes Bild. Auch hier kam es zu einer Steigerung der relativen Proteinkonzentration nach 15 min CO<sub>2</sub>-Behandlung in allen TGF-β-Subgruppen, allerdings fielen die Konzentrationen in allen Wachstumsfaktor-Subgruppen nach 60 min wieder ab. SMAD7 wird also bei geringer CO<sub>2</sub>-Einwirkung getriggert aber bei stärkerem CO<sub>2</sub>-Einfluss gehemmt. Dies spiegelt aber ebenfalls wider, dass CO<sub>2</sub> einen ambivalenten Einfluss auf den TGF-β-Signalweg ausübt.

Die alleinige Inkubation mit TGF-β zeigte bei meinen Versuchen einen leichten Anstieg beider Inhibitoren. Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen anderer Studien, die eine verminderte Konzentrationen der inhibitorischen SMAD-Proteine, SMAD6 und SMAD7, in fibrotischen Geweben nachweisen konnten (Piersma, Bank, und Boersema 2015). Grund dafür könnte sein, dass bei meinen Versuchen nur mit einem Wachstumsfaktor gearbeitet wurde, in *in vivo* aber eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren und Signalmolekülen im Rahmen profibrotischer Erkrankungen beteiligt ist, die auf viele verschiedene Signalwege unterschiedlich wirken, die dann wiederum aufeinander Einfluss nehmen (Piersma, Bank, und Boersema 2015). Deswegen wird schlussendlich die Transkription der Zielgene der SMAD-Kaskade nicht nur von der Anwesenheit des Komplexes aus pSMAD2, pSMAD3 und SMAD4 bestimmt, sondern mitentscheidend an der Regulation beteiligt ist das Vorhandensein oder Fehlen einer Vielzahl von zusätzlichen weiteren DNA-bindenden-(Co-) Faktoren, Mastertranskriptionsfaktoren, Repressoren sowie *Chromatin-Readern* (Piersma, Bank, und Boersema 2015; Massagué 2012; Ac u. a. 2011). Außerdem kommt es durch Komponenten anderer Signalwege, wie der GSK3 als Teil der Wnt-Signalkaskade oder den MAP-Kinasen als Bestandteil des MAPK-Signalweges zu Interaktionen mit Proteinen des TGF-β-Signalweges. Beispielhaft ist hierbei zu nennen, dass verschiedene SMAD-Proteine durch die MAPK phosphoryliert werden können, wobei die genaue Lokalisation der Phosphorylierung festlegt, ob es zu einer Stabilisierung oder zum Abbau des Substrates kommt (K. Luo 2017; Tzavlaki und Moustakas 2020). Außerdem sollte auch nicht vergessen werden, dass epigenetische Einflüsse wie DNA-Methylierungen oder Histonmodifikationen zusätzlich noch regulierend auf die Transkription wirken, indem sie festlegen, welche Gene zu welchem Zeitpunkt abgelesen werden können (Massagué

2012). Deshalb führt eine alleinige Inhibition des TGF- $\beta$ -Signalwegs auch zu keiner vollständigen Blockierung der profibrotischen Antwort (Piersma, Bank, und Boersema 2015).

