

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

**Reduktion der TGF- β -induzierten Differenzierung
von Fibroblasten zu Myofibroblasten durch
therapeutische Verwendung von Kohlenstoffdioxid**

Dissertation

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

vorgelegt von

Till Christophers

2025

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Christian Heiss

Für Frederik

Zusammenfassung

Wundheilungsstörungen sind häufige Komplikationen im klinischen Alltag. Seit langer Zeit ist bereits bekannt, dass die Anwendung von Kohlenstoffdioxid (CO₂) einen positiven Effekt auf die Wundheilung haben kann. So werden z.B. CO₂-Bäder zur Behandlung von chronischen Wunden angewendet. Hypertrophe Narben und Keloide sind Wundheilungsstörungen, die eine erhebliche Herausforderung in der Therapie und der Rezidivprophylaxe darstellen. Pathophysiologisch haben diese Erkrankungen einen Überschuss an Myofibroblasten im erkrankten Gewebe gemein. Auch Fibromatosen und andere fibrosierende Erkrankungen zeigen dieses Charakteristikum auf.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Behandlung von Fibroblasten *in vitro* mit CO₂ einen signifikanten Effekt auf die Myofibrogenese hat. In dieser Arbeit soll dieser Effekt mit verschiedenen Konzentrationen und Behandlungszeiten näher untersucht werden. Zudem soll die Frage geklärt werden, auf welcher Ebene das CO₂ in die hochkomplexen Abläufe der Fibroblastendifferenzierung eingreift.

Es wurden humane Fibroblasten aus Hautresektaten elektiver Reduktionsmamma- oder Abdominalplastiken gesunder Männer und Frauen im Alter von 17 bis 70 Jahren verwendet. Diese wurden in Kultur gebracht, mit *transforming growth factor beta 1* (TGF-β1) zur Differenzierung angeregt und mit einem mit CO₂ versetztem Nährmedium behandelt. Es wurden unterschiedliche Behandlungszeiten und CO₂-Konzentrationen gewählt und die beobachteten Effekte mit mitgeführten unbehandelten Kontrollen verglichen. Als wichtigster Differenzierungsmarker wurde das Protein *alpha-smooth muscle actin* (α-SMA) mittels *Western Blot* quantifiziert. Dieser und andere Differenzierungsmarker wurden ebenfalls auf der Genebene mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) nachgewiesen. Zudem wurde die Auswirkung auf die Anzahl, Viabilität und die Glykolyseaktivität der Zellen untersucht.

Es konnte eine zeit- und konzentrationsabhängige signifikante Hemmung der TGF-β1-induzierten Differenzierung der Fibroblasten beobachtet werden. Die Behandlungsdauer hatte hierbei den größeren Einfluss auf diesen Effekt. Außer α-SMA konnte kein weiterer Differenzierungsmarker identifiziert werden, der durch die CO₂-Behandlung beeinflusst wird. Ebenso konnte kein signifikanter Effekt der Behandlung auf die Zellzahl und die Glykolyseaktivität der Fibroblasten beobachtet werden. Die Untersuchung der Zellviabilität ergab kontroverse Ergebnisse, mit kurz- und langfristiger Hemmung bei kurzer Behandlungsdauer und kurzfristiger Hemmung, dann aber langfristiger Steigerung der Viabilität bei langer Behandlungsdauer.

Zusammenfassend konnte in diesen *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden, dass auch eine kurzfristige Behandlung mit CO₂ eine effektive Möglichkeit bietet, die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten signifikant zu inhibieren. Dies bietet womöglich neue Ansatzpunkte für weiterführende *in vivo* Untersuchungen zur Therapie von fibrosierenden Erkrankungen.

Summary

Wound healing disorders are frequent complications in everyday clinical practice. It has long been known that the application of carbon dioxide (CO₂) can have a positive effect on wound healing. For example, CO₂ baths are used to treat chronic wounds. Hypertrophic scars and keloids are wound healing disorders that pose a considerable challenge in terms of treatment and recurrence prevention. Pathophysiologically, these diseases have an excess of myofibroblasts in the diseased tissue in common. Fibromatoses and other fibrosing diseases also exhibit this characteristic.

It has already been shown that the treatment of fibroblasts in vitro with CO₂ has a significant effect on myofibrogenesis. In this study, this effect is investigated in more detail with different concentrations and treatment times. In addition, the question on which level CO₂ intervenes in the highly complex processes of fibroblast differentiation will be examined.

We used human fibroblasts from skin resectates of elective reduction mammoplasties or abdominoplasties of healthy men and women aged 17 to 70 years. These were cultured, stimulated to differentiate with transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) and treated with a CO₂ saturated culture medium. Different treatment times and CO₂ concentrations were chosen, and the observed effects were compared with untreated controls. The protein alpha-smooth muscle actin (α-SMA) was quantified by Western blot as the most important differentiation marker. The protein α-SMA and other differentiation markers were also detected at gene level using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). In addition, the effect on the number, viability and glycolytic activity of the cells was investigated.

A time- and concentration-dependent significant inhibition of TGF-β1-induced differentiation of fibroblasts was observed. The duration of treatment had the greater influence on this effect. Apart from α-SMA, no other differentiation marker could be identified that was influenced by CO₂ treatment. Likewise, no significant effect of the treatment on the cell number and glycolysis activity of the fibroblasts could be observed. The investigation of cell viability showed controversial results, with short- and long-term inhibition at short treatment duration and short-term inhibition, but then long-term increase in viability at long treatment duration.

In summary, these in vitro studies have shown that even short-term treatment with CO₂ offers an effective way of significantly inhibiting the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts. This may offer new approaches for further in vivo studies on the therapy of fibrosing diseases.

Abkürzungsverzeichnis

A. dest	Aqua destillata	RT	Reverse Transkription
AK	Antikörper	SDS	Natriumdodecylsulfat
APS	Ammoniumpersulfat	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
BCA	Bicinchoninsäure	SMAD	Namenszusammensetzung aus den Genen SMA (small body size) und MAD (mothers against decapentaplegic) die diese Proteine codieren
BSA	Bovines Serumalbumin	TBS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-gepufferte Salzlösung
CO₂	Kohlenstoffdioxid	TBS-T	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-gepufferte Salzlösung + 0,1 % Tween
CTB	CellTiter-Blue®	TEMED	Tetramethylethylendiamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	TGF-β1	Transforming growth factor beta 1
DMSO	Dimethylsulfoxid	TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
dT	Desoxythymidin	WR	Working reagent
FCS	Fetales Kälberserum	α-SMA	Alpha-smooth muscle actin
CypB	Cyclophilin B	°C	Grad Celsius
FoxO1	Forkhead box protein O1	μl	Mikroliter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	cm	Zentimeter
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	g	Gramm
HRP	Meerrettichperoxidase	h	Stunde
Ki-67	Protein Ki-67	l	Liter
NaCl	Natriumchlorid	log	Logarithmus
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat	min	Minute
Nox4	NADPH-Oxidase 4	ml	Milliliter
NP-40	Nonylphenoxypolyethoxyethanol	pH	pondus Hydrogenii
Nrf2	Nuclear factor erythroid related factor-2	rpm	Umdrehungen pro Minute
p	Signifikanzniveau	s	Sekunde
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung	U	Unit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	V	Volt
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin		
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion		
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay		
RNA	Ribonukleinsäure		
RNase	Ribonuklease		
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Haut.....	1
1.1.1	Kutis.....	1
1.1.1.1	Epidermis.....	1
1.1.1.2	Dermis	2
1.1.2	Subkutis	3
1.2	Fibroblasten	3
1.2.1	Myofibrogenese	4
1.2.2	Der TGF- β Signalweg.....	5
1.2.3	Differenzierungsmarker	7
1.2.3.1	Alpha-smooth muscle actin	7
1.2.3.2	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase 4	7
1.2.3.3	Ki-67	8
1.2.3.4	Nuclear factor erythroid related factor-2	8
1.2.3.5	Forkhead box protein O1	8
1.3	Wundheilung.....	9
1.3.1	Phasen	9
1.3.2	Pathologien.....	11
1.3.2.1	Hypertrophe Narben und Keloide	11
1.3.2.2	Fibromatosen	13
1.3.2.3	Therapieformen.....	13
1.4	Medizinisches Kohlenstoffdioxid	14
2	Ziele der Arbeit	16
3	Material	17
3.1	Verbrauchsmaterialien	17
3.2	Chemikalien.....	19
3.3	Enzyme, Seren und Antibiotika.....	20
3.4	Lösungen, Puffer und Medien.....	21
3.4.1	Lösungen.....	21
3.4.2	Puffer	22

3.4.3	Medien	23
3.5	Laborgeräte	24
3.6	Kits	26
3.7	Software	26
4	Methoden	28
4.1	Zellkulturen	28
4.1.1	Codierung der Zellkulturen	28
4.1.2	Isolation der Fibroblasten aus Spendergewebe	29
4.1.3	Zählen der Fibroblasten	30
4.1.4	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen	32
4.1.5	Anlage und Pflege der Zellkulturen	33
4.2	CO ₂ -Gerät	34
4.2.1	Vorbereitung	34
4.2.2	Versetzung des Mediums mit CO ₂	34
4.2.3	Kontrolle der CO ₂ -Konzentration	36
4.2.4	Reinigung	36
4.3	Versuche	37
4.3.1	Zellviabilitätsversuch	37
4.3.2	Differenzierungsversuch	39
4.3.3	Verdünnungsreihenversuch	43
4.3.4	Verdünnungsversuch	44
4.3.5	Differenzierungsversuch für Gennachweise	46
4.3.6	Glukoseverbrauchsversuch	47
4.4	Quantifizierung des Zielproteins α -SMA	50
4.4.1	Protein-Quantifizierung	51
4.4.2	SDS-PAGE	53
4.4.2.1	Herstellung der SDS-Gele	53
4.4.2.2	Vorbereitung des Elektrophorese-Systems	55
4.4.2.3	Vorbereitung der Proben	56
4.4.2.4	Durchführung	57
4.4.3	Proteintransfer	58
4.4.4	Immunmarkierung	59

4.4.5	Proteindetektion	61
4.4.6	Auswertung	62
4.5	Polymerase-Kettenreaktion	63
4.5.1	Vorbereitung und Aufreinigung	64
4.5.2	Gesamt-RNA-Quantifizierung	65
4.5.3	Reverse Transkription	66
4.5.4	Messung und Auswertung	68
4.6	Gesamt-DNA-Quantifizierung	70
4.7	Autoklavieren	71
4.7.1	Laborutensilien	71
4.7.2	Abfälle	71
5	Ergebnisse	73
5.1	Erkenntnisse aus Vorarbeiten	73
5.2	Zellviabilitätsversuch	74
5.3	Differenzierungsversuch	78
5.4	Verdünnungsreihenversuch	81
5.5	Verdünnungsversuch	83
5.6	Differenzierungsversuch für Gennachweise	84
5.6.1	Alpha-smooth muscle actin	85
5.6.2	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase 4	87
5.6.3	Ki-67	88
5.6.4	Nuclear factor erythroid related factor-2	89
5.6.5	Forkhead box protein O1	90
5.7	Glukoseverbrauchsversuch	91
6	Diskussion	93
7	Schlussfolgerung und Ausblick	100
8	Literatur- und Quellenverzeichnis	102
9	Darstellungsverzeichnis	106

1 Einleitung

1.1 Haut

Die Haut umfasst bei einem Erwachsenen eine Fläche von bis zu 2,0 m² und ist somit das größte Organ des Menschen. Sie setzt sich aus der Kutis, die in Epidermis und Dermis unterteilt wird und der Subkutis zusammen. Die Hautanhangsgebilde, zu denen Haarfollikel, Hautdrüsen und Nägel zählen, werden ebenfalls dem Organ Haut zugeordnet. An den Handinnenflächen und Fußsohlen (*Palmae* und *Plantae*) befindet sich die sogenannte Leistenhaut. Diese zeichnet sich durch ein besonders zahlreiches Vorkommen von Schweißdrüsen und Mechanorezeptoren aus. Zudem besitzt sie anders als die Felderhaut, die am restlichen Körper zu finden ist, keine Haarfollikel. Die Haut als Grenzorgan zur Umwelt übernimmt vielfältige Funktionen, so erfüllt sie neben der Aufnahme von Sinnesreizen vor allem eine Schutzfunktion für den Körper. Hierzu gehören unter anderem der Schutz vor mechanischen, thermischen, chemisch-toxischen, mikrobiellen, sowie viralen Einflüssen, vor ultravioletter Strahlung und Austrocknung. (MOLL *et al.*, 2010)

1.1.1 Kutis

Die Kutis, die je nach Körperregion eine Dicke von 1 – 2 mm aufweist, macht ca. 15 % des Körpergewichts aus. Sie lässt sich in Epidermis und Dermis unterteilen, die histologisch durch eine Basalmembran, die *Membrana basalis* voneinander getrennt sind. (AUMÜLLER *et al.*, 2010)

1.1.1.1 Epidermis

Die Epidermis bildet die äußerste Schicht der Haut und somit die Grenze des Körpers zur Umwelt. Sie besteht zu über 90 % aus Keratinozyten und bildet ein mehrschichtig verhornendes Plattenepithel. Die Epidermis wird in vier bzw. fünf Schichten unterteilt. (AUMÜLLER *et al.*, 2010; MOLL *et al.*, 2010)

Die äußerste Hornschicht, das *Stratum corneum* besteht aus avitalen Keratinozyten, die in Form von Schuppen nach und nach abgeschilfert werden. Sie trägt vor allem zum Schutz der darunterliegenden Hautschichten und zur Aufrechterhaltung des inneren Milieus bei. In der Leistenhaut schließt sich der Hornschicht die sogenannte helle Schicht (*Stratum lucidum*) an. Diese Schicht markiert den Übergang von vitalen zu avitalen, verhornenden Zellen. In der Felderhaut folgt der Hornschicht direkt die Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*). Die Zellen dieser Schicht befinden sich in Differenzierungs- und Apoptosevorgängen, sie bilden Hornmaterial und Kittsubstanzen. Darunter befindet sich die Stachenzellschicht (*Stratum spinosum*). Die Zellen dieser Schicht weisen kleine stachelartige Ausläufer auf, mit denen sie sowohl miteinander, als auch mit den Zellen der letzten Schicht der Epidermis, der Basalschicht (*Stratum basale*), eine feste Verbindung eingehen. Dies sorgt für Stabilität und verhindert Abschilferungen. (AUMÜLLER *et al.*, 2010; JUNQUEIRA *et al.*, 2004; WELSCH UND SOBOTTA, 2006)

1.1.1.2 Dermis

Die Dermis ist eine bindegewebige Schicht, die fest mit der darüberliegenden Epidermis verzahnt ist und für die mechanische Festigkeit und Elastizität der Haut sorgt. Sie lässt sich in die Papillarschicht (*Stratum papillare*) und die Geflechschicht (*Stratum reticulare*) unterteilen. Diese beiden Schichten gehen ineinander über und können histologisch anhand ihrer Gewebsbestandteile unterschieden werden. (JUNQUEIRA *et al.*, 2004)

Direkt angrenzend an die Basalmembran unter der Epidermis liegt die Papillarschicht. Diese macht lediglich 20 % der Dermis aus und besteht vor allem aus kollagenen Fasern und lockerem Bindegewebe. Sie bildet viele kleine Papillen aus, die in die Epidermis ragen und sich so über Kollagenfibrillen fest mit dieser verzahnen. Die dominierenden Zellen dieses Bindegewebes sind die Fibroblasten, die hier in unterschiedlichen Aktivitäts- und Differenzierungsstadien (1.2) vorkommen. Auch Gefäß- und Lymphkapillaren, Nervenaußenzweigungen, Tastkörperchen und freie Zellen wie Mastzellen und Makrophagen sind hier lokalisiert. Die Geflechschicht

macht die restlichen 80 % der Dermis aus. Sie weist weniger Zellen, dafür mehr Kollagen und elastische Fasern als die Papillarschicht auf. Hierbei handelt es sich vor allem um starke kollagene Faserbündel, die die mechanischen Schutzfunktion und Elastizität der Haut vermitteln. (JUNQUEIRA *et al.*, 2004; WELSCH UND SOBOTTA, 2006; MOLL *et al.*, 2010)

1.1.2 Subkutis

Die Subkutis ist eine je nach Körperregion und Ernährungszustand quantitativ variierende Schicht aus Fettgewebe, das durch lockeres Bindegewebe in läppchenartige Strukturen septiert wird. Sie besteht überwiegend aus Adipozyten und verbindet die Dermis mit der oberflächlichen Körperfaszie. Somit sorgt sie für die Verschieblichkeit der Haut zu den darunterliegenden Strukturen. Darüber hinaus fungiert sie als Energiereserve, Wärmeisolation und Druckpolster und spielt auch in der Druck- und Vibrationswahrnehmung eine Rolle. (JUNQUEIRA *et al.*, 2004; WELSCH UND SOBOTTA, 2006)

1.2 Fibroblasten

Fibroblasten sind Zellen des Bindegewebes, die in vielen unterschiedlichen Organen des menschlichen Körpers vorkommen. In der Haut machen sie den größten zellulären Anteil des dermalen Bindegewebes aus und sind maßgeblich für dessen Stabilität und die Synthese der extrazellulären Matrix verantwortlich (MOLL *et al.*, 2010). In ruhendem Zustand auch Fibrozyten genannt, liegen diese inaktiv im Bindegewebe und bilden mit ihren untereinander verbundenen spindelförmigen Zellfortsätzen ein dreidimensionales Netz, was für dessen Stabilität sorgt. Sie können bei Bedarf, wie z.B. bei einer Verletzung, rekrutiert bzw. aktiviert werden. Die Fibroblasten differenzieren dann zu sogenannten Myofibroblasten. Dieser Vorgang nennt sich Myofibrogenese (1.2.1). Sie migrieren zum Ort der Verletzung und spielen dort in der Wundheilung (1.3) eine wichtige Rolle. (METZ, 2003)

1.2.1 Myofibrogenese

Unter bestimmten Voraussetzungen kommt es physiologisch z.B. bei der Wundheilung der Haut, aber auch pathologisch bei verschiedenen fibrotischen Erkrankungen, unter Einfluss verschiedener Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu einer Differenzierung der Fibroblasten zu sogenannten Myofibroblasten (DISTLER *et al.*, 2019; WEISKIRCHEN *et al.*, 2019). Diesen Vorgang bezeichnet man als Myofibrogenese. Die Myofibroblasten besitzen kontraktile Kräfte und vermitteln damit z.B. die Wundkontraktion in der Wundheilung (DARBY *et al.*, 2014).

Bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten ist vor allem das Zytokin *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) zu nennen, das unter anderem bei einer Verletzung von Gewebe freigesetzt wird. Durch das Durchlaufen des sogenannten TGF- β -Signalweges (1.2.2) wird die Zelle zur Expression des Proteins *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) (1.2.3.1) angeregt, welches die Myofibroblasten zur Kontraktilität befähigt. Dieses Protein wird in die sogenannten Stressfasern der Zellen eingebaut und erhöht deren Kräfte erheblich. Da die Zellen starke Verbindungen mit der extrazellulären Matrix eingehen, wird diese nun ebenfalls kontrahiert und remodelliert. Zusätzlich werden durch den mechanischen Stress umliegende Fibroblasten zur Differenzierung angeregt. Es entsteht ein mechanischer Kreislauf. Dieser wird unterbrochen, sobald die extrazelluläre Matrix wieder organisiert ist und die mechanische Last trägt. Die Myofibroblasten gehen dann in Apoptose. Das Protein α -SMA ist charakteristisch für Myofibroblasten und der zuverlässigste Marker für die Quantifizierung von Myofibroblasten *in vitro*. (VAUGHAN *et al.*, 2000; HINZ, 2007; DARBY *et al.*, 2014; RAO *et al.*, 2014)

In dieser Arbeit wird das Protein α -SMA mittels *Western Blot* und quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) quantifiziert und als Maß für die Differenzierung der Fibroblasten herangezogen (4.4).

1.2.2 Der TGF- β Signalweg

Der TGF- β Signalweg ist ein Bestandteil von vielen zellulären Prozessen des menschlichen Körpers. Die drei bekannten Isoformen TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 sind Zytokine der sogenannten TGF- β -Familie. Diese Signalmoleküle verfügen über die Fähigkeit, eine Zelle zur Transformation bzw. Differenzierung (*transforming*) und als Wachstumsfaktor (*growth factor*) zur Proliferation und zum Wachstum anzuregen. Auch in der zellulären Adhäsion, Migration und Apoptose haben diese Zytokine Relevanz. Wie bereits beschrieben, spielt besonders die erste Isoform, der TGF- β 1, eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten und ist somit ein wichtiger Faktor in der Wundheilung. (DESMOULIERE *et al.*, 1993; BIERNACKA *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2018)

Der Signalweg wird in Abb. 1 schematisch dargestellt. Kurz nach der Synthese dimerisieren die TGF- β 1-Moleküle und bilden einen Komplex mit dem sogenannten latenten TGF- β -Bindungsprotein. Sie liegen somit in einer latenten, inaktiven Form vor (KOLI *et al.*, 2001). Verschiedene Faktoren wie das Enzym Plasmin, Proteine wie Thrombospondin-1 und Integrine, aber auch Schwankungen in Temperatur und pH-Wert und generell Vorgänge, bei denen es zu einem Anstieg von ROS im Extrazellularraum kommt, können zu einer Aktivierung der latenten Form führen. (HYTTIÄINEN *et al.*, 2004)

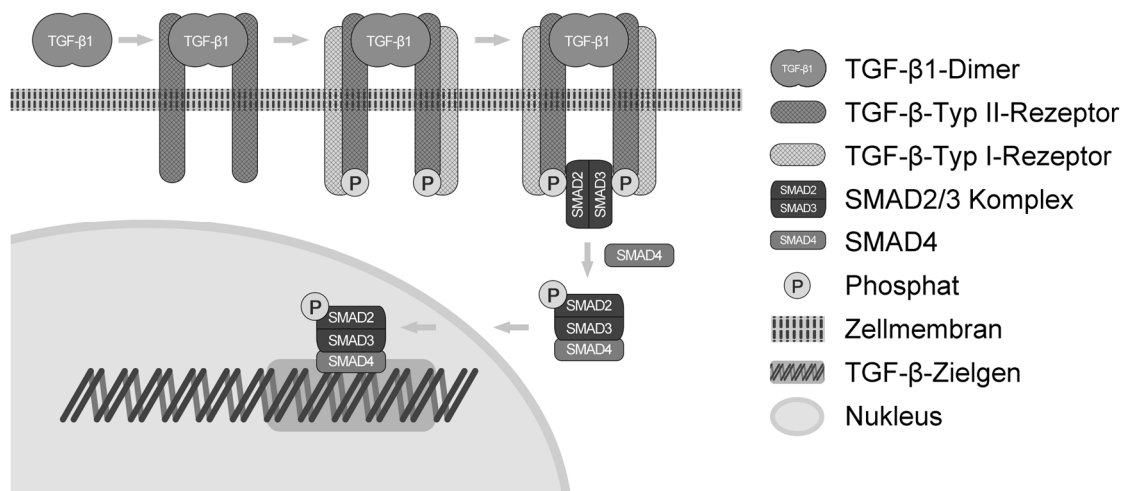


Abb. 1: Vereinfachte schematische Darstellung des TGF- β 1-Signalwegs.

Der im Extrazellularraum befindliche *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1)-Dimer bindet an einen heteromeren TGF- β -Typ-II-Rezeptor an der Zellmembran. Der TGF- β -Typ-I-Rezeptor wird nun rekrutiert und der entstandene Rezeptorkomplex durch Auto-phosphorylierung aktiviert. Dieser aktiviert nun die intrazellulären Proteine *small body size/mothers against decapentaplegic* (SMAD)2 und SMAD3, die zusammen mit SMAD4 einen Komplex bilden. Dieser Komplex wandert nun in den Nukleus ein, bindet dort am TGF- β -Zielgen an der DNA und startet die Genexpression.

Wird der Komplex aktiviert, bindet das TGF- β 1-Dimer an dem heteromeren TGF- β -Typ-II-Rezeptor an der Zellmembran des Fibroblasten. Durch Rekrutierung des TGF- β -Typ-I-Rezeptors bildet sich ein Rezeptorkomplex. Dieser wird nun durch Autophosphorylierung aktiviert. Der aktivierte Rezeptorkomplex phosphoryliert nun wiederum die intrazellulären Proteine *small body size/mothers against decapentaplegic* (SMAD)2 und SMAD3, die daraufhin mit dem *common-mediator*-SMAD (co-SMAD, SMAD4) einen Komplex bilden (CHAUDHURY UND HOWE, 2009). Der entstandene Komplex aus SMAD2, -3 und -4 wandert in den Zellkern ein und sorgt dort durch Bindung an den Zielgenen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) für die TGF- β -spezifische Genexpression. Hierdurch wird unter anderem die Differenzierung der Zelle initiiert. (WRANA UND ATTISANO, 2000)

1.2.3 Differenzierungsmarker

In dieser Arbeit werden insgesamt fünf Differenzierungs- bzw. Proliferationsmarker untersucht, um zu beleuchten, auf welcher Ebene in den Prozess der Differenzierung eingegriffen wird.

1.2.3.1 Alpha-smooth muscle actin

Das Protein α -SMA ist ein Aktin, welches normalerweise in Zellen der glatten Muskulatur, z.B. in den Wänden von Hohlorganen, wie Blutgefäßen, dem Darm, sowie den Atem- und Harnwegen zu finden ist. Das α -SMA kommt aber auch in bestimmten „Nicht-Muskelzellen“ wie den Myofibroblasten (1.2.1) vor und befähigt diese Zellen unter anderem zur Kontraktilität. (WANG *et al.*, 2006; ISHIGURO *et al.*, 2009)

Das α -SMA gilt als der zuverlässigste Marker für die Quantifizierung ausdifferenzierter Myofibroblasten *in vitro*. (VAUGHAN *et al.*, 2000; RAO *et al.*, 2014; DARBY *et al.*, 2014)

1.2.3.2 Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase 4

Das Protein Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase 4 (Nox4) ist ein membranassoziiertes Enzym, welches die Bildung von ROS, vor allem die des Hyperoxid-Anions katalysiert. ROS fungieren als wichtige Signalmoleküle in humanen Zellen. Auch bei der Myofibrogenese im TGF- β -Signalweg (1.2.2) spielt Nox4 eine Rolle, indem es die dauerhafte Aktivierung des SMAD 2/3-Komplexes reguliert. Dieser Effekt wurde in kardialen, pulmonalen, renalen, hepatischen und dermalen Fibroblasten nachgewiesen. (CUCORANU *et al.*, 2005; HECKER *et al.*, 2009; BARNES UND GORIN, 2011; BABALOLA *et al.*, 2014)

1.2.3.3 Ki-67

Das Protein Ki-67 wurde bei seiner Erstbeschreibung in proliferierenden Zellen, nicht aber in ruhenden nachgewiesen und wird seither vor allem als Tumor-Proliferationsmarker in der Onkologie angewendet (GERDES *et al.*, 1983). Das Protein fungiert als wichtiger Bestandteil in der Zellzyklusprogression. In der Mitose ist es an der Ausbildung einer perichromosomalen Schicht beteiligt und verhindert ein Verkleben der kondensierten Chromosomen. In der Ruhephase des Zellzyklus fällt die Konzentration des Ki-67 Proteins in der Zelle ab. (SUN UND KAUFMAN, 2018) Auch bei der Proliferation humaner Fibroblasten wurde die Expression des Ki-67 Proteins nachgewiesen (SUN *et al.*, 2017).

In dieser Arbeit wird die Expression des Ki-67 Proteins zur Untersuchung einer möglichen Zytotoxizität oder Wachstumsinhibition durch die Behandlung der Zellkulturen quantifiziert.

1.2.3.4 Nuclear factor erythroid related factor-2

Das Protein *nuclear factor erythroid related factor-2* (Nrf2) ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von Enzymen mit antioxidativen, zytoprotektiven und entgiftenden Eigenschaften vermittelt. Er kann als Gegenspieler der Nox4 (1.2.3.2) verstanden werden und erzeugt durch Inaktivierung der ROS ein Redox-Gleichgewicht in der Zelle. (AUDOUSSET *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2022) Somit spielt der Nrf2 auch in der Myofibrogenese eine wichtige Rolle. Eine vermehrte Expression führt zu Verringerung des Differenzierungspotentials und kann auch zu einer Dedifferenzierung von Myofibroblasten zurück zu ruhenden Fibroblasten führen. (ARTAUD-MACARI *et al.*, 2013)

1.2.3.5 Forkhead box protein O1

Das Protein *forkhead box protein O1* (FoxO1) ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Regulation vieler Funktionen von Zellen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose zuständig ist. Auch in der Myofibrogenese

spielt das FoxO1 eine wichtige Rolle. Es wurde an kardialen Fibroblasten gezeigt, dass FoxO1 essenziell für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten ist. Eine Überexpression von FoxO1 führte zu einer vermehrten TGF- β 1-induzierte Differenzierung und andersherum inhibierte ein *knockout* des FoxO1-Gens die Differenzierung. Der genaue Mechanismus dahinter ist jedoch unbekannt. (VIVAR *et al.*, 2016; NORAMBUENA-SOTO *et al.*, 2017)

1.3 Wundheilung

Eine Wunde ist ein pathologischer Zustand, der durch eine Durchtrennung und Zerstörung von Gewebe durch äußere Einflüsse und eine daraus resultierende Funktionseinschränkung gekennzeichnet ist. Bei einer Wunde der Haut kann es zu einem Verlust deren Barriere- bzw. Schutzfunktion und zu einem Austritt von Blut und Serum kommen. Dies kann je nach Ausmaß zu schwerwiegenden Komplikationen bis hin zum Tod führen, weshalb neben einer optimalen Wundversorgung, eine funktionierende Wundheilung unabdingbar ist. (HENNE-BRUNS *et al.*, 2012; NIETHARD *et al.*, 2014)

Die Wundheilung, also der Defektverschluss durch vernarbendes Bindegewebe und Epithelregeneration, kann in drei sich überschneidende und teilweise parallel ablaufende Phasen gegliedert werden. Man unterscheidet die Exsudations-, die Proliferations- und die Regenerationsphase. In diesen Phasen spielen die Fibroblasten bzw. deren Differenzierung zu Myofibroblasten eine entscheidende Rolle. Störungen in diesen komplexen Abläufen, können zu atypischen, also krankhaften Verläufen führen. (HINZ, 2007; HENNE-BRUNS *et al.*, 2012)

1.3.1 Phasen

Die Exsudationsphase beginnt unmittelbar nach der Verletzung und dauert etwa 3 Tage an (NIETHARD *et al.*, 2014). In dieser Phase kommt es zur Hämostase, also zur Blutstillung und zu einem provisorischen

Wundverschluss durch einen Fibrinthrombus. Initial tritt eine Vasokonstriktion der verletzten Blut- und Lymphgefäße auf, wodurch die Blutung in den Wundspalt sistiert. Außerdem heften sich Thrombozyten an die geschädigten Gefäßwände an und vernetzen sich miteinander, wodurch ein Thrombozytenpfropf entsteht. Hierbei werden Gerinnungsfaktoren freigesetzt, welche die Blutgerinnung initiieren. Am Ende dieser Gerinnungskaskade wird schließlich Fibrinogen zu Fibrin umgewandelt und es entsteht ein stabiler, quervernetzter Fibrinthrombus (BAUM UND ARPEY, 2005; WILD UND AUBÖCK, 2007). Aus diesem und dem umgebenen Wundgewebe werden proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie TGF- β 1 freigesetzt. Hierdurch kommt es zur Migration von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen in die Wunde, die unter anderem für die Säuberung und immunologische Überwachung zuständig sind. Die Makrophagen stimulieren zusätzlich Fibroblasten, sowie epitheliale und endotheliale Zellen, und leiten somit den Übergang in die Proliferationsphase ein (GUO UND DIPIETRO, 2010).

