

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik  
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der  
Universität Tübingen

**Biphasische Antwort von Vitamin C in Zigarettenrauch-  
induziertem Zelltod von SCP-1-Zellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Heid, Daniel Georg**

**2020**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. U. K. Hofmann

Tag der Disputation: 17.06.2019

Wenn man nicht versucht, etwas zu tun,  
was jenseits des bereits Gemeisterten liegt,  
dann wird man nicht wachsen.

-Ralph Waldo Emerson, amerikanischer Philosoph-

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Zigarettenkonsum und damit assoziierte Knochenerkrankungen .....	1
1.2 Theoretische Grundlagen .....	5
1.2.1 Die Phasen der Frakturheilung .....	5
1.2.2 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress durch Zigarettenrauch .....	9
1.2.3 Das Antioxidative Schutzsystem der Zellen .....	11
1.2.4 Vitamin C .....	13
1.2.5 Einfluss von Vitamin C auf den Prozess der osteogenen Differenzierung .....	16
1.2.6 Der NRF2/ARE-Signalweg .....	17
<b>2 Fragestellung und Zielsetzung .....</b>	<b>18</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
3.1 Material .....	19
3.1.1 „Single-cell derived human mesenchymal stem cell line“ (SCP-1).....	19
3.1.2 Chemikalien .....	20
3.1.3 Nährmedien und Zusätze .....	21
3.1.4 Lösungen und Puffer .....	22
3.1.5 Geräte .....	24
3.1.6 Verbrauchsmaterialien .....	24
3.1.7 Primäre und sekundäre Antikörper für Western-Blotting.....	25
3.1.8 Software .....	25
3.2 Methoden .....	27
3.2.1 Zellkulturexperimente .....	27
3.2.2 Passagieren und Ausplattieren von SCP-1-Zellen .....	28
3.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypan-Blau .....	29
3.2.4 Zellviabilitätsmessung mittels Resazurin-Umsatz .....	30
3.2.5 Messung der AP-Aktivität .....	31
3.2.6 Sulforhodamin B (SRB)-Färbung .....	32

3.2.7	Alizarinrot-Färbung .....	32
3.2.8	Intrazelluläre ROS-Bestimmung mittels DCFH-DA-Assay .....	32
3.2.9	Scratch Assay .....	33
3.2.10	Molekularbiologische Methoden .....	34
3.2.11	Western Blot .....	39
3.2.12	Auswertung und Statistik .....	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
4.1	Beeinträchtigung der Viabilität, der AP-Aktivität und der Matrixmineralisierung unter CSE-Exposition .....	45
4.2	Verminderte Migrationsfähigkeit von SCP-1-Zellen unter Einfluss von CSE .....	46
4.3	Vermehrte Messung von ROS unter CSE-Exposition .....	47
4.4	Gesteigerter Proteingehalt unter 100 und 200 µM L-Ascorbat im Toxizitätstest von Vitamin C .....	48
4.5	Anstieg der Viabilität, der AP-Aktivität und teilweise der Matrixmineralisierung unter Co-Inkubation von CSE und L-Ascorbat .....	49
4.6	Förderung der Zellmigration unter Inkubation mit CSE und 200 µM L-Ascorbat .....	53
4.7	Abnehmende ROS-Produktion unter Co-Inkubation mit hohen CSE-Konzentrationen und L-Ascorbat bereits 15 Minuten nach singulärer Exposition .....	54
4.8	Bestimmung der Expressionsmuster antioxidativer Enzyme .....	55
4.8.1	Absinken der <i>NOX4</i> -Genexpression unter Stimulation mit CSE nach mehrtägiger osteogener Differenzierung .....	55
4.8.2	Wiederanstieg von <i>NOX4</i> unter Co-Inkubation mit 200 µM L-Ascorbat .....	56
4.8.3	Tendenzieller Anstieg von <i>GPX3</i> nach vierstündiger Inkubation mit CSE und anschließender Reprimierung nach einem und zwei Tagen .....	57
4.8.4	Keine signifikanten Veränderungen der Genexpression von <i>GPX3</i> nach 14-tägiger Co-Inkubation mit CSE und L-Ascorbat .....	58
4.8.5	Keine signifikanten Genexpressionsveränderungen der <i>Katalase</i> unter CSE im Zeitraum von einer Stunde bis 14 Tagen .....	59
4.8.6	Hohe Korrelation in der Gen- und Proteinexpression von Katalase nach 14 Tagen unter Co-Inkubation mit L-Ascorbat und CSE .....	59
4.8.7	Keine signifikanten Genexpressionsveränderungen von <i>SOD2</i> durch CSE .....	61

4.8.8	Unterschiedliche Regulation in der Gen- und Proteinexpression von <i>SOD2</i> .....	61
4.8.9	CSE ruft keine signifikanten Expressionsveränderungen in <i>GSR</i> hervor .....	62
4.8.10	Tendenzieller Anstieg von <i>GSR</i> unter Co-Inkubation von CSE und L-Ascorbat .....	63
4.9	Einfluss von L-Ascorbat auf die Expression weiterer wichtiger Signaltransduktionswege nach 14 Tagen.....	64
4.9.1	Unterschiedliche Proteinexpression von pNRF2 unter Co-Inkubation von CSE mit verschiedenen Konzentrationen L-Ascorbat .....	64
4.9.2	Geringe Korrelation zwischen Gen- und Proteinexpression von p38MAPK .....	65
4.9.3	Induktion von ERK1/2 unter singulärer Applikation von L-Ascorbat...	66
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>68</b>
5.1	Einfluss von CSE auf funktionelle Parameter im Prozess der osteogenen Differenzierung.....	69
5.2	Auswirkungen von L-Ascorbat auf SCP-1-Zellen .....	71
5.3	Molekulargenetische Auswirkungen von CSE und L-Ascorbat.....	73
5.4	Übersicht über die Ergebnisse und die Diskussion .....	79
5.5	Ausblick.....	80
5.6	Limitationen der Arbeit .....	81
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>101</b>
9.1	Bilderstrecke des Scratch Assays .....	101
9.2	Genexpression von <i>GAPDH</i> .....	104
<b>10</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>105</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>106</b>
<b>12</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>107</b>
<b>13</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>108</b>

# Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mit Rauchen assoziierte Tumore und Krankheiten des menschlichen Körpers.....	2
Abbildung 2: Untersuchung der Aufenthaltsdauer und der Komplikationsrate zwischen Rauchern und Nichtrauchern.....	3
Abbildung 3: Entstehung des Frakturhämatoms.....	6
Abbildung 4: Entstehung von Granulationsgewebe durch Neovaskularisierung und Einwanderung von MSCs. ....	7
Abbildung 5: Mehrere Monate dauernde Transformation des “weichen Kallus” in den “harten Kallus”.....	8
Abbildung 6: Bildung von Lamellenknochen.....	9
Abbildung 7: Entstehung Reaktiver Sauerstoffspezies und ihre Inaktivierung durch antioxidative Enzyme. ....	12
Abbildung 8: Redoxsystem der Ascorbinsäure.....	15
Abbildung 9: Aufgaben von Vitamin C im menschlichen Körper.....	15
Abbildung 10: Osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen.....	19
Abbildung 11: Herstellung des Zigarettenrauchmediums. ....	27
Abbildung 12: Neubauer-Zählkammer mit eingraviertem Zählnetz und Erklärung der Zellzählung.....	29
Abbildung 13: Reaktionsschema der Alkalischen Phosphatase-Aktivität.. ....	31
Abbildung 14: Messung der Aktivität reaktiver Sauerstoffverbindungen.....	33
Abbildung 15: RNA-Isolierung mit TriFast. ....	35
Abbildung 16: Kontrolle der RNA-Integrität. ....	36
Abbildung 17: Standard-Schema für eine GAPDH-PCR.. ....	38
Abbildung 18: Standard-Eichgerade für die Proteinbestimmung nach Lowry.....	41
Abbildung 19: Proteindetektion mit Primär- und Sekundärantikörpern. ....	43

Abbildung 20: CSE-Exposition beeinträchtigt den Resazurinumsatz (a), die AP-Aktivität (b) und die Matrixmineralisierung (c) von SCP-1-Zellen. ....	46
Abbildung 21: Zellmigration von SCP-1-Zellen unter Inkubation mit CSE nach 16, 24 und 48 h. ....	47
Abbildung 22: ROS-Produktion von SCP-1-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen CSE-Konzentrationen. ....	48
Abbildung 23: Resazurinumsatz (a) und SRB-Färbung (b) in SCP-1-Zellen unter wiederholter Gabe verschiedener Konzentrationen L-Ascorbat (0-1000 $\mu$ M).....	49
Abbildung 24: Resazurinumsatz in SCP-1-Zellen nach 14-tägiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen CSE (%) und L-Ascorbat (100 $\mu$ M und 200 $\mu$ M). 51	
Abbildung 25: AP-Aktivität in SCP-1-Zellen nach 14-tägiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen CSE (%) und L-Ascorbat (100 $\mu$ M und 200 $\mu$ M). 52	
Abbildung 26: Matrixmineralisierung in SCP-1-Zellen nach 21-tägiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen CSE (%) und L-Ascorbat (100 $\mu$ M und 200 $\mu$ M). ....	52
Abbildung 27: Zellmigration von SCP-1-Zellen nach 48 h unter Co-Inkubation mit CSE (5 % und 10 %) und L-Ascorbat (100 $\mu$ M und 200 $\mu$ M).....	53
Abbildung 28: ROS-Produktion von SCP-1-Zellen unter CSE (rote Kurve) und unter Co-Inkubation mit 100 $\mu$ M (blaue Kurve) und 200 $\mu$ M L-Ascorbat (grüne Kurve)..	54
Abbildung 29: Expressionsänderung von reguliertem <i>NOX4</i> in SCP-1-Zellen im Zeitverlauf von einer bis vier Stunden (a) und von einem bis 14 Tagen (b). ....	56
Abbildung 30: Änderung der Genexpression von <i>NOX4</i> nach 14-tägiger Behandlung mit CSE und L-Ascorbat.....	57
Abbildung 31.: Expressionsänderung von reguliertem <i>GPX3</i> in SCP-1-Zellen im Zeitverlauf von einer bis vier Stunden (a) und von einem bis 14 Tagen (b). ....	58
Abbildung 32: Änderung der Genexpression von <i>GPX3</i> nach 14-tägiger Behandlung mit CSE und L-Ascorbat.....	58
Abbildung 33: Expressionsänderung von regulierter <i>Katalase</i> in SCP-1-Zellen im Zeitverlauf von einer bis vier Stunden (a) und von einem bis 14 Tagen (b). ....	59