In Bezug zu den Ergebnissen des zweiten von mir untersuchten Signalweges, der Wnt-Signalkaskade, lässt sich berichten, dass die relative Konzentration von  $\beta$ -Catenin unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  stieg. Da von extern kein direkter Einfluss auf den Wnt-Signalweg genommen wurde, muss die beobachtete Steigerung der  $\beta$ -Catenin-Konzentration in meinen Versuchen indirekt durch Komponenten der TGF- $\beta$ -Signalkaskade hervorgerufen worden sein, was wiederum den gegenseitig aufeinander ausübenden Einfluss der unterschiedlichen Signalwege veranschaulicht. In *vivo* kommt dem Wnt-Signalweg, der ebenfalls die Homöostase von Myofibroblasten beeinflusst, eine entscheidende Rolle im Rahmen von profibrotischen Erkrankungen an Herz, Lunge, Leber, Nieren sowie der Haut zu (Yousefi u. a. 2020; Königshoff und Eickelberg 2010; Nishikawa, Osawa, und Kimura 2018; Tan u. a. 2014; Hamburg u. a. 2015). In Untersuchungen zu profibrotischen Erkrankungen der Niere konnte in Modellen der *unilateralen ureteralen* Obstruktion, welche eine progressive *interstitielle* Fibrosierung hervorruft, eine Überexpression fast aller Wnt-Liganden, ihrer mRNAs und der Frizzled-Rezeptoren sowie eine Akkumulation von  $\beta$ -Catenin mit verstärkter Expression der Zielgene des Signalweges, darunter Fibronectin und Kollagen Typ I, nachgewiesen werden (He u. a. 2009). In den Lungen von Patienten, die an idiopathischer Lungenfibrose erkrankt waren, konnte ebenfalls ein erhöhtes Vorkommen von Wnt2 und Wnt5a, von den Rezeptoren FZD7 und FZD10, von Zielgenen des Signalweges wie MMP7, aber auch von Regulatoren der Signalkaskade wie sFRP1 sowie sFRP2 nachgewiesen werden (Moisés Selman, Pardo, und Kaminski 2008; Moises Selman u. a. 2006). In einer anderen Studie zum Krankheitsbild der idiopathischen Lungenfibrose konnten in Biopsien der Lunge betroffener Patienten Zellen mit einer erhöhten *intranukleären*  $\beta$ -Catenin-Konzentrationen sowie gesteigerten Expressionsraten von Zielgenen des aktivierten Wnt-Signalweges, darunter MMP7 und Cyclin-D1, nachgewiesen werden (Chilosi u. a. 2003). Weiterhin konnte in Versuchen mit Mäusen zur Untersuchung von muskulären Fibrosierungen, bei denen mit einem Überschuss von Wnt3a, einem Liganden des Wnt-Signalweges, gearbeitet wurde, eine fibrotische Antwort mit einer verstärkten Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix induziert werden (Brack u. a. 2007). In anderen Modellen, die mit einer Stabilisierung bzw. einer Deletion von  $\beta$ -Catenin in Fibroblasten genetisch modifizierter Mäuse gearbeitet haben, konnte ebenfalls eine verstärkte fibrotische Antwort auf Bleomycin als profibrotisches

Signal mit einer erhöhten Anzahl an Myofibroblasten in der Subgruppe der Individuen mit stabilisierten  $\beta$ -Catenin generiert werden. In der Versuchsgruppe der Mäuse, bei denen eine Fibroblasten-spezifische Deletion des  $\beta$ -Catenins induziert wurde, zeigte sich eine deutliche Minderung der fibrotischen Antwort im Vergleich zur Gruppe ohne  $\beta$ -Catenin-Modifikation. Es konnte aber keine vollständige Inhibition der fibrotischen Entwicklung erreicht werden (Beyer u. a. 2012). Ebenso zeigte sich in einem anderen Versuch mit *pulmonalen* Fibroblasten gesunder Spender, die erhöhten Konzentrationen von Wnt3a bzw. stabilisiertem TGF- $\beta$  ausgesetzt waren, zwar eine erhöhte Fibroblastenproliferation und -migration, aber keine verstärkte Expression der klassischen profibrotischen Proteine Kollagen Typ I oder  $\alpha$ -SMA. Dabei wurde durch den gleichzeitigen Nachweis einer vermehrten Produktion von Axin2, einem anderen Zielprotein der Wnt-Signalkaskade, eine zu geringe Stimulation dieses Signalweges ausgeschlossen (Lam u. a. 2011). Aus all diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass der Wnt-Signalweg zwar ein wichtiger Teil profibrotischer Veränderungen ist, seine alleinige Inhibition aber keine ausreichende Maßnahme zur Verhinderung von Fibrosierungen darstellt, sondern auch hier, genauso wie beim TGF- $\beta$ -Signalweg, Interaktionen mit anderen Signalkaskaden und die sich daraus ergebende summierte Wirkung entscheidend dafür ist, ob eine Fibrose *getriggert* bzw. blockiert wird (Piersma, Bank, und Boersema 2015). Dabei scheinen diese Interaktionsmöglichkeiten je nach Versuchskonzept unterschiedlich stark angesprochen zu werden (Beyer u. a. 2012; Piersma, Bank, und Boersema 2015). Zu der Frage, ob CO<sub>2</sub> ein möglicher Inhibitor des Signalweges ist, lässt sich anhand meiner Ergebnisse folgendes festhalten: Die Behandlung mit dem Gas zeigte ähnliche Ergebnisse wie bei SMAD7, d.h. in allen TGF- $\beta$ -Subgruppen kam es zu einem Anstieg der relativen  $\beta$ -Catenin-Konzentration in den 15 min CO<sub>2</sub>-Subgruppen gegenüber den jeweiligen CO<sub>2</sub>-freien Gruppen, aber bei den 60 min mit CO<sub>2</sub> inkubierten Zellen fiel die  $\beta$ -Catenin-Konzentration wieder geringer aus. Das bedeutet, dass es auch hier einen Behandlungszeit-abhängigen Einfluss von CO<sub>2</sub> auf die Signalkaskade oder zumindest deren zentrales Protein  $\beta$ -Catenin zu geben scheint, wobei geringe Mengen CO<sub>2</sub> bzw. kurze Inkubationszeiten die Signalkaskade aktivieren und eine längere CO<sub>2</sub>-Einwirkung sie inhibiert.