Die Proliferationsphase findet etwa vom 2. bis zum 20. Tag nach der Verletzung statt (NIETHARD *et al.*, 2014). In dieser Phase der Wundheilung wird der provisorische Fibrinthrombus durch Granulationsgewebe ersetzt. Hierbei kommt es zur Einwanderung von Fibroblasten, epithelialen und endothelialen Zellen. Die epithelialen Zellen proliferieren und migrieren über die provisorische Matrix, wodurch die Barrierefunktion der Haut wiederaufgebaut wird. Dies wird als Reepithelialisierung bezeichnet (GUO UND DIPIETRO, 2010). Durch die Angiogeneese, also das Einsprossen neuer Blutgefäße in die Wunde, wird die Versorgung des verletzten Gewebes mit Sauerstoff und den für die Wundheilung wichtigen Nährstoffen wiederhergestellt. Dies trägt dazu bei, dass einwandernde Fibroblasten proliferieren und Kollagen, sowie andere wichtige Bestandteile der extrazellulären Matrix synthetisieren. Sie bilden somit das Granulationsgewebe, was der Wunde mechanische Stabilität verleiht (BROUGHTON *et al.*, 2006).

Die Regenerationsphase beginnt etwa am dritten Tag nach der Verletzung und kann bis zu zwei Jahren dauern (WILD UND AUBÖCK, 2007; NIETHARD *et al.*, 2014). In dieser Phase wird die extrazelluläre Matrix der Wunde organisiert und komprimiert. Fibroblasten lysieren alte Matrix und

produzieren neue, wodurch eine, der gesunden Haut ähnliche Architektur wiederhergestellt wird. Kollagen vom Typ III wird resorbiert und vor allem an den Hautspannungslinien durch das dickere und besser organisierte Kollagen Typ I ersetzt (CAMPOS *et al.*, 2008). Die Fibroblasten fangen an, sich unter Einfluss des TGF- β 1 zu Myofibroblasten zu differenzieren und sorgen mit ihren, durch das α -SMA vermittelten, kontraktilen Kräften für eine Kontraktion der Wunde (DESMOULIERE *et al.*, 1993; HINZ, 2007). Zusätzlich kommt es zu einer langsamen Rückbildung der vielen neu gebildeten Blutgefäße, sodass wieder eine normale vaskuläre Dichte erreicht wird. Diese Prozesse sorgen im Verlauf der Regenerationsphase für eine stabile Narbe, welche die Funktionen der Haut weitestgehend wieder gewährleistet (GUO UND DIPIETRO, 2010). In der normalen Wundheilung kommt es schließlich am Ende der dritten Phase zu einer durch Apoptose vermittelten Rarefizierung der Myofibroblasten im gebildeten Narbengewebe (TAN UND WU, 2017).

Sind diese Abläufe gestört, kann es zur atypischen Wundheilung kommen, was z.B. Narbenkontrakturen und die Ausbildung von hypertrophen Narben oder Keloiden zur Folge haben kann. Die genauen Mechanismen sind allerdings noch nicht gänzlich verstanden (LUO *et al.*, 2001).

1.3.2 Pathologien

Es gibt viele Pathologien, die durch eine Störung der Wundheilung entstehen können. Für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind aber die hypertrophen Narben und Keloide, da diese sich durch einen Überschuss an Myofibroblasten auszeichnen. Auch die Fibromatosen finden in diesem Zusammenhang Erwähnung. Sie gehören zwar nicht zu den Wundheilungsstörungen, zeigen aber ebenso einen Überschuss an Myofibroblasten im erkrankten Gewebe.

1.3.2.1 Hypertrophe Narben und Keloide

Bei einer gestörten Wundheilung kann es zu einer Bildung von hypertrophen Narben oder Keloiden kommen. Unter einer hypertrophen Narbe

versteht man eine Erhebung des Narbengewebes über das Hautniveau, wobei sich die Ausdehnung des Gewebes grundsätzlich auf den Bereich der ursprünglichen Hautläsion beschränkt. Ein Keloid zeigt keine Beschränkung auf diesen Bereich und oft eine Invasion des umliegenden Gewebes. (BAYAT *et al.*, 2003)

Der Entstehung von Keloiden und hypertrophen Narben liegt zunächst eine Irritation oder Verletzung der Haut zugrunde. Dazu zählen Traumata, Verbrennungen, Operationen, aber auch Piercings, Akne und die durch das Varizella-Zoster-Virus ausgelöste sogenannte Gürtelrose.

Es wird vermutet, dass beiden Krankheitsbildern derselbe entzündliche fibroproliferative Mechanismus zugrunde liegt und sie sich lediglich durch die Dauer und Intensität dieser Entzündung unterscheiden. Diese wird von verschiedenen Risikofaktoren beeinflusst: genetische Risikofaktoren, wie z.B. der Einzelnukleotid-Polymorphismus oder genetisch bedingte Erkrankungen wie das Rubinstein-Taybi-Syndrom, systemische Risikofaktoren, wie z.B. Schwangerschaft oder Hypertonie, lokale Risikofaktoren, wie z.B. die Lokalisation der Verletzung an besonders beanspruchten Körperregionen, wie im Bereich von Gelenken, dem Hals oder Thorax, und Risikofaktoren des Lebensstils, wie z.B. Ernährung und Alkoholkonsum, aber auch langes heißes Baden. (OGAWA *et al.*, 2020)

Der genaue Pathomechanismus der Entstehung von hypertrophen Narben und Keloiden ist noch nicht vollständig verstanden. Untersuchungen lassen jedoch vermuten, dass bei beiden Krankheitsbildern eine Dysbalance zwischen der Zellproliferation und des apoptotischen Zelltodes von Fibroblasten und Myofibroblasten in der Wundheilung bzw. der Narbenbildung eine wichtige Rolle spielt. Durch eine erhöhte Proliferationsrate und eine verringerte Apoptoserate kommt es zu einem Überschuss an Fibroblasten und Myofibroblasten und somit zu einer massiv überschüssigen Produktion von extrazellulärer Matrix. (LUO *et al.*, 2001; GRABOWSKI *et al.*, 2020)

1.3.2.2 Fibromatosen

Fibromatosen zählen nicht zu den Wundheilungsstörungen, dennoch weisen sie einige Ähnlichkeiten zu den bereits dargestellten fibroblastenassoziierten Pathologien auf, weshalb sie an dieser Stelle ebenfalls kurz vorgestellt werden.

Unter einer Fibromatose versteht man eine gutartige Wucherung von Bindegewebe, die an verschiedensten Stellen des Körpers auftreten kann. Die wohl bekanntesten Vertreter der Fibromatosen sind die palmare Fibromatose, auch Morbus Dupuytren genannt und dessen plantares Korrelat der Morbus Ledderhose. Bei diesen Erkrankungen, die auch als oberflächliche Fibromatosen zusammengefasst werden, kommt es zu Kontrakturen im Bereich der Handinnenfläche bzw. Fußsohle (STEWART UND NASCIMENTO, 2021). Die Kontrakturen weisen überwiegend Fibroblasten mit einer hohen Expression von α -SMA auf. Es kommt also wie bei hypertrophen Narben und Keloiden (1.3.2.1) ebenfalls zu einer überschießenden Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten, sowie einer verringerten Apoptoserate dieser Zellen. (TOMASEK UND RAYAN, 1995; VERJEE *et al.*, 2009; CARROLL *et al.*, 2018)

Die Mechanismen der Entstehung dieser Dysbalance sind wie bei der Entstehung von hypertrophen Narben und Keloiden auch hier noch nicht gänzlich verstanden. Es wurde der Einfluss verschiedener Zytokine, unter anderem auch der des TGF- β -1 nachgewiesen und über 20 verschiedene Genloci identifiziert, die in der Pathophysiologie dieser Erkrankungen eine Rolle spielen. (WALTHALL *et al.*, 2022)

1.3.2.3 Therapieformen

Es existieren zahlreiche Therapieformen mit verschiedenen Ansätzen zur Behandlung von Wundheilungsstörungen (1.3.2.1) und Fibromatosen (1.3.2.2). Da wie bereits dargestellt einige Überschneidungen auf zellulärer Ebene und im Pathomechanismus dieser Erkrankungen bestehen, ähneln sich auch die Ansätze der Therapieregime dieser Krankheitsbilder.

Zunächst ist die invasive Therapie einerseits mittels chirurgischer Revision und Exzision bei hypertrophen Narben und Keloiden und andererseits mittels der Fasziektomie und Exzision bei der palmaren und plantaren Fibromatose als größter Baustein der multimodalen Therapieschemata zu nennen. Aber auch in der konservativen Therapie zeigen sich einige Überschneidungen. Die Radiatio, Laser-, Licht- und extrakorporale Stoßwellentherapie, sowie medikamentöse Ansätze wie die Injektion von Botulinumtoxin, 5-Fluorouracil, Kollagenasen oder Steroiden oder auch die topische Anwendung von Steroiden, Imiquimod oder Tamoxifen finden sich in der Literatur. (BERMAN *et al.*, 2017; LEE UND JANG, 2018; WANG *et al.*, 2018; FUIANO *et al.*, 2019; GRABOWSKI *et al.*, 2020; OGAWA *et al.*, 2020; RIVERS UND ZARBAFIAN, 2021; WALTHALL *et al.*, 2022; TRUONG *et al.*, 2022)

Da die Monotherapie dieser Krankheitsbilder im Allgemeinen eine sehr hohe Rezidivrate aufweist, wird in vielen Fällen auf eine Kombinationstherapie der verschiedenen Verfahren zurückgegriffen. Eine adjuvante Radiatio oder auch die prä- und postoperative medikamentöse Behandlung sind typische Therapieregime, um eine niedrigere Rezidivrate zu erreichen. (BAYAT *et al.*, 2003; FUIANO *et al.*, 2019)

Sowohl die Radiatio als auch einige medikamentöse Therapieansätze wie die Behandlung mit Steroiden, Tamoxifen, Botulinumtoxin, 5-Fluorouracil greifen unter anderem über den TGF- β Signalweg (1.2.2) in den Differenzierungsprozess von Myofibroblasten ein. Sie haben somit einen grundlegenden biochemischen Mechanismus, der bei diesen Krankheitsbildern eine wichtige Rolle spielt, gemein. (LEE UND JANG, 2018; CARROLL *et al.*, 2018)

1.4 Medizinisches Kohlenstoffdioxid

Kohlenstoffdioxid (CO₂) kommt in vielen Bereichen der Medizin zur Therapie von Erkrankungen oder zur Unterstützung der Wundheilung zur Anwendung. Es wird sowohl gasförmig als auch in wässriger Lösung, topisch oder als Injektion verabreicht. Vorteile der CO₂-Therapie sind ein

sehr geringes Nebenwirkungspotential, sowie eine einfache Anwendung (BRANDI *et al.*, 2010).

Ein häufig beschriebener Effekt der CO₂-Therapie ist die Vasodilatation. Dieser Effekt wird beispielsweise zur Therapie von chronischen Wunden genutzt, die durch eine Hypoxie des Gewebes verursacht sind. Beispiele hierfür sind die häufig diabetesassoziierte periphere arterielle Verschlusskrankheit und die chronisch venöse Insuffizienz. Durch die Vasodilatation kommt es zu einer verbesserten Durchblutung und somit auch Oxygenierung des betroffenen Areals (DÖNMEZ *et al.*, 2008; BRANDI *et al.*, 2010).

Auch in der Therapie von Verbrennungswunden spielt CO₂ eine wichtige Rolle. Auch hier wird die Verbesserung der Mikrozirkulation, aber z.B. auch die verbesserte Reepithelisierung nach Hauttransplantation beschrieben. Es kommen Anwendungen in wässriger Lösung als CO₂-Bad, aber auch gasförmige Applikationen als sogenannte trockene Anwendungsform mittels einer Gaseinleitung in eine, die Wunde umschließende, Plastiktüte oder Klebefolie zum Einsatz (TENENHAUS UND RENNEKAMPFF, 2012; SORG *et al.*, 2012).

Die subkutane Injektionstherapie von CO₂, die sogenannte Carboxytherapie, findet vor allem in der kosmetischen Dermatologie Anwendung. Hierbei wird das sterile Gas direkt unter die Haut gespritzt. Indikationen für diese Art der Anwendung sind unter anderem unästhetische Narben, Cellulite oder Dehnungsstreifen, aber auch dermatologische Erkrankungen wie die chronische Schuppenflechte, der kreisrunde Haarausfall oder die Rosazea. (SEIDEL UND MOY, 2015; KROUMPOUZOS *et al.*, 2022)

In der Literatur wird eine grundsätzliche Verbesserung der Wundheilung durch die CO₂-Behandlung z.B. nach Verbrennung beschrieben. In der Prävention oder Behandlung von Kontrakturen, die eine häufige Komplikation einer gestörten Wundheilung darstellen wie in der Therapie von hypertrophen Narben, Keloiden, aber auch bei Fibromatosen hat die CO₂-Therapie in der Literatur bis dato wenig bis keinen Stellenwert.

2 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die möglichen Angriffspunkte einer CO₂-Behandlung in den Differenzierungsprozess von Fibroblasten zu Myofibroblasten untersucht werden. Auch die Dosis-Wirkungs-Verhältnisse und eine mögliche Effektsättigung sollen analysiert werden. Hierzu wird aufbauend auf bereits gewonnene Erkenntnisse aus unserer Arbeitsgruppe mit verschiedenen Konzentrationen und Behandlungszeiten gearbeitet. Zudem sollen einige Ansätze zu den zugrundeliegenden Mechanismen der Einflussnahme des CO₂ auf die Myofibrogenese geprüft werden.

Ausblickend sollen die durch diese Arbeit gewonnen Erkenntnisse die Basis für weitergehende Forschung zur CO₂-Therapie als mögliche additive Behandlungsmöglichkeit für Wundheilungsstörungen und Fibromatosen schaffen.

3 Material

3.1 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Produktbezeichnung	Produzent
24-Well-Platte	24-Well-Platten für Zellkulturen aus Polystyrol, steril, mit Deckel	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
96-Well-Platte	MicroAmp™ optische 96-Well-Reaktionsplatte	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, US
Abwurfbeutel	Vernichtungsbeutel aus Polypropylen, autoklavierbar bis 121 °C	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Aufreinigungssäulen	RNeasy-Spinsäulen mit Silikamembran und Sammelröhrchen	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
Autoklavier-Indikatorband	Comply™ Steam Indicator Tape, Class 1	3M Deutschland GmbH, Neuss, DE
Blotting-Membran	Nitrocellulose Blotting-Membran (Porengröße 0,2 µm)	VWR International, LLC., Radnor, US
Blotting-Membran	Nitrocellulose Blotting-Membran (Porengröße 0,2µm)	VWR International, LLC., Radnor, US
Blotting-Papier	Blotting Filter Paper, 2,5 mm thick, 7,5 x 8,4 cm	Invitrogen, Carlsbad, US
Einfrierröhrchen	Cryo.s™ 2 ml, Typ: 122	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Entsorgungsbeutel	Sekuroka®-Entsorgungsbeutel, PP, Folienstärke 100 µm, 700 x 1100 mm, 110 l	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Flächendesinfektionstuch	schülke wipes, Feuchttuchspender für Flächendesinfektionsmittel	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, DE
Gas-Detektorröhrchen	MRCO ₂ (700 ~ 1300 mg/l)	GASTEC Corp., Ayase, JP
Glaspipette	Pasteurpipette, Natron-Kalk-Glas, Lang ausgezogene, feine Spitze, 225 mm	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Handschuhe	Micro-Touch®, Nitra-Tex®, Nitrile, Powder-Free, Examination Gloves	Ansell Ltd., Richmond, AU
Homogenisierungssäulen	QIAshredder - Zelllysathomogenisatoren mit Sammelröhrchen	QIAGEN GmbH, Hilden, DE

Papiertücher	tapira® Plus Kosmetiktücher	GVS-Großverbraucher-spezialisten eG, Friede-wald, DE
PCR-Platte	FrameStar® Break-A-Way PCR Plate, Clear wells, clear plate	4titude Ltd., Wotton, UK
Petrischale	TC-Schale 100, Standard	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Pipetten	Eppendorf Research® plus (1 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipettenspitzen	10/20 µl XL Graduated Tip, 200 µl Bevelled Tip, 1000 µl Graduated Tip	STARLAB International GmbH, Hamburg, DE
Pipettenspitzen	5 ml, 10 ml, 25 ml Costar® Stripette® Serological Pipet	Corning Inc., Corning, US
Plattenverschlussfolie	Adhesive Film for Micropla-tes	VWR International, LLC., Radnor, US
Präzisionswischtücher	Kimtech™ Science, Präzi-sionswischtücher, weiß	KIMBERLY-CLARK GmbH, Koblenz, DE
Reaktionsgefäß	SafeSeal Gefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Skalpell	Feather® Disposable Scal-pel	FEATHER Safety Razor Co, Ltd., Osaka, JP
Spritze	Injekt® Solo, 2-teilige Ein-malspritzen (2 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Sterilfilter	Millex®-GS, Sterile Filter Unit with MF-Millipore MCE Membrane, 0,22 µm	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Sterilisationsbeutel	Steriking® 1, 50 x 250 mm	Wipak Walsrode GmbH & Co. KG, Bomlitz, DE
Verschlussfolie	Parafilm® M All-Purpose Laboratory Film	Bemis Company Inc., Neenah, US
Zellkulturflasche	Zellkulturflasche 250 ml, 75 cm², Poly-D-Lysin CELLCOAT®, Filter-Schraubverschluss	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellsieb	EASYstrainer™ 100 µm, steril, für 50 ml Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zentrifugenröhrchen	50 ml CELLSTAR® Polyp-ropylen Röhrchen	Greiner Bio-One Internatio-nal GmbH, Kremsmünster, AT

Tabelle 1: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

3.2 Chemikalien

Produkt	Produktbezeichnung	Produzent
2-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol for molecular biology, electrophoresis, cell culture, BioReagent, 99% (GC/titration)	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, US
A. dest	Demineralisiertes Wasser techn. 10 l	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, DE
Acrylamid (30 %)	30 % Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid "Rotiphorese Gel 30"	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
APS (10 %)	Ammonium persulfate, for molecular biology, for electrophoresis, ≥ 98 %	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, US
Bromphenolblau	Bromphenolblau Natriumsalz, für Gelelektrophorese. Indikator pH 3,0-4,6	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
BSA	Albumin Fraktion V ≥ 98 %, pulv., für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
CO ₂ -Gas	Kohlendioxid UN 1013	Linde AG Gases Division, Pullach im Isartal, DE
DMEM	gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium: [+] 4,5 g/l D-Glucose, L-Glutamine; [-] Pyruvate	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
DMSO	Dimethyl sulfoxide ≥ 99.5 % (GC), plant cell culture tested	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, US
Ethanol (70 %)	Technisolv Ethanol 70% (V/V) denaturated Euro-denaturant	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, FR
Flächendesinfektionsmittel	Incidin™ Rapid - Viruzid, sporizid gegen C. difficile, formaldehydfrei	Ecolab GmbH & Co. OHG, Düsseldorf, DE
Glycerol	Glycerin ROTIPURAN $\geq 99,5$ %, p.a., wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Glycin	Glycin PUFFERAN ≥ 99 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
HEPES	HEPES solution, 1 M, pH 7.0-7.6, sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, US
Methanol	Methanol Rotipuran $\geq 99,9$ %, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE

NaCl	Natriumchlorid	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Natriumdeoxycholat	Sodium deoxycholate; BioXtra, ≥ 98.0 % (dry matter, NT)	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, US
Natriumhypochloritlösung	NaClO + H ₂ O; 12 % Cl, techn.; Molare Masse (M): 74,45 + aq g/mol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
NP-40	Nonidet-P40 - N3500; Nonylphenylpolyethylene glycol; Polyethyleneglycol-p-isooctylphenyl ether	United States Biological, Salem, US
RNase-freies Wasser	RNase-free water prepared without the use of diethylpyrocarbonate	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, modified w/o CaCl ₂ & MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, US
Phosphataseinhibitor	PhosSTOP™ EASYpack; Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Ponceau S	BioReagent, suitable for electrophoresis, 0.1 % (w/v) in 5 % acetic acid	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, US
Proteaseinhibitor	cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
SDS	Natriumdodecylsulfat $\geq 99,5$ %, Blotting-Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
TEMED	TEMED 99 %, p.a., für die Elektrophorese	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
TGF- β 1	Recombinant Human TGF- β 1 (HEK293 derived)	PeptoTech Inc., Rocky Hill, US
TRIS	TRIS PUFFERAN®, $\geq 99,3$ %, Buffer Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Trypsin	Trypsin-EDTA 10X; sterile filtered	Biowest S.A.S., Nuaille, FR
Tween	Tween® 20 for molecular biology, viscous liquid	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, US

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien

3.3 Enzyme, Seren und Antibiotika

Produkt	Produktbezeichnung	Produzent
Amphotericin B	gibco Amphotericin B 250 μ g/ml	Life Technologies Ltd., Paisley, UK

Dispase	Dispase® II (neutral protease, grade II); from <i>Bacillus polymyxa</i> ; 0,9 U/mg lyo.	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Fetales Kälberserum	Sera Plus special processed FBS; 0.2 µm sterile filtered	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Gentamicin	gibco Gentamicin (50 mg/ml)	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Kollagenase	Collagenase, Typ: CLS; 345 U/mg	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin, 10,000 Units/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE

Tabelle 3: Liste der verwendeten Enzyme, Seren und Antibiotika

3.4 Lösungen, Puffer und Medien

3.4.1 Lösungen

Die folgenden Lösungen mit festen Bestandteilen werden zunächst unsteril in einem Zentrifugenröhrchen angesetzt. Hierbei werden Pipette bzw. Pipettierhilfe mit passenden Pipettenspitzen und Analysenwaage verwendet. Mittels Vortexmischer und Taumel-Rollenmischer werden die festen Bestandteile vollständig aufgelöst. Anschließend werden die Lösungen in einer Sicherheitswerkbank in eine Spritze aufgenommen und durch einen Sterilfilter in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt.

Dispase-Lösung

19 ml	PBS
1 ml	HEPES
0,04 g	Dispase II

Kollagenase-Lösung

10 ml	PBS
0,15 g	BSA
0,02 g	Kollagenase I

Desinfektions-Lösung

200 ml	Natriumhypochloritlösung ad 10 l A. dest
--------	---

Trypsin-Löung

4,5 ml	PBS
0,5 ml	Trypsin

3.4.2 Puffer

RIPA-Puffer

1 ml	NP-40
0,87 g	NaCl
0,78 g	TRIS (pH 8)
0,5 g	Natriumdeoxycholat
0,1 g	SDS
1 Tbl.	Phosphataseinhibitor
1 Tbl.	Proteaseinhibitor
	ad 100 ml A. dest

Trenngel-Puffer (4x)

91 g	TRIS (pH 8,8)
2 g	SDS
	ad 500 ml A. dest

Sammelgel-Puffer (4x)

6,05 g	TRIS (pH 6,8)
0,4 g	SDS
	ad 100 ml A. dest

Lauf-Puffer (10x)

30,3 g	TRIS (pH 8,3 – 8,8)
144,2 g	Glycin
10 g	SDS
	ad 1000 ml A. dest

Transfer-Puffer (25x)

18,2 g	TRIS
90 g	Glycin
	ad 500 ml A. dest

Laemmli-Puffer (4x)

2,5 ml	1 M TRIS (pH 6,8)
4 ml	Glycerol
0,8 g	SDS
1	Spatelspitze Bromphenolblau ad 10 ml A. dest

TBS-Puffer (10x)

12,1 g	TRIS (pH 7,5)
87,7 g	NaCl ad 1000 ml A. dest

TBS-T-Puffer

100 ml	TBS-Puffer (10x)
1 ml	Tween ad 1000 ml A. dest

3.4.3 Medien

Kulturmedium

500 ml	DMEM
50 ml	FCS
5 ml	Pen/Strep

Einfriermedium

50 ml	FCS
5 ml	DMSO

CO₂-Medium

500 ml	DMEM
10 ml	Pen/Strep
5 ml	Amphotericin B
1 ml	Gentamicin
> 1300 mg/l	CO ₂

Versuchsmedium

500 ml	DMEM
50 ml	FCS
10 ml	Pen/Strep
5 ml	Amphotericin B
1 ml	Gentamicin

Differenzierungsmedium (5 ng/ml)

5 ml	Fibroblasten-Medium
25 µl	TGF-β1 (1 µg/ml)

CTB-Medium

47,5 ml	Versuchs-Medium
2,5 ml	<i>CellTiter-Blue</i> ® Reagens

3.5 Laborgeräte

Produkt	Produktbezeichnung	Produzent
Absaugvorrichtung	LABOPORT® Vakuum-pumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, DE
Abzug	Laborsystem mc6® - TA 1500 x 900 - 900	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, DE
Analysenwaage	ABJ 220-4M	Kern & Sohn GmbH, Balin-gen-Frommern, DE
Autoklav	Systec DX-90 Tischauto-klav	Systec GmbH, Linden, DE
Bildgebungsgerät	ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, US
CO ₂ -Brutschrank	Heracell™ 150i CO ₂ -Inkubator (37 °C, 5 % CO ₂)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, US
CO ₂ -Gerät	CARBOTHERA™ K104	Mitsubishi Chemical Corpo-ration, Tokio, JP
Eismaschine	Scotsman AF 80 Ice Flaker	Scotsman Ice Systems, Ipswich, GB
Elektrophorese-Netzgerät	PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, US
Gas-Probenahmepumpe	Model GV-100 Gas Sam-pling Pump for Detector Tube Systems	Gastec Corp., Ayase, JP
Gefrierbehälter	Cryo 1 °C "Mr. Frosty" Freezing Container	Nalge Nunc International Corp., Rochester, US
Gefrierschrank -20 °C	GUw 1213	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biber-ach an der Riß, DE
Gefrierschrank -80 °C	HERAfreeze™ HFU T Se-rie -86 °C Ultratiefkühlschrank	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, US
Gehörschutz	Peltor™ Optime™ I Kap-selgehörschutz H510A	3M Deutschland GmbH, Neuss, DE
Heizblock	Fisherbrand™ Single Block Dry Bath FB15101	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, US

Hybridisierungsöfen	Mini-Shaking Ofen OV3 Hybridisierungsöfen	Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, DE
Impulssiegelgerät	F 70-300 impulse sealer 220-240 VAC, 50/60 Hz	Famos Medizintechnik Ver- triebs GmbH, Straelen, DE
Kontaminationsabfalltonne	WIVA™ medical waste container	Mauser Werke GmbH, Brühl, DE
Kühlschrank 4 °C	KUw 1740	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biber- ach an der Riß, DE
Kühlschrank 4 °C	NUNC Kühlschrank mit Glastür	Nalge Nunc International Corp., Rochester, US
Messzylinder	Borosilikatglas 3.3, Klasse B	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Mikroskop	Axio Vert.A1 - inverses Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
PCR-Gerät	Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, US
Pipettierhilfe	accu-jet® pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Plattenlesegerät	Multimode Plate Reader VICTOR™ X3	PerkinElmer Inc., Waltham, US
Proteintransfer-Gerät	Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, US
Schlauch	PVC-Schlauch m. Gewebe 9 x 15 mm	welabo GmbH, Nettetal, DE
Sicherheitswerkbank	Herasafe™ KS 18	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, US
Sonifizierer	UP50H (Sonotrode MS1)	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, DE
Spektralphotometer	NanoDrop™ 1000 Mikrovo- lumen Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, US
Taumel-Rollenmischer	RM 5	Ingenieurbüro CAT, M. Zip- perer GmbH, Ballrechten- Dottingen, DE
Vortexmischer	Reax top - Standardmodell	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwab- ach, DE
Wärmeschrank 37 °C	kelvitron® t, Typ: B 6060	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Wasserbad	Aqualine AL 12 (25 °C bis 95 °C)	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen, DE
Zählkammer	System: Neubauer, Kam- mertiefe: 0,1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königsh- ofen, DE
Zentrifuge	MiniSpin®	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge	Heraeus™ Megafuge™ 16R	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, US

Tabelle 4: Liste der verwendeten Laborgeräte

3.6 Kits

Produkt	Produktbezeichnung	Produzent
DNA-Entfernungs-Kit	Invitrogen™, DNA-free™ DNase treatment and removal reagents	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, US
Elektrophorese-Kit	Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, 4-gel, for 1.0 mm thick handcast gels	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, US
Glucosedetektions-Kit	Glucose-Glo™ Assay, bioluminescent assay for detection of glucose	Promega GmbH, Mannheim, DE
Proteinbestimmungs-Kit	Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, US
RNA-Isolations-Kit	RNeasy® Plus Mini Kit, QIAGEN RNA extraction kits	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
Reverse-Transkriptions-Kit	Omniscript® RT Kit, For reverse transcription of 50 ng to 2 µg RNA for end-point PCR	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
Zellviabilitätsbestimmungs-Kit	CellTiter-Blue® Cell Viability Assay, for estimating the number of viable cells	Promega GmbH, Mannheim, DE

Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits

3.7 Software

Produkt	Produktbezeichnung	Produzent
Bildanalysesoftware	Image Lab™ (Version 6.0.0) bulid 25, Standard Edition	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, US
Bildbearbeitungssoftware	Photoshop CS5.1 (Version 12.1)	Adobe Systems Software Ireland Ltd., Dublin, IE
Literaturverwaltungssoftware	EndNote X9.3.3	Clarivate Analytics, Philadelphia, US
Mikrotiterplatten-Analysesoftware	WorkOut 2.0	Dazdaq Ltd., Brighton, GB
PCR-Software	Sequence Detection Systems-Software (Version 1.4)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, US

Spektralphotometer-Software	Messsoftware für Nano-Drop™ 1000 (Version 3.8.1)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, US
Statistikanalysesoftware	Prism 5 (Version 5.01)	GraphPad Software Inc., San Diego, US
Tabellenkalkulationssoftware	Excel 2016 (Version 16.0)	Microsoft Corporation, Redmond, US

Tabelle 6: Liste der verwendeten Software

4 Methoden

4.1 Zellkulturen

Beim Umgang mit Zellkulturen muss auf eine sterile Durchführung der Arbeitsschritte geachtet werden, um einer Kontamination dieser vorzubeugen. Hierzu werden alle Arbeiten, die das Öffnen der Zellkulturflaschen erfordern, unter einer biologischen Sicherheitswerkbank, mit Handschuhen und sterilen Materialien, durchgeführt. Alle unsterilen Gegenstände werden mit einem Flächendesinfektionstuch, gründlich abgewischt, bevor sie in der Sicherheitswerkbank zum Einsatz kommen.