Abbildung 34: Direkter Vergleich von Änderungen der Gen- und Proteinexpression der Katalase nach 14-tägiger Behandlung mit CSE und L-Ascorbat. ....	60
Abbildung 35: Western Blot von Katalase mit SCP-1-Zellen. ....	60
Abbildung 36: Expressionsänderung von regulierter <i>SOD2</i> in SCP-1-Zellen im Zeitverlauf von einer bis vier Stunden (a) und von einem bis 14 Tagen (b). ....	61
Abbildung 37: Direkter Vergleich von Änderungen der Gen- und Proteinexpression von <i>SOD2</i> nach 14-tägiger Behandlung mit CSE und L-Ascorbat. ....	62
Abbildung 38: Expressionsänderung von regulierter <i>GSR</i> in SCP-1-Zellen im Zeitverlauf von einer bis vier Stunden (a) und von einem bis 14 Tagen (b). ....	63
Abbildung 39: Änderung der Genexpression von <i>GSR</i> nach 14-tägiger Behandlung mit CSE und L-Ascorbat. ....	63
Abbildung 40: Änderung der Proteinexpression von pNRF2 nach 14-tägiger Behandlung mit CSE und L-Ascorbat. ....	64
Abbildung 41: Repräsentativer Western Blot von pNRF2 unter Inkubation mit CSE und L-Ascorbat nach 14-tägiger Behandlung. ....	65
Abbildung 42: Direkter Vergleich von Änderungen der Gen- und Proteinexpression von p38MAPK nach 14-tägiger Behandlung mit CSE und L-Ascorbat. ....	66
Abbildung 43: Änderung der Proteinexpression von ERK1/2 nach 14-tägiger Behandlung mit CSE und L-Ascorbat. ....	67
Abbildung 44: Repräsentativer Western Blot von ERK1/2 unter Inkubation mit CSE und L-Ascorbat nach 14-tägiger Behandlung. ....	67
Abbildung 45: Übersicht der relevanten Ergebnisse und Diskussionspunkte. ....	79
Abbildung 46: Repräsentative Zellmigration von SCP-1-Zellen unter Inkubation mit CSE nach 0, 16, 24 und 48 h. ....	101
Abbildung 47: Repräsentative Zellmigration von SCP-1-Zellen unter Inkubation mit CSE und 100 µM L-Ascorbat nach 0, 16, 24 und 48 h. ....	102
Abbildung 48: Repräsentative Zellmigration von SCP-1-Zellen unter Inkubation mit CSE und 200 µM L-Ascorbat nach 0, 16, 24 und 48 h. ....	103
Abbildung 49: Expressionsänderung von regulierter <i>GAPDH</i> in SCP-1-Zellen im Zeitverlauf von einer bis vier Stunden (a) und von einem bis 14 Tagen (b). ....	104

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien.....	20
Tabelle 2: Liste der verwendeten Zusätze für Nährmedien. ....	21
Tabelle 3: Liste der verwendeten Nährmedien für SCP-1-Zellen. ....	21
Tabelle 4: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer. ....	22
Tabelle 5: Liste der verwendeten Geräte. ....	24
Tabelle 6: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	24
Tabelle 7: Liste der verwendeten Primär-Antikörper. ....	25
Tabelle 8: Liste der verwendeten Sekundär-Antikörper.....	25
Tabelle 9: Liste der verwendeten Software. ....	25
Tabelle 10: Liste der verwendeten Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). ....	26
Tabelle 11: Anzahl der auszuplattierten Zellen und Volumen bei 6,24 oder 96-Well- Platten. ....	30
Tabelle 13: Liste der benötigten Chemikalien für Lösung A und B. ....	40
Tabelle 14: Benötigte Chemikalien zur Herstellung der Western Blot Gele.....	41
Tabelle 15: Benötigte Chemikalien zur Herstellung von Lösung A und B.....	44

## Abkürzungsverzeichnis

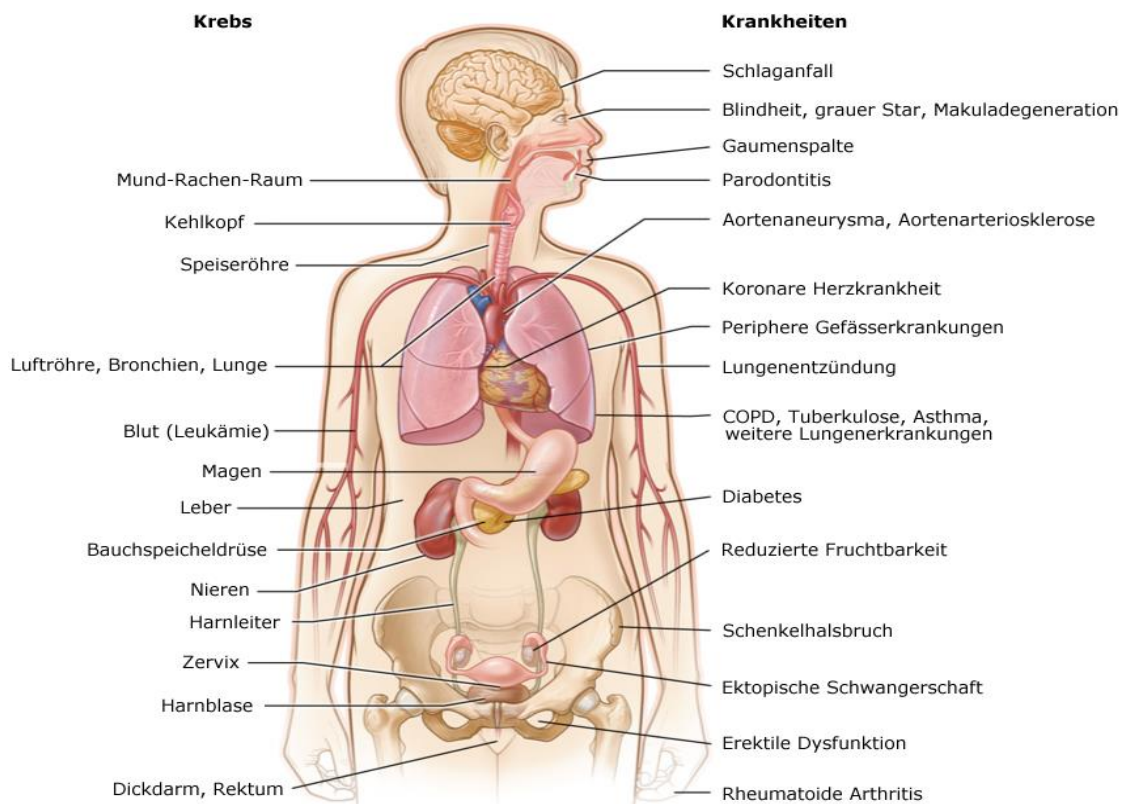
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
ARE	Antioxidant Response Element
cDNA	Komplementäre DNA
CSE	Cigarette Smoke Extract
DCFH-DA	Dichlorofluorescein-Diacetat
ddH <sub>2</sub> O	Demineralisiertes Wasser
DEPC H <sub>2</sub> O	Diethylcarbonat RNase-freies Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPBS	Dulbecco´s Phosphat gepufferte Saline
ERK	Extrazelluläre signalregulierte Kinase
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPX	Glutathionperoxidase
GSR	Glutathion-Reduktase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-1-ethansulfonsäure
L-Asc	L-Ascorbat
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
N	Biologische Replikate
n	Technische Replikate
NOX4	NADPH-Oxidase 4
NRF2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
O <sub>2</sub> -•	Hyperoxid-Anion-Radikal
OD	Optische Dichte
OH•	Hydroxyl-Radikal
OPG	Osteoprotegerin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SOD	Superoxid-Dismutase
SRB	Sulforhodamin B
T/E	Trypsin / EDTA
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WB	Western Blot