Die dritte untersuchte Signalkaskade, der MAPK-Signalweg, zeigte ebenfalls eine Aktivierung durch die Zugabe von TGF- $\beta$ , was sich daraus ableiten lässt, dass die relative Konzentration von pErk1/2 unter TGF- $\beta$ -Einfluss stieg. Hier gilt genauso wie im Fall des Wnt-Signalweges, dass die Aktivierung indirekt über Wechselwirkungen mit Komponenten der TGF- $\beta$ -Signalkaskade stattgefunden haben muss, da keine Liganden der

MAPK -Signalkaskade zugesetzt wurden. Die ausgewerteten Konzentrationen von ERK1/2 hingegen zeigen keine nennenswerte Veränderung bei Vorhandensein des Wachstumsfaktors, was sich aber dadurch erklären ließe, dass die Menge des phosphorylierten ERK1/2 zu der des ERK1/2 vergleichsweise gering ist, sodass die schwache Erhöhung der Phosphorylierungsrate auf die Konzentration des ERK1/2 keine nennenswerte Auswirkung hat.

Durch die zusätzliche Inkubation mit CO<sub>2</sub> zeigte sich in meinen Versuchen weder eine erkennbare Erhöhung noch eine Erniedrigung der relativen Konzentrationen von ERK1/2 und pERK1/2, sodass sich anhand meiner Ergebnisse keine Aktivierung oder Inaktivierung des Signalweges durch das Gas ableiten lässt.

Das letzte untersuchte Protein ist das ED-A Fibronectin, eine Spleißvariante des Fibronectins, welches bei fibrotischen Krankheitsbildern von den vermehrt vorkommenden Myofibroblasten verstärkt gebildet wird (Hinz 2016; Serini u. a. 1998) und dessen Gen ein Zielgen des TGF- $\beta$ -Signalweges darstellt (Leask und Abraham 2004). Daher sollte mit dieser Arbeit auch geprüft werden, ob dieses Protein in Anwesenheit von CO<sub>2</sub>, welches die Myofibroblastendifferenzierung inhibiert, dementsprechend auch vermindert gebildet wird. Meine Ergebnisse zeigen in diesem Zusammenhang zunächst die erwartete signifikante Erhöhung der Expression durch die Inkubation mit TGF- $\beta$ . Bei den Zellen, die neben dem Wachstumsfaktor auch dem CO<sub>2</sub> ausgesetzt waren, erkennt man zudem, zumindest in den Subgruppen mit 3 ng/ml und 5 ng/ml, eine Verminderung der relativen Konzentration des ED-A Fibronectins. Da diese Abnahmen aber nicht signifikant sind und es in der Subgruppe 1 ng/ml sogar zu einer Erhöhung des Proteins bei 60 min CO<sub>2</sub>-Behandlung kam, sind weitere Versuche mit größeren Stichproben nötig, um die Frage, ob CO<sub>2</sub> die Synthese von ED-A Fibronectin inhibiert, befriedigend beantworten zu können.

Meine Ergebnisse haben somit, wie erwartet, gezeigt, dass eine Inhibition der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten durch CO<sub>2</sub> stattfindet, konnten aber nicht aufklären, welche Signalwege an dieser Inhibition beteiligt sind. Es konnte aber gezeigt werden, dass die von mir untersuchten Signalkaskaden (TGF- $\beta$ -, Wnt- und MAPK-Signalweg) nicht die Schlüsselsignalwege dieser Hemmung sind.