4.1.1 Codierung der Zellkulturen

Jeder Zellkultur wird zur späteren Unterscheidbarkeit ein individueller alphanummerischer Code zugeteilt. Dieser setzt sich zusammen aus der Zellart (F = Fibroblasten), des Datums der Gewebsentnahme (JJMMTT), aus Geschlecht (m = männlich; w = weiblich) und Alter des Spenders des Gewebes (in Jahren) und der aktuellen Passage der Zellen (p#). Bei Letzterem wird nach der Isolation aus dem Spendergewebe bei null begonnen. Zur Veranschaulichung folgt als Beispiel der Code einer Fibroblastenkultur, einer am 20.07.2017 operierten, 35-jährigen Frau, in der vierten Passage.

F170720w35p4

Diese Art der Codierung ist im Forschungslabor der Unfall- und Handchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf etabliert und wird hier in dieser oder leicht abgewandelter Form für alle verwendeten Zellarten durchgeführt.

4.1.2 Isolation der Fibroblasten aus Spendergewebe

Zur Gewinnung der Fibroblasten wurden Hautresektate gesunder Männer und Frauen im Alter von 17 bis 70 Jahren verwendet. Diese stammen aus elektiven Reduktionsmamma- oder Abdominalplastiken. Zur Verwendung dieser Zellen liegt ein positives Votum der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit der Studiennummer 3634 vor.

Zunächst werden Epidermis und Dermis voneinander getrennt. Hierzu wird die Haut mithilfe einer Pinzette und eines Skalpells vom Fettgewebe gelöst und mit evtl. Zuhilfenahme einer Schere in einer Petrischale in ca. 0,5 x 0,5 cm große Stücke geschnitten. Daraufhin wird ein Zentrifugenröhrchen bis zu etwa einem Drittel mit den Hautstücken befüllt und 20 ml Dispase-Lösung (3.4.1) zugegeben. Anschließend wird das Zentrifugenröhrchen fest verschlossen und auf einem Taumel-Rollenmischer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird das Zentrifugenröhrchen für 30 min bei 37 °C im Rotor des Hybridisierungssofens wieder erwärmt. Die Epidermis hat sich nun von der Dermis gelöst und die Reaktion kann gestoppt werden. Hierzu wird das Zentrifugenröhrchen in eine Petrischale geleert und 20–30 ml 4 °C kalte phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) hinzugegeben. Die Epidermis, die als gräuliche Phase den Hautstücken aufliegt wird nun mit einer Pinzette in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt. Hieraus können Keratinozyten isoliert werden.

Im nächsten Schritt wird die Dermis weiterverarbeitet, um daraus Fibroblasten zu gewinnen. Die in der Petrischale verbliebenen Hautstücke werden hierfür in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt, mit 10 ml Kollagenase-Lösung (3.4.1) versetzt und für 60 min bei 37 °C im Rotor des Hybridisierungssofens inkubiert. Anschließend wird ein Zellsieb mit einer Porengröße von 100 µm auf einem neuen Zentrifugenröhrchen platziert und die Dermisstücke unter Nachspülung mit PBS hindurchgestrichen. Hierzu eignet sich z. B. der Spritzenstempel einer 2 ml Spritze oder ein ähnlicher steriler Gegenstand. Danach wird das Zellsieb entnommen und verworfen, das Zentrifugenröhrchen fest verschlossen und 5 min bei 1200 rpm in der Zentrifuge abzentrifugiert. Nun wird die Flüssigkeit

vorsichtig mit einer Glaspipette, die an die Absaugvorrichtung angeschlossen wird, abgesaugt, sodass ausschließlich das entstandene Zellpellet am Boden des Zentrifugenröhrchens verbleibt. Je nach Größe des Zellpellets, also je nach Ausbeute an Fibroblasten aus dem Spendergewebe, wird dieses nun durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in 12–36 ml Kulturmedium (3.4.3) resuspendiert, auf eine bis drei, mit dem entsprechenden Code (4.1.1) versehenen, Zellkulturflaschen verteilt und für über Nacht bei 37 °C im Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Brutschrank inkubiert. Zur weiteren Handhabung siehe 4.1.5 Anlage und Pflege der Zellkulturen.

4.1.3 Zählen der Fibroblasten

Um die benötigte Zellzahl für Versuche oder zur Konservierung der Zellen zu erhalten, werden diese in einer Zählkammer vom Neubauer Typ gezählt. Hierzu wird zunächst das abzentrifugierte Zellpellet je nach Größe in 5–10 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wird diese Suspension gemäß der Gebrauchsanweisung zwischen Zählkammer und Deckglas beschickt und die Zellen unter dem Mikroskop wie in Abb. 2 schematisch dargestellt, in den vier Eckquadraten der Zählkammer gezählt. Es werden die als schwarze Kreise dargestellten Zellen in die Zählung einbezogen, wohingegen die grauen Kreise nicht berücksichtigt werden. An zwei Seiten – hier an der oberen und linken – werden die Zellen, die die äußere Begrenzungslinie des Eckquadrats schneiden, mitberücksichtigt. An den jeweils anderen beiden Seiten werden diese nicht mitgezählt. Diese Technik wird für jedes einzelne der 16 Kleinquadrate jedes Eckquadrats durchgeführt, um ein doppeltes Zählen der Zellen zu vermeiden.

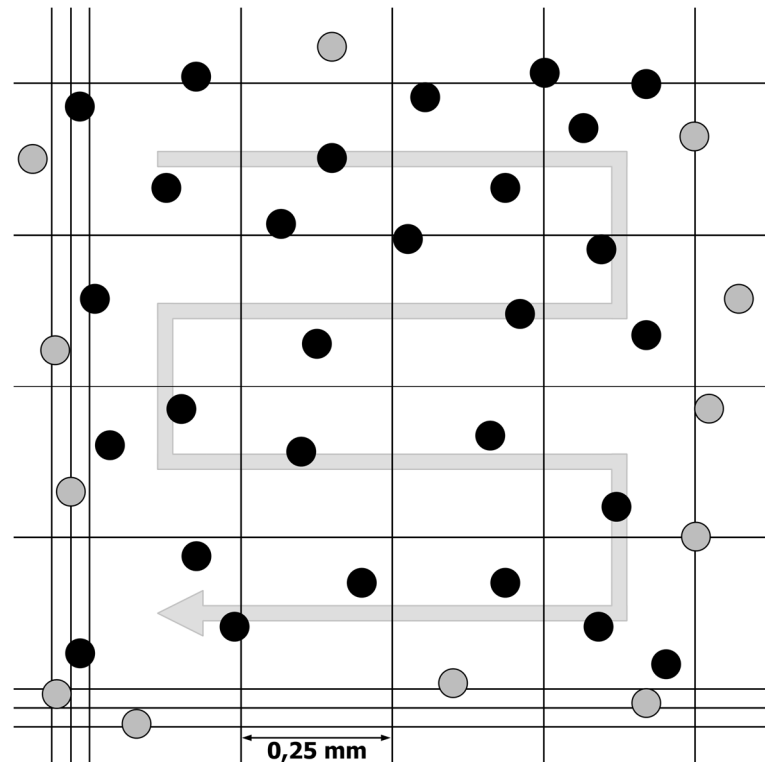


Abb. 2: Schematische Darstellung des oberen rechten Eckquadrats einer Zählkammer vom Neubauer Typ.
 Die schwarzen Kreise stellen die zu zählenden, die grauen die nicht zu zählenden Zellen dar. Der Pfeil stellt die empfohlene, mäandrierende Zählrichtung dar. Ein Kleinquadrat hat eine Fläche von 0,25 mm².

Es werden alle vier Eckquadrate der Zählkammer ausgezählt und die gezählte Anzahl der Zellen in folgende Formel eingesetzt:

$$\frac{(\text{gezählte Zellen})}{4} * 10^4 = \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$$

Zunächst wird die gezählte Zellzahl durch die Anzahl der Eckquadrate dividiert, um den Mittelwert für ein Eckquadrat zu errechnen. Ein Eckquadrat hat eine Fläche von 1 mm² und die Kammer eine Höhe von 0,1 mm, also beträgt das Volumen über einem Eckquadrat 0,1 µl (1 mm² x 0,1 mm = 0,1 mm³ = 0,1 µl). Um die Anzahl der Zellen pro ml Zellsuspension zu erhalten, wird anschließend der vorher errechnete Mittelwert mit dem Faktor 10⁴ multipliziert.

4.1.4 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Beim Einfrieren und Auftauen von Zellen ist zu beachten, dass die Arbeitsschritte, bei denen die Zellen mit dem Einfriermedium in Kontakt sind, zügig und auf Eis durchgeführt werden müssen, da das im Einfriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) bei Temperaturen $> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ zytotoxisch wirkt.

Für das Einfrieren, also die Kryokonservierung der Fibroblasten werden zunächst die Einfrierröhrchen mit dem entsprechenden Code der zu konservierenden Zellkultur versehen (4.1.1) und das Einfriermedium (3.4.3) vorbereitet und auf Eis gelegt. Bei der Codierung ist zu beachten, dass durch das Einfrieren eine neue Passage beginnt. Anschließend werden die Zellen, wie in 4.1.5 beschrieben, aus der Zellkulturflaschen gelöst, in ein Einfrierröhrchen überführt, gezählt (4.1.3) und für 10 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird nun so mit dem Einfriermedium resuspendiert, dass eine Suspension mit 10^6 Zellen pro ml entsteht. Im nächsten Schritt wird je 1 ml der Suspension in die Einfrierröhrchen pipettiert und der Deckel fest verschlossen. Anschließend werden die gefüllten Einfrierröhrchen in einen Gefrierbehälter überführt und über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Somit werden die Zellen schonend $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro min herabgekühlt. Am nächsten Tag können die Einfrierröhrchen dem Behälter entnommen und weiter bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Für das Auftauen der Fibroblasten wird zunächst eine Zellkulturflasche mit 10 ml Kulturmedium (3.4.3) befüllt. Danach wird die gewünschte kryokonservierte Zellkultur im $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ Wasserbad unvollständig aufgetaut und rasch 1 ml Kulturmedium hinzugegeben, um die zytotoxische Wirkung des DMSO auf die Zellen zu vermindern. Anschließend wird der gesamte Inhalt eines Einfrierröhrchens in die vorbereitete Zellkulturflaschen überführt und diese dann für 24 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im CO_2 -Brutschrank inkubiert. Zur weiteren Handhabung siehe 4.1.5 Anlage und Pflege der Zellkulturen.

4.1.5 Anlage und Pflege der Zellkulturen

Bei den frisch durch Isolation aus Spendergewebe (4.1.2) oder aber durch Auftauen bereits konservierter Kulturen (4.1.4) gewonnenen Zellen wird nun, nachdem sie 24 h inkubiert wurden, das Kulturmedium gewechselt. Hierbei verbleiben die vitalen, an der Innenoberfläche adhärenen Fibroblasten in der Zellkulturflasche, wohingegen die toten, nicht adhärenen Zellen ausgewaschen werden. Für diesen Mediumwechsel wird zunächst Kulturmedium (3.4.3) im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Anschließend wird das alte Kulturmedium vorsichtig mit einer Glaspipette in einer Ecke der Zellkulturflasche abgesaugt, sodass lediglich der Zellrasen am Boden der Flasche zurückbleibt. Nun werden 12 ml des frischen Mediums hinzugegeben und die Flasche wieder in den CO₂-Brutschrank gelegt. Alle drei bis vier Tage sollte ein solcher Mediumwechsel erfolgen.

Hat die Zellkultur eine ausreichende Dichte am Boden der Zellkulturflaschen erlangt, können die Fibroblasten entweder für Versuche oder zur erneuten Konservierung (4.1.4) geerntet werden oder die Zellkultur muss gesplittet werden. Hierzu werden zunächst 5 ml Trypsin-Lösung (3.4.1) angesetzt. Anschließend wird das Kulturmedium vorsichtig mit einer Glaspipette in einer Ecke der Zellkulturflasche abgesaugt, die Trypsin-Lösung hinzugegeben und für 5 min im CO₂-Brutschrank inkubiert. Die Ablösung der Zellen kann danach durch dosiertes Klopfen der Zellkulturflasche gegen die Tischkante unterstützt und lichtmikroskopisch kontrolliert werden. Hat sich der Zellrasen komplett gelöst wird die Reaktion mit 5 ml Kulturmedium gestoppt. Nun wird der gesamte Inhalt der Zellkulturflasche in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird anschließend, wie bereit in 4.1.2 beschrieben, vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet je nach Größe mit 5–10 ml Kulturmedium resuspendiert. Jetzt können die Zellen entweder gezählt und für Versuche auf 24-Well-Platten ausgesät, oder auf frische Zellkulturflaschen mit je 12 ml Kulturmedium gesplittet werden. Hierbei sind die neuen Zellkulturflaschen mit neuer Passage zu codieren.

4.2 CO₂-Gerät

Für die Versetzung des CO₂-Mediums (3.4.3) mit dem Kohlenstoffdioxid wird das CO₂-Gerät „CARBOTHERA™ K104“ verwendet. Da dieser Vorgang nicht steril durchgeführt werden kann und es somit schnell zu Kontaminationen der Zellkulturen mit Mikroorganismen kommen kann, wird mit in Abwurfbeuteln autoklavierten Schläuchen gearbeitet (4.7.1), das Gerät vor und nach jedem Gebrauch mit den zum Gerät gehörigen Schläuchen (hier: Reinigungsschläuche) gründlich gespült und mit Antibiotika im CO₂-Medium gearbeitet.

4.2.1 Vorbereitung

Vor jedem Gebrauch wird das CO₂-Gerät gründlich mit *Aqua destillata* (A. dest) gespült. Hierzu wird der, mit dem als „IN“ markierten Ventil verbundene, Reinigungsschlauch in einen 10 l Kanister A. dest und der, mit dem als „OUT“ markierten Ventil verbundene, Reinigungsschlauch in ein Waschbecken geführt. Nun wird das Gerät eingeschaltet und die, mit dem Gerät verbundene, CO₂-Flasche geöffnet. Das Programm „*Rinsing / Drain*“ wird gewählt, der Timer mit den Pfeiltasten auf 1 min gestellt, die Eingabe mit der „SET“-Taste bestätigt und der Vorgang mit der „START / STOP“-Taste gestartet. Nach der abgelaufenen Minute muss nun noch das restliche, im Gerät verbliebene A. dest entfernt werden. Hierzu wird der Schlauch aus dem A. dest Kanister entfernt und der oben beschriebene Spülvorgang wiederholt. Sobald kein Wasser mehr in das Waschbecken gepumpt wird, kann der Vorgang mit der „START / STOP“-Taste abgebrochen werden. Nun wird die „RESET“-Taste betätigt, um den abgebrochenen Vorgang zu stornieren. Das Gerät ist damit einsatzbereit.

4.2.2 Versetzung des Mediums mit CO₂

Zuerst wird das CO₂-Medium kalt in der *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)-Flasche unter der Sicherheitswerkbank angesetzt. Anschließend wird der Reinigungsschlauch von dem mit „IN“ markierten

Ventil des CO₂-Geräts gezogen und ins Waschbecken gelegt. Der zweite Reinigungsschlauch bleibt konnektiert und mündet weiterhin in das Waschbecken. Nun wird das Ventil mit Ethanol (70 %) desinfiziert und zunächst ein Ende eines der autoklavierten Schläuche vorsichtig aus dem Abwurfbeutel entfernt und, ohne dieses durch Oberflächenkontakt zu kontaminieren, mit dem Ventil verbunden. Anschließend wird die Flasche des CO₂-Mediums geöffnet und der Deckel mit der Öffnung nach unten auf ein Flächendesinfektionstuch gelegt.

Nun wird das andere Ende des autoklavierten Schlauches ebenfalls vorsichtig dem Abwurfbeutel entnommen und in die Flasche geführt. Anschließend wird das Programm „*Foot Bath / Washing*“ ausgewählt, der Timer auf 2 min eingestellt und der Vorgang gestartet. Medium wird angesaugt und das Schlauchsystem des CO₂-Geräts füllt sich. Sobald Medium in das Waschbecken gepumpt wird, wird die „*START / STOP*“-Taste gedrückt, um den Vorgang zu pausieren. Nun wird, in gleicher Technik wie zuvor, auch der zweite Reinigungsschlauch entfernt, das Ventil desinfiziert, der zweite autoklavierte Schlauch konnektiert und dieser ebenfalls in die Flasche mit dem CO₂-Medium geführt. Danach wird das pausierte Programm durch erneute Betätigung der „*START / STOP*“-Taste fortgesetzt. Ist das Programm beendet, wird es wiederholt und beide Schläuche so angehoben, dass das Gerät Luft zieht und das im Schlauchsystem verbliebene CO₂-Medium in die Flasche gepumpt wird. Sobald kein CO₂-Medium mehr gepumpt wird, wird das Programm gestoppt, die Schläuche entfernt und die Flasche fest verschlossen.

Das CO₂-Medium ist damit fertig und kann für die Versuche (4.3) verwendet werden. Bei der Handhabung ist nun darauf zu achten, dass das CO₂-Medium vorsichtig, also ohne Schwenken oder Schütteln transportiert, direkt verwendet und langsam pipettiert wird, um das CO₂ in Lösung in dem Medium zu behalten.

4.2.3 Kontrolle der CO₂-Konzentration

Um die CO₂-Konzentration des CO₂-Mediums zu bestimmen, werden vorsichtig 50 ml CO₂-Medium in eine leere 250 ml Plastikflasche pipettiert und diese fest verschlossen. Nun wird das Gas-Detektorröhrchen an beiden Seiten geöffnet und an die Gas-Probenahmepumpe angeschlossen. Für die nächsten Arbeitsschritte sollte nicht unter einer Sicherheitswerkbank oder einem Abzug gearbeitet werden, da sich das zu messende CO₂ zu rasch verflüchtigen würde. Die Flasche wird nun für 1 min kräftig geschüttelt und der Deckel vorsichtig geöffnet. Das Gas-Detektorröhrchen wird, ohne das CO₂-Medium zu berühren, in die Flasche geführt und die Gas-Probenahmepumpe betätigt. Der Indikatorstreifen im Gas-Detektorröhrchen verfärbt sich nun blau und zeigt die ungefähre CO₂-Konzentration des CO₂-Mediums an. Diese sollte über der messbaren Grenze von 1300 mg/l liegen.

Die Kontrolle der CO₂-Konzentration sollte in regelmäßigen Abständen wiederholt werden, um die Funktion des CO₂-Geräts zu prüfen und vergleichbare Versuchsbedingungen zu schaffen.

4.2.4 Reinigung

Zur Reinigung werden die benutzten autoklavierten Schläuche diskonnektiert, mit Leitungswasser im Waschbecken durchgespült und zum erneuten Autoklavieren wieder in Abwurfbeutel verpackt. Nun werden die Ventile mit Ethanol (70 %) desinfiziert, die Reinigungsschläuche aufgesteckt und wie in 4.2.1 beschrieben 1 min mit A. dest durchgespült. Nun kann entweder erneut ein CO₂-Medium mit CO₂ versetzt (4.2.2), oder das Gerät am Ende eines Versuchstages desinfiziert werden.

Zur Desinfektion des CO₂-Geräts wird zunächst in einem 10 l Kanister A. dest die Desinfektions-Lösung (3.4.1) angesetzt. Diese kann etwa einen Monat verwendet werden. Nun werden die Reinigungsschläuche an das CO₂-Gerät angeschlossen und beide in den Kanister mit der Desinfektions-Lösung geführt. Anschließend wird das Programm „*Disinfection*“

ausgewählt, der Timer auf 30 min eingestellt und der Vorgang gestartet. Nach den 30 min werden die Reinigungsschläuche dem Kanister entnommen und in ein Becherglas gelegt. Dabei verbleiben die Reinigungsschläuche angeschlossen und die Desinfektions-Lösung im Schlauchsystem des CO₂-Geräts. Die CO₂-Flasche kann nun zugedreht und das CO₂-Gerät ausgeschaltet werden.

4.3 Versuche

Bei allen Versuchen ist eine Kontamination der Zellkulturen mit Mikroorganismen zu vermeiden. Daher wird beim Umgang mit den Zellkulturen (4.1) sowie den Versuchsplatten auf eine sorgfältige und sterile Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte geachtet.

Das Kulturmedium (3.4.3) wird im Folgenden als bereits angesetzt vorausgesetzt. Alle Medien, die mit den Fibroblasten in Kontakt kommen werden vor gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Auch der Radioimmunpräzipitationsassay (RIPA)-Puffer wird als bereits vorbereitet, in Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -20 °C gelagert vorausgesetzt.

4.3.1 Zellviabilitätsversuch

Für den Zellviabilitätsversuch wird zum einen das Zellviabilitäts-Kit (3.6) und zum anderen die Methode der Gesamt-DNA-Quantifizierung (4.6) verwendet. Das Zellviabilitäts-Kit macht sich die Umsetzung des im *CellTiter-Blue*[®] (CTB)-Reagens enthaltenden Farbstoffes Resazurin zu Resorufin zur Quantifizierung der funktionsfähigen Zellen zunutze und mit der Gesamt-DNA-Quantifizierung wird die Zellzahl bestimmt. Der Versuch wird an vier aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

Vorbereitend werden die Versuchsplatten am ersten Tag des Versuchs mit Fibroblasten beimpft. Hierzu werden, wie in Abb. 3 schematisch dargestellt, je vier Zellkulturen auf eine 24-Well-Platte gebracht. Für den Versuch werden vier dieser Versuchsplatten mit den gleichen vier Zellkulturen benötigt. Die sechste Spalte jeder Platte wird hierbei als Kontrolle

leer gelassen. Der Vorgang des Ausplattierens der Zellen ist ausführlich beim Differenzierungsversuch (4.3.2) beschrieben.

Am zweiten Tag des Versuchs werden die Platten für unterschiedliche Dauer mit CO₂-Medium (3.4.3) behandelt. Hierbei wird, abweichend zum Differenzierungsversuch, einer Platte eine bestimmte Behandlungszeit zugewiesen, sodass alle vier Zellkulturen einer Platte für die gleiche Zeit behandelt werden. Eine Platte wird als Kontrolle mitgeführt und lediglich mit Versuchsmedium (3.4.3) inkubiert. Die anderen Platten werden für 5, 15 und 60 min mit CO₂-Medium behandelt.

Nun wird das CTB-Medium (3.4.3) in einem Zentrifugenröhrchen angesetzt. Nach der Exposition mit dem CO₂-Medium werden die *Wells* abgesaugt und, gemäß der in Abb. 3 angegebenen Zeitangaben nach der Behandlung, mit 0,5 ml CTB-Medium befüllt. Die mit „0 h nach Behandlung“ gekennzeichneten *Wells* werden sofort mit CTB-Medium, die anderen zunächst mit Versuchsmedium befüllt. Nach dieser und jeder neuen Befüllung der *Wells* mit dem CTB-Medium werden die Platten für eine Stunde bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Danach werden je dreimal 100 µl des CTB-Mediums aus den entsprechenden *Wells* auf eine Mikrotiterplatte überführt. Die *Wells* werden nach der Probenentnahme abgesaugt, mit 0,5 ml Versuchsmedium befüllt und bis zur nächsten Messung bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Für alle Platten wird zu jeder Messung zusätzlich eine Kontrolle des CTB-Mediums in einem der *Wells* der sechsten Spalte, die keine Zellen enthalten, mitgeführt, die dann auf der Mikrotiterplatte ebenfalls in dreifacher Bestimmung mitgemessen wird.

		nach Behandlung [h]					
		0	1	2	4	18	
		1	2	3	4	5	6
Kultur 1	A						
Kultur 2	B						
Kultur 3	C						
Kultur 4	D						

Abb. 3: Schematische Darstellung einer Versuchsplatte für den Zellviabilitätsversuch.

Auf dieser 24-Well-Platte werden vier verschiedene Fibroblastenkulturen gleichzeitig behandelt, jeweils eine in jeder Zeile. Für diesen Versuch werden vier dieser Platten benötigt, eine als Kontrolle mitgeführte unbehandelte und drei für 5, 15, bzw. 60 min behandelte. Die Zellen werden mit 2 ml pro Well eines mit Kohlenstoffdioxid versetzten Mediums behandelt und anschließend, gemäß der für die Spalten angegebenen Zeitangaben nach der Behandlung, mit 0,5 ml *CellTiter-Blue®* (CTB)-Medium pro Well befüllt, eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenz des umgesetzten Farbstoffs wird daraufhin in einem Plattenlesegerät gemessen. Die sechste Zeile wird nicht mit Zellen bestückt, hier wird CTB-Medium als zusätzliche Kontrolle mitgeführt.

Anschließend wird in der Software „WorkOut 2.0“ ein passendes Layout gewählt und die Fluoreszenz bei einer Exzitationswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm im Plattenlesegerät gemessen. Die Ergebnisse der Messung werden nun aus der Software „WorkOut 2.0“ als „Excel-Datei“ exportiert. Die gemessenen Werte werden in dieser Datei auf Blatt 2 „Plate“ angezeigt. Nun wird der Mittelwert der drei Messwerte jeder Probe errechnet und der Mittelwert der CTB-Medium-Kontrolle damit subtrahiert.

4.3.2 Differenzierungsversuch

Im Differenzierungsversuch wird der Effekt unterschiedlicher Behandlungszeiten der Zellen mit CO₂-Medium auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten untersucht. Der Versuch wird, mit der

Vorbereitung der Platten, der eigentlichen Versuchsdurchführung und der Ernte der behandelten Zellen, an fünf aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

Am ersten Tag des Versuchs wird die Versuchsplatte vorbereitet. Hierzu wird eine Zellkultur wie in 4.1.5 beschrieben aus ihrer Zellkulturflasche gelöst, abzentrifugiert und gezählt (4.1.3). Anschließend wird die Suspension auf 80.000 Zellen pro ml mit Kulturmedium verdünnt. Nun werden 0,5 ml Suspension pro *Well* auf eine 24-*Well*-Platte pipettiert, um eine Dichte von 40.000 Zellen pro *Well* zu erreichen. Die verbleibenden Zellen können nun wie in (4.1.5) beschrieben als neue Passage in eine frische Zellkulturflasche gegeben werden. Die beimpfte Versuchsplatte wird nun verschlossen, mit dem Code der Zellkultur (4.1.1) und der aktuellen Versuchsnummer beschriftet und über Nacht im CO₂-Brutschrank inkubiert.

Am zweiten, dritten und vierten Tag wird der eigentliche Versuch durchgeführt. Zunächst wird jedes *Well* lichtmikroskopisch auf regelrechte Adhäsion und Vitalität der Zellen kontrolliert und die Versuchsplatte anschließend wieder in den CO₂-Brutschrank gelegt. Nun werden das Versuchs- und das CO₂-Medium angesetzt (3.4.3), Letzteres mit CO₂ versetzt (4.2.2) und beide im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. In dieser Zeit wird das TGF-β1 bei Zimmertemperatur aufgetaut und bis zum Gebrauch auf Eis gelegt. Nun wird das Differenzierungsmedium (3.4.3) in einem Zentrifugenröhrchen vorbereitet. Für eine Versuchsplatte werden 6 ml Differenzierungsmedium benötigt, es sollte aber immer etwas mehr angesetzt werden. Nun wird jedes *Well* der Versuchsplatte zügig mit einer Glaspipette in einer Ecke abgesaugt und wie in Abb. 4 schematisch dargestellt mit den verschiedenen Medien befüllt.

		Behandlungsdauer [min]					
		0	1	2,5	5	15	60
Versuchs- medium	A	○	○	○	○	○	○
	B	○	○	○	○	○	○
Differen- zierungs- medium	C	○	○	○	○	○	○
	D	○	○	○	○	○	○

Abb. 4: Schematische Darstellung einer Versuchsplatte für den Differenzierungsversuch.

Die Zellen auf dieser Versuchsplatte werden zwischen 0 und 60 min mit einem mit Kohlenstoffdioxid versetzten Medium behandelt und anschließend mit Versuchs- bzw. Differenzierungsmedium inkubiert. Die mit 0 min gekennzeichneten *Wells* werden während der Behandlungszeit als Kontrolle mit Versuchsmedium inkubiert. Das Differenzierungsmedium wurde mit 5 ng/ml *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) versetzt.

Die *Wells* werden zunächst mit je 2 ml CO₂-Medium befüllt und, wie in den Spalten im Schema angegeben, nach einer bestimmten Zeit wieder abgesaugt. Nach dem Absaugen werden die *Wells* der Spalten A und B mit je 0,5 ml Versuchsmedium und die Spalten C und D mit je 0,5 ml Differenzierungsmedium befüllt. Die Spalte 1 wird bei diesem Versuchsaufbau nicht mit CO₂-Medium, sondern als unbehandelte Kontrolle direkt mit Versuchs- bzw. Differenzierungsmedium befüllt.

Das Versuchsmedium wird nach einem beendeten Versuchstag im Kühlschrank gelagert und am nächsten wiederverwendet, wohingegen das CO₂-Medium für jeden Versuchstag frisch angesetzt wird.

Am fünften Tag werden zunächst 12 unsterile Reaktionsgefäße pro Versuchsplatte mit dem Code der entsprechenden Zellkultur versehen und durchnummeriert. Anschließend werden 5 ml Trypsin-Lösung (3.4.1) pro Versuchsplatte angesetzt und die *Wells* abgesaugt. Es werden nun je 200 μ l Trypsin-Lösung in jedes *Well* pipettiert und die Versuchsplatte für 5 min im CO₂-Brutschrank inkubiert. Danach wird unter lichtmikroskopischer Kontrolle die Ablösung der Zellen kontrolliert und die Reaktion mit

300 ml Versuchsmedium pro *Well* abgestoppt. Nun wird die Zellensuspension, nach dem in Tabelle 7 gezeigten Schema, in die beschrifteten Reaktionsgefäße pipettiert.

Nr.	Wells	Minuten CO ₂ -Medium	Medium
1	1A; 1B	0	Versuchsmedium
2	1C; 1D	0	Differenzierungsmedium
3	2A; 2B	1	Versuchsmedium
4	2C; 2D	1	Differenzierungsmedium
5	3A; 3B	2,5	Versuchsmedium
6	3C; 3D	2,5	Differenzierungsmedium
7	4A; 4B	5	Versuchsmedium
8	4C; 4D	5	Differenzierungsmedium
9	5A; 5B	15	Versuchsmedium
10	5C; 5D	15	Differenzierungsmedium
11	6A; 6B	60	Versuchsmedium
12	6C; 6D	60	Differenzierungsmedium

Tabelle 7: Schema des Erntens der Zellen nach Differenzierungsversuch

Die Zellen werden aus den *Wells* der 24-*Well*-Platte gelöst und nach diesem Schema in die nummerierten Reaktionsgefäße 1–12 überführt. Es werden in jedes Reaktionsgefäß je die 2 *Wells* mit identischer Behandlung pipettiert. Beispielsweise werden die *Wells* 1A und 1B in Reaktionsgefäß 1 pipettiert. Diese *Wells* wurden beide nicht, also 0 min mit CO₂-Medium behandelt und mit Versuchsmedium inkubiert. Das Differenzierungsmedium wurde mit 5 ng/ml *transforming growth factor beta 1* (TGF-β1) versetzt.

Jetzt werden die Reaktionsgefäße für 3 min bei 13.400 rpm abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt, sodass lediglich das Zellpellet am Boden des Reaktionsgefäßes verbleibt. Abschließend werden in jedes Reaktionsgefäß 20 µl des bei Raumtemperatur aufgetauten RIPA-Puffers pipettiert und die damit fertigen Proben bei -20 °C eingefroren.

In den generierten Proben wird nun das Zielprotein α-SMA quantifiziert (4.4), um das Ausmaß der Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten zu detektieren.