# 1 Einleitung

## 1.1 Zigarettenkonsum und damit assoziierte Knochenerkrankungen

Tabakprodukte zählen zu den am weitesten verbreiteten legalen Drogen mit hohem Abhängigkeits- und Suchtpotenzial und das Rauchen eben jener stellt die wichtigste, weltweit vermeidbare Ursache eines vorzeitigen Todes dar [2]. International konsumierten im Jahr 2015 fast 1 Milliarde Menschen Tabakerzeugnisse, davon rauchten allein in Deutschland rund 16,3 Millionen Menschen [3]. Laut Erhebungen des Mikrozensus aus dem Jahre 2013 sterben allein in Deutschland jedes Jahr mehr als 100.000 Menschen frühzeitig durch Rauchen [2]. Während Anfang des 20. Jahrhunderts vorwiegend Personen aus gehobenen Gesellschaftsschichten zur Zigarette griffen, entstammen heute mehr Raucher sozial benachteiligten Gruppen. Die Gründe, weshalb sich Menschen für das Rauchen entscheiden, sind vielfältig und können neben sozialen, körperlichen und psychischen Ursachen auch den von Rauchern beschriebenen „angenehmen Wirkungen“ des Nikotins zugeschrieben werden. Dabei ist allgemein anerkannt, dass regelmäßiger Tabakkonsum als bedeutendster Risikofaktor für chronische, nicht übertragbare Krankheiten (NCDs, „*noncommunicable diseases*“) gilt [4]. Mit einer dosis- und zeitabhängigen Wirkung auf viele verschiedene Organsysteme des menschlichen Körpers ist der Zigarettenkonsum im Besonderen für Erkrankungen der Atemwege, des kardiovaskulären Systems sowie verschiedene Krebsarten verantwortlich, welche in Abb. 1 dargestellt sind [5-7]. Im Tabakrauch sind weit über 6000 verschiedene Inhaltsstoffe enthalten, darunter befinden sich zahlreiche krebserzeugende und giftige Bestandteile [8]. Als wichtigste gesundheitsgefährdende Substanzen gelten Kohlenwasserstoffe, Sauerstoffverbindungen, Stickstoffverbindungen und Metalle, die miteinander in Wechselwirkung treten und leicht durch die Alveolen der Lunge ins Blut übertreten können [2]. Hier entfalten sie ihren schädigenden Einfluss auf das reichlich durchblutete

Knochengestüt. Auch erreichen die Konzentrationen von Nikotin und dessen Hauptmetaboliten Cotinin laut Benowitz *et al.* im Knochen und im Skelettmuskel nahezu die gleichen Werte wie im Blut [9]. Beim Rauchen einer Zigarette werden etwa 0,5 bis 1,5 mg Nikotin in das Blut übertragen, wobei Konzentrationen zwischen 20 und 60 ng Nikotin pro ml erreicht werden [2, 10-12].