Einen anderen Ansatz hat die Forschungsgruppe Vohwinkel et al. untersucht, indem sie sich auf den Zellzyklus konzentriert hat. Auch sie haben mit Fibroblasten gearbeitet und diese mit CO<sub>2</sub> behandelt. Dabei haben sie eine Verringerung der Zellzahl gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt. In weiteren Experimenten konnten sie dann aufzeigen, dass

dies nicht auf eine erhöhte *Apoptoserate* oder einen verstärkten Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase zurückzuführen ist, sondern der Zellzyklus verlangsamt durchlaufen wird, sodass sich eine niedrigere Proliferationsrate der Fibroblasten ergibt. Weiterhin konnten sie darlegen, dass dieser Vorgang auf einer verminderten Produktion von ATP unter CO<sub>2</sub>-Einfluss basiert, was wiederum auf einer durch das Gas induzierten mitochondrialen Dysfunktion beruht. Die Verbindung besteht laut Vohwinkel et al. darin, dass ein entscheidender Schritt im Citratzyklus durch die Anwesenheit von CO<sub>2</sub> gehemmt wird. Dieser Schritt ist die Umwandlung von Isocitrat zu alpha-Ketoglutarat durch die Isocitratdehydrogenase 2 (IDH2), wobei CO<sub>2</sub> gebildet wird. Das bedeutet, bei Vorhandensein einer hohen CO<sub>2</sub>-Konzentration soll, laut der Forschungsgruppe von Vohwinkel et al., diese Reaktion herunter reguliert werden. Die Verbindung soll darin bestehen, dass CO<sub>2</sub> die vermehrte Synthese von microRNA-183 induziert. Diese inhibiert wiederum die IDH2, sodass der Fortlauf des Citratzyklus behindert wird. Bei Zugabe von alpha-Ketoglutarat zu diesem Versuchsansatz kam es zu keiner Behinderung der Zellproliferation, sodass abgeleitet werden konnte, dass die weiteren Schritte des Citratzyklus nicht vom CO<sub>2</sub> beeinflusst werden (Vohwinkel u. a. 2011).

Diese Ergebnisse geben Aufschluss über die Hemmung eines Merkmals der überschießenden Narbenbildung, nämlich dem der Proliferationshemmung von Fibroblasten durch CO<sub>2</sub>. Sie erklären aber noch nicht die von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek beobachtete Inhibition der Differenzierung zu Myofibroblasten. Hier sind weitere Versuchsansätze erforderlich, um entweder eine Verbindung zwischen der nachgewiesenen mitochondrialen Dysfunktion und der Hemmung der Differenzierung zu Myofibroblasten aufzuzeigen oder einen komplett anderen Signalweg zu identifizieren, der, beeinflusst durch CO<sub>2</sub>, die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten inhibiert.

## **5.1 Kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse**

Für die Versuche dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden verwendet, die bereits, mit Ausnahme der CO<sub>2</sub>-Anreicherung und -Behandlung, in der Literatur etablierte Methoden sind.

Zellkulturen stellen die Grundlage vieler experimenteller Untersuchungen dar. Die Methoden zur Isolierung, zur *Subkultivierung* und zur Bestimmung der Zellzahl, wie sie für diese Arbeit verwendet wurden, beruhen auf laborinternen SOPs (*Standard Operating Procedures*) und werden tagtäglich in dieser Weise angewendet. Da die von mir

eingesetzten Zellen eines Spenders für alle Versuchsansätze durch Vermehrung aus der ursprünglichen Zellkultur dieses Spenders gewonnen wurden, konnte ich eine Vergleichbarkeit der Ausgangslage der Behandlungsgruppen sicherstellen.

Auch die Behandlung mit TGF- $\beta$ -haltigem Medium erfolgte standardisiert, d.h. das verwendete TGF- $\beta$  stammte an jedem Behandlungstag für alle Konzentrations-Subgruppen von der gleichen Ausgangslösung und die jeweiligen eingesetzten TGF- $\beta$ -Konzentrationen (1 ng/ml, 3 ng/ml bzw. 5 ng/ml) wurden an jedem Behandlungstag daraus frisch hergestellt. Es wurde zu keinem Zeitpunkt TGF- $\beta$ -haltiges Medium verwendet, das noch vom Vortag stammte.