4.3.3 Verdünnungsreihenversuch

Der Verdünnungsreihenversuch ist prinzipiell wie der Differenzierungsversuch (4.3.1) aufgebaut. Abweichend werden hier anstatt verschiedener Zeiten, verschiedene Konzentrationen des CO₂-Mediums auf ihren Effekt auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten hin untersucht.

Die Vorbereitung dieses Versuches, also der erste Tag, ist identisch mit der des Differenzierungsversuches. Für die eigentliche Durchführung am zweiten, dritten und vierten wird das CO₂-Medium (3.4.3) nach der Versetzung mit CO₂ (4.2.2) zunächst in sechs frischen Zentrifugenröhrchen mit Versuchsmedium (3.4.3) verdünnt. Hierbei wird die in Tabelle 8 dargestellte Verdünnungsreihe hergestellt, wobei das nach Anleitung mit ≥ 1300 mg/l hergestellte CO₂-Medium gleich 100 % gesetzt wird. Es werden pro Versuchsplatte 10 ml jeder Verdünnung hergestellt und vorsichtig je 2 ml in die jeweiligen *Wells* pipettiert.

Konzentration	CO ₂ -Medium	Versuchsmedium
[%]	[ml]	[ml]
100	10	0
80	8	2
60	6	4
40	4	6
20	2	8
0 = Kontrolle	0	10

Tabelle 8: Konzentrationen der Verdünnungsreihe für den Verdünnungsreihenversuch

Das nach Anleitung mit ≥ 1300 mg/l Kohlenstoffdioxid (CO₂) hergestellte CO₂-Medium wird gleich 100 % gesetzt und mit Versuchsmedium verdünnt.

Die 0%ige CO₂-Konzentration enthält nur Versuchsmedium und wird als Kontrolle mitgeführt. Die Verdünnungen werden nach dem in Abb. 5

dargestellten Schema in die einzelnen *Wells* pipettiert und für 15 min im CO₂-Brutschrank inkubiert.

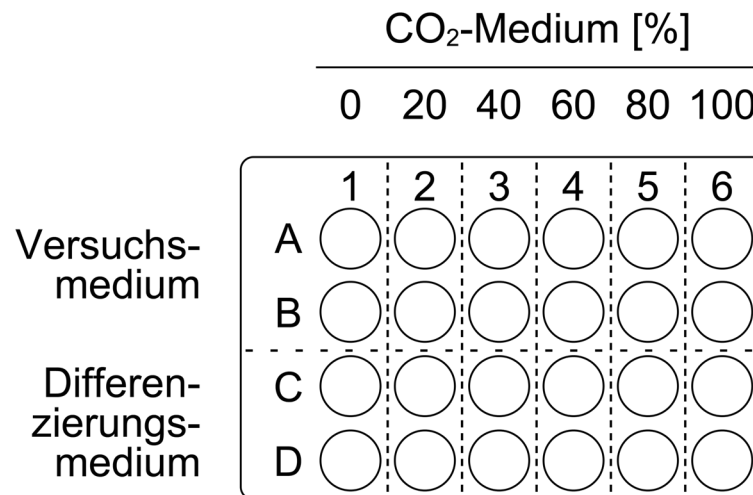


Abb. 5: Schematische Darstellung einer Versuchsplatte für den Verdünnungsreihenversuch.

Die Zellen auf dieser Versuchsplatte werden mit 2 ml pro *Well* unterschiedlich konzentriertem, mit Kohlenstoffdioxid (CO₂) versetztem Medium behandelt und anschließend mit Versuchs- bzw. Differenzierungsmedium inkubiert. Das Differenzierungsmedium wurde mit 5 ng/ml *transforming growth factor beta 1* (TGF-β1) versetzt.

Anschließend werden die *Wells* abgesaugt und mit 0,5 ml Versuchs- bzw. Differenzierungsmedium befüllt. Danach wird die Platte wieder im CO₂-Brutschrank gelagert. Diese Schritte werden, wie schon bei dem Differenzierungsversuch, an den beiden darauffolgenden Tagen wiederholt.

Das Ernten der behandelten Zellen am fünften Tag des Verdünnungsreihenversuches, ist wie der erste identisch zu dem des Differenzierungsversuches. Auch hier schließt sich die Quantifizierung des Zielproteins α-SMA (4.4) an.

4.3.4 Verdünnungsversuch

Der Verdünnungsversuch hat, wie schon der Verdünnungsreihenversuch prinzipiell den gleichen Aufbau wie der Differenzierungsversuch (4.3.1). Hier wird die Wirkung einer 60%igen Verdünnung des CO₂-Mediums (3.4.3) mit zwei unterschiedlichen Behandlungszeiten auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten untersucht.

Die Versuchsvorbereitung deckt sich mit der des Differenzierungsversuchs, bis darauf, dass pro Fibroblastenkultur nur drei Spalten benötigt werden und somit, wie in Abb. 6 dargestellt, zwei Kulturen auf eine 24-Well-Platte gebracht werden.

Die eigentliche Versuchsdurchführung am zweiten, dritten und vierten Versuchstag wird nun abweichend lediglich mit 15 und 60 min Behandlungsdauer, sowie einer Kontrolle durchgeführt. Zudem wird das CO₂-Medium auf 60 % verdünnt. Hierzu wird das nach Anleitung mit ≥ 1300 mg/l CO₂ versetzte CO₂-Medium (4.2.2) gleich 100 % gesetzt und mit Versuchsmedium (3.4.3) auf 60 % verdünnt. Für eine Versuchsplatte werden 50 ml des verdünnten CO₂-Mediums, also 30 ml 100%iges CO₂-Medium und 20 ml Versuchsmedium benötigt. Wie in Abb. 6 schematisch dargestellt, werden in den Spalten eins und vier die unbehandelten Kontrollen der beiden Kulturen mitgeführt und in den Spalten zwei und drei, sowie fünf und sechs die Behandlung mit dem verdünnten CO₂-Medium für 15 bzw. 60 min durchgeführt. Die anschließende Behandlung mit Versuchs- bzw. Differenzierungsmedium (3.4.3) deckt sich mit der des Differenzierungsversuches.

		Behandlungsdauer [min]					
		0	15	60	0	15	60
Versuchs- medium	A	○	○	○	○	○	○
	B	○	○	○	○	○	○
Differen- zierungs- medium	C	○	○	○	○	○	○
	D	○	○	○	○	○	○

Abb. 6: Schematische Darstellung einer Versuchsplatte für den Verdünnungsversuch.

Auf dieser Versuchsplatte werden zwei verschiedene Fibroblastenkulturen gleichzeitig behandelt, jeweils eine in drei Spalten. Die Zellen werden mit 2 ml pro Well eines auf 60 % des Ansatzes verdünnten, mit Kohlenstoffdioxid versetzten Mediums behandelt und anschließend mit Versuchs- bzw. Differenzierungsmedium inkubiert. Die mit

0 min gekennzeichneten *Wells* werden während der Behandlungszeit als Kontrolle mit Versuchsmedium inkubiert. Das Differenzierungsmedium wurde mit 5 ng/ml *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) versetzt.

Das Ernten der behandelten Zellen am fünften Tag des Verdünnungsversuches ist identisch zu dem des Differenzierungsversuches. Auch hier schließt sich die Quantifizierung des Zielproteins α -SMA (4.4) an.

4.3.5 Differenzierungsversuch für Gennachweise

Der Ablauf des Differenzierungsversuchs für bestimmte Differenzierungsmarker mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ist prinzipiell der gleiche wie der des Differenzierungsversuchs (4.3.1). Hier soll die Auswirkung des CO₂ auf die Genexpression der Differenzierungsmarker α -SMA, Nox4, KI-67, NRF2 und FoxO1 (1.2.3) untersucht werden.

Die Versuchsvorbereitung deckt sich mit der des Differenzierungsversuchs, bis darauf, dass pro Fibroblastenkultur nur zwei Spalten benötigt werden und somit, wie in Abb. 7 dargestellt, drei Kulturen auf eine 24-*Well*-Platte gebracht werden.

Die eigentliche Versuchsdurchführung an den Tagen zwei, drei und vier wird nun abweichend nur mit einer Behandlungsdauer vom 15 min und einer Kontrolle durchgeführt. Wie in Abb. 7 schematisch dargestellt, werden in den Spalten eins, drei und fünf die unbehandelten Kontrollen der drei Kulturen mitgeführt und entsprechend in den Spalten zwei, vier und sechs die Behandlung mit dem CO₂-Medium (3.4.3) für 15 min durchgeführt.

		Behandlungsdauer [min]					
		0	15	0	15	0	15
Versuchs- medium	A	1	2	3	4	5	6
	B						
Differen- zierungs- medium	C						
	D						
Kultur		1		2		3	

Abb. 7: Schematische Darstellung einer Versuchsplatte für den Differenzierungsversuch für Gennachweise.

Auf dieser Versuchsplatte werden drei verschiedene Fibroblastenkulturen gleichzeitig behandelt, jeweils eine in zwei Spalten. Die Zellen werden mit 2 ml pro *Well* eines mit Kohlenstoffdioxid versetzten Mediums behandelt und anschließend mit Versuchs- bzw. Differenzierungsmedium inkubiert. Die mit 0 min gekennzeichneten *Wells* werden während der Behandlungszeit als Kontrolle mit Versuchsmedium inkubiert. Das Differenzierungsmedium wurde mit 5 ng/ml *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) versetzt.

Bei der Ernte am fünften Tag des Versuchs werden die Zellen, abweichend zum Differenzierungsversuch, trocken eingefroren. Hierzu werden die abzentrifugierten Zellpellets nach dem Absaugen des Überstandes ohne Zusatz bei -20 °C eingefroren. Es folgt die Bestimmung der Zielgene mittels qRT-PCR (4.5).

Nach der letzten Inkubation mit CTB-Medium, 18 h nach Behandlung mit CO₂-Medium, werden die Zellen geerntet und wie in 4.3.5 beschrieben trocken für die spätere Gesamt-DNA-Quantifizierung (4.6) eingefroren.

4.3.6 Glukoseverbrauchsversuch

Für den Glukoseverbrauchsversuch wird das Glukosedetektions-Kit verwendet. Dieses macht sich die in Abb. 8 schematisch dargestellten Reaktionsschritte der Glukose zum lichtemittierenden Luciferin zunutze.

Das entstandene Licht wird im Plattenlesegerät detektiert und ist proportional zu der in der Probe enthaltenen Glukosemenge. Es soll die Differenz des Glukoseverbrauches von behandelten und unbehandelten Fibroblastenkulturen als Hinweis auf einen Einfluss des CO₂ auf die Glykolyse untersucht werden.

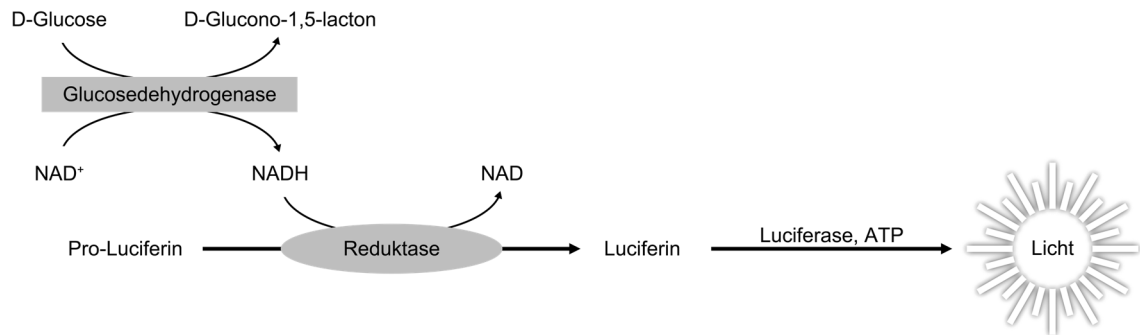


Abb. 8: Schematische Darstellung des Reaktionsprinzips des Glukosedetektions-Kits.

Die Glucosedehydrogenase katalysiert die Oxidation der D-Glucose und die gleichzeitige Reduktion des Nicotinamidadenindinukleotids (NAD) in seinem oxidierten Zustand (NAD⁺) in seine reduzierte Form (NADH). In Anwesenheit von NADH wird das Pro-Luciferin durch die Reduktase zu Luciferin reduziert. Das Luciferin wird nun durch die lichterzeugende Reaktion mit dem Enzym Luciferase und Adenosintriphosphat (ATP) nachgewiesen. Das emittierte Licht wird in einem Plattenlesegerät gemessen und ist proportional zu der Glukosemenge in der Probe.

Der Versuch wird, wie in Abb. 9 schematisch dargestellt, mit acht Fibroblastenkulturen pro Versuchsplatte durchgeführt, sodass jede Kultur drei *Wells* belegt. Die Beimpfung einer Versuchsplatte am ersten Versuchstag ist bereits beim Differenzierungsversuch (4.3.1) ausführlich erläutert.

		Behandlungsdauer [min]							
		0	15	60	0	15	60		
		1	2	3	4	5	6		
Kultur 1	A	○	○	○	○	○	○	Kultur 5	
Kultur 2	B	○	○	○	○	○	○	Kultur 6	
Kultur 3	C	○	○	○	○	○	○	Kultur 7	
Kultur 4	D	○	○	○	○	○	○	Kultur 8	

Abb. 9: Schematische Darstellung einer Versuchsplatte für den Glukoseverbrauchversuch.

Auf dieser 24-Well-Platte werden acht verschiedene Zellkulturen gleichzeitig behandelt. Die Zellen werden für 15 bzw. 60 min mit 2 ml pro *Well* eines mit Kohlenstoffdioxid versetzten Mediums behandelt. Zusätzlich wird in den Spalten 1 und 4 eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt.

Am zweiten Versuchstag werden die Fibroblasten, wie ebenfalls beim Differenzierungsversuch beschrieben, mit dem CO₂-Medium (3.4.3) behandelt. Hierbei werden die Zellen wie in Abb. 9 dargestellt in den Spalten 2 und 5 für 15 min und in den Spalten 3 und 6 für 60 min mit CO₂-Medium behandelt. Die Zellen in den Spalten 1 und 4 werden als unbehandelte Kontrolle mitgeführt.

Die Behandlungszeiten werden so aufeinander abgestimmt, dass die Behandlung aller *Wells* gleichzeitig abgeschlossen ist. Während der Behandlungszeit werden nun 24 Reaktionsgefäße nachvollziehbar beschriftet und mit je 190 µl PBS befüllt. Nach der Behandlung wird das CO₂-Medium und das Kulturmedium der Kontrollen abgesaugt und durch 0,5 ml Versuchsmedium (3.4.3) ersetzt.

Ohne den Zellrasen zu berühren werden nun sofort 10 µl des Mediums aus jedem *Well* entnommen, in die vorbereiteten Reaktionsgefäße pipettiert und diese anschließend bei -20 °C eingefroren. Danach wird die Versuchsplatte im CO₂-Brutschlank inkubiert und die nächsten 24 Reaktionsgefäße wie oben beschrieben vorbereitet. Diese Probenentnahme wird nun nach 30 Minuten, 1, 2, 4 und 24 Stunden wiederholt.

Sind alle Proben generiert, wird die darin enthaltene Glukosemenge mit Hilfe des Glukosedetektions-Kits bestimmt. Hierzu werden die vorverdünnten Proben zunächst auf Eis gelegt und mit je 800 μ l PBS weiter auf ein Verhältnis von 1 : 100 verdünnt. Nun werden je 50 μ l der verdünnten Proben, nach kurzem Vermischen auf dem Vortexmischer, auf eine Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wird das im Kit enthaltenen Glukosedetektions-Reagens angesetzt und 50 μ l in jedes bereits mit Probe gefüllte *Well* pipettiert. Nun wird die Mikrotiterplatte mit einer Folie verschlossen und für ca. 30 s leicht geschüttelt. Daraufhin wird die Platte für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie dann nach Entfernung der Folie im Plattenlesegerät gemessen wird. Aus der detektierten Fluoreszenz wird die Glukosekonzentration in Mikromolar (μ M) errechnet.

4.4 Quantifizierung des Zielproteins α -SMA

Für die Quantifizierung von bestimmten Proteinen in einer Probe sind sechs Schritte erforderlich. Im ersten Schritt wird in der Proteinbestimmung der Gesamtproteingehalt jeder einzelnen Probe quantifiziert. Im zweiten Schritt, der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), werden die Proteine ihrer Molekülmasse nach auf einem Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gel aufgetrennt. Im dritten Schritt werden die Proteine im *Western Blot* aus dem Gel auf eine *Blotting*-Membran übertragen, auf der dann im vierten Schritt das Zielprotein α -SMA und das, zur Normalisierung benötigte, *Housekeeping*-Protein *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) mit ihrem spezifischen Antikörper (AK) markiert werden. Im fünften Schritt werden diese Proteine dann mit einem Bildgebungsgerät digital abgebildet, um schließlich im sechsten und letzten Schritt das Zielprotein mit einer Bildanalyse- und einer Tabellenkalkulations-Software normalisieren und quantifizieren zu können.

4.4.1 Protein-Quantifizierung

Um im *Western Blot* bestimmte Proteine quantifizieren zu können, wird zunächst die Gesamtproteinkonzentration der Proben bestimmt. Hierzu wird das Proteinbestimmungs-Kit verwendet.

Für die Proteinbestimmung werden die Proben zunächst sonifiziert. Vorbereitend werden hierfür die Proben auf Eis gelegt, die Sonotrode des Sonifizierers mit Ethanol (70 %) und einem Papiertuch gereinigt und ein Gehörschutz aufgesetzt. Das Gerät wird nun auf „*Cycle*“ 0,5 und „*Amplitude*“ 80 % eingestellt. Jetzt wird jedes Reaktionsgefäß einzeln geöffnet, die Sonotrode eingeführt und der „*START*“-Knopf des Sonifizierers je 10 Mal hintereinander betätigt. Danach wird der Deckel wieder verschlossen und die jeweilige Probe wieder auf Eis gelegt. Zwischen dem Sonifizieren zweier Proben wird die Sonotrode wie oben beschrieben gereinigt, um einer Probenverschleppung vorzubeugen.

Im nächsten Schritt werden die Proben 1 : 6 in PBS verdünnt. Hierzu werden neue Reaktionsgefäße beschriftet und mit je 20 µl PBS befüllt. Nun werden je 4 µl der jeweiligen Probe hinzugegeben. Die Proben werden anschließend wieder bei -20 °C eingefroren und die Verdünnungen auf Eis gelegt.

Nun werden die verdünnten bovines Serumalbumin (BSA)-Standards vorbereitet. Hierzu werden frische Reaktionsgefäße mit den Buchstaben „A“ bis „I“ versehen. Der im Kit enthaltene BSA-Standard wird nun wie in Tabelle 9 beschrieben mit PBS verdünnt, um eine Konzentrationsreihe von 0,0 bis 2,0 mg/ml zu erhalten.

Reaktionsgefäß [Bezeichnung]	BSA-Standard [μl]	PBS [μl]	Konzentration [μg/μl]
A	300	0	2,0
B	375	125	1,5
C	325	325	1,0
D	175 von B	175	0,75
E	325 von C	325	0,5
F	325 von E	325	0,25
G	325 von F	325	0,125
H	100 von G	400	0,025
I	0	400	0,0 = Kontrolle

Tabelle 9: Herstellung der verdünnten BSA-Standards

(BSA = Bovines Serumalbumin; PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung)

Die verdünnten BSA-Standards werden nun auf Eis gelegt und nach ihrem Gebrauch bei -20 °C eingefroren. Sie können bei der nächsten Proteinbestimmung aufgetaut und wiederverwendet werden.

Jetzt muss das *working reagent* (WR) angesetzt werden. Um die benötigte Menge des WR zu erhalten wird folgende Formel verwendet:

$$(\#Standards + \#Proben) * (\#Replikate) * (200 \mu l WR) = Volumen WR$$

Nun wird die errechnete Menge des WR im Verhältnis 50 : 1 (Reagens A : B) angesetzt.

Jetzt wird eine Mikrotiterplatte mit den verdünnten BSA-Standards und den zu untersuchenden verdünnten Proben bestückt. Jede Probe und jeder BSA-Standard wird nun einzeln auf dem Vortexmischer vermischt und je 10 μl pro *Well*, in Doppelbestimmung auf die Platte pipettiert. Anschließend werden 200 μl WR in jedes *Well* pipettiert, die Mikrotiterplatte mit einer Folie verschlossen, vorsichtig geschwenkt und für 30 min bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Danach wird die Folie entfernt, die Mikrotiterplatte auf Raumtemperatur abgekühlt und in das Plattenlesegerät gelegt. Nun wird in der Software „WorkOut 2.0“ ein passendes Layout gewählt und die Absorption bei 540 nm gemessen. Durch die mitgemessenen BSA-

Standards kann nun die Proteinkonzentration der Proben quantifiziert werden.

Die Ergebnisse der Proteinbestimmung können aus der Software „Work-Out 2.0“ als „Excel-Datei“ exportiert werden. Die gemessenen Proteinkonzentrationen werden in dieser Datei auf Blatt 7 „*Results Table*“ in Spalte F „*Concs.*“ in der Einheit $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ angezeigt. Abschließend muss die 1 : 6 Verdünnung der Proben zurückgerechnet, also die Konzentration mit dem Faktor 6 multipliziert werden, um die tatsächliche Proteinkonzentration zu erhalten.

4.4.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse in einem SDS-Gel, mittels eines elektrischen Feldes. Für diese Gelelektrophorese, wie auch für die Herstellung der Gele wird das Elektrophorese-Kit „Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell“ verwendet.

4.4.2.1 Herstellung der SDS-Gele

Im Folgenden wird die Herstellung eines 12%igen SDS-Gels, mit 15 *Wells* und einer Dicke von 1,0 mm beschrieben. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dieser Art von Gelen gearbeitet.

Vorbereitend werden eine 1,0 mm Distanzplatte und eine kurze Platte aufeinandergelegt und auf einem flachen Untergrund, mit der kurzen Platte nach vorne, in einem Gussrahmen fixiert. Danach wird der Gussrahmen in den Gussständer montiert. Es ist darauf zu achten, dass die Platten und das graue Dichtungskissen sauber und trocken sind und, dass die Unterkanten der Platten exakt aufeinanderliegen, um einem Auslaufen der Gele vorzubeugen. Nun wird ein 15-*Well*-Kamm zwischen den Platten eingesetzt und ca. 1 cm unter dem Kamm eine Markierung auf der kurzen Platte gesetzt. Danach wird der Kamm wieder entfernt.

Im nächsten Schritt wird das Trenngel vorbereitet. Je nach Molekülmasse des zu untersuchenden Proteins wird, wie in Tabelle 10 dargestellt, eine bestimmte Zusammensetzung des Trenngels gewählt.

Molekülmasse [kDa]	Konzentration [%]	Acrylamid (30 %) [ml]	A. dest [ml]
> 250	5	1,25	4,375
250 - 120	7,5	1,875	3,75
120 - 40	10	2,5	3,125
40 - 15	12	3	2,625
< 20	15	3,75	1,875

Tabelle 10: Konzentration und Komponenten des Trenngels in Abhängigkeit von der Molekülmasse des Proteins
(A. dest = *aqua destillata*)

Das hier zu bestimmende Protein α -SMA hat eine Molekülmasse von 42 kDa. Erfahrungsgemäß hat sich bei diesem Protein allerdings, abweichend zum angegebenen Richtwert, das 12%ige Trenngel zur besseren Bandendifferenzierung bewährt. Unabhängig von der gewählten Konzentration des Trenngels werden den in Tabelle 10 genannten Komponenten nun noch die folgenden beigelegt:

1,875 ml	Trenngelpuffer (4x)
10 μ l	Tetramethylethyldiamin (TEMED)
25 μ l	APS (10 %)

Hierbei ist darauf zu achten, dass durch die Zugabe des Ammoniumpersulfats (APS) der Polymerisationsprozess sofort startet. Daher wird das APS als letztes hinzugegeben, die Komponenten durch vorsichtiges Schwenken vermischt und bis zur Markierung zwischen die vorbereiteten Platten pipettiert. Danach wird das Trenngel vorsichtig mit Ethanol (70 %) überschichtet. Die Polymerisation dauert nun etwa 20 min.

In dieser Zeit kann nun das Sammelgel vorbereitet werden. Hierbei spielt im Gegensatz zum Trenngel die Molekülmasse der Proteine keine Rolle, weshalb die Mengenangaben immer die Gleichen sind:

650 µl	Acrylamid (30 %)
3 ml	A. dest
1,5 ml	Sammelgelpuffer (4x)
10 µl	TEMED
25 µl	APS (10 %)

Auch beim Sammelgel wird das APS als letztes, unmittelbar vor der Befüllung der Platten, hinzugegeben. Nach Ablauf der 20 min wird das Ethanol abgegossen und durch das Sammelgel ersetzt. Abschließend wird der 15-Well-Kamm eingesetzt. Nach weiteren 20 min ist die Polymerisation abgeschlossen und das SDS-Gel kann verwendet werden.

4.4.2.2 Vorbereitung des Elektrophorese-Systems

Zur Vorbereitung des Elektrophorese-Systems wird zunächst der Lauf-Puffer vorbereitet. Für ein oder zwei SDS-Gele (4.4.2.1) werden 700 ml Lauf-Puffer, also 70 ml Lauf-Puffer (10x) (3.4.2) und 630 ml A. dest angesetzt. Für drei oder vier Gele werden 1000 ml Lauf-Puffer, also 100 ml Lauf-Puffer (10x) und 900 ml A. dest benötigt.

Nun wird ein Gel, mit der kurzen Platte zur Mitte zeigend, in die Elektroden-Einheit eingesetzt. Sollen zwei Gele gleichzeitig laufen, wird das zweite Gel ebenfalls mit der kurzen Platte zur Mitte, also spiegelverkehrt zum ersten platziert. Wird nur ein Gel benutzt, wird eine sogenannter Pufferdamm eingesetzt, um das System abzudichten. Nun wird die mit den Gelen bestückte Elektroden-Einheit in die Elektrophorese-Kammer eingelegt. Es können zwei dieser Elektroden-Einheiten in eine Elektrophorese-Kammer eingelegt, also bis zu vier Gele gleichzeitig betrieben werden.

Jetzt wird der Lauf-Puffer zunächst bis zum oberen Rand der kurzen Platte zwischen die beiden Gele, bzw. zwischen Gel und Pufferdamm gefüllt. Hiermit wird kontrolliert ob die Elektroden-Einheit dicht ist. Läuft kein Puffer aus, kann die Elektroden-Einheit komplett und die Elektrophorese-Kammer bis zur jeweiligen Markierung gefüllt werden. Nun wird der 15-Well-Kamm vorsichtig entfernt und jedes Well behutsam mit einer Pipette mit Lauf-Puffer durchgespült, um etwaige Gelreste zu entfernen. Nun können die Gele mit den Proben beladen werden.

4.4.2.3 Vorbereitung der Proben

Für die Gelelektrophorese werden hier 10 µl verdünnte Probe verwendet, die je 5 µg Protein der jeweiligen Probe enthält. Dafür muss zunächst die Menge der Probe errechnet werden, die diese Proteinmenge enthält. Danach wird die Menge A. dest errechnet, um die gewünschten 10 µl verdünnte Probe zu erhalten. Außerdem wird der Laemmli-Puffer (4x) (3.4.2) benötigt. Dieser sollte im Vorfeld angesetzt werden. Der Puffer ist bei 4 °C für 6 Monate haltbar, muss aber vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Im ersten Schritt werden die gewünschten 5 µg Protein mit jedem der, in der Proteinbestimmung (4.4.1) gemessenen, Proteinkonzentrationen dividiert. Der Quotient dieser Rechnung gibt die Menge jeder Probe an, die 5 µg Protein enthält. Diese Rechnung wird in folgendem Beispiel einer Probe mit einer Proteinkonzentration von 1,85 µg/µl dargestellt:

$$\frac{5 \mu g}{1,85 \frac{\mu g}{\mu l}} = 2,7 \mu l$$

Nun wird die Menge A. dest zur Verdünnung der Probe errechnet. Hierzu wird die errechnete Menge der Probe, die 5 µg Protein enthält, von 10 µl A. dest subtrahiert. Im Folgenden wird das obige Beispiel fortgesetzt:

$$10 \mu l - 2,7 \mu l = 7,3 \mu l$$

Jetzt werden die bei -20 °C gelagerten Proben auf Eis gelegt und neue Reaktionsgefäße gemäß dieser Proben beschriftet. Danach wird die individuell für jede Probe errechnete Menge A. dest in die vorbereiteten Reaktionsgefäße vorgelegt. Anschließend werden die Proben durch Auf- und Abpipettieren gemischt und die errechneten Mengen ebenfalls in das jeweilige Reaktionsgefäß gegeben, sodass jedes Reaktionsgefäß 10 µl verdünnte Probe mit 5 µg Protein enthält. Die originalen Proben werden nun wieder bei -20 oder -80 °C eingefroren und die verdünnten Proben auf Eis gelegt.

Danach wird der Laemmli-Puffer hinzugegeben. Bei dem benötigten Verhältnis von 1 : 4 (Puffer : Probe) wird hier aufgerundet und mit 4 µl

Laemmli-Puffer pro Probe gerechnet, um den durch das Pipettieren des dickflüssigen Puffers bedingten Verlust auszugleichen. Vor der Anwendung wird der Laemmli-Puffer unter dem Abzug in einem frischen Reaktionsgefäß mit 20 % 2-Mercaptoethanol versetzt, gut verschlossen und kurz auf dem Vortexmischer vermischt. Nun werden jeder verdünnten Probe 4 µl dieser Mischung zugegeben. Hierbei ist darauf zu achten eine Probenverschleppung zu vermeiden. Nun werden die Proben ebenfalls kurz auf dem Vortexmischer vermischt, kurz abzentrifugiert und für 7 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Danach werden sie wieder auf Eis gelegt und umgehend auf das vorbereitete SDS-Gel aufgetragen.

4.4.2.4 Durchführung

Für die Durchführung der Gelelektrophorese wird das vorbereitete SDS-Gel in der Elektrophorese-Kammer (4.4.2.2) mit den vorbereiteten Proben (4.4.2.3) bestückt und die darin enthaltenen Proteine, durch das Anlegen eines elektrischen Stroms, ihrer Molekülmasse nach aufgetrennt.

Zunächst wird der *Western*-Marker aufgetaut, kurz auf dem Vortexmischer vermischt, in eine der äußersten *Wells* pipettiert und wieder bei -20 °C eingefroren. Danach werden die Proben sorgfältig und zügig, in einer später nachvollziehbaren Reihenfolge, in die danebenliegenden *Well* pipettiert. Nun wird der Deckel der Elektrophorese-Kammer geschlossen und die Stromkabel mit dem Elektrophorese-Netzgerät verbunden. Anschließend wird zunächst für ca. 30 min eine Spannung von 60 V angelegt, bis die Proben das Sammelgel passiert und sich auf dem Trenngel gesammelt haben. Nun wird für ca. 60 min eine Spannung von 130 V angelegt. Sobald die Proben unten aus dem Gel laufen zu beginnen, wird der Vorgang gestoppt und das Gel aus der Elektroden-Einheit entnommen.

Die in den Proben enthaltenen Proteine sind nun ihrer Molekülmasse nach in dem Gel aufgetrennt und können nun auf eine *Blotting*-Membran transferiert werden.