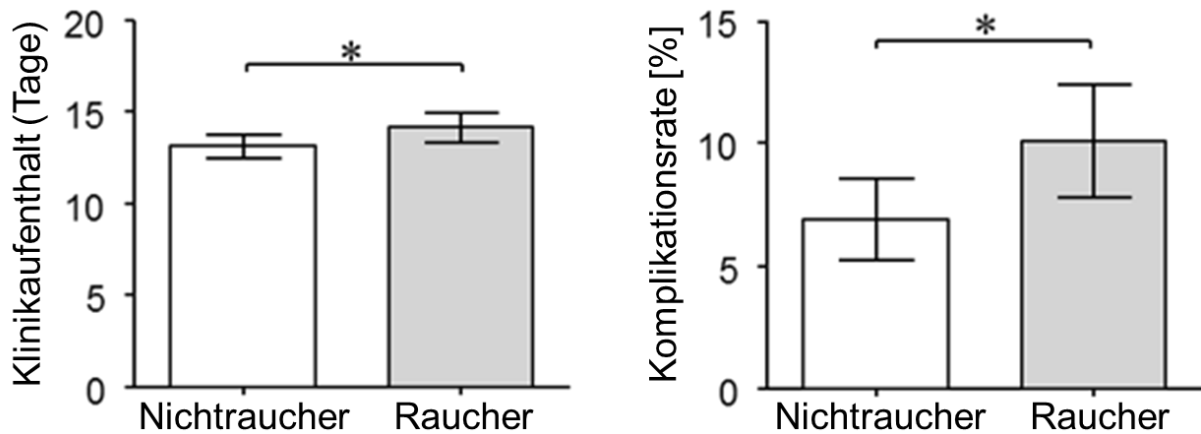


**Abbildung 1: Mit Rauchen assoziierte Tumore und Krankheiten des menschlichen Körpers.** In der Abbildung sind verschiedene, vom Rauchen betroffene Organsysteme sowie mit dem Rauchen assoziierte Krebsarten dargestellt. Modifiziert nach [13].

Es konnten viele schädigende Auswirkungen des Tabakrauches auf dieses empfindliche System in verschiedenen Studien mit Tiermodellen als auch mit Menschen beobachtet werden [14, 15]. So treten Hüftfrakturen und Knocheninfektionen bei Rauchern wesentlich häufiger auf als bei Nichtrauchern [16, 17]. Weiterhin bekannt ist, dass Raucher neben einer verzögerten Wundheilung auch eine verminderte Knochendichte aufweisen, welche durch die langfristigen Auswirkungen des Rau-

chens auf den Knochenmetabolismus zustande kommt [18, 19]. Die Betroffenen leiden dementsprechend häufiger unter Osteoporose, welche die am Häufigsten mit Zigarettenkonsum assoziierte Erkrankung des Knochens ist [20]. Sie ist gekennzeichnet durch einen vermehrten Abbau der Spongiosa, bedingt durch verstärkte Osteoklastenaktivierung. Hierdurch erleiden vor allem Ältere sog. „Pathologische Frakturen“, worunter man einen Knochenbruch versteht, der ohne äußere Einflüsse aufgetreten ist [21].

Rauchen verzögert ebenfalls den Heilungsprozess bei Frakturen und steigert das Risiko für postoperative Komplikationen [22, 23]. In einer von der BG-Klinik durchgeführten Studie wurden die stationäre Aufenthaltsdauer und die Komplikationsrate von 1585 Nichtrauchern und Rauchern untersucht und festgestellt, dass Raucher einerseits länger im Krankenhaus verweilten als Nichtraucher und andererseits häufiger unter postoperativen Problemen wie Infektionen und Pseudarthrosen litten (nicht veröffentlichte Daten), was in nachfolgender Abb. 2 dargestellt wurde.



Studie mit 1585 Patienten der BG Klinik Tübingen

**Abbildung 2: Untersuchung der Aufenthaltsdauer und der Komplikationsrate zwischen Rauchern und Nichtrauchern.** Dargestellt ist eine Studie mit 1585 Patienten der BG-Klinik Tübingen, aus welcher hervorgeht, dass Raucher einerseits länger in der Klinik verweilten und andererseits eine höhere Komplikationsrate aufwiesen.

Zu den gleichen Ergebnissen kamen auch Scolaro *et al.* in einer systematischen Analyse aus 19 Studien, in welcher sie die Komplikationen nach Frakturen langer Röhrenknochen in Rauchern genauer analysierten [24]. Dabei stellten sie fest, dass

Raucher mit einer Tibiafraktur eine höhere Rate an nicht zusammenwachsenden Knochenbrüchen aufwiesen. Ebenso wurde eine um 6 Wochen (Raucher 30,2 W vs Nichtraucher 24,1 W) verlängerte Heilungszeit gegenüber Nichtrauchern beobachtet [24]. Beide dieser Faktoren führen zu einer verstärkten Belastung des Gesundheitssystems, deren direkte und indirekte durch das Rauchen verursachte Kosten auf rund 80 Milliarden Euro jährlich geschätzt werden [25]. Wenn die Heilungsrate der Frakturen in Rauchern durch Prävention oder Therapie verbessert werden könnte, würde ein Teil dieser Kosten für die Gesellschaft eingespart werden.

Es existieren verschiedene Erklärungsansätze, welche die Auswirkungen des Rauchens auf die Frakturheilung aus unterschiedlichen Perspektiven betrachten [26]. Ein wichtiges Modell führt den verzögerten Heilungsprozess auf eine verminderte Durchblutung der Frakturstelle zurück. Diese kann sowohl durch eine gesteigerte Gerinnung, vermehrt arteriosklerotische Ablagerungen, als auch durch eine nikotinvermittelte periphere Vasokonstriktion hervorgerufen werden [27, 28]. In diesem Zusammenhang wird auch ein dämpfender Effekt von Nikotin auf die Stickstoffmonoxid-Synthase diskutiert. Hierdurch wird weniger Stickstoffmonoxid synthetisiert, welches unter physiologischen Bedingungen relaxierend auf die glatte Gefäßmuskulatur wirkt [29, 30].

Außerdem zirkulieren im Blut für die Knochen- und Wundheilung benötigten Stammzellen, Fibroblasten, Wachstumsfaktoren sowie Akute-Phase-Proteine. Im Blutkreislauf treten sie in den direkten Kontakt mit den inhalierten Rauchbestandteilen und können dabei von diesen geschädigt werden [31]. Mehrere Studien wiederum behaupten, dass Nikotin in einer hohen Dosis einen toxischen Einfluss auf Osteoblasten besitzt, während niedrigere Dosen deren Zellwachstum förderten [32-34].