Als schwierig stellte sich aber eine gleichmäßige Behandlung der Zellkulturen mit CO<sub>2</sub> heraus. Dabei bestand zum einen das Problem, dass die Anreicherung des Mediums mit CO<sub>2</sub> mittels *SodaStreamer* nicht immer exakt dieselbe Konzentration lieferte. Dies konnte damit ausgeglichen werden, dass eine mit CO<sub>2</sub> angereicherte Flasche Medium für den gesamten Versuchsansatz reichte, also alle Zellen der CO<sub>2</sub>-positiven Subgruppen an einem Behandlungstag das gleiche CO<sub>2</sub>-haltige Medium erhalten haben. Ein weiterer Kritikpunkt besteht darin, dass das CO<sub>2</sub>-haltige Medium nicht stabil ist, d.h. das gelöste CO<sub>2</sub> verdunstet mit der Zeit, sodass dessen Konzentration im Medium abnimmt. Indem jedes Well mit deutlich mehr Medium befüllt wurde (4 ml), statt den sonst üblichen 1,5 ml konnte dieser Tendenz zumindest teilweise entgegengewirkt werden. Um vergleichbare Bedingungen zu den CO<sub>2</sub>-negativen Ansätzen herzustellen, wurden diese entsprechend auch mit 4 ml Versuchslösung ohne CO<sub>2</sub> inkubiert.

Wiederum unproblematisch stellten sich die weiteren Schritte zur Gewinnung der Zellen, zu ihrer Aufbewahrung, zur Proteinbestimmung und zum *Western Blotting* dar, da alle diese Vorgänge wieder nach laborinternen SOPs erfolgten.

Ein besonderes Augenmerk musste aber wieder auf die beiden letzten Schritte, die Antikörperfärbungen und die Auswertungen der Banden gelegt werden. Hier muss zunächst erwähnt werden, dass jeder Antikörper, besonders aber Anti-Hasen-Antikörper, nicht nur ihr Zielprotein an der vom Hersteller angegebenen Stelle binden, sondern es auch immer zur Entstehung von zusätzlichen schwächeren Banden an anderer Stelle auf der Membran durch Kreuzreaktionen kommt. Dieser Tendenz konnte dadurch entgegengewirkt werden, dass die *Blots* öfter bzw. länger mit PBS „gewaschen“ wurden, um die nicht ganz so fest gebundenen Antikörper der Kreuzreaktionen wieder abzulösen. Trotzdem blieben noch schwache Zusatzbanden zurück. Diese waren zunächst für die Analyse der eigentlich untersuchten Bande des Proteins unwichtig, da sie sich im

Normalfall weit genug von dieser entfernt befanden. Allerdings wurden für meine Arbeit zwölf verschiedene Proteine untersucht und aufgrund des Aufwandes konnten dafür keine zwölf *Blots* angefertigt werden. Das heißt, es mussten mehrere Proteine pro *Blot* detektiert werden. Um das Problem der Überlagerung von Banden zu minimieren, wurden deshalb folgende Maßnahmen getroffen: Zum einen wurden vorgefertigte Gele mit einem Polycrylamidkonzentrationsgradienten von 4-20 % verwendet, die durch ihren Aufbau eine präzisere Trennung der Banden ermöglichen als solche mit einer einheitlichen Polycrylamidkonzentration im Trenngel. Dadurch konnten die Banden von Proteinen mit einem ähnlichen Molekulargewicht besser unterschieden werden, wenn sie auf derselben Membran detektiert wurden. Zudem wurden zunächst alle Antikörper an *Testblots* erprobt. Damit konnte auf der einen Seite geprüft werden, ob das vom Hersteller angegebene Molekulargewicht tatsächlich eine Bande an genau dieser Stelle hervorrief. Denn schon geringe Abweichungen können besonders bei starken und somit breiteren Banden zu Problemen führen, wenn ein weiteres, zu analysierendes Protein ein ähnliches Molekulargewicht besitzt und beide somit räumlich auf der Membran nah beieinander abgebildet werden. Auf der anderen Seite ließ sich somit darstellen, welche unspezifischen Zusatzbanden an welcher Stelle des *Blots* der betreffende Antikörper generiert. Mit dieser Information ließ sich dann festlegen, welche Proteine auf demselben *Blot* detektiert werden konnten. Und drittens konnte so die Stärke der zu untersuchenden Bande ermittelt werden. Denn gerade sich blass darstellende Banden (in meiner Versuchsanordnung besonders die von SMAD3) mussten als erste detektiert werden, da hier auch schon geringe Überlappungen mit schwachen Banden durch unspezifische Bindungen anderer Antikörper zu deutlichen Abweichungen der detektierten Ergebnisse führten. Dementsprechend wurde als letzte Maßnahme zur Objektivierung immer die gleiche Detektionsreihenfolge der Proteine festgelegt, d.h. die Antikörper wurden bei jedem *Blot* immer in der gleichen Reihenfolge aufgetragen.