4.4.3 Proteintransfer

Für den Transfer der aufgetrennten Proteine von dem SDS-Gel auf eine *Blotting*-Membran, wird das Proteintransfer-Gerät „Trans-Blot® Turbo™ Transfer System“ verwendet.

Zunächst wird der Transfer-Puffer (25x) (3.4.2) benötigt, um den gebrauchsfertigen Transfer-Puffer vorzubereiten. Dies sollte bereits während der laufenden SDS-PAGE (4.4.2.4) erfolgen. Hierfür werden die folgenden Ingredienzen in einen Messzylinder gegeben:

40 ml	Transfer-Puffer (25x)
50 ml	Methanol
	ad 500 ml A. dest

Für zwei Gele werden 500 ml, für vier Gele 750 ml Transfer-Puffer benötigt. Dieser wird zunächst abgedeckt und bis zum Gebrauch bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden. Ist die SDS-PAGE fertig, werden zwei *Blotting*-Papiere und die zugeschnittene *Blotting*-Membran in eine mit dem *Blotting*-Puffer gefüllte Schale gelegt. Anschließend wird das fertige Gel vorsichtig aus den Platten gelöst und das Sammelgel abgetrennt und verworfen. Anschließend wird das verbleibende, proteintragende Trenngel ebenfalls vorsichtig in eine Schale mit Transfer-Puffer gelegt und für ca. 2 min äquilibriert.

Nach diesen vorbereitenden Schritten werden nun, wie in Abb. 10 dargestellt, zwei *Blotting*-Papiere, die *Blotting*-Membran und das proteinbeladene Gel in die Mitte der Bodenschale einer der Kassetten des Proteintransfer-Geräts gestapelt. In diese Bodenschale ist die Anode eingearbeitet. Eventuell auftretende Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen des „*Blot*-Sandwiches“, werden mit der, dem Kit beiliegenden, kleinen Kunststoffwalze entfernt. Danach wird der Deckel der Kassette, der die Kathode hält, auf die Bodenschale gesetzt und die Kassette verschlossen.

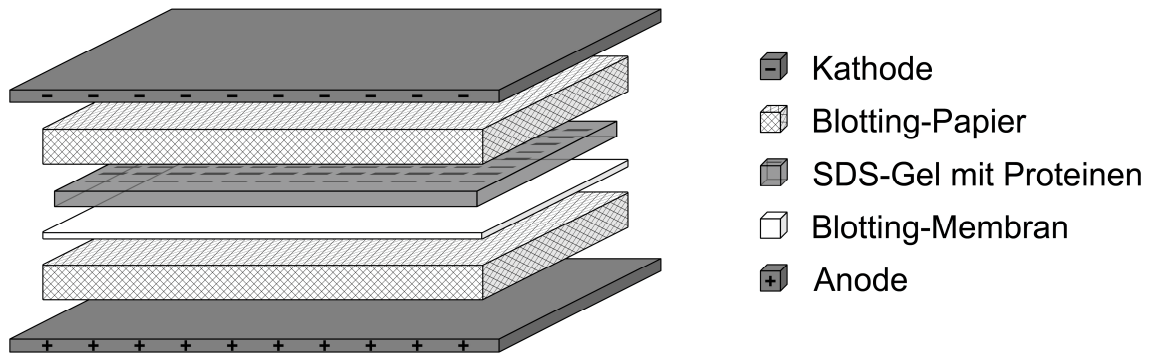


Abb. 10: Schematische Darstellung des Aufbaus eines „Blot-Sandwiches“.
 Auf die Anode wird ein *Blotting*-Papier gelegt. Dann wird die *Blotting*-Membran und darauf das mit Proteinen beladene *sodium dodecyl sulfate* (SDS)-Gel geschichtet. Zwischen Gel und Kathode wird ein weiteres *Blottings*-Papier gelegt.

Nun wird die Kassette in einen der Kassettenschächte geschoben und ein Programm mit 25 V, 2,5 A für 20 min eingestellt. Dadurch werden die Proteine aus dem Gel auf die *Blotting*-Membran übertragen.

Nun werden der Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-gepufferte Salzlösung (TBS)- und der TBS + 0,1 % *Tween* (TBS-T)-Puffer angesetzt. Hierzu werden je 100 ml TBS-Puffer (10x) (3.4.2) einmal mit 1 ml *Tween* und einmal direkt auf ein Endvolumen von je 1 l mit A. dest aufgefüllt.

Ist das Programm abgeschlossen, wird die Kassette entnommen und das Gel zur Aufbewahrung in einem Gefäß mit TBS-Puffer bei 4 °C in den Kühlschrank gelegt. Die *Blotting*-Membran wird zur Kontrolle des regelrechten Proteintransfers mit Ponceau S angefärbt. Wurden die Proteinbanden sauber übertragen, wird die *Blotting*-Membran zunächst mit A. dest und anschließend mit TBS-Puffer entfärbt.

4.4.4 Immunmarkierung

Für die Markierung spezifischer Proteine mit dem jeweiligen AK, muss die *Blotting*-Membran zunächst geblockt werden. Hierzu werden 2,5 g BSA in 50 ml TBS-T-Puffer gelöst und die *Blotting*-Membran in einem Zentrifugenröhrchen für 1 h bei Raumtemperatur mit 5 ml dieser 5%igen BSA-Lösung auf einem Taumel-Rollenmischer platziert. Damit wird verhindert, dass die *Blotting*-Membran die dargebotenen AK unspezifisch bindet. Nun werden in vier Schritten das Zielprotein α -SMA, das *Housekeeping*-Protein

GAPDH und der *Western*-Marker mit ihrem jeweiligen, spezifischen primären AK und dem sekundären AK markiert.

Im ersten Schritt wird das Zielprotein α -SMA mit seinem spezifischen AK markiert. Es werden 4 μ l α -SMA-AK mit 4 ml BSA-Lösung, zu einem Verhältnis von 1 : 1000, in einem frischen Zentrifugenröhrchen verdünnt und die *Blotting*-Membran vorsichtig mit einer Pinzette hinzugefügt. Das Zentrifugenröhrchen wird nun über Nacht bei 4 °C auf den Taumel-Rollenmischer gelegt. Am nächsten Tag wird die *Blotting*-Membran mit TBS-T-Puffer gewaschen. Hierzu wird das Zentrifugenröhrchen geleert, mit 5 ml TBS-T-Puffer befüllt und für 5 min auf den Taumel-Rollenmischer gelegt. Dieser Schritt wird drei Mal wiederholt.

Im zweiten Schritt werden nun der sekundäre AK und der *Western*-Marker-AK hinzugegeben. Es wird ein 1 : 1.000 Verhältnis, also 4 μ l Ziegen Anti-Maus-AK und ein 1 : 4.000 Verhältnis, also 1 μ l *Western*-Marker-AK in 4 ml TBS-T-Puffer in einem frischen Zentrifugenröhrchen hergestellt und die *Blotting*-Membran hinzugefügt. Anschließend wird das Zentrifugenröhrchen für 60 min bei Raumtemperatur auf den Taumel-Rollenmischer gelegt und danach wie oben beschrieben drei Mal mit TBS-T-Puffer gewaschen.

Im dritten Schritt wird der primäre AK für das *Housekeeping*-Protein GAPDH in einem Verhältnis von 1 : 10.000 in BSA-Lösung angesetzt. Hierzu werden zunächst 10 ml BSA-Lösung und 1 μ l GAPDH-AK angesetzt und davon 5 ml in das Zentrifugenröhrchen mit der *Blotting*-Membran gegeben. Dieses wird nun für 60 min bei Raumtemperatur auf einen abgedunkelten Taumel-Rollenmischer gelegt. Der verdünnte GAPDH-AK kann nun wieder umgefüllt, bei -20 °C eingefroren und bis zu fünf Mal wiederverwendet werden. Jetzt wird die *Blotting*-Membran erneut wie oben beschrieben gewaschen.

Im vierten und letzten Schritt wird die *Blotting*-Membran, ähnlich wie im zweiten Schritt, mit 4 ml des im Verhältnis 1 : 1.000 verdünnten Ziegen Anti-Maus-AK in einem frischen Zentrifugenröhrchen für 60 min auf den abgedunkelten Taumel-Rollenmischer gelegt und anschließend erneut drei Mal gewaschen.

4.4.5 Proteindetektion

Zur Detektion des Zielproteins wird die *Blotting*-Membran mit *Western*-Substrat behandelt und in dem Bildgebungsgerät „ChemiDoc MP Imaging System“ abgebildet.

Die proteinbeladene *Blotting*-Membran wird zunächst geglättet. Hierzu wird sie in einem Abwurfbeutel vorsichtig über die Tischkante gezogen, bis sie sich nicht wellt. Nun wird die *Blotting*-Membran gleichmäßig mit dem *Western*-Substrat benetzt und zügig auf den Probenteller des Bildgebungsgeräts gelegt. Eventuelle Luftblasen werden mit der Kunststoffwalze entfernt, die Schublade in das Gerät geschoben und die Tür geschlossen. Nun wird das *Western*-Substrat, wie in Abb. 11 schematisch dargestellt, durch das, mit dem sekundären AK konjugierte, Enzym *horseradish peroxidase* (HRP) umgesetzt. Hierbei entsteht Licht, das von dem Bildgebungsgerät detektiert wird.

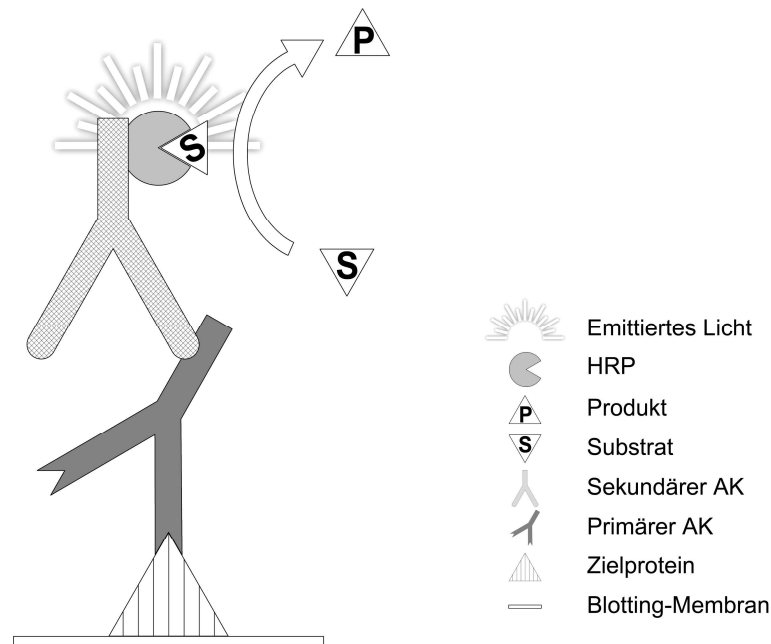


Abb. 11: Schematische Darstellung der Immunmarkierung und Detektion des Zielproteins.

Der primäre Antikörper (AK) bindet an das Zielprotein auf der *Blotting*-Membran. Der mit dem Enzym *horseradish peroxidase* (HRP) konjugierte sekundäre AK, bindet an den primären AK. Bei Hinzugabe des *Western*-Substrats wird dieses durch die HRP unter Entstehung von Licht zu seinem Produkt gespalten.

Nun wird die Einstellung „15 Bilder im Chemilumineszenz-Modus, 1–150 s Belichtungszeit mit Signalakkumulation“ gewählt und der Vorgang gestartet. Ist der Vorgang beendet, werden die Bilder nachvollziehbar benannt und zur weiteren Bearbeitung auf ein Speichermedium kopiert.

4.4.6 Auswertung

Zur Auswertung werden die, mit dem Bildgebungs-Gerät aufgenommenen, Bilder in der Bildanalyse-Software „Image Lab™“ analysiert und die gemessenen Volumina in einer „Excel-Datei“ exportiert.

Zunächst wird je ein Bild, auf dem die Banden des *Housekeeping*-Proteins GAPDH und die des Zielproteins α -SMA gut zu erkennen, aber nicht überbelichtet sind, ausgewählt. Überbelichtete Areale werden in der Software mit roten Pixeln dargestellt. Nun werden die Bilder im Menüfeld „*Image Tools*“ so rotiert, dass die Banden horizontal ausgerichtet sind und eventuell horizontal gespiegelt, sodass die Proteinleiter auf der linken Bildseite

zu sehen ist. Anschließend wird das Menüfeld „*Volume Tools*“ ausgewählt und von links nach rechts Rechtecke um die zu messenden Banden gezogen. Diese werden automatisch als „U“ für „*Unknown*“ gekennzeichnet und durchnummeriert. Nun wird noch ein repräsentatives Areal als Hintergrund definiert, der dann von den ausgewählten Bereichen subtrahiert wird. Hierzu wird ein Rechteck auf dem Hintergrund, also einem Areal ohne Banden, gezeichnet und per Doppelklick unter „*Volume Type*“ die Option „*Background*“ gewählt. Dieses Rechteck wird nun als „B1“ angezeigt. Jetzt wird im Menüfeld „*Analysis Table*“ der Reiter „*Volume Table*“ ausgewählt und die Tabelle als „Excel-Datei“ exportiert.

In der Tabellenkalkulations-Software „Microsoft Excel“ werden die korrigierten, also mit dem Hintergrund subtrahierten, Volumina der Intensität des detektierten Lichtes, aus der Spalte „*Adj. Vol. (Int)*“ von GAPDH und α -SMA in eine neue Tabelle kopiert. Hier werden nun die Volumina des Zielproteins α -SMA mit denen des *Housekeeping*-Proteins GAPDH dividiert, um diese zu normalisieren. Zuletzt wird noch das Volumen der mitgeführten Kontrolle, also das der Zellen, die nur mit Versuchs- und nicht mit CO₂-Medium inkubiert wurden, gleich eins gesetzt, um die relative Veränderung der α -SMA-Expression graphisch darstellen zu können.

4.5 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Quantifizierung der Genexpression der verschiedenen Differenzierungsmarker (1.2.3) wird die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) mithilfe des PCR-Gerätes „Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System“ und der dazugehörigen Software „Sequence Detection Systems-Software“ verwendet. Hiermit wird in Echtzeit die Menge der zu untersuchenden Ribonukleinsäure (RNA) nachgewiesen.

Die RNA-Proben werden zunächst aufgereinigt und von verunreinigenden Zellbestandteilen und DNA befreit (4.5.1). Es folgt die Quantifizierung der Gesamt-RNA zur Normierung der Proben auf eine einheitliche Menge an RNA zur Vergleichbarkeit (4.5.2). Anschließend wird die RNA in der sogenannten reversen Transkription in komplementäre DNA (cDNA)

umgeschrieben (4.5.3). Mithilfe der entsprechenden Primer können nun bestimmte Gene vervielfältigt und vollautomatisch quantifiziert werden.

4.5.1 Vorbereitung und Aufreinigung

Als erster Schritt werden die im RNA-Isolations-Kit enthaltenen Lösungen vorbereitet. Reines Ethanol wird mit Ribonuclease (RNase)-freiem Wasser auf 70 % verdünnt. Der Lyse-Puffers (RLT-Puffer) wird mit 2-Mercaptoethanol (10 µl auf 1 ml Puffer) versetzt und das Wasch-Puffer-Konzentrat (RPE-Puffer) mit 260 ml Ethanol verdünnt. Nun werden die trockenen eingefrorenen Zellpellets aufgetaut und auf Eis gelagert. Die Homogenisierungs- und Aufreinigungssäulen, sowie 1,5 ml Reaktionsröhrchen werden entsprechend der zu untersuchenden Proben beschriftet.

Nun werden die Zellpellets mit 350 µl RLT-Puffer resuspendiert und die Proben auf die entsprechenden Homogenisierungssäulen pipettiert. Nun werden die Proben für zwei Minuten bei 13.000 rpm bei 10 °C zentrifugiert. Alle folgenden Zentrifugationen werden ebenfalls bei einer Temperatur von 10 °C durchgeführt. Das im Sammelröhrchen entstandene Lysat wird nun mit je 350 µl des 70 %igen Ethanols versetzt. Anschließend werden die Proben in die Aufreinigungssäulen gegeben und bei 10.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Die Sammelröhrchen werden verworfen und die Säulen in neuen Sammelröhrchen platziert. Nun werden je 700 µl des im Kit enthaltenen RW1-Puffers auf die Säulen pipettiert und diese erneut für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Daraufhin werden je 500 µl RPE-Puffer auf die Säulen gegeben und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Sammelröhrchen werden anschließend erneut verworfen und dieser Schritt mit einer Zentrifugationszeit von zwei Minuten wiederholt. Nun wird die Membran der Aufreinigungssäulen bei 13.000 rpm und einer Zentrifugationszeit von fünf Minuten getrocknet.

Die nun in der Membran der Aufreinigungssäulen isolierte RNA der jeweiligen Proben wird mit RNase-freiem Wasser in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Hierzu werden je 50 µl RNase-freies Wasser auf die Membranen pipettiert, die Säulen in die entsprechend beschrifteten

Reaktionsgefäße eingeführt und diese für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert.

Anschließend wird verunreinigende DNA mittels des DNA-Entfernungs-Kits „DNA-free“ aus den Proben entfernt. Es folgt die Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA der Proben.

4.5.2 Gesamt-RNA-Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Gesamt-RNA der zu untersuchenden Proben wird das Spektralphotometer „NanoDrop 1000“ mit der dazugehörigen Messsoftware (Version 3.8.1) verwendet. Die Proben werden zunächst 1 : 50 in Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) verdünnt. Hierzu werden je 2 µl der Proben mit 98 µl TRIS in ein neues, entsprechend beschriftetes Reaktionsgefäß überführt und kurz auf dem Vortexmischer vermischt.

Vor einer Messserie wird das Gerät zunächst mit 1 µl RNase-freiem Wasser initialisiert. Zwischen dem Aufbringen der verschiebenden Proben wird der Sensor des Gerätes mit einem fusselfreien Präzisionswischtuch gereinigt. Nun wird der Geräteleerwert mit TRIS als Leerprobe bestimmt. Es folgen die eigentlichen Messungen. Hierzu werden je 1 µl der Proben nacheinander auf den Sensor des Spektralphotometers gegeben. Anhand des Geräteleerwertes und Probenwerte errechnet nun die Messsoftware mit Hilfe der folgenden Formel die Absorption bzw. Gesamtextinktion der einzelnen Proben.

$$\text{Absorption} = -\log \left[\frac{\text{Probenintensität}}{\text{Leerprobenintensität}} \right]$$

Mit Hilfe des BEER'SCHEN Gesetzes wird nun anhand der Extinktion bei 260 nm die RNA-Konzentration bestimmt und die Ergebnisse über die zugehörige Messsoftware in einer „Excel-Datei“ ausgegeben. Zudem werden auch Angaben zu der Probenqualität gemacht. Das sogenannte 260/280-Reinheitsverhältnis gibt das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm zur Extinktion bei 280 nm an und beträgt bei einer „reinen“ RNA-Probe etwa 2,0.

Anhand der gemessenen Konzentrationen kann nun eine einheitliche Menge RNA von 200 ng entnommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit RNase-freiem Wasser auf 200 ng RNA pro 10 µl verdünnt werden.

4.5.3 Reverse Transkription

Bei dem Vorgang der reversen Transkription wird die Gesamt-RNA in die sogenannte cDNA umgeschrieben. Hierzu wird das Reverse-Transkriptions-Kit der Firma „Omniscript®“ verwendet. Zunächst werden 0,5 µg der zu untersuchenden RNA-Proben mit 10 µl RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 0,05 µg/µl in frischen, entsprechend beschrifteten Reaktionsgefäßen verdünnt. Dann wird ein sogenannter *Mastermix* nach dem in Tabelle 11 beschriebenen Pipettierschema angesetzt.

Bestandteile	Volumen [µl]
10 x Puffer RT	2
dNTP Mix (jeweils 5 mM dNTP)	2
Oligo(dT)-Primer (10 µM)	1
RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,25
Omniscript Reverse Transkriptase (4 U/µl)	0,25
RNase freies Wasser	4,5
Gesamtvolumen	10

Tabelle 11: Pipettierschema für den *Mastermix* zur Umschreibung der Gesamt-RNA in cDNA (Einfachansatz)

Die Bestandteile des Mastermixes sind im Omniscript® RT Kit enthalten. (RNA = Ribonukleinsäure; cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure; RT = Reverse Transkription; dNTP = Desoxyribonukleosidtriphosphat; RNase = Ribonuklease; µl = Mikroliter; µM = Mikromolar; U = Unit)

Es werden nun je 10 µl *Mastermix* zu den verdünnten RNA-Proben gegeben. 0,5 µg RNA in 20 µl ergibt eine RNA-Konzentration von 25 ng/µl. Die Proben werden kurz auf dem Vortexmischer vermischt, abzentrifugiert und anschließend für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die nun entstandene cDNA kann nun direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

Es folgt der Ansatz der *Mastermixe* für die verschiedenen Zielgene (1.2.3), sowie der *Housekeeping*-Gene Cyclophilin B (CypB) und 18S ribosomale RNA (18S-rRNA). Für das 18S-rRNA-Gen wird ein anderer Ansatz als für die übrigen Gene benötigt. Die Ansätze werden nach den in Tabelle 12 dargestellten Pipettierschemata hergestellt.

Bestandteile	Volumen 18S-rRNA [µl]	Volumen Zielgene [µl]
SYBR™ <i>Green Mastermix</i> (2x)	12,5	12,5
<i>Forward</i> Primer (10 µM)	0,25	0,75
<i>Reverse</i> Primer (10 µM)	0,25	0,75
RNase freies Wasser	8	7
Gesamtvolumen	21	21

Tabelle 12: Pipettierschemata für den *Mastermix* der Ziel- und *Housekeeping*-Gene (Einfachansatz)

Für das *Housekeeping*-Gen 18S-rRNA ist ein anderer Ansatz des *Mastermixes* als für das andere hier verwendete *Housekeeping*-Gen und die zu quantifizierenden Zielgene zu verwenden. (RNase = Ribonuklease; µl = Mikroliter; µM = Mikromolar)

Die in Tabelle 11 und Tabelle 12 dargestellten Einfachansätze werden nun für die gewünschte Anzahl der zu untersuchenden Proben hergestellt. Hierbei ist darauf zu achten, dass alle Proben in Dreifachbestimmung untersucht werden. Es werden nun je 4 µl der cDNA-Proben und 21 µl *Mastermix* nach dem in Abb. 12 dargestellten Schema auf eine optische 96-Well-Reaktionsplatte pipettiert. Eine sogenannte *no template control* (NTC) bestehend aus dem *Mastermix* und 4 µl RNase-freiem Wasser anstatt einer Probe wird ebenfalls in Dreifachbestimmung als Kontrolle mitgeführt.

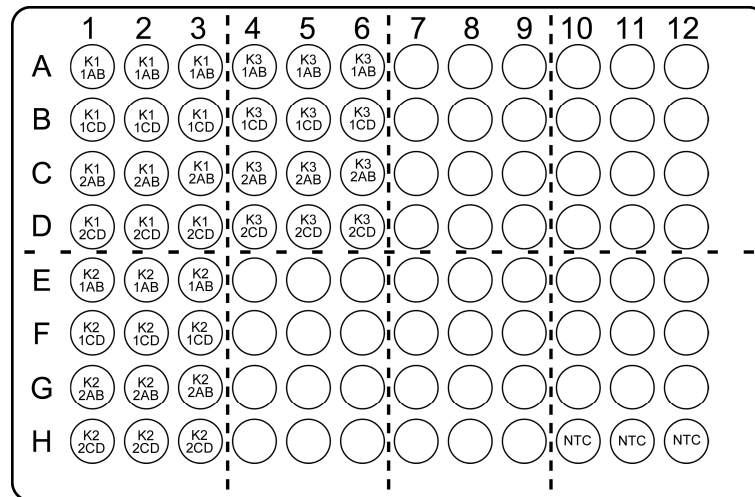


Abb. 12: Schematische Darstellung einer 96-Well-Platte als Pipettiervorlage für die cDNA-Proben.

Die in dem Differenzierungsversuch für Gennachweise (4.3.5) erzeugten Proben werden anhand dieser Vorlage auf eine optischen 96-Well-Reaktionsplatte gebracht. Die in den einzelnen Wells dargestellten alphanumerischen Codes beschreiben aus welcher Kultur (K) und aus welchen Wells der Versuchsplatte (Abb. 7) die Proben stammen. Die Proben und die mitgeführte Kontrolle (NTC = no template control) werden jeweils als Dreifachbestimmung aufgetragen. Zur Veranschaulichung wurden hier die Proben einer Versuchsplatte mit den darauf behandelten drei Fibroblastenkulturen auf der Reaktionsplatte dargestellt.

(cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure)

Die Platte wird nun mit einer Plattenverschlussfolie verschlossen, kurz abzentrifugiert und in das PCR-Gerät eingelegt.

4.5.4 Messung und Auswertung

Bei der Quantifizierung der Zielgene muss zwischen Nox4 mit dem entsprechenden *Housekeeping*-Gen CypB einerseits und den Genen FoxO1, Ki67, Nrf2, α -SMA mit dem entsprechenden *Housekeeping*-Gen 18S-rRNA andererseits unterschieden werden. In Tabelle 13 ist das PCR-Protokoll mit dem speziellen Temperaturverlauf für die Gene der Proteine Nox4 und CypB dargestellt.

Phase	Zyklenanzahl	Temperatur [°C]	Zeit [mm:ss]
1	1	55	02:00
2	1	95	10:00
3	40	95	00:15
		55	01:00

Tabelle 13: Verwendetes PCR-Protokoll für die Gene der Proteine Nox4 und CypB
(PCR = Polymerase-Kettenreaktion; Nox4 = Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase 4; CypB = Cyclophilin B)

Für die Gene der Proteine FoxO1, Ki67, Nrf2, α -SMA und 18S-rRNA wird der in Tabelle 14 dargestellte Temperaturverlauf verwendet

Phase	Zyklenanzahl	Temperatur [°C]	Zeit [mm:ss]
1	1	95	10:00
2	40	95	00:15
		60	01:00

Tabelle 14: Verwendetes PCR-Protokoll für die Gene der Proteine FoxO1, Ki67, Nrf2, α -SMA und 18S-rRNA

(PCR = Polymerase-Kettenreaktion; FoxO1 = *forkhead box protein O1*; Nrf2 = *nuclear factor erythroid related factor-2*; α -SMA = *alpha-smooth muscle actin*; 18S-rRNA = 18S ribosomale Ribonukleinsäure)

Nun wird der Modus „Standard 7300“ und das entsprechende Protokoll ausgewählt. Das Probenvolumen wird auf 25 μ l festgelegt und der Vorgang gestartet. Die Ergebnisse werden als „Excel-Datei“ exportiert.

Der ausgegebene *cycle threshold* (Ct)-Wert wird nun zur Berechnung des relativen Expressionsunterschieds zwischen den behandelten Proben und den unbehandelten Proben, also den Kontrollen, herangezogen. Hierzu wird die sogenannte Delta-Delta-($\Delta\Delta$)-Ct-Methode verwendet. Für diese Methode wird zunächst der Δ Ct-Wert für alle Proben mit folgender Formel errechnet.

$$\Delta Ct = Ct (\text{Zielgen}) - Ct (\text{Housekeeping-Gen})$$

Anschließend wird der sogenannte $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert berechnet. Hierzu wird der ΔCt -Wert jeder behandelten Probe von dem Mittelwert aller ΔCt -Werte der Kontrollgruppe subtrahiert.

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{behandelte Probe}) - \text{Mittelwert} (\Delta\text{Ct Kontrolle})$$

Der Expressionsunterschied zwischen den behandelten Proben und den Kontrollen, normiert auf das *Housekeeping*-Gen wird nun mit der folgenden Formel berechnet.

$$\text{Expressionsunterschied} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Abschließend wird die Kontrollgruppe gleich 100 % gesetzt und man erhält die relative Expression des Zielgens der behandelten Gruppe zur unbehandelten Kontrolle.

4.6 Gesamt-DNA-Quantifizierung

Für die Quantifizierung der Gesamt-DNA einer Probe wird analog zur Gesamt-RNA-Quantifizierung (4.5.2) das Spektralphotometer „NanoDrop 1000“ verwendet. In der dazugehörigen Software kann hier als zu untersuchendes Material DNA ausgewählt werden. Zur Quantifizierung von Doppelstrang-DNA wird hier der Modus „DNA-50“ gewählt.

Die Reinheit der Proben wird, wie schon bei der RNA-Quantifizierung mit dem 260/280-Reinheitsverhältnis errechnet. Anders als bei der RNA wird bei der DNA ein Verhältnis von 1,8 als „rein“ angesehen.

Mit der DNA-Quantifizierung wird die bei den verschiedenen Versuchen eingesetzte Zellzahl bestimmt, die z.B. für die zur Normierung der Ergebnisse verwendet wird. Hiermit können Schwankungen der Zellzahl der ausplattierten Fibroblastenkulturen herausgerechnet und falschpositive oder falschnegative Ergebnisse vermieden werden.

4.7 Autoklavieren

Zum Autoklavieren wird der Tischautoklav „Systec DX-90“ verwendet. Es werden zwei voreingestellte Programme in diesem Gerät durchgeführt, eines zum Aufbereiten von Laborutensilien und eines zur Dekontamination von Abfällen, die mit den Zellkulturen in Berührung gekommen sind. Zur Sterilitätskontrolle wird ein Autoklavier-Indikatorband verwendet.

4.7.1 Laborutensilien

Unsteril gelieferte oder wiederverwendbare Materialien, die mit den Zellkulturen in Berührung kommen, müssen vor Gebrauch autoklaviert werden. Dies erfolgt in autoklavierbaren Behältnissen, die später die Sterilität der Materialien gewährleisten.

Pinzetten und Scheren, für die Präparation des Spendergewebes (4.1.2), werden mit dem Impulssiegelgerät in Sterilisationsbeuteln eingeschweißt. Die Schläuche für die Versetzung des CO₂-Mediums mit CO₂ (4.2.2) werden nach Gebrauch zunächst gründlich mit Wasser durchgespült und dann einzeln in Abwurfbeuteln eingerollt. Diese werden umgeschlagen und mit einem Streifen Autoklavier-Indikatorband verschlossen. Reaktionsgefäße werden in einen Kunststoffbehälter gefüllt, der Schraubdeckel lose aufgesetzt und ebenfalls mit einem Streifen Autoklavier-Indikatorband befestigt.

Die Utensilien werden in einem Sieb gesammelt und mit dem voreingestellten Programm „1 – Festkörper“ autoklaviert. Dieses Programm hat bei einer Temperatur von 121 °C eine Sterilisationszeit von 20 min und eine Trocknungszeit von 10 min.

4.7.2 Abfälle

Alle Abfälle, die mit Zellen in Kontakt gekommen sind, müssen gesondert von anderen Abfällen entsorgt werden. Spitze, scharfe, sowie Glas- und organische Abfälle, wie z.B. Spendergewebereste, werden in einer Kontaminationsabfalltonne entsorgt. Alle anderen kontaminierten Materialien

werden vor ihrer Entsorgung in Entsorgungsbeuteln dekontaminiert. Hierzu werden sie mit dem voreingestellten Programm „4 – Abfall (Beutel)“ autoklaviert. Dieses Programm hat bei einer Temperatur von 121 °C eine Sterilisationszeit von 20 min.