Hohe Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS), sowie niedrige Spiegel von Antioxidantien und Vitaminen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle. Es wird vermutet, dass Rauchen aufgrund einer vermehrten ROS-Produktion zu einem erhöhten Umsatz wichtiger Vitamine wie Vitamin C führt [35]. Daher wird den Konsumenten von Tabakprodukten empfohlen, den vermehrten Bedarf an Antioxidantien bspw. durch höhere Mengen von Vitamin C zu decken [36]. Des Weiteren

konnte gezeigt werden, dass Rauchen sowohl suppressive Auswirkungen auf die angeborene als auch auf die erworbene Immunität ausübt [37]. In der Tat werden wichtige Funktionen wie die Phagozytose oder die Antigenpräsentation von angeborenen Immunzellen (Neutrophile, Makrophagen, dendritische Zellen und Monozyten) durch Tabakkonsum beeinträchtigt [38, 39]. Ebenso konnten verringerte T- und B-Zellantworten auf Antigene beobachtet werden [40, 41]. Hierdurch ließe sich ein durch Rauchen hervorgerufenen, gesteigertes Risiko für Infektionen wie Pneumonien, Influenza, Tuberkulose, Parodontitis, postchirurgische Infektionen, Meningitis und viele weitere Infektionen erklären [42, 43].

## **1.2 Theoretische Grundlagen**

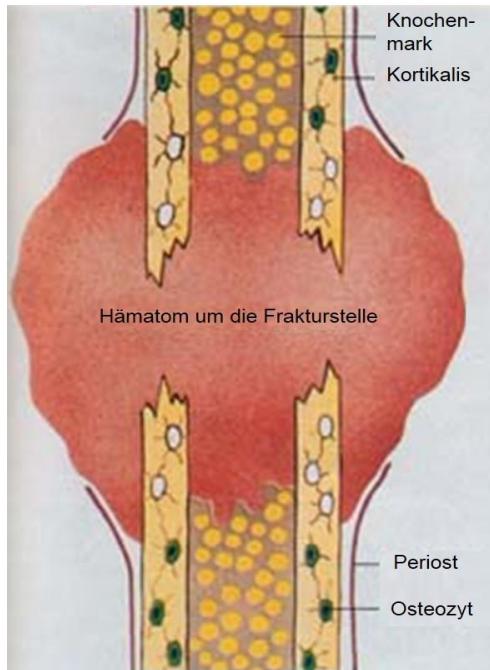
### **1.2.1 Die Phasen der Frakturheilung**

Der Knochen gilt als eines der stoffwechselaktivsten und am besten durchbluteten Organe des menschlichen Körpers, welches durch kontinuierliche Anpassungen an funktionelle und statische Gegebenheiten ständigen Auf-, Ab- und Umbauprozessen unterlegen ist. An dem Vorgang dieses sog. „Knochenremodellings“ sind unterschiedliche Zellen wie Osteoblasten und Osteoklasten involviert, die sich in normalem Knochen in einem stetigen Gleichgewicht befinden [44, 45]. Eine Kontinuitätsunterbrechung des Knochens stellt eine Fraktur dar und kann entstehen, wenn Knochengewebe durch ein Trauma geschädigt wird oder es einer langfristig einwirkenden, pathologischen Belastung nicht standhalten kann. Abhängig von der Stabilisation und der Distanz der zueinander liegenden Knochenfragmente resultiert entweder eine primäre (direkte) oder eine sekundäre (indirekte) Knochenheilung, wobei es in den meisten Fällen durch mechanische Instabilität zu interfragmentären Bewegungen und damit zu einem sekundären Heilungsprozess kommt (Frakturbreite > 0,5 mm) [46]. Dieser komplexe Vorgang umfasst das Zusammenspiel zellulärer und biomechanischer Ereignisse und lässt sich in mehrere aufeinanderfolgende, teils überlappende Phasen einteilen: Die Entzündungsphase,



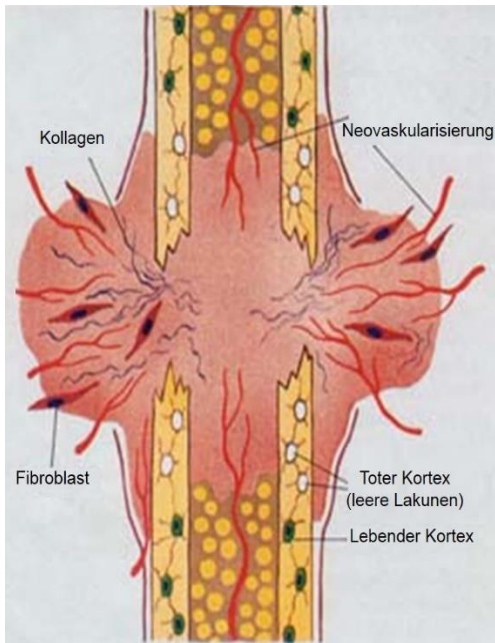
die Phase der Kallusbildung und die Phase des „Remodellings“ [46]. Besonders auffällig ist, dass der Reparaturprozess dabei nicht, wie bei anderen Geweben, in einer Narbe verheilt, sondern die ursprüngliche Knochenstruktur und seine Funktion wiederhergestellt werden [47].

### Die Entzündungsphase



**Abbildung 1: Entstehung des Frakturhämatoms.** Durch Zerstörung von Blutgefäßen wandern wichtige Zellen in den Frakturspalt ein und initiieren somit den Heilungsprozess. Modifiziert nach [1].