Bei der Auswertung der *Blots* mittels des Programms Image Lab 6.0 musste dann darauf geachtet werden, dass die automatische Markierung und Begrenzung der Banden durch das Programm häufig zu fehlerhaften Eingrenzungen der Banden führte. Dieses geschah insbesondere dann, wenn Banden nah beieinander lagen, sodass das Programm nicht sicher zwischen ihnen unterscheiden konnte, sowie bei ERK1/2 und pERK1/2, da hier jeweils zweigipflige Banden abgebildet wurden, da die Antikörper jeweils an beide Untereinheiten banden. Deshalb mussten die Markierungen stets manuell kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert werden. Dadurch blieb die genaue Eingrenzung der Banden

letztendlich ein subjektiver Vorgang. Um die Größe des daraus hervorgehenden Fehlers einschätzen zu können, habe ich am Beispiel  $\alpha$ -SMA getestet, wie sich eine leicht weitere bzw. engere Begrenzung der Banden auf die errechneten Ergebnisse auswirkt. Dabei ließ sich feststellen, dass die entstandenen Abweichungen erst in der dritten bis vierten Dezimalstelle der Ergebnisse auftraten, sodass ich diese als vernachlässigbar bewerten konnte.

Als letzter Punkt sollte noch erwähnt werden, dass aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes und Zeitumfanges allein für die Durchführung der Versuche mit den Zellen eines Spenders, der Spenderumfang auf  $n=8$  begrenzt wurde. Dies könnte dazu geführt haben, dass viele Effekte, die ich bei der Auswertung als Tendenzen aufzeigen konnte, sich nicht als signifikant nachweisen ließen.

## **5.2 Kernaussagen der Arbeit**

Zusammenfassend lässt sich bezogen auf meine Ergebnisse festhalten, dass es, bezüglich der Frage nach dem Einfluss von  $\text{CO}_2$  auf die von mir untersuchten Parameter, neben der bereits durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek aufgedeckten Inhibition von  $\alpha$ -SMA durch die Gasbehandlung lediglich eine weitere signifikante Änderung, nämlich die Zunahme von pSMAD2 in der TGF- $\beta$ -Subgruppe 3 ng/ml und 60 min  $\text{CO}_2$ -Einwirkung, gab. Alle weiteren beschriebenen Erhöhungen oder Erniedrigungen der Parameter sind zwar als Tendenzen vorhanden, aber nicht signifikant. Zu diesen Veränderungen unter  $\text{CO}_2$ -Behandlung gehören sowohl eine Aktivierung der TGF- $\beta$ -Signalkaskade, ein teils ambivalenter Einfluss auf die Inhibitoren dieses Signalweges sowie eine Tendenz zur Steigerung des MAPK-Signalweges und eine Neigung zur verminderten Produktion von ED-A Fibronectin. Um diese Einflüsse der  $\text{CO}_2$ -Behandlung sicher zu verifizieren oder zu widerlegen, bedarf es einer erneuten Testung in einer größeren Stichprobe.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