5 Ergebnisse

Die folgenden Ergebnisse wurden durch mehrere Methoden generiert. Die Proteinquantifizierung erfolgte mittels *Western Blot*, bestimmte Gene wurden mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) nachgewiesen und die Gesamt-DNA und -RNA wurde mittels eines Spektralphotometers gemessen. Auch Tests zur Quantifizierung der Glukose oder der Viabilität der Zellen wurden verwendet. Die statistische Analyse und Visualisierung der Daten erfolgte mit Hilfe der Statistikanalysesoftware „*GraphPad Prism 5*“. Ausreißer wurden mit dem Ausreißertest nach GRUBBS ausgeschlossen.

5.1 Erkenntnisse aus Vorarbeiten

In der Literatur existieren einige Arbeiten, die die positive Wirkung von CO₂ in der Wundheilung und bei fibrotischen Erkrankungen belegen. Es werden *in vivo* als auch *in vitro* neben allgemeiner wundheilungsfördernder Wirkung auch gefäßerweiternde und durchblutungsfördernde Wirkungen mit einer resultierenden erhöhten Sauerstoffversorgung durch trans- oder subkutane CO₂-Applikation beschrieben (IRIE *et al.*, 2005; BRANDI *et al.*, 2010; FINZGAR *et al.*, 2015). Auch ein hemmender Effekt von CO₂ auf die Proliferation von Lungenfibroblasten wurde bereits gezeigt (VOHWINKEL *et al.*, 2011).

In der Recherche war allerdings nur eine Arbeit zu finden, die sich indirekt mit dem Effekt von topisch appliziertem CO₂ auf die Myofibrogenese auseinandersetzt. Hier wurden Krebs-assoziierte Fibroblasten nach transkutaner CO₂-Applikation am Maus-Modell untersucht. Es konnte analog zu den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen ebenfalls eine Reduktion des Proteins α -SMA sowie anderer Fibroblasten-Marker nachgewiesen werden. (TADOKORO *et al.*, 2023)

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass die Behandlung von TGF- β 1-stimulierten dermalen Fibroblasten mit wässrigen CO₂-haltigen Medien einen signifikanten Effekt auf die Differenzierung dieser zu

Myofibroblasten *in vitro* hat (DÖHMEN, 2021). Es wurden die Effekte von einer 15-, sowie einer 60-minütigen Behandlung an drei aufeinanderfolgenden Tagen untersucht. In dieser Arbeit wurde nun dieser Effekt bei kleineren Zeitabständen sowie unterschiedlichen Konzentrationen untersucht.

Zudem wurde die Wirkung der CO₂-Behandlung auf verschiedene Differenzierungsmarker und auf die Glykolyseaktivität der Fibroblasten untersucht, um zu beleuchten, auf welcher Ebene das CO₂ in die Differenzierung eingreift.

5.2 Zellviabilitätsversuch

Mit dem Zellviabilitätsversuch soll zunächst untersucht werden, ob die Behandlung der Fibroblastenkulturen mit CO₂-haltigem Nährmedium eine Auswirkung auf die Viabilität und die Anzahl der untersuchten Zellen hat. Hierzu wurde das Zellviabilitäts-Kit (3.6) und die Methode der Gesamt-DNA-Quantifizierung (4.6) verwendet.

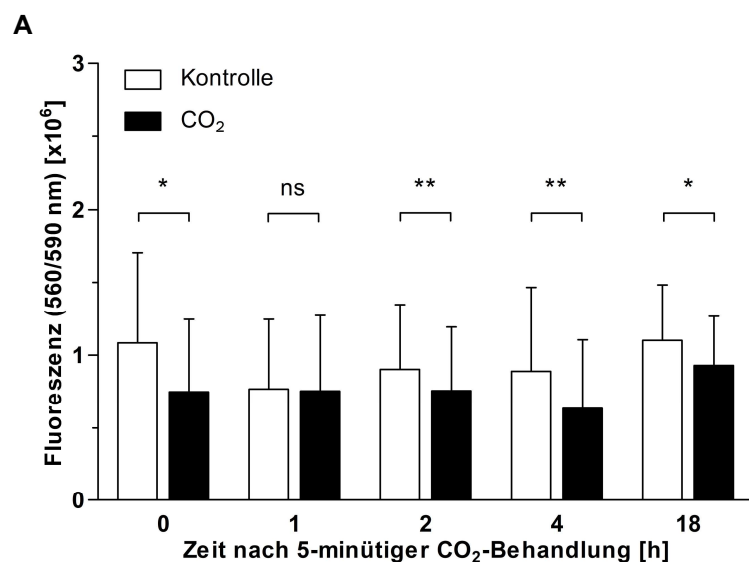
Die Proben wurden einmalig für 5, 15 oder 60 Minuten mit CO₂-Medium (3.4.3) behandelt. Anschließend wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Hilfe des *CellTiter-Blue*[®] (CTB)-Reagens die Differenz der Fluoreszenz zwischen den behandelten Proben und der jeweiligen unbehandelten Kontrolle als Maß für die Viabilität der Zellen bestimmt. Eine zellfreie Probe wurde als Referenz der Fluoreszenz mitgeführt. Für die Zeitpunkte der Untersuchung wurden unmittelbar nach der Behandlung (0 Stunden), 1, 2, 4 und 18 Stunden nach der Behandlung gewählt. Nach den abgelaufenen 18 Stunden wurden die Zellen geerntet, eingefroren und die Zellzahl mittels DNA-Quantifizierung bestimmt. Hierdurch sollte zusätzlich der Effekt der CO₂-Behandlung auf die Zellzahl beleuchtet werden. Die Anzahl der untersuchten Zellkulturen betrug n = 12.

Es zeigt sich wie in Abb. 13 [A], [B] und [C] graphisch dargestellt bei allen drei Behandlungszeiten unmittelbar nach der CO₂-Behandlung eine signifikante Abnahme der Fluoreszenz. Bei einer Behandlungsdauer von 5 Minuten [A] betrug die Differenz etwa 30 %, bei 15 Minuten [B] etwa

20 %, beides mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. Nach einer Behandlungsdauer von 60 Minuten [C] zeigte sich eine Abnahme der Fluoreszenz von fast 50 % ($p \leq 0,001$).

Eine Stunde nach der jeweiligen CO₂-Behandlung zeigte sich bei allen drei Behandlungszeiten keine signifikante Änderung ($p > 0,05$) der Fluoreszenz. Nach zwei und vier Stunden zeigten sich bei den Behandlungszeiten von 5 und 15 Minuten mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ erneut eine signifikante Abnahme, wohingegen sich bei einer Behandlungsdauer von 60 Minuten zu diesen Zeitpunkten keine signifikante Änderung zu messen war.

Nach 18 Stunden zeigte sich bei einer Behandlungsdauer von 5 Minuten erneut eine signifikante Abnahme der Fluoreszenz. Bei 15 Minuten Behandlungsdauer konnte ebenfalls eine Abnahme beobachtet werden, die sich aber bei $p > 0,05$ nicht signifikant zeigte. Bei einer Behandlungsdauer der Fibroblasten mit CO₂ von 60 Minuten zeigte sich nach 18 Stunden eine signifikante Zunahme ($p > 0,05$) der Fluoreszenz von etwa 30 % zur unbehandelten Kontrolle.



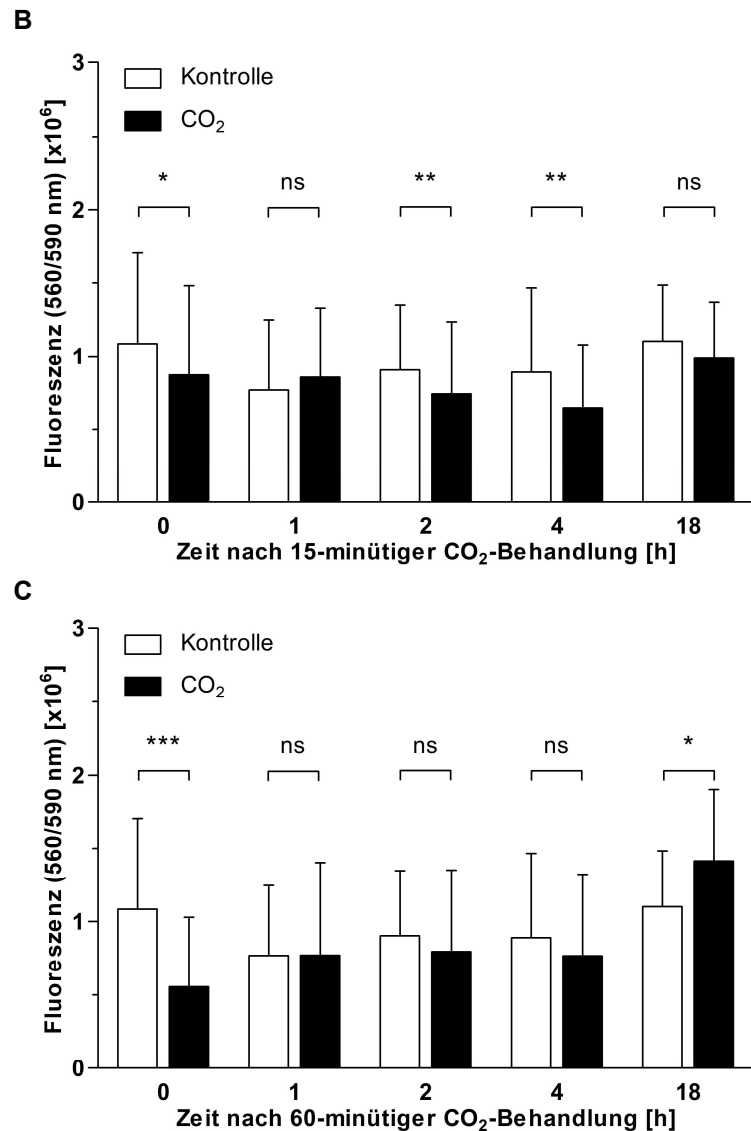


Abb. 13: Signaldifferenz nach Zugabe von *CellTiter-Blue*[®] (CTB)-Reagens als Indikator für die Zellviabilität von CO₂-behandelten und unbehandelten Fibroblasten bei unterschiedlicher Behandlungsdauer zu verschiedenen Zeitpunkten.

Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig für 5 [A], 15 [B] und 60 [C] Minuten mit einem mit Kohlenstoffdioxid (CO₂) versetztem Nährmedium behandelt. Nach den angegebenen Zeiten von 0, also unmittelbar nach der Behandlung, 1, 2, 4 und 18 Stunden (h) wurde CTB-Reagens hinzugegeben und die Zellen für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde anschließend bei einer Exzitationswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm im Plattenlesegerät „Victor³“ gemessen. Es wurde stets eine unbehandelte Probe als Kontrolle und eine zellfreie Probe als Referenz mitgeführt. Abgebildet sind hier die Mittelwerte als Säulendiagramm mit schwarzer Säule für die mit CO₂ behandelten Zellen und weißer Säule für die jeweiligen Kontrollen mit Standardabweichung als Fehlerindikator.

(Signifikanzniveau zur jeweilig mitgeführten Kontrolle: ns = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; n = 12)

Nach den Untersuchungen zur Zellviabilität wurde die DNA der verschiedenen Proben quantifiziert, um die Auswirkung der CO₂-Behandlung auf die Zellzahl zu beleuchten, bzw. um die Güte des Viabilitäts-Kits zu prüfen.

Es zeigt sich, wie in Abb. 14 dargestellt, keine signifikante ($p > 0,05$) Änderung in der DNA-Menge nach den CO₂-Behandlungen. Eine Tendenz von im Mittel abnehmender DNA-Menge bei zunehmender Behandlungsdauer ist erkennbar.

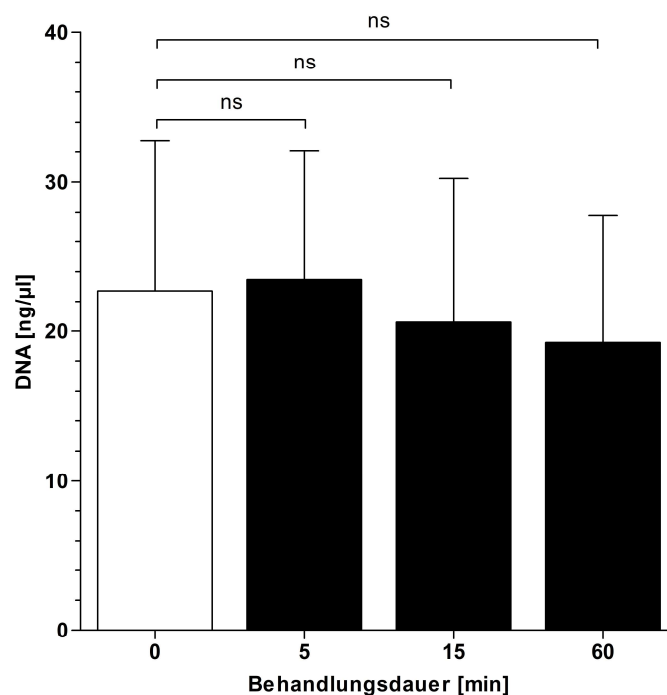


Abb. 14: DNA-Menge un behandelter und für unterschiedliche Dauer behandelter Fibroblastenkulturen nach 18 Stunden Inkubation.

Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig für 5, 15 und 60 Minuten (min) mit einem mit Kohlenstoffdioxid (CO₂) versetztem Nährmedium behandelt. Nach einem Zeitraum von 18 Stunden wurde die DNA mittels Spektrophotometer quantifiziert. Eine un behandelte Probe (0 min) wurde als Kontrolle mitgeführt. Abgebildet sind hier die Mittelwerte als Säulendiagramm mit schwarzer Säule für die mit CO₂ behandelten Zellen und weißer Säule für die un behandelte Kontrolle mit Standardabweichung als Fehlerindikator.

(Signifikanzniveau zur Kontrolle: ns = $p > 0,05$; $n = 12$)

Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse des Viabilität-Tests und der DNA-Menge wurden alle Fluoreszenzwerte addiert und ebenfalls graphisch in Abb. 15 dargestellt. Hier zeigt sich wie bei der DNA-Menge keine signifikante Änderung. Jedoch ist eine gegenläufige Tendenz zur

DNA-Menge mit zunehmender Fluoreszenz bei zunehmender Behandlungsdauer zu erkennen.

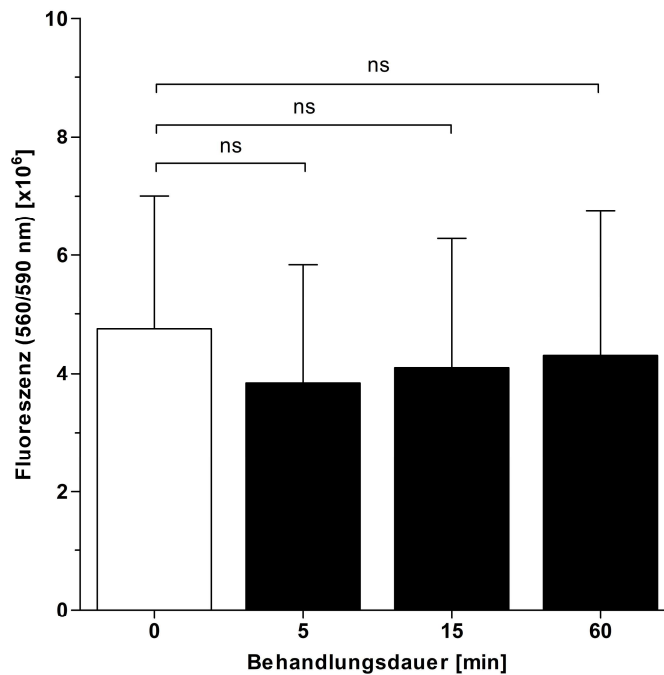


Abb. 15: Addierte Fluoreszenz nach Zugabe von CellTiter-Blue® (CTB)-Reagens als Indikator für die Zellviabilität von CO₂-behandelten und unbehandelten Fibroblasten bei unterschiedlicher Behandlungsdauer. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig für 5, 15 und 60 Minuten mit einem mit Kohlenstoffdioxid (CO₂) versetztem Nährmedium behandelt. Nach 0, also unmittelbar nach der Behandlung, 1, 2, 4 und 18 Stunden (h) wurde CTB-Reagens hinzugegeben und die Zellen für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde anschließend bei einer Exzitationswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm im Plattenlesegerät „Victor3“ gemessen und für jeden Behandlungsdauer addiert. Es wurde stets eine unbehandelte Probe als Kontrolle und eine zellfreie Probe als Referenz mitgeführt. Abgebildet sind hier die Mittelwerte als Säulendiagramm mit schwarzer Säule für die mit CO₂ behandelten Zellen und weißer Säule für die Kontrolle mit Standardabweichung als Fehlerindikator. (Signifikanzniveau zur Kontrolle: ns = $p > 0,05$; $n = 12$)

5.3 Differenzierungsversuch

Mit dem Differenzierungsversuch soll gezeigt werden, welchen Effekt eine unterschiedliche Behandlungsdauer der Zellkulturen mit CO₂-haltigem Nährmedium (3.4.3) auf die TGF- β 1-induzierte Differenzierung der

Fibroblasten zu Myofibroblasten hat. Hierzu wurden aus Spendergewebe isolierte Fibroblastenkulturen *in vitro* mit CO₂-Medium für je 1, 2,5, 5, 15 und 60 min an drei aufeinanderfolgenden Tagen behandelt und anschließend das Protein α -SMA als Indikator der Differenzierung in den einzelnen Proben quantifiziert. Die mitgeführte, nicht mit CO₂-Medium behandelte Kontrolle wurde hier als Bezugswert gleich 100 % gesetzt. Die Anzahl der untersuchten Zellkulturen betrug n = 10.

Der Versuch zeigte, wie in Abb. 16 dargestellt, einen signifikanten Effekt der Behandlung mit CO₂-Medium auf die Expression von α -SMA und somit auf die mittels TGF- β 1-induzierte Differenzierung der Fibroblasten. Bereits die niedrigste gewählte Behandlungsdauer von je 1 min an den drei Behandlungstagen, zeigte eine signifikante Reduktion der α -SMA-Expression im Median um mehr als 50 %. Bei den höheren gewählten Behandlungszeiten von täglichen 15 bzw. 60 min konnte eine Reduktion von 70 bzw. 90 % beobachtet werden. Das Signifikanzniveau lag bei allen Behandlungszeiten bei $p \leq 0,01$.

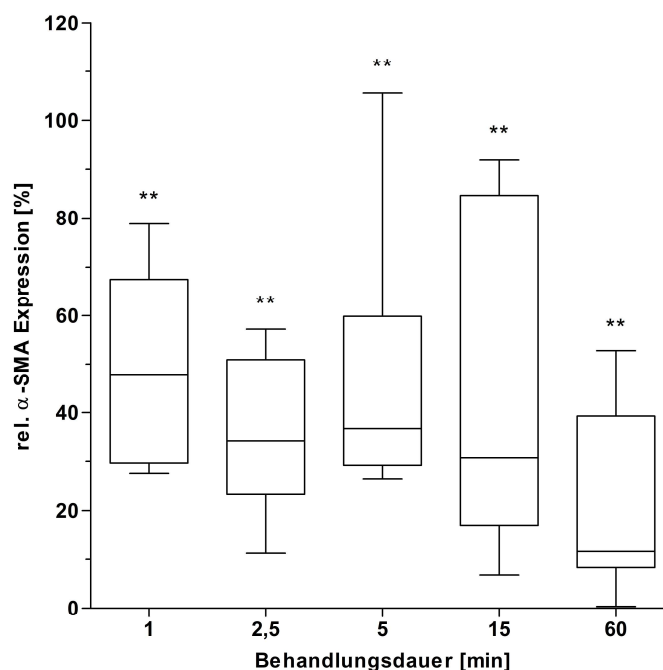


Abb. 16: Relative Expression des Proteins α -SMA in Fibroblasten bei unterschiedlicher Behandlungsdauer mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium unter Einfluss von TGF- β 1.

Humane dermale Fibroblasten wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen für je 1, 2,5, 5, 15 und 60 Minuten (min) mit einem kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium behandelt. Zwischen den Behandlungen wurden sie mit 5 ng/ml *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) zur Differenzierung angeregt. Es wurde das Protein *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) mittels *Western Blot* nachgewiesen. Eine mitgeführte, unbehandelte Kontrolle wurde als Bezugswert gleich 100 % gesetzt und die relative (rel.) Expression für die behandelten Gruppen abgebildet. (Signifikanzniveau zur Kontrolle: ** = $p \leq 0,01$; n = 10)

Bei der Inhibition der spontanen Differenzierung, also bei den nicht mit TGF- β 1 behandelten Zellen, zeigte sich hingegen nur bei 60-minütiger Behandlungsdauer ein signifikanter Effekt. Wie in Abb. 17 graphisch dargestellt, ist aber auch bei den kleiner gewählten Behandlungszeiten eine Tendenz zu erkennen. Je länger die Behandlungsdauer mit dem CO₂-Medium, desto geringer die relative α -SMA-Expression. Eine Ausnahme zeigt sich hier in der Gruppe mit je einer Minute Behandlungsdauer, in der die Expression im Median über der der unbehandelten Kontrolle liegt. In Behandlungsgruppen 1 bis 15 Minuten zeigt sich mit einem Signifikanzniveau $p > 0,05$ kein signifikantes Ergebnis. Bei einer Behandlungsdauer von 60 Minuten an drei aufeinanderfolgenden Tagen kommt es dagegen mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ zu einer signifikanten Reduktion der α -SMA-Expression.

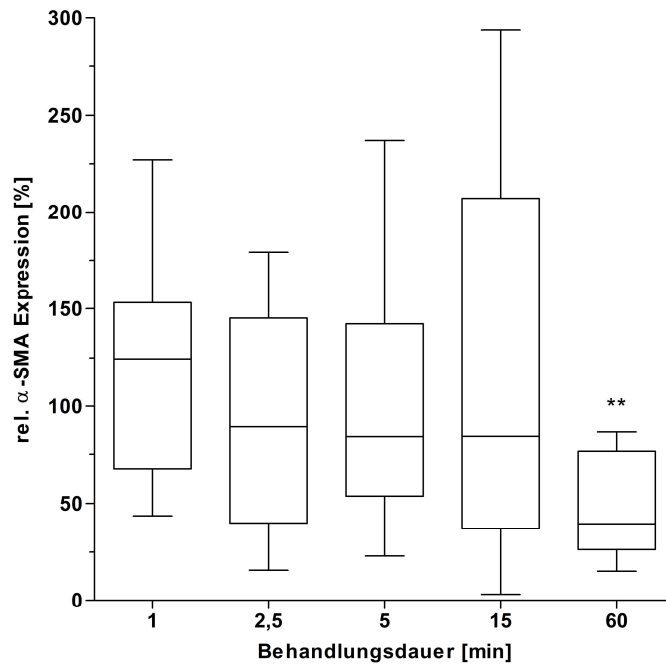


Abb. 17: Relative Expression des Proteins α -SMA in spontan differenzierenden Fibroblasten bei unterschiedlicher Behandlungsdauer mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium.

Humane dermale Fibroblasten wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen für je 1, 2,5, 5, 15 und 60 Minuten (min) mit einem kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium behandelt. Es wurde das Protein *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) mittels *Western Blot* nachgewiesen. Eine mitgeführte, unbehandelte Kontrolle wurde als Bezugswert gleich 100 % gesetzt und die relative (rel.) Expression für die behandelten Gruppen abgebildet.

(Signifikanzniveau zur Kontrolle: ** = $p \leq 0,01$; ns = $p > 0,05$; n = 10)

5.4 Verdünnungsreihenversuch

Der Verdünnungsreihenversuch soll untersuchen, ob der im Differenzierungsversuch (5.3) gezeigte Effekt des CO₂-haltigen Nährmediums (3.4.3) auch in niedrigeren Konzentrationen einen signifikanten Einfluss auf die Myofibrogenese hat. Hierzu wurden aus humanem Spendergewebe isolierte Fibroblasten *in vitro* an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit unterschiedlich konzentriertem CO₂-Medium versetzt. Anschließend wurde das Protein α -SMA in den einzelnen Proben quantifiziert. Die mitgeführte, nicht mit CO₂-Medium behandelte Kontrolle wurde als

Bezugswert gleich 100 % gesetzt. Die Anzahl der untersuchten Zellkulturen betrug $n = 7$.

Der Versuch zeigt, wie in Abb. 18 dargestellt, einen signifikanten Effekt der Behandlung mit den hoch konzentrierten CO₂-Medien (60, 80 und 100 %) auf die Expression von α -SMA und somit auf die Differenzierung der Fibroblasten. Diese wiesen ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ auf. Bei der 60 %igen Verdünnung konnte im Median eine relative Reduktion der Expression von α -SMA von ca. 32 %, bei der 80 %igen Verdünnung von ca. 58 % beobachtet werden. Das unverdünnte CO₂-Medium (100 %) hatte analog zum Differenzierungsversuch den größten Effekt. Hier wurde im Median eine relative Reduktion der Expression von α -SMA von ca. 85 % beobachtet. Die geringer konzentrierten CO₂-Medien (20 und 40 %) hatten mit einem Signifikanzniveau von $p > 0,05$ dagegen keinen signifikanten Effekt auf die Myofibrogenese.

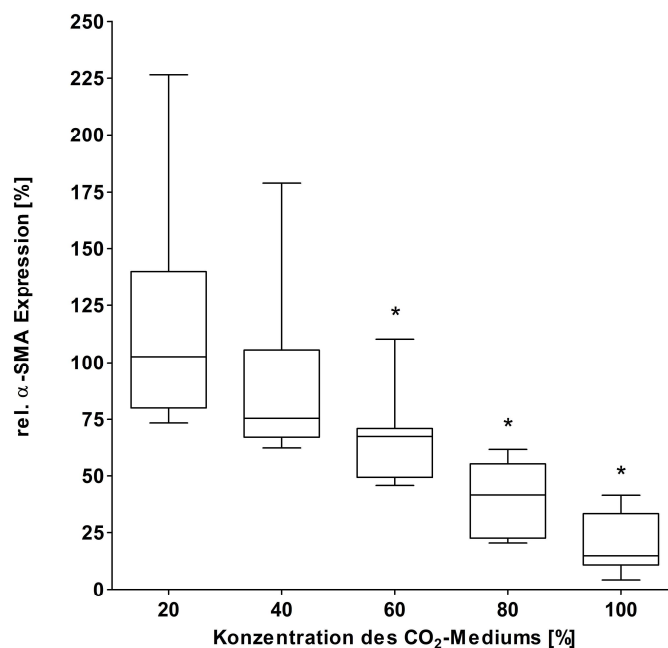


Abb. 18: Relative Expression des Proteins α -SMA in Fibroblasten bei unterschiedlicher Konzentration von kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium unter Einfluss von TGF- β 1.

Humane dermale Fibroblasten wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen für je 15 Minuten mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium behandelt. Dieses nach Anleitung hergestellte Medium wurde gleich 100 % gesetzt und mit normalem Medium auf 20, 40, 60 und 80 %

verdünnt. Zwischen den Behandlungen wurden die Zellen mit 5 ng/ml *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) zur Differenzierung angeregt. Es wurde das Protein *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) mittels *Western Blot* nachgewiesen. Eine mitgeführte, unbehandelte Kontrolle wurde als Bezugswert gleich 100 % gesetzt und die relative (rel.) Expression für die behandelten Gruppen abgebildet. (Signifikanzniveau zur Kontrolle: * = $p \leq 0,05$; n = 7)

5.5 Verdünnungsversuch

Der Verdünnungsversuch soll den Effekt von den im Verdünnungsreihenversuch (5.4) angewendeten, niedrigeren CO₂-Konzentrationen auf die Fibroblastendifferenzierung bei unterschiedlicher Behandlungsdauer untersuchen. Hierzu wurden aus Spendergewebe isolierte Fibroblastenkulturen *in vitro* für verschiedene Zeiten an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit verdünntem CO₂-Medium versetzt. Anschließend wurde das Protein α -SMA in den einzelnen Proben quantifiziert. Es wurde mit einer Konzentration von 60% die niedrigste Konzentration des CO₂-Mediums gewählt, die im Verdünnungsreihenversuch noch einen signifikanten Effekt auf die Differenzierung der Fibroblasten aufwies. Die mitgeführte, nicht mit CO₂-Medium behandelte Kontrolle wurde als Bezugswert gleich 100 % gesetzt. Die Anzahl der untersuchten Zellkulturen betrug n = 10.

Der Versuch zeigt, wie in Abb. 19 dargestellt, einen signifikanten Effekt der Behandlung mit dem 60%igen CO₂-Medium auf die Expression von α -SMA und somit auf die Differenzierung der Fibroblasten. Bei einer Behandlungsdauer von täglich 15 min konnte im Median eine Reduktion der Expression von α -SMA von ca. 50 % beobachtet werden. Bei der Behandlungsdauer von täglich 60 min zeigte sich eine Reduktion von ca. 65 %. Beide Gruppen wiesen ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ auf.

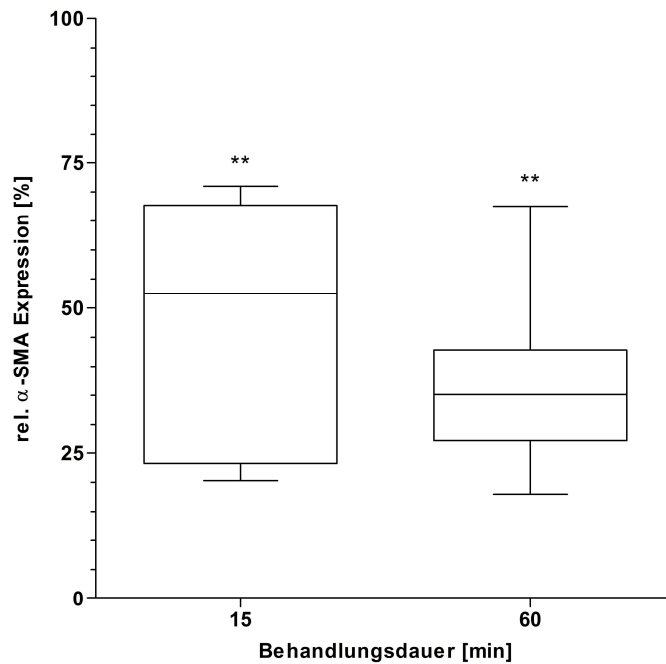


Abb. 19: Relative Expression des Proteins α -SMA in Fibroblasten bei unterschiedlicher Behandlungsdauer mit verdünntem kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium unter Einfluss von TGF- β 1.