Eine Fraktur führt zur Zerstörung zahlreicher Blutgefäße mit anschließender Blutung in das Frakturgebiet. Dadurch kommt es zur Einwanderung zahlreicher Zellen in den Frakturspalt, darunter auch von hämatomstabilisierenden Thrombozyten, welche durch Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie „tumor-derived growth factor“ (TGF- $\beta$ ) und „platelet derived growth factor“ (PDGF) nachfolgend Immunzellen (Makrophagen, Granulozyten und Mastzellen) sowie Knochenstammzellen, Osteoblasten und Osteozyten anlocken [48]. Das sich, wie in Abb. 3 dargestellte, entwickelnde Frakturhämatom stellt den Beginn der inflammatorischen Heilungskaskade dar, welche durch



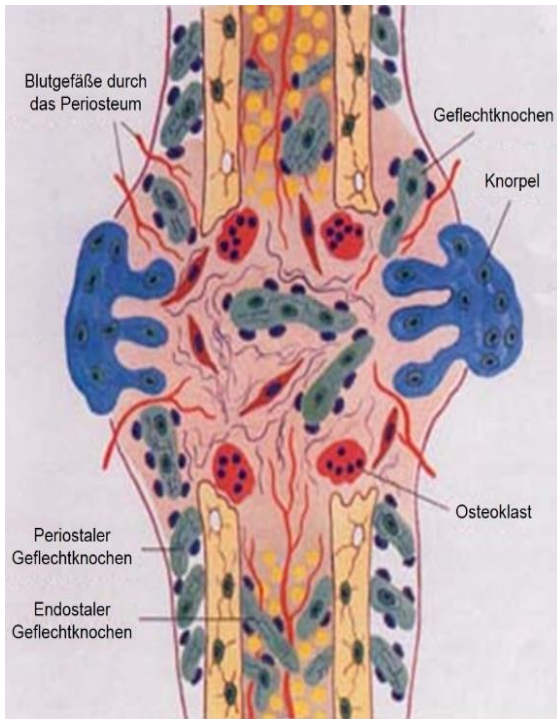
**Abbildung 2: Entstehung von Granulationsgewebe durch Neovaskularisierung und Einwanderung von MSCs (nicht dargestellt).** Modifiziert nach [1].

die Ausschüttung proinflammatorischer Signale wie „*fibroblast growth factor-2*“ (FGF-2), „*insulin-like growth factor-1*“ (IGF-1) und Wachstumsfaktoren wie „*bone morphogenetic protein*“ (BMP) nach rund 24 Stunden ihren Höhepunkt erreicht [49]. Die Kombination der verschiedenen Faktoren führt zu einer verstärkten Vaskularisierung und charakteristischen Einwanderung pluripotenter, mesenchymaler Stammzellen (MSCs) in das Granulationsgewebe, welches sich um den 7. Tag aus dem Hämatom entwickelt [50, 51]. In Abb. 4 werden wichtige beschriebene Vorgänge skizziert.

MSCs spielen dank ihrer vielseitigen

Proliferations- und Differenzierungsfähigkeiten in Osteo-, Fibro- und Chondroblasten eine zentrale Rolle der Knochenheilung. Sie entstammen dem zirkulierenden Blutkreislauf oder aus dem umgebenden Frakturgewebe, wie angrenzendem Muskel, Endothel, mesenchymalen Zellen des Knochenmarks oder dem sich um die Frakturstelle befindlichen Endost und Periost, das durch die Entzündungsreaktion aktiviert und zur Proliferation angeregt wird [50]. Aus dem Granulationsgewebe des Hämatoms reifen die MSCs nachfolgend zu Fibro-, Chondro- und Osteoblasten heran. Letztere sind für die Kollagensynthese, die Steuerung der Mineralisation und die Regulation des Knochenabbaus durch Überwachung der Osteoklastentätigkeit zuständig [52, 53].

## Die Phase der Kallusbildung

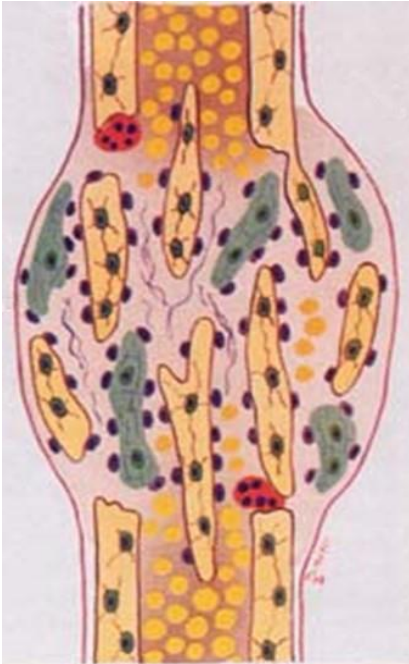


**Abbildung 3: Mehrere Monate dauernde Transformation des „weichen Kallus“ in den „harten Kallus“.** Modifiziert nach [1].