- „2-Mercaptoethanol M3148“. o. J. 60-24-2. Zugegriffen 13. August 2020. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m3148>.
- „BCA Assay - DE“. o. J. Zugegriffen 13. August 2020. [//www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/bca-protein-assays.html](https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/bca-protein-assays.html).
- Benninghoff, Alfred [Begründer]. 2004. *Anatomie : makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie / Bd. 2 : Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut*. 16., völlig neu bearb. Aufl. München u.a.: Urban & Fischer.
- Berman, Brian, Andrea Maderal, und Brian Raphael. 2017. „Keloids and Hypertrophic Scars: Pathophysiology, Classification, and Treatment“. *Dermatologic Surgery* 43 (Januar): S3–18. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000000819>.
- Böcker, W. 2012. *Pathologie : mit rund 150 Tabellen ; [Plus im Web mediscript]*. 5., vollst. überarb. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Bukvic Mokos, Zrinka, Anamaria Balić, Lovorka Grgurevic, Ivo Dumic-Cule, Kresimir Kostovic, Romana Ceovic, und Branka Marinović. 2017. „Current Therapeutic Approach to Hypertrophic Scars“. *Frontiers in Medicine* 4 (Juni). <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00083>.
- Cargnello, Marie, und Philippe P. Roux. 2011. „Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases“. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 75 (1): 50–83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>.
- Cisternas, P., C.P. Vio, und N.C. Inestrosa. 2014. „Role of Wnt Signaling in Tissue Fibrosis, Lessons from Skeletal Muscle and Kidney“. *Current Molecular Medicine* 14 (4): 510–22. <https://doi.org/10.2174/1566524014666140414210346>.
- Clevers, Hans, und Roel Nusse. 2012. „Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Disease“. *Cell* 149 (6): 1192–1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>.
- Ehrlich, H Paul, und Alexis Desmouliere. 1994. „Morphological and Immunochemical Differences Between Keloid and Hypertrophic Scar“ 145 (1): 9.
- English, Robert S., und Philip D. Shenefelt. 1999. „Keloids and Hypertrophic Scars“. *Dermatologic Surgery*. 1. August 1999. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1524-4725.1999.98257.x>.

- Guan, K. -L. 1994. „The Mitogen Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway: From the Cell Surface to the Nucleus“. *Cellular Signalling* 6 (6): 581–89. [https://doi.org/10.1016/0898-6568\(94\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0898-6568(94)90041-8).
- Guo, Y., L. Xiao, L. Sun, und F. Liu. 2012. „Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling: A Promising New Target for Fibrosis Diseases“. *Physiological Research*, August, 337–46. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932289>.
- Hinz, Boris. 2007. „Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair“. *Journal of Investigative Dermatology* 127 (3): 526–37. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700613>.
- . 2016. „Myofibroblasts“. *Experimental Eye Research*, Role of ocular fibrosis in ophthalmic disease, 142 (Januar): 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.07.009>.
- Leask, Andrew, und David J. Abraham. 2004. „TGF- $\beta$  Signaling and the Fibrotic Response“. *The FASEB Journal* 18 (7): 816–27. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1273rev>.
- Luo, Kunxin. 2017. „Signaling Cross Talk between TGF- $\beta$ /Smad and Other Signaling Pathways“. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (1): a022137. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022137>.
- Luo, Shengkang M. D., Messod Benathan, Wassim M. D. Raffoul, Renato G. M. D. Panizzon, und Daniel V. M. D. Egloff. 2001. „Abnormal Balance between Proliferation and Apoptotic Cell Death in Fibroblasts Derived from Keloid Lesions“. *Plastic & Reconstructive Surgery* 107 (1): 87–96.
- Najafi, Masoud, Amirhossein Ahmadi, und Keywan Mortezaee. 2019. „Extracellular-Signal-Regulated Kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling as a Target for Cancer Therapy: An Updated Review“. *Cell Biology International* 43 (11): 1206–22. <https://doi.org/10.1002/cbin.11187>.
- Nemeth, ALBERT J. 1993. „Keloids and Hypertrophic Scars“. *Journal of Dermatologic Surgery and Oncology* 19 (8): 738–46. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.1993.tb00418.x>.
- Penke, Loka R., und Marc Peters-Golden. 2019. „Molecular Determinants of Mesenchymal Cell Activation in Fibroproliferative Diseases“. *Cellular and Molecular Life Sciences* 76 (21): 4179–4201. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03212-3>.
- Piersma, Bram, Ruud A. Bank, und Miriam Boersema. 2015. „Signaling in Fibrosis: TGF- $\beta$ , WNT, and YAP/TAZ Converge“. *Frontiers in Medicine* 2. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00059>.
- „protein-assay-technical-handook.pdf“. o. J.