Humane dermale Fibroblasten wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen für je 15 bzw. 60 Minuten (min) mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium behandelt. Dieses nach Anleitung hergestellte Medium wurde gleich 100 % gesetzt und mit normalem Medium auf 60 % verdünnt. Zwischen den Behandlungen wurden die Zellen mit 5 ng/ml *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) zur Differenzierung angeregt. Es wurde das Protein *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) mittels *Western Blot* nachgewiesen. Eine mitgeführte, unbehandelte Kontrolle wurde als Bezugswert gleich 100 % gesetzt und die relative (rel.) Expression für die behandelten Gruppen abgebildet. (Signifikanzniveau zur Kontrolle: ** = $p \leq 0,01$; $n = 10$)

5.6 Differenzierungsversuch für Gennachweise

Mit dem Differenzierungsversuch für Gennachweise soll untersucht werden, welchen Effekt die Behandlung der TGF- β -induzierten Fibroblastenkulturen mit CO₂-haltigem Nährmedium auf die Expression spezieller Differenzierungsmarker (1.2.3) hat, um zu beleuchten, auf welcher Ebene das CO₂ in die Myofibrogenese eingreift. Hierzu wurden aus humanem Spendergewebe isolierte Fibroblasten *in vitro* mit CO₂-Medium für je 15 min an drei aufeinanderfolgenden Tagen behandelt. Zwischen

den Behandlungen wurden die Zellen mit 5 ng/ml TGF- β 1 versetztem Nährmedium zur Differenzierung angeregt. Anschließend wurden die Gene der Proteine α -SMA, Nox4, Ki-67, Nrf2 und FoxO1 mittels qRT-PCR (4.5) quantifiziert. Anhand der ebenfalls quantifizierten *Housekeeping*-Gene CypB und 18S-rRNA wurde mittels der $\Delta\Delta$ Ct-Methode (4.5.4) der Expressionsunterschied der Differenzierungsmarker der behandelten Proben zu den mitgeführten unbehandelten Kontrollen errechnet. Die unbehandelte Kontrolle wurde jeweils als Bezugswert gleich 100 % gesetzt, um die relative Expression des Zielgens zu erhalten. Die Anzahl der untersuchten Zellkulturen betrug $n = 9$.

5.6.1 Alpha-smooth muscle actin

Der Versuch zeigt, wie in Abb. 20 dargestellt, einen signifikanten Effekt der CO₂-Behandlung auf die Expression des α -SMA-Gens. Analog zu den Erkenntnissen aus dem direkten Proteinnachweis des α -SMA, zeigt sich auch hier eine deutliche Reduktion der Genexpression durch die Behandlung der Fibroblasten mit CO₂. Diese betrug im Median ca. 60 %. Das Signifikanzniveau liegt bei $p \leq 0,01$.

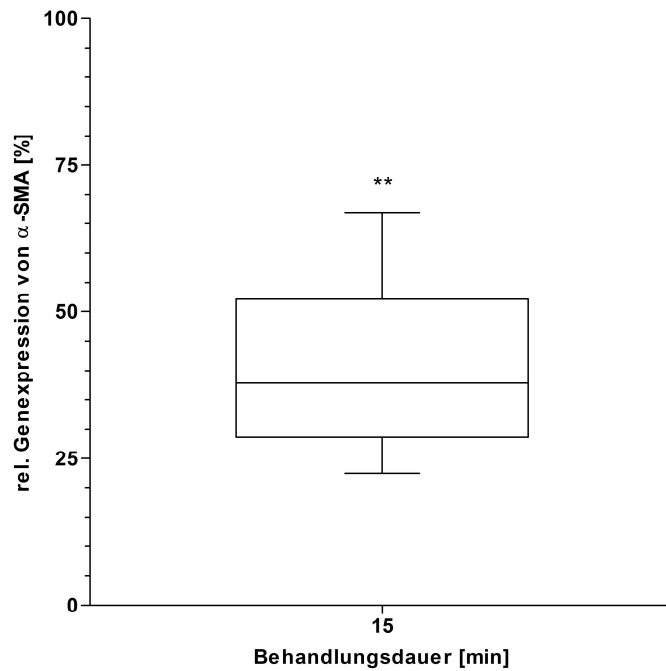


Abb. 20: Relative Genexpression von α -SMA in Fibroblasten nach Behandlung mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium unter Einfluss von TGF- β 1.

Humane dermale Fibroblasten wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen für je 15 Minuten (min) mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium behandelt. Zwischen den Behandlungen wurden die Zellen mit 5 ng/ml *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) zur Differenzierung angeregt. Es wurde das Gen des Proteins *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesen. Eine mitgeführte, unbehandelte Kontrolle wurde als Bezugswert gleich 100 % gesetzt und die relative (rel.) Expression für die behandelte Gruppe abgebildet.

(Signifikanzniveau zur Kontrolle: ** = $p \leq 0,01$; $n = 9$)

5.6.2 Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase 4

Das Nox4-Gen zeigt, wie in Abb. 21 dargestellt, keine signifikante Änderung seiner Expression nach der Behandlung mit CO₂. Es zeigt sich eine Zunahme der Expression im Median von ca. 15%. Bei einer deutlichen Streuung der Werte ist die relative Expression des Nox4-Gens der behandelten Fibroblasten zur Kontrolle mit einem Signifikanzniveau von $p > 0,05$ jedoch nicht signifikant.

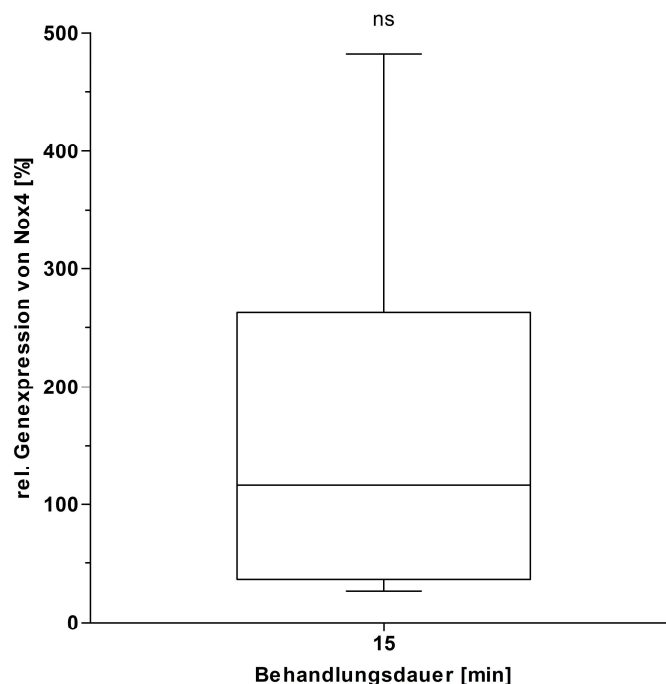


Abb. 21: Relative Genexpression von Nox4 in Fibroblasten nach Behandlung mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium unter Einfluss von TGF- β 1.

Humane dermale Fibroblasten wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen für je 15 Minuten (min) mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium behandelt. Zwischen den Behandlungen wurden die Zellen mit 5 ng/ml *transforming growth factor beta* 1 (TGF- β 1) zur Differenzierung angeregt. Es wurde das Gen des Proteins Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase 4 (Nox4) mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesen. Eine mitgeführte, unbehandelte Kontrolle wurde als Bezugswert gleich 100 % gesetzt und die relative (rel.) Expression für die behandelte Gruppe abgebildet.

(Signifikanzniveau zur Kontrolle: ns = $p > 0,05$; n = 9)

5.6.3 Ki-67

Wie das Nox4-Gen zeigt auch das Ki-67-Gen, wie in Abb. 22 dargestellt, keine signifikante Änderung der Expression nach Behandlung mit CO₂. Relativ zur unbehandelten Kontrolle zeigt sich eine Reduktion der Expression des Ki-67-Gens von ca. 25 % im Median. Dieses Ergebnis ist jedoch ebenfalls mit einem Signifikanzniveau von $p > 0,05$ nicht signifikant.

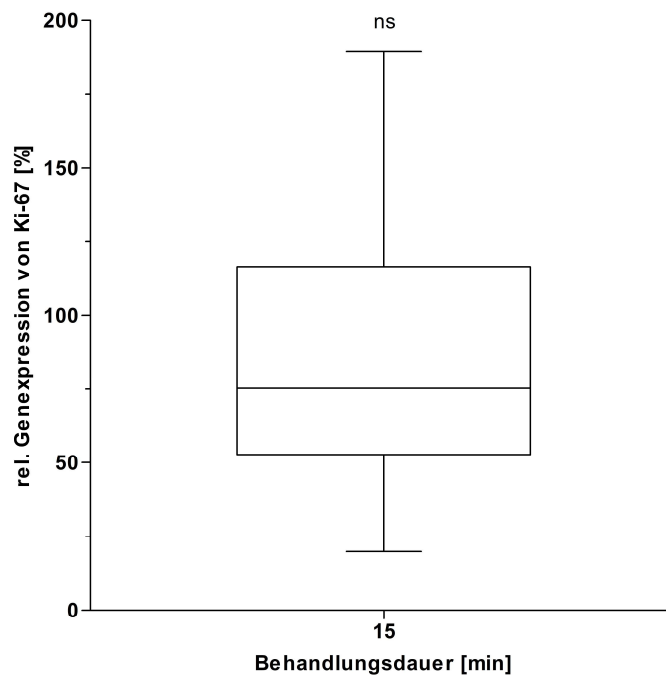


Abb. 22: Relative Genexpression von Ki-67 in Fibroblasten nach Behandlung mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium unter Einfluss von TGF- β 1.

Humane dermale Fibroblasten wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen für je 15 Minuten (min) mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium behandelt. Zwischen den Behandlungen wurden die Zellen mit 5 ng/ml *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) zur Differenzierung angeregt. Es wurde das Gen des Proteins Ki-67 mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesen. Eine mitgeführte, unbehandelte Kontrolle wurde als Bezugswert gleich 100 % gesetzt und die relative (rel.) Expression für die behandelte Gruppe abgebildet.

(Signifikanzniveau zur Kontrolle: ns = $p > 0,05$; n = 9)

5.6.4 Nuclear factor erythroid related factor-2

Das Nrf-2-Gen zeigt, wie in Abb. 23 dargestellt, analog zu dem Nox4- und dem Ki-67-Gen ebenfalls keine signifikante Änderung in seiner Expression nach Behandlung mit CO₂. Im Median ist eine Reduktion von ca. 2 % zu beobachten. Mit einem Signifikanzniveau von $p > 0,05$ ist dieses Ergebnis ebenfalls nicht signifikant.

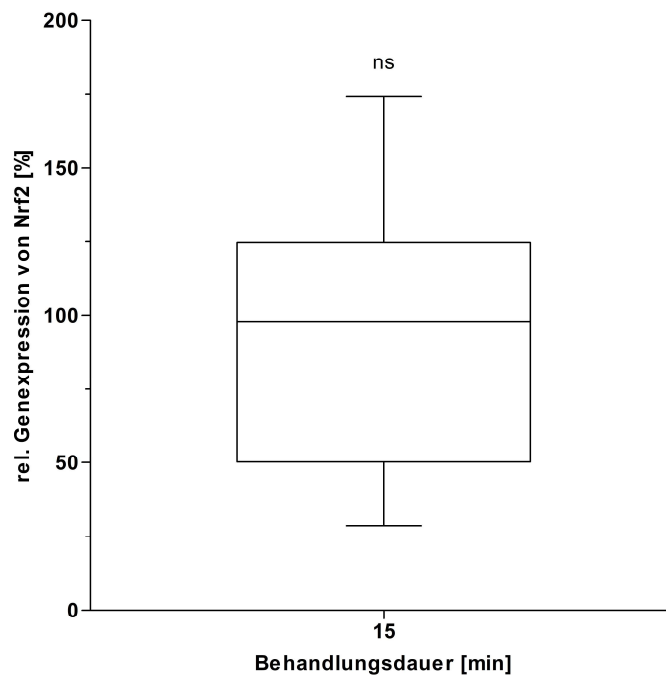


Abb. 23: Relative Genexpression von Nrf2 in Fibroblasten nach Behandlung mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium unter Einfluss von TGF- β 1.

Humane dermale Fibroblasten wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen für je 15 Minuten (min) mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium behandelt. Zwischen den Behandlungen wurden die Zellen mit 5 ng/ml *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) zur Differenzierung angeregt. Es wurde das Gen des Proteins *Nuclear factor erythroid related factor-2* (Nrf2) mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesen. Eine mitgeführte, unbehandelte Kontrolle wurde als Bezugswert gleich 100 % gesetzt und die relative (rel.) Expression für die behandelte Gruppe abgebildet.

(Signifikanzniveau zur Kontrolle: ns = $p > 0,05$; n = 9)

5.6.5 Forkhead box protein O1

Das FoxO1-Gen zeigt, wie in Abb. 24 dargestellt, ebenfalls keine signifikante Änderung in seiner Expression nach der Behandlung mit CO₂. Im Median zeigt sich hier eine relative Zunahme der Expression von ca. 3 % zu der unbehandelten Kontrolle. Mit einem Signifikanzniveau von $p > 0,05$ ist dieses Ergebnis ebenfalls nicht signifikant.

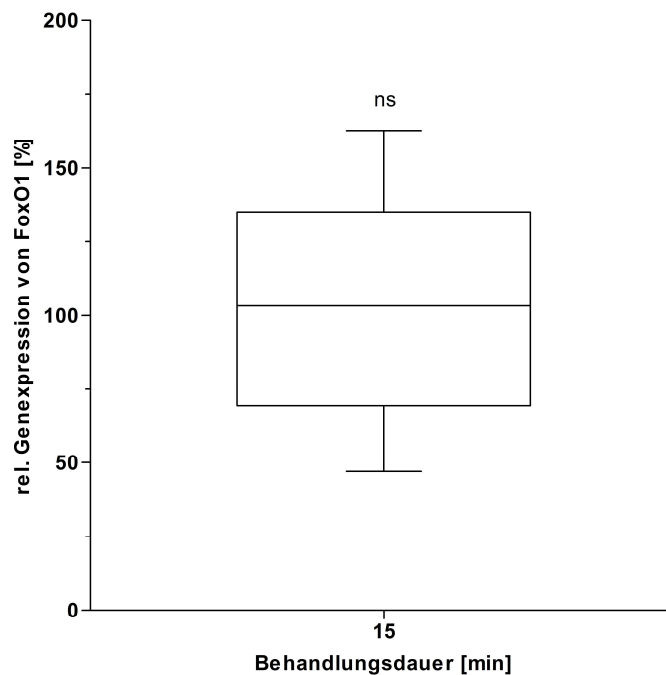


Abb. 24: Relative Genexpression von FoxO1 in Fibroblasten nach Behandlung mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium unter Einfluss von TGF- β 1.

Humane dermale Fibroblasten wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen für je 15 Minuten (min) mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium behandelt. Zwischen den Behandlungen wurden die Zellen mit 5 ng/ml *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) zur Differenzierung angeregt. Es wurde das Gen des Proteins *Forkhead box protein O1* (FoxO1) mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesen. Eine mitgeführte, unbehandelte Kontrolle wurde als Bezugswert gleich 100 % gesetzt und die relative (rel.) Expression für die behandelte Gruppe abgebildet.

(Signifikanzniveau zur Kontrolle: ns = $p > 0,05$; n = 9)

5.7 Glukoseverbrauchsversuch

Mit dem Glukoseverbrauchsversuch soll untersucht werden, welchen Effekt die Behandlung der Fibroblastenkulturen mit CO₂-haltigem Nährmedium auf die Glykolyseaktivität der Zellen hat. Hierzu wurden aus humanem Spendergewebe isolierte Fibroblasten *in vitro* mit CO₂-Medium für je 15 und 60 min behandelt und anschließend die Glukosekonzentration des Nährmediums zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Behandlung quantifiziert. Eine unbehandelte Kontrolle wurde mitgeführt. Als Zeitpunkte wurden 30 Minuten, 1, 2, 4 und 24 Stunden gewählt. Zudem wurde ein Ausgangswert unmittelbar nach der Behandlung als Kontrolle bestimmt. Die Anzahl der untersuchten Zellkulturen betrug $n = 6$.

Der Versuch zeigt, wie in Abb. 25 dargestellt, bei beiden gewählten Behandlungszeiten von 15 [A] und 60 [B] Minuten keinen signifikanten Effekt auf den Glukoseverbrauch der Fibroblasten in den ersten 24 Stunden nach einer Behandlung mit CO₂-haltigem Nährmedium. Es zeigt sich lediglich eine Tendenz, dass die behandelten Fibroblasten in den ersten vier Stunden im Mittel etwas mehr Glukose verbrauchen als die unbehandelten. Nach 24 Stunden egalisiert sich diese Tendenz allerdings wieder. Es zeigt sich jedoch mit einem Signifikanzniveau von $p > 0,05$ zu keinem der beobachteten Zeitpunkte eine signifikante Änderung in der Glukosekonzentration.

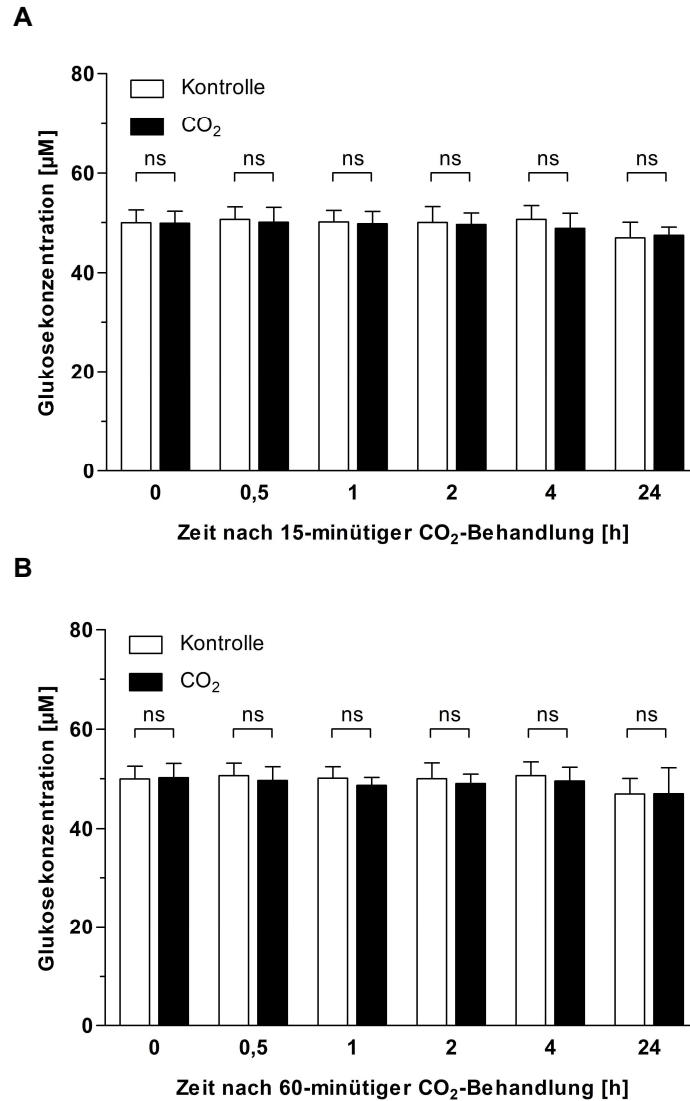


Abb. 25: Differenz der Glukosemenge des Nährmediums von CO₂-behandelten und unbehandelten Fibroblasten bei unterschiedlicher Behandlungsdauer zu verschiedenen Zeitpunkten.

Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig für 15 **[A]** und 60 **[B]** Minuten mit einem mit Kohlenstoffdioxid (CO₂) versetzten Nährmedium behandelt. Nach den angegebenen Zeiten von 0, also unmittelbar nach der Behandlung, 30 Minuten, 1, 2, 4 und 24 Stunden (h) wurde mit Hilfe des Glucosedetektions-Kits „*Glucose-Glo*[™]“ die Glukosekonzentration in Mikromolar (µM) gemessen. Es wurde stets eine unbehandelte Probe als Kontrolle mitgeführt. Abgebildet sind hier die Mittelwerte als Säulendiagramm mit schwarzer Säule für die mit CO₂ behandelten Zellen und weißer Säule für die jeweiligen Kontrollen mit Standardabweichung als Fehlerindikator.

(Signifikanzniveau zur jeweilig mitgeführten Kontrolle: ns = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; n = 6)

6 Diskussion

Die Wundheilung ist ein hochkomplexer Prozess, in dem verschiedene Zellen der Haut beteiligt sind und viele Mechanismen ineinandergreifen. Kommt es auf einer Ebene dieser Abläufe zu einem Fehler, kann dies zu Störungen in der Wundheilung und somit zur Entstehung von hiermit assoziierten Krankheitsbildern mit schwerwiegenden ästhetischen, aber auch gesundheitlichen Folgen kommen. Eine wichtige Rolle im Prozess der Wundheilung spielt der Fibroblast und speziell der Prozess dessen Differenzierung zum Myofibroblasten, die Myofibrogenese (HINZ, 2007; HENNE-BRUNS *et al.*, 2012). Kommt es zu einer Störung im Ablauf dieser Differenzierung können Wundheilungsstörungen wie hypertrophe Narben und Keloide entstehen (LUO *et al.*, 2001; GRABOWSKI *et al.*, 2020). Auch Fibromatosen wie der Morbus Dupuytren und der Morbus Ledderhose sind in diesem Zusammenhang von Interesse, da sie in ihrer Entstehung ähnliche Mechanismen, die bei den genannten Wundheilungsstörungen eine Rolle spielen, zeigen. (VERJEE *et al.*, 2009; CARROLL *et al.*, 2018)

Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass die Behandlung von humanen Fibroblasten mit CO₂ in wässriger Lösung die Myofibrogenese hemmt und dass diese Hemmung nicht durch einen durch das CO₂ herabgesetzten pH-Wert vermittelt wird. Auch eine Abnahme der proliferativen Aktivität und der Migration von Fibroblasten konnte nachgewiesen werden. Hinweise auf eine toxische Wirkung der Behandlung auf die Zellen im Sinne einer Apoptoseinduktion ergaben sich hierbei nicht. Auch die Methodik der dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchsaufbauten wie z.B. die Versetzung der Nährmedien mit CO₂ wurden geprüft und für die Arbeitsgruppe etabliert. (DÖHMEN, 2021)

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, in welchem Maße die Anwendung von CO₂ die Myofibrogenese hemmt und auf welcher Ebene diese Hemmung stattfindet.

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Exposition der Fibroblasten mit dem CO₂-haltigen Nährmedium einen Einfluss auf die Zellviabilität bzw. die Zellzahl hat. Hierzu wurden Fibroblastenkulturen einmalig für 5, 15 und

60 Minuten mit CO₂-Medium (3.4.3) behandelt. Anschließend wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Differenz der Fluoreszenz des Farbstoffes Resorufin des *CellTiter-Blue*[®]-Reagens zwischen den behandelten Proben und einer jeweilig mitgeführten unbehandelten Kontrolle als Maß für die Viabilität der Zellen bestimmt. Für die Zeitpunkte der Untersuchung wurden unmittelbar nach der Behandlung (0 Stunden), 1, 2, 4 und 18 Stunden nach der Behandlung gewählt.

Da nicht geklärt ist, ob die Behandlung mit CO₂ sich direkt auf die Umsetzung des Farbstoffes auswirkt, der bei der CTB-Methode angewandt wird, wurde zur Kontrolle nach den abgelaufenen 18 Stunden mittels DNA-Quantifizierung die Zellzahl bestimmt. Die Anzahl der untersuchten Zellkulturen betrug n = 12.

In den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde bereits diskutiert, dass nicht sicher geklärt ist, ob durch die CO₂-Behandlung der Metabolismus in dem Maße beeinflusst wird, dass die Umsetzung des CTB-Farbstoffes Resazurin direkt gehemmt wird, ob es durch die Hemmung der Zellproliferation zu einer geringeren Fluoreszenz kommt oder ob beide Mechanismen zum Tragen kommen (DÖHMEN, 2021). Diese Frage sollte durch die zusätzliche Bestimmung der Zellzahl mittels der DNA-Quantifizierung beantwortet werden.

Es konnte beobachtet werden, dass die Fluoreszenz des CTB-Reagens unmittelbar nach der CO₂-Behandlung signifikant abnahm. Dies zeigte sich bei allen gewählten Behandlungszeiten. Der größte Effekt mit im Mittel etwa 50 % Reduktion konnte zu diesem Zeitpunkt bei der längsten Behandlungsdauer von 60 Minuten beobachtet werden. Eine Dosisabhängigkeit scheint jedoch nicht vorzuliegen, da bei einer Behandlungsdauer von 5 Minuten zu diesem Zeitpunkt ein stärkerer Effekt zu beobachten war als bei einer Behandlungsdauer von 15 Minuten. Eine Stunde nach der CO₂-Behandlung zeigte sich in allen Gruppen keine signifikante Änderung. Bei einer Behandlungsdauer von 15 Minuten zeigte sich jedoch eine im Mittel erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Zwei und vier Stunden nach der Behandlung ist wieder eine Abnahme der Fluoreszenz in allen drei Behandlungsgruppen zu erkennen. Bei der

Behandlungsdauer von 60 Minuten ist diese aber nicht signifikant. Interessanterweise zeigt sich aber nach 18 Stunden in dieser Gruppe eine signifikant höhere Fluoreszenz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei 5 Minuten Behandlungsdauer ist sie signifikant niedriger.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich die CO₂-Behandlung kurzfristig negativ auf die Viabilität bzw. den Metabolismus der Fibroblasten auswirkt, sich aber bei langen Behandlungszeiten längerfristig ein positiver Effekt einstellt. Die Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten bisher nur einen negativen Effekt bei einer Behandlungsdauer mit CO₂ von 15 Minuten an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Hier konnte eine signifikante Abnahme der Viabilität im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle 48 und 72 Stunden nach der ersten Behandlung nachgewiesen werden.

Anschließend wurde die DNA derselben Zellen, die zuvor mit dem CTB-Reagens behandelt wurden, quantifiziert, um die zwei Methoden der Zellzahlbestimmung zu vergleichen und die Güte dieser Ergebnisse zu prüfen.

Die DNA-Quantifizierung ergab keine signifikante Änderung der DNA-Menge nach CO₂-Behandlung zu der unbehandelten Kontrolle. Es lässt sich aber eine Tendenz erkennen, dass mit steigender Behandlungsdauer die DNA-Menge abnimmt. Interessant ist, dass sich diese Tendenz bei einer Addition aller Fluoreszenzwerte des Viabilität-Tests gegenläufig zu der DNA-Menge darstellt. Mit zunehmender Behandlungsdauer nahm im Mittel auch die Fluoreszenz zu. Diese Beobachtungen legen nahe, dass mit zunehmender Behandlungsdauer der Fibroblasten mit CO₂ die Zellzahl im Sinne einer Inhibierung der Proliferation, nicht aber der Zellmetabolismus gehemmt wird. Die Ergebnisse zeigen allerdings keine Signifikanz auf, weshalb diese Hypothese nicht endgültig zu belegen ist. Dies stellt einen interessanten Ansatz für weiterführende Untersuchungen dar.

Im nächsten Schritt der Versuchsreihe sollte die Wirkung der CO₂-Behandlung auf die Myofibrogenese näher untersucht werden. Wie bereits gezeigt, konnte die TGF- β -induzierte Differenzierung von humanen Fibroblasten *in vitro* durch eine Behandlung von CO₂ in wässriger Lösung signifikant gehemmt werden. Es wurden hierzu die Behandlungszeiten von

15 und 60 Minuten an drei aufeinanderfolgenden Tagen gewählt (DÖHMEN, 2021). In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob dieser Effekt auch bei kleiner gewählten Behandlungszeiten zu beobachten ist. Eine weitere Frage, die sich uns stellte, war, ob dieser Effekt in einer möglichen topischen klinischen Anwendung auch zu beobachten sei, wenn Faktoren wie die Eindringtiefe in Gewebe und die Erreichbarkeit der betreffenden Zellen ebenfalls zu berücksichtigen sind. Das Gas CO₂ weist hierzu grundsätzlich günstige physikalische Eigenschaften auf. Die hohe Diffusionskonstante und der hohe Löslichkeitskoeffizient, also die gute Löslichkeit von CO₂ in Wasser und biologischen Flüssigkeiten, befähigt das Gas schnell und tief in Gewebe einzudringen. (SCHMIDT UND LANG, 2007)

Trotz dieser positiven Eigenschaften muss sowohl experimentell als auch bei einer möglichen klinischen Anwendung von CO₂ in wässriger Lösung von einem Abgasen unbekannten Ausmaßes und somit einer Reduktion der ursprünglichen Konzentration des Gases in den Behandlungsmedien ausgegangen werden. Es wurde durch vorsichtige Handhabung der hergestellten Medien mit schonendem Transport und vorsichtigem Pipettieren versucht, diesen Effekt möglichst gering zu halten. Zudem wählten wir für die Versuche 24-Well-Zellkulturplatten als Kompromiss zwischen einer möglichst geringen Diffusionsfläche zur Minimierung des Abgasens und der Praktikabilität bezüglich der Platzverhältnisse für eine ausreichende Zellzahl im Hinblick auf Adhäsion und Proliferation.

Trotz dieses zu erwartenden Effektes konnte im Differenzierungsversuch (5.3) bereits bei der kleinstgewählten täglichen Behandlungsdauer von einer Minute eine signifikante Hemmung der Differenzierung beobachtet werden. Es zeigte sich eine signifikante ($p \leq 0,01$) Reduktion der α -SMA-Expression im Median um mehr als 50 %. Analog zu den Voruntersuchungen zeigten auch die höher gewählten Behandlungszeiten einen signifikanten Effekt. Es ist mit einem zunehmenden Effekt bei steigender Behandlungszeit eine deutliche Dosisabhängigkeit zu erkennen.

Um das Problem des Abgasens weiter zu beleuchten und eine mögliche begrenzte Eindringtiefe bei topischer Anwendung *in vivo* zu simulieren,

wurden verschiedene Konzentrationen des CO₂-Mediums gewählt und der Effekt auf die α -SMA-Expression gemessen. Hierzu wurde das nach einem festgesetzten Standard hergestellte CO₂-Medium (≥ 1300 mg/l CO₂) mit Versuchsmedium anhand des in Tabelle 8 dargestellten Schemas verdünnt. Für die Behandlungsdauer wurden je 15 Minuten an drei aufeinanderfolgenden Tagen gewählt. Es zeigte sich eine signifikante Hemmung der α -SMA-Expression ab einer Verdünnung des CO₂-Mediums von 60 %. Die niedriger gewählten Konzentrationen von 40 und 20 % ergaben kein signifikantes Ergebnis, doch lässt sich insgesamt eine Tendenz erkennen, die ebenfalls auf eine Dosisabhängigkeit hindeutet.

Auf Basis dieser Erkenntnisse führten wir einen weiteren Versuch mit dem auf 60 % verdünnten Nährmedium als kleinstgewählte Konzentration durch, die noch ein signifikantes Ergebnis aufwies. Hierbei wurde nun die Behandlungsdauer variiert. Bei einer Behandlungsdauer von täglich 15 min konnte im Median eine signifikante ($p \leq 0,01$) Reduktion der Expression von α -SMA von ca. 50 %, bei 60 min sogar von ca. 65% beobachtet werden.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine geringe Konzentration durch eine erhöhte Behandlungsdauer ausgeglichen werden kann, was für mögliche *in vivo* Untersuchungen oder klinische Anwendungen durchaus interessant wäre. In der klinischen Anwendung bzw. bei *in vivo* Untersuchungen kann zudem die Zeitspanne der Behandlungen noch deutlich erhöht werden. In dieser Arbeit war die Proliferation der Fibroblasten der limitierende Faktor, da bereits nach wenigen Tagen eine Konfluenz erreicht war. Aufgrund dessen wurde hier die Zeitspanne der Behandlungen auf drei Tage limitiert.

Anschließend führten wir eine Versuchsreihe durch, die darüber Aufschluss geben sollte, auf welcher Ebene das CO₂ in die Myofibrogenese eingreift. Hierzu wurden nach der CO₂-Behandlung der TGF- β -stimulierten Fibroblastenkulturen die Expression verschiedener Differenzierungs- bzw. Proliferationsmarker mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) quantifiziert. Bei prinzipiell gleichem Aufbau wie bei den vorangegangenen Versuchen wählten wir eine Behandlungsdauer von

15 min. Anschließend wurden die für die Proteine Alpha-smooth muscle actin (α -SMA), Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase 4 (Nox4), Ki-67, *nuclear factor erythroid related factor-2* (Nrf2) und *forkhead box protein O1* (FoxO1) codierenden Gene quantifiziert.

Das α -SMA-Gen zeigte analog zu den Ergebnissen aus dem direkten Proteinnachweis eine signifikante ($p \leq 0,01$) Reduktion seiner Expression von ca. 60 % im Median nach der CO₂-Behandlung. Die übrigen Gene zeigten mit einem Signifikanzniveau von $p > 0,05$ keine signifikante Änderung in der Expression.

In mehreren Arbeiten wird das Protein Nox4 als wichtiger Bestandteil des TGF- β -Signalweges und somit in der Myofibrogenese beschrieben (CUCORANU *et al.*, 2005; HECKER *et al.*, 2009; BARNES UND GORIN, 2011; BABALOLA *et al.*, 2014). Neueste Untersuchungen legen jedoch nahe, dass Nox4 bei der Differenzierung von dermalen Fibroblasten keine Rolle zu spielen scheint (SIEDLAR *et al.*, 2023). In dieser Arbeit wurde hierzu zwar kein signifikantes Ergebnis generiert, jedoch zeigte sich im Median tendenziell sogar eine Zunahme der Nox4-Genexpression nach der CO₂-Behandlung. Dieses paradoxe Ergebnis bietet einen interessanten Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen.

Das Protein Ki67 ist ein bekannter Proliferationsmarker in der Onkologie, wurde aber auch in proliferierenden primären humanen Fibroblasten nachgewiesen (GERDES *et al.*, 1983; SUN *et al.*, 2017). Ohne ein signifikantes Ergebnis generiert zu haben, ist in der Tendenz aber eine verminderte Genexpression nach CO₂-Behandlung zu erkennen. Somit wäre dies ein Hinweis auf eine Hemmung der Proliferation, was sich mit den Erkenntnissen aus den vorangegangenen Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe deckt (DÖHMEN, 2021).

Das Protein Nrf2 kann als Gegenspieler der Nox4 verstanden werden und inhibiert bei erhöhter Expression die Myofibrogenese bis hin zur Dedifferenzierung von Myofibroblasten zurück zu ruhenden Fibroblasten (ARTAUD-MACARI *et al.*, 2013; AUDOUSSET *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2022). In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Effekt der CO₂-Behandlung auf die Genexpression nachgewiesen werden. Die relative Genexpression

zeigte sich im Median nahezu unverändert zu der unbehandelten Kontrolle.

Auch die Genexpression des Proteins FoxO1 zeigte nach CO₂-Behandlung keine signifikante Änderung zur Kontrolle. Dieses Protein wurde als essenziell für die TGF- β -induzierte Fibroblastendifferenzierung beschrieben, ohne den genauen Mechanismus zu kennen (VIVAR *et al.*, 2016; NORAMBUENA-SOTO *et al.*, 2017).

Insgesamt zeigten sich bei der Quantifizierung der Gene deutliche Schwankungen und größere Ausreißer in den erzeugten Daten. In dieser Hinsicht könnte eine Neuauflage dieser Versuchsreihe mit z.B. höherer Probenzahl oder mit Unterteilung in *Responder* und *Non-Responder* interessant sein.

Abschließend sollte untersucht werden, ob die Behandlung der Fibroblasten mit CO₂ einen Effekt auf die Glykolyse der Zellen hat. Hierzu wurde das Glukoseverbrauchs-Test „*Glucose-Glo*TM“ verwendet. Die Fibroblasten wurden für 15 bzw. 60 Minuten mit dem CO₂-Medium behandelt und anschließend mit normalem Nährmedium inkubiert. Direkt im Anschluss an die CO₂-Behandlung sowie nach 30 Minuten, 1, 2, 4 und 24 Stunden wurde die Glukosekonzentration des Nährmediums bestimmt, um die Differenz des Glukoseverbrauches zwischen den behandelten und den unbehandelten Zellen zu überprüfen. Es zeigte sich keine signifikante Differenz des Glukoseverbrauches zu den beobachteten Zeitpunkten. Die Behandlung von Fibroblasten mit CO₂ scheint also keinen Effekt auf die Glykolyse der Zellen zu haben.

Allerdings zeigt eine andere Untersuchung aus unserer Arbeitsgruppe eine signifikante Hemmung der Glykolyse nach CO₂-Behandlung. Hier wurde mit dem Analysegerät „*Agilent Seahorse XF24*“ die extrazelluläre Versauerungsrate gemessen. Da diese Methode deutlich sensitiver und weniger fehleranfällig ist, sind die hier erhobenen Daten in ihrer Aussagekraft fraglich.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde der Effekt der Behandlung von Fibroblastenkulturen mit CO₂ in wässriger Lösung auf deren TGF- β 1-induzierte Differenzierung zu Myofibroblasten untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikante Hemmung der Myofibrogenese. Es konnte sowohl eine Dosisabhängigkeit als auch eine Abhängigkeit von der Behandlungsdauer gezeigt werden. Vermutete Mechanismen hinter diesem Effekt wurden ebenfalls untersucht. Die Quantifizierung der Expression verschiedener Differenzierungs- und Proliferationsmarker ergab keinen Aufschluss über den zugrundeliegenden Mechanismus des beobachteten Effektes. Auch die initial als plausibler Wirkmechanismus vermutete Hemmung der Glykolyse, die an anderer Stelle als zentraler Angriffspunkt postuliert wurde, konnte jedoch in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse stellen jedoch eine interessante Grundlage für weiterführende Untersuchungen *in vitro* sowie *in vivo* dar.

Bei der Behandlung von chronischen Wunden hat das CO₂ schon seit langer Zeit einen Stellenwert. Auch in anderen Bereichen wie der Therapie von Verbrennungswunden und der kosmetischen Dermatologie wird ein positiver Effekt der Behandlung mit CO₂ beschrieben. Daten zu dem Effekt einer CO₂-Therapie auf hypertrophe Narben, Keloide oder Fibromatosen wie dem Morbus Dupuytren existieren in der Literatur bis dato jedoch nicht. Für diese Krankheitsbilder sind die in dieser Arbeit erhobenen Daten aufgrund ihrer Gemeinsamkeit der überschießenden Myofibrogenese von großer Relevanz.

Die hier erhobenen Daten *in vitro* in Verbindung mit den bereits existierenden Daten in anderen medizinischen Bereichen stellen eine vielversprechende Grundlage für eine mögliche klinische Anwendbarkeit zur Behandlung dieser Krankheitsbilder dar. Auch bei noch fehlenden *in vivo* Untersuchungen sind die Ergebnisse dieser Arbeit aussichtsreich. Es konnten signifikante Effekte auch bei kurzer Behandlungsdauer und bei geringer Konzentration des CO₂ gezeigt werden. Hiermit sollte unter anderem die Eindringtiefe in die Haut *in vivo* simuliert werden. In Verbindung

mit den bereits bekannten Erkenntnissen zu der CO₂-Therapie und den ohnehin günstigen physikalischen Eigenschaften dieses Gases, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit einen möglicherweise potenten Ansatz zur Inhibition der Myofibrogenese bei diesen Krankheitsbildern.

Die Anwendung von CO₂ in wässriger Lösung z.B. in der Balneotherapie oder bei der Therapie chronischer Wunden ist schon seit langer Zeit etabliert. Risiken wie eine Hyperkapnie sind daher bekannt und können einfach vermieden werden. Die Anwendung bei den genannten Krankheitsbildern stellt somit eine womöglich einfache, kostengünstige und risikoarme Alternative zu den etablierten Therapieverfahren dar. Auch eine prophylaktische Anwendung bei bestehender Prädisposition oder zur Vermeidung eines Rezidivs z.B. nach operativer Therapie ist ein spannender möglicher Einsatzbereich. Eine solche additive Therapie könnte bei einem allgemein hohen Rezidivrisiko dieser Erkrankungen von großer Bedeutung sein.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ARTAUD-MACARI, E., D. GOVEN, S. BRAYER, A. HAMIMI, V. BESNARD, J. MARCHAL-SOMME, Z. E. ALI, B. CRESTANI, S. Kerdine-Romer, A. BOUTTEN & M. BONAY 2013. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 nuclear translocation induces myofibroblastic dedifferentiation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal*, 18, 66-79.
- AUDOUSSET, C., T. MCGOVERN & J. G. MARTIN 2021. Role of Nrf2 in Disease: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches - Pulmonary Disease/Asthma. *Front Physiol*, 12, 727806.
- AUMÜLLER, G., G. AUST, A. DOLL, J. ENGELE, J. KIRSCH, S. MENSE, D. REISSIG, J. SALVETTER, W. SCHMIDT, F. SCHMITZ, E. SCHULTE, K. SPANEL-BOROWSKI, W. WOLFF, L. J. WURZINGER & H.-G. ZILCH 2010. *Duale Reihe Anatomie*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- BABALOLA, O., A. MAMALIS, H. LEV-TOV & J. JAGDEO 2014. NADPH oxidase enzymes in skin fibrosis: molecular targets and therapeutic agents. *Arch Dermatol Res*, 306, 313-330.
- BARNES, J. L. & Y. GORIN 2011. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int*, 79, 944-56.
- BAUM, C. L. & C. J. ARPEY 2005. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg*, 31, 674-86; discussion 686.
- BAYAT, A., D. A. MCGROUTHER & M. W. FERGUSON 2003. Skin scarring. *BMJ*, 326, 88-92.
- BERMAN, B., A. MADERAL & B. RAPHAEL 2017. Keloids and Hypertrophic Scars: Pathophysiology, Classification, and Treatment. *Dermatol Surg*, 43 Suppl 1, S3-S18.
- BIERNACKA, A., M. DOBACZEWSKI & N. G. FRANGOGIANNIS 2011. TGF-beta signaling in fibrosis. *Growth Factors*, 29, 196-202.
- BRANDI, C., L. GRIMALDI, G. NISI, A. BRAFA, A. CAMPA, M. CALABRO, M. CAMPANA & C. D'ANIELLO 2010. The role of carbon dioxide therapy in the treatment of chronic wounds. *In Vivo*, 24, 223-6.
- BROUGHTON, G., 2ND, J. E. JANIS & C. E. ATTINGER 2006. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*, 117, 1e-S-32e-S.
- CAMPOS, A. C., A. K. GROTH & A. B. BRANCO 2008. Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 11, 281-8.
- CARROLL, P., R. M. HENSHAW, C. GARWOOD, K. RASPOVIC & D. KUMAR 2018. Plantar Fibromatosis: Pathophysiology, Surgical and Nonsurgical Therapies: An Evidence-Based Review. *Foot Ankle Spec*, 11, 168-176.
- CHAUDHURY, A. & P. H. HOWE 2009. The tale of transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling: a soigne enigma. *IUBMB Life*, 61, 929-39.
- CUCORANU, I., R. CLEMPUS, A. DIKALOVA, P. J. PHELAN, S. ARIYAN, S. DIKALOV & D. SORESCU 2005. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res*, 97, 900-7.
- DARBY, I. A., B. LAVERDET, F. BONTE & A. DESMOULIERE 2014. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Invest Dermatol*, 7, 301-11.
- DESMOULIERE, A., A. GEINOZ, F. GABBIANI & G. GABBIANI 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*, 122, 103-11.
- DISTLER, J. H. W., A. H. GYORFI, M. RAMANUJAM, M. L. WHITFIELD, M. KONIGSHOFF & R. LAFYATIS 2019. Shared and distinct mechanisms of fibrosis. *Nat Rev Rheumatol*, 15, 705-730.
- DÖHMEN, N. K. 2021. *Der Einfluss wässriger CO2-Lösungen auf wundheilungsrelevante Parameter humaner Zellen der Cutis in vitro*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- DÖNMEZ, A., Z. TÜTÜNCÜ, K. ÖZTÜRK, E. ODABAŞI & S. AKTAŞ 2008. Evaluation of the Effects of H₂S- and CO₂-Water Baths on Peripheral Circulation Disorders*. *Physikalische Medizin, Rehabilitationsmedizin, Kurortmedizin*, 10, 58-59.
- FINZGAR, M., Z. MELİK & K. CANKAR 2015. Effect of transcutaneous application of gaseous carbon dioxide on cutaneous microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc*, 60, 423-35.
- FUIANO, M., M. MOSCA, S. CARAVELLI, S. MASSIMI, M. G. BENEDETTI, F. DI CAPRIO, S. MOSCA & S. ZAFFAGNINI 2019. Current concepts about treatment options of plantar fibromatosis: A systematic review of the literature. *Foot Ankle Surg*, 25, 559-564.
- GABBIANI, G. 2003. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*, 200, 500-3.
- GERDES, J., U. SCHWAB, H. LEMKE & H. STEIN 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31, 13-20.
- GRABOWSKI, G., M. J. PACANA & E. CHEN 2020. Keloid and Hypertrophic Scar Formation, Prevention, and Management: Standard Review of Abnormal Scarring in Orthopaedic Surgery. *J Am Acad Orthop Surg*, 28, e408-e414.
- GUO, S. & L. A. DIPETRO 2010. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*, 89, 219-29.
- HECKER, L., R. VITTAL, T. JONES, R. JAGIRDAR, T. R. LUCKHARDT, J. C. HOROWITZ, S. PENNATHUR, F. J. MARTINEZ & V. J. THANNICKAL 2009. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med*, 15, 1077-81.
- HENNE-BRUNS, D., E. BARTH, H. BARTH, H. V. BAUM, T. BECKER, M. BEREND, P. BIBERTHALER, A. S. BÖHLE, F. BRAUN, A. BRINKMANN, C. BROCKSCHMIDT, D. BRÖRING, J. BRUNS, E. CAVUS, J. CREMER, P. DOHRMANN, J. M. DONIEC, M. DÜRIG, S. ENGLER, S. FRAUND-CREMER, H. GEBHARDT, A. L. GERBES, H. GRIMM, K. D. GUPTA, A. HECKMANN, M. HELLER, S. W. HIRT, H. HOF, H. HOFBAUER, R. ISENMANN, H. JUHL, H.-J. KAATSCH, I. KACZMAREK, H.-J. KLOMP, A. KNAUSS, M. KORNMANN, K. KRAMER, H. KRAEMER-HANSEN, T. KREUSCH, U. KRÜGER, T. KÜCHLER, A. LIEBOLD, M. LÖHNERT, J. MAYER, A. NIEDERBICHLER, H.-J. OESTERN, L. RENDERS, H. SCHAUBE, J. SCHEEWE, W. SCHLOSSER, A. SCHMID, R. SCHÖN, J. SCHRÖDER, W. SEELING, H. SORG, M. SPIES, L. STAIB, P. STEFFEN, H. SUGER-WIEDECK, J. TEPEL, I. VOGEL, P. M. VOGT, F. WAGNER, H. WENK, M. WITTAU, A. M. WOLF, F. WOLFRUM & P. WÜRL 2012. *Duale Reihe Chirurgie*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- HINZ, B. 2007. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*, 127, 526-37.
- HU, H. H., D. Q. CHEN, Y. N. WANG, Y. L. FENG, G. CAO, N. D. VAZIRI & Y. Y. ZHAO 2018. New insights into TGF-beta/Smad signaling in tissue fibrosis. *Chem Biol Interact*, 292, 76-83.
- HYTTIÄINEN, M., C. PENTTINEN & J. KESKI-OJA 2004. Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 41, 233-64.
- IRIE, H., T. TATSUMI, M. TAKAMIYA, K. ZEN, T. TAKAHASHI, A. AZUMA, K. TATEISHI, T. NOMURA, H. HAYASHI, N. NAKAJIMA, M. OKIGAKI & H. MATSUBARA 2005. Carbon dioxide-rich water bathing enhances collateral blood flow in ischemic hindlimb via mobilization of endothelial progenitor cells and activation of NO-cGMP system. *Circulation*, 111, 1523-9.
- ISHIGURO, S., Y. AKASAKA, H. KIGUCHI, T. SUZUKI, R. IMAIZUMI, Y. ISHIKAWA, K. ITO & T. ISHII 2009. Basic fibroblast growth factor induces down-regulation of alpha-smooth muscle actin and reduction of myofibroblast areas in open skin wounds. *Wound Repair Regen*, 17, 617-25.
- JUNQUEIRA, L. C. U., J. CARNEIRO, M. GRATZL, A. MAYERHOFER & L. J. WURZIGER 2004. *Histologie*, Berlin/ Heidelberg, Springer Verlag.
- KOLI, K., J. SAHARINEN, M. HYTTIÄINEN, C. PENTTINEN & J. KESKI-OJA 2001. Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microsc Res Tech*, 52, 354-62.
- KROUMPOUZOS, G., G. ARORA, M. KASSIR, H. GALADARI, U. WOLLINA, T. LOTTI, S. GRABBE & M. GOLDUST 2022. Carboxytherapy in dermatology. *Clin Dermatol*, 40, 305-309.
- LEE, H. J. & Y. J. JANG 2018. Recent Understandings of Biology, Prophylaxis and Treatment Strategies for Hypertrophic Scars and Keloids. *Int J Mol Sci*, 19.

- LUO, S., M. BENATHAN, W. RAFFOUL, R. G. PANIZZON & D. V. EGLOFF 2001. Abnormal balance between proliferation and apoptotic cell death in fibroblasts derived from keloid lesions. *Plast Reconstr Surg*, 107, 87-96.
- METZ, C. N. 2003. Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing. *Cell Mol Life Sci*, 60, 1342-50.
- MOLL, I., M. AUGUSTIN, F. A. BAHMER, J. BAHMER, C. BAYERL, H. P. J. BOONEN, E. COORS, M. GRIMMEL, I. HADSHIEW, U. HAUSWIRTH, H. HOFMANN, E. G. JUNG, W. KIMMIG, E. KNUSSMANN-HARTIG, X. MILLER, M. RADTKE, A. RAUTERBERG, W. SCHULZE, U. SIEMANN-HARMS, S. STANGL, A. TSANAKAS, V. VOIGTLÄNDER, J. WEISS & R. WESSBECHER 2010. *Duale Reihe Dermatologie*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- NIETHARD, F. U., J. PFEIL & P. BIBERTHALER 2014. *Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- NORAMBUENA-SOTO, I., C. NUNEZ-SOTO, F. SANHUEZA-OLIVARES, N. CANCINO-ARENAS, D. MONDACA-RUFF, R. VIVAR, G. DIAZ-ARAYA, R. MELLADO & M. CHIONG 2017. Transforming growth factor-beta and Forkhead box O transcription factors as cardiac fibroblast regulators. *Biosci Trends*, 11, 154-162.
- OGAWA, R., T. DOHI, M. TOSA, M. AOKI & S. AKAISHI 2020. The Latest Strategy for Keloid and Hypertrophic Scar Prevention and Treatment: The Nippon Medical School (NMS) Protocol. *J Nippon Med Sch*.
- RAO, K. B., N. MALATHI, S. NARASHIMAN & S. T. RAJAN 2014. Evaluation of myofibroblasts by expression of alpha smooth muscle actin: a marker in fibrosis, dysplasia and carcinoma. *J Clin Diagn Res*, 8, ZC14-7.
- RIVERS, J. K. & M. ZARBAFIAN 2021. Improvement of Dupuytren Disease After Treatment With a Fractionated CO2 Laser. *Dermatol Surg*, 47, 153-154.
- SCHMIDT, R. F. & F. LANG 2007. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, Heidelberg, Springer-Verlag Berlin.
- SEIDEL, R. & R. MOY 2015. Effect of Carbon Dioxide Facial Therapy on Skin Oxygenation. *J Drugs Dermatol*, 14, 976-80.
- SORG, H., A. LIMBOURG, A. H. ROUSHAN, G. KÜTHER, D. BRAUNSCHWEIG, C. GUTENBRUNNER, P. VOGT & H. O. RENNEKAMPFF 2012. Improvement of wound healing by CO2-treatment-Organisation and management of the therapy. *ZfW* 2012, No. 1, 23-28.
- STEWART, B. D. & A. F. NASCIMENTO 2021. Palmar and plantar fibromatosis: a review. *J Pathol Transl Med*, 55, 265-270.
- SUN, X., A. BIZHANOVA, T. D. MATHESON, J. YU, L. J. ZHU & P. D. KAUFMAN 2017. Ki-67 Contributes to Normal Cell Cycle Progression and Inactive X Heterochromatin in p21 Checkpoint-Proficient Human Cells. *Mol Cell Biol*, 37.
- SUN, X. & P. D. KAUFMAN 2018. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127, 175-186.
- TADOKORO, Y., D. TAKEDA, A. MURAKAMI, N. YATAGAI, I. SAITO, S. ARIMOTO, Y. KAKEI, M. AKASHI & T. HASEGAWA 2023. Transcutaneous carbon dioxide application suppresses the expression of cancer-associated fibroblasts markers in oral squamous cell carcinoma xenograft mouse model. *PLoS One*, 18, e0290357.
- TAN, J. & J. WU 2017. Current progress in understanding the molecular pathogenesis of burn scar contracture. *Burns Trauma*, 5, 14.
- TENENHAUS, M. & H. O. RENNEKAMPFF 2012. Surgical advances in burn and reconstructive plastic surgery: new and emerging technologies. *Clin Plast Surg*, 39, 435-43.
- TOMASEK, J. & G. M. RAYAN 1995. Correlation of alpha-smooth muscle actin expression and contraction in Dupuytren's disease fibroblasts. *J Hand Surg Am*, 20, 450-5.
- TRUONG, K., I. PRASIDHA & T. WAIN 2022. A systematic review of randomised controlled trials investigating laser assisted drug delivery for the treatment of keloid and hypertrophic scars. *Lasers Med Sci*, 37, 47-59.

- VAUGHAN, M. B., E. W. HOWARD & J. J. TOMASEK 2000. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res*, 257, 180-9.
- VERJEE, L. S., K. MIDWOOD, D. DAVIDSON, D. ESSEX, A. SANDISON & J. NANCHAHAL 2009. Myofibroblast distribution in Dupuytren's cords: correlation with digital contracture. *J Hand Surg Am*, 34, 1785-94.
- VIVAR, R., C. HUMERES, C. MUNOZ, P. BOZA, S. BOLIVAR, F. TAPIA, S. LAVANDERO, M. CHIONG & G. DIAZ-ARAYA 2016. FoxO1 mediates TGF-beta1-dependent cardiac myofibroblast differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 1863, 128-38.
- VOHWINKEL, C. U., E. LECUONA, H. SUN, N. SOMMER, I. VADASZ, N. S. CHANDEL & J. I. SZNAJDER 2011. Elevated CO(2) levels cause mitochondrial dysfunction and impair cell proliferation. *J Biol Chem*, 286, 37067-76.
- WALTHALL, J., P. ANAND & U. H. REHMAN 2022. Dupuytren Contracture. *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- WANG, C. J., J. Y. KO, W. Y. CHOU, J. H. CHENG & Y. R. KUO 2018. Extracorporeal shockwave therapy for treatment of keloid scars. *Wound Repair Regen*, 26, 69-76.
- WANG, J., R. ZOHAR & C. A. MCCULLOCH 2006. Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res*, 312, 205-14.
- WANG, Y., J. WEI, H. DENG, L. ZHENG, H. YANG & X. LV 2022. The Role of Nrf2 in Pulmonary Fibrosis: Molecular Mechanisms and Treatment Approaches. *Antioxidants (Basel)*, 11.
- WEISKIRCHEN, R., S. WEISKIRCHEN & F. TACKE 2019. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Mol Aspects Med*, 65, 2-15.
- WELSCH, U. & J. SOBOTTA 2006. *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie*, München, Elsevier Urban & Fischer Verlag.
- WILD, T. & J. AUBÖCK 2007. *Manual der Wundheilung: Chirurgisch-dermatologischer Leitfaden der modernen Wundbehandlung*, Wien, Springer Verlag.
- WRANA, J. L. & L. ATTISANO 2000. The Smad pathway. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11, 5-13.

9 Darstellungsverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1: Vereinfachte schematische Darstellung des TGF- β 1-Signalwegs.	6
Abb. 2: Schematische Darstellung des oberen rechten Eckquadrats einer Zählkammer vom Neubauer Typ.	31
Abb. 3: Schematische Darstellung einer Versuchsplatte für den Zellviabilitätsversuch.	39
Abb. 4: Schematische Darstellung einer Versuchsplatte für den Differenzierungsversuch.	41
Abb. 5: Schematische Darstellung einer Versuchsplatte für den Verdünnungsreihenversuch. .	44
Abb. 6: Schematische Darstellung einer Versuchsplatte für den Verdünnungsversuch.	45
Abb. 7: Schematische Darstellung einer Versuchsplatte für den Differenzierungsversuch für Gennachweise.	47
Abb. 8: Schematische Darstellung des Reaktionsprinzips des Glukosedetektions-Kits.	48
Abb. 9: Schematische Darstellung einer Versuchsplatte für den Glukoseverbrauchsversuch. ...	49
Abb. 10: Schematische Darstellung des Aufbaus eines „Blot-Sandwiches“.	59
Abb. 11: Schematische Darstellung der Immunmarkierung und Detektion des Zielproteins.	62
Abb. 12: Schematische Darstellung einer 96-Well-Platte als Pipettiervorlage für die cDNA-Proben.	68
Abb. 13: Signaldifferenz nach Zugabe von <i>CellTiter-Blue</i> [®] (CTB)-Reagens als Indikator für die Zellviabilität von CO ₂ -behandelten und unbehandelten Fibroblasten bei unterschiedlicher Behandlungsdauer zu verschiedenen Zeitpunkten.	76
Abb. 14: DNA-Menge unbehandelter und für unterschiedliche Dauer behandelte Fibroblastenkulturen nach 18 Stunden Inkubation.	77
Abb. 15: Addierte Fluoreszenz nach Zugabe von <i>CellTiter-Blue</i> [®] (CTB)-Reagens als Indikator für die Zellviabilität von CO ₂ -behandelten und unbehandelten Fibroblasten bei unterschiedlicher Behandlungsdauer.	78
Abb. 16: Relative Expression des Proteins α -SMA in Fibroblasten bei unterschiedlicher Behandlungsdauer mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium unter Einfluss von TGF- β 1.	79
Abb. 17: Relative Expression des Proteins α -SMA in spontan differenzierenden Fibroblasten bei unterschiedlicher Behandlungsdauer mit kohlenstoffdioxid-haltigem Nährmedium.	81
Abb. 18: Relative Expression des Proteins α -SMA in Fibroblasten bei unterschiedlicher Konzentration von kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium unter Einfluss von TGF- β 1.	82
Abb. 19: Relative Expression des Proteins α -SMA in Fibroblasten bei unterschiedlicher Behandlungsdauer mit verdünntem kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium unter Einfluss von TGF- β 1.	84
Abb. 20: Relative Genexpression von α -SMA in Fibroblasten nach Behandlung mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium unter Einfluss von TGF- β 1.	86
Abb. 21: Relative Genexpression von Nox4 in Fibroblasten nach Behandlung mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium unter Einfluss von TGF- β 1.	87
Abb. 22: Relative Genexpression von Ki-67 in Fibroblasten nach Behandlung mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium unter Einfluss von TGF- β 1.	88
Abb. 23: Relative Genexpression von Nrf2 in Fibroblasten nach Behandlung mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium unter Einfluss von TGF- β 1.	89
Abb. 24: Relative Genexpression von FoxO1 in Fibroblasten nach Behandlung mit kohlenstoffdioxidhaltigem Nährmedium unter Einfluss von TGF- β 1.	90

Abb. 25: Differenz der Glukosemenge des Nährmediums von CO ₂ -behandelten und unbehandelten Fibroblasten bei unterschiedlicher Behandlungsdauer zu verschiedenen Zeitpunkten.....	92
--	----

Tabellen

Tabelle 1: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	18
Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien	20
Tabelle 3: Liste der verwendeten Enzyme, Seren und Antibiotika	21
Tabelle 4: Liste der verwendeten Laborgeräte	26
Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits	26
Tabelle 6: Liste der verwendeten Software.....	27
Tabelle 7: Schema des Erntens der Zellen nach Differenzierungsversuch	42
Tabelle 8: Konzentrationen der Verdünnungsreihe für den Verdünnungsreihenversuch.....	43
Tabelle 9: Herstellung der verdünnten BSA-Standards	52
Tabelle 10: Konzentration und Komponenten des Trenngels in Abhängigkeit von der Molekülmasse des Proteins	54
Tabelle 11: Pipettierschema für den <i>Mastermix</i> zur Umschreibung der Gesamt-RNA in cDNA (Einfachansatz)	66
Tabelle 12: Pipettierschemata für den <i>Mastermix</i> der Ziel- und <i>Housekeeping</i> -Gene (Einfachansatz)	67
Tabelle 13: Verwendetes PCR-Protokoll für die Gene der Proteine Nox4 und CypB	69
Tabelle 14: Verwendetes PCR-Protokoll für die Gene der Proteine FoxO1, Ki67, Nrf2, α -SMA und 18S-rRNA	69

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen aufrichtigen Dank an all diejenigen aussprechen, die mich während der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt dem Vater aller Doktorväter – Christoph – für deine ständige Erreichbarkeit, lockere Art und Kommunikation auf Augenhöhe. Du hast mir zunächst diese Arbeit ermöglicht, mir dann im Verlauf mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich zuletzt motiviert durchziehen. Auch wenn du selbst schon die Tage zählst: Es wird ein großes Loch entstehen, wenn mit dir ein hervorragender Betreuer, Chef und Doktorvater in den wohlverdienten Ruhestand geht. Hierfür wünsche ich dir alles erdenklich Gute.

Auch dem Team des Forschungslabors – insbesondere Jutta, Samira und Christa – möchte ich ganz herzlich danken. Eure tagtägliche Unterstützung mit eurer Expertise, Geduld und der von euch geschaffenen harmonischen Arbeitsatmosphäre hat mir die Arbeit im Labor zu einer unvergesslich schönen Erfahrung gemacht und einen unverzichtbaren Beitrag zur Erhebung meiner Daten geleistet.

Überaus dankbar bin ich auch meiner lieben Frau Ann-Sophie, die mich immer unterstützt hat. Seit dem Beginn dieser Arbeit ist so viel passiert: drei Umzüge, neue Jobs, unsere Hochzeit, die Geburt von Frederik und sein spannendes erstes Lebensjahr sowie viele kleinere Ereignisse, die wir gemeinsam erlebt und gemeistert haben. Während all dieser Zeit hast du mich immer wieder motiviert, vieles auf dich genommen und persönliche Opfer gebracht und mir somit den nötigen Freiraum verschaffen, um mich auf diese Arbeit zu fokussieren. Das war nicht immer einfach, und gerade in diesen herausfordernden Zeiten habe ich deine Unterstützung und deinen unermüdlichen Einsatz umso mehr zu schätzen gelernt. Ich liebe dich mein Biggi.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern danken. Ihr habt sowohl das Studium als auch die Promotion erst möglich gemacht, standet mir immer zur Seite und habt mich in meinen Entscheidungen unterstützt. In diesem Zusammenhang auch danke für die Geduld, denn endlich kann ich auf die Frage „Na, wie weit bist du?“ mit „Fertig!“ antworten und bekomme nun den verdammten Keks aus der Prinzenrolle.