- Rao, Sowmya, Jagadish Rao, Jyothi Bm, und Varsha Vk. 2017. „Mysterious Myofibroblast: A Cell with Diverse Origin and Multiple Functions“. *Journal of Interdisciplinary Histopathology*, 1. <https://doi.org/10.5455/jihp.20160622013430>.
- Serini, Guido, Marie-Luce Bochaton-Piallat, Patricia Ropraz, Antoine Geinoz, Laura Borsi, Luciano Zardi, und Giulio Gabbiani. 1998. „The Fibronectin Domain ED-A Is Crucial for Myofibroblastic Phenotype Induction by Transforming Growth Factor- $\beta$ “. *The Journal of Cell Biology* 142: 9.
- Slemp, Alison E, und Richard E Kirschner. 2006. „Keloids and Scars: A Review of Keloids and Scars, Their Pathogenesis, Risk Factors, and Management“: *Current Opinion in Pediatrics* 18 (4): 396–402. <https://doi.org/10.1097/01.mop.0000236389.41462.ef>.
- Sm, Karppinen, Heljasvaara R, Gullberg D, Tasanen K, und Pihlajaniemi T. 2019. „Toward Understanding Scarless Skin Wound Healing and Pathological Scarring.“ *F1000research* 8 (Juni). <https://doi.org/10.12688/f1000research.18293.1>.
- „Sodium dodecyl sulfate L3771“. o. J. Dodecyl sulfate sodium salt. Zugegriffen 13. August 2020. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/l3771>.
- Tzavlaki, Kalliopi, und Aristidis Moustakas. 2020. „TGF- $\beta$  Signaling“. *Biomolecules* 10 (3): 487. <https://doi.org/10.3390/biom10030487>.
- Unahabhokha, Thitita, Apirada Sucontphunt, Ubonthip Nimmannit, Pithi Chanvorachote, Nuttida Yongsanguanchai, und Varisa Pongrakhananon. 2015. „Molecular signalings in keloid disease and current therapeutic approaches from natural based compounds“. *Pharmaceutical Biology* 53 (3): 457–63. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.918157>.
- Vohwinkel, Christine U., Emilia Lecuona, Haying Sun, Natascha Sommer, István Vadász, Navdeep S. Chandel, und Jacob I. Sznajder. 2011. „Elevated CO<sub>2</sub> Levels Cause Mitochondrial Dysfunction and Impair Cell Proliferation“. *Journal of Biological Chemistry* 286 (43): 37067–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.290056>.
- Welsch, Ulrich [Herausgeber]. 2002. *Atlas Histologie : Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; 15 Tabellen*. 6., neu Bearb. Aufl. München u.a.: Urban & Fischer.
- Wolfram, Dolores, Alexandar Tzankov, Petra Pülzl, und Hildegunde Piza-Katzer. 2009. „Hypertrophic Scars and Keloids—A Review of Their Pathophysiology, Risk Factors, and Therapeutic Management“. *Dermatologic Surgery* 35 (2): 171–81. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2008.34406.x>.

- Yan, Zheng, Zhang kui, und Zhu Ping. 2014. „Reviews and Prospectives of Signaling Pathway Analysis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis“. *Autoimmunity Reviews* 13 (10): 1020–25. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.08.028>.
- Zhang, Tao, Xiao-Feng Wang, Zheng-Cai Wang, Dong Lou, Qing-Qing Fang, Yan-Yan Hu, Wan-Yi Zhao, Li-Yun Zhang, Li-Hong Wu, und Wei-Qiang Tan. 2020. „Current Potential Therapeutic Strategies Targeting the TGF- $\beta$ /Smad Signaling Pathway to Attenuate Keloid and Hypertrophic Scar Formation“. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 129 (September): 110287. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110287>.
- Zilberberg, Lior, Vesna Todorovic, Branka Dabovic, Masahito Horiguchi, Thomas Couroussé, Lynn Y. Sakai, und Daniel B. Rifkin. 2012. „Specificity of Latent TGF- $\beta$  Binding Protein (LTBP) Incorporation into Matrix: Role of Fibrillins and Fibronectin“. *Journal of Cellular Physiology* 227 (12): 3828–36. <https://doi.org/10.1002/jcp.24094>.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christoph V. Suschek bedanken, dass ich die Möglichkeit erhalten habe, meine Dissertation im molekularbiologischen Labor der Unfall- und Handchirurgie der Heinrich- Heine-Universität anzufertigen sowie dem gesamten Team des Labors dafür, dass Ihr mich so herzlich in eure Gemeinschaft aufgenommen und meine Arbeit so wundervoll begleitet habt.

Mein weiterer Dank gilt meiner Familie, die mir ebenfalls stets unterstützend zur Seite gestanden hat.

Und zu guter Letzt möchte ich auch meinen Freunden danken. Ohne Euch hätte ich mein Studium nicht mit so viel Freude absolvieren können und auch während der Anfertigung dieser Dissertationsschrift habt Ihr stets dafür gesorgt, dass ich den nötigen Ausgleich zu dieser oftmals mühsamen Arbeit nicht verpasst habe.