Während der ersten zwei Wochen bilden Chondro- und Fibroblasten ein fibrös-knorpeliges Knochengewebe, welches auch als „weicher Kallus“ bezeichnet wird. Zur weiteren Stabilisierung synthetisieren Osteoblasten eine organische, unmineralisierte Knochenmatrix in Form von Kollagen II und Proteoglykanen, welche später sezernierten Kalziumsalzen als Grundgerüst dient [53]. Dieser rund viermonatige Mineralisationsvorgang entspricht der sog. enchondralen Ossifikation, bei welcher eine schrittweise Transformation von Knorpelgewebe in Geflechtknochen stattfindet und die als Phase des

„harten Kallus“ bezeichnet wird (siehe Abb. 5) [21]. Geflechtknochen ist definiert durch unregelmäßig angeordnete Kollagenfasern und ungeordnete Osteozyten. Durch die Überbrückung des Frakturspaltes erhält der Knochen eine feste mechanische Verbindung. In Versuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass Rauchen die Transformationsphase vom „weichen“ in den „harten Kallus“ verzögert [54]. Hierfür wurden Mäuse mit geschlossenen Tibiafrakturen über einen längeren Zeitraum Zigarettenrauch ausgesetzt. Nach 14 Tagen konnte bei den Versuchstieren eine verstärkte Chondrogenese mit einem doppelt so großen kartilaginären Kallusanteil als in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. In Letzterer ist bereits mehr Knochengewebe aus dem „weichen Kallus“ gebildet worden. Nach 28 Tagen konnte in der Versuchsgruppe noch ein vergrößerter, weniger geordneter Kallus um die Frakturstelle gezeigt werden [54].

## Die Phase des „Remodellings“



**Abbildung 4: Bildung von Lamellenknochen.** Durch axiale Belastung der Knochenenden kommt es zur stetigen Umwandlung von Geflechtknochen in Lamellenknochen. Modifiziert nach [1].

Knochen unterliegt sowohl in Ruhe als auch während der Frakturheilung einem permanenten Umbau, um sich an ständig wechselnde Gegebenheiten leichter anpassen zu können. Hierdurch ist er in der Lage, sich vor Mikroschäden zu schützen, sich an mechanische Belastungen anzupassen und Calcium bereitzustellen. Während der Frakturheilung erfolgt in der Phase des „Remodellings“ die Umwandlung von Geflechtknochen, welcher mit zunehmender axialer Belastung in den belastbareren, ausdifferenzierten Lamellenknochen umgewandelt wird [46, 55]. Die komplette Knochenheilung kann bei regelhaftem Heilungsverlauf 6 bis 24 Monate andauern. Der funktionell wiederhergestellte Knochen ist in Abb. 6 dargestellt.

### **1.2.2 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress durch Zigarettenrauch**

Aktuelle Daten zeigen, dass die Toxine des Zigarettenrauchs Gewebeschäden sowohl initiieren, verstärken, als auch weiterführend Entzündungsreaktionen hervorrufen können. Der Gewebeschaden kann durch direkte toxische Einflüsse (DNA-Schäden), veränderte Genregulation oder indirekt durch vermehrten oxidativen Stress hervorgerufen werden [56-58].

Beim Rauchen lässt sich zwischen dem vom Raucher inhalierten Hauptstrom und dem in die Umgebung entweichenden Nebenstrom unterscheiden. Eine weitere Unterteilung des Hauptstroms erfolgt in die Gasphase und die Teerphase, letztere wird

auch als Partikelphase bezeichnet. Die bisherigen Zigarettenfilter bieten keine effektiven Möglichkeiten, ROS aus dem Hauptstrom der Zigaretten zu eliminieren oder unschädlich zu machen [59]. Mit rund  $10^{17}$  freien, langlebigen Radikalen in der Teerphase und  $10^{15}$  gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies in der Gasphase enthält der Hauptstrom mit jedem Zigarettenzug besonders viele reaktive Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffverbindungen (RNS), die beide den freien Radikalen zugeordnet werden können. Bei diesen handelt es sich um Atome oder Moleküle mit mindestens einem freien, ungepaarten Elektron in der äußeren Elektronenhülle, wodurch sie sehr reaktionsfreudig sind und andere Moleküle leicht oxidieren können [60]. Außer einer exogenen ROS-Zufuhr durch Umweltgifte, ionisierender Strahlung, UV-Licht und Chemotherapeutika können reaktive Sauerstoffspezies auch im Organismus entstehen. Die Komplexe I und III der mitochondrialen Atmungskette gelten als Hauptquelle der endogenen ROS-Produktion, in welchen zwischen 1 und 5 % des genutzten molekularen Sauerstoffs durch das Enzym NADPH-Oxidase zum sog. Hyperoxid-Anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) reduziert wird [60, 61]. Neben diesem gibt es weitere echte Sauerstoffradikale wie z.B. das hochreaktive Hydroxyl-Radikal ( $HO\cdot$ ), aber auch reaktive Sauerstoffverbindungen wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Hypochlorid ( $HOCl$ ), Peroxyl-Radikale ( $ROO\cdot$ ) und Stickstoffmonoxid ( $NO$ ) [62]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass wässrige Extrakte des Zigaretteenteers prooxidative Substanzen enthalten, welche Zellen ebenfalls zu einer vermehrten endogenen Produktion von ROS anregen [63, 64]. In physiologischen Konzentrationen erfüllen ROS im Organismus wichtige Aufgaben als intrazelluläre Signalmoleküle mit Einfluss auf das Zellwachstum, die Zellalterung und auf das Entzündungsgeschehen oder werden von Zellen des unspezifischen Immunsystems zur Abwehr gegen Tumorzellen oder Mikroorganismen gebildet [65-67].

Ein über das physiologische Maß hinaus gesteigertes Vorhandensein von freien Radikalen wird allgemein mit dem Begriff des oxidativen Stresses beschrieben, welcher bereits im Jahre 1985 von Helmut Sies geprägt wurde und eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler Erkrankungen spielt [68]. Als zwei wichtige Ursachen werden

einerseits eine vermehrte Produktion an ROS und andererseits ein zu geringes Level an zellulären Schutzmechanismen angesehen. Folglich verursacht oxidativer Stress Schäden an der DNA durch Mutationen und es treten verstärkt Proteinmodifikationen, Lipidperoxidationen sowie Membranschäden auf [69, 70]. Des Weiteren sind ROS an der Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten sowie an der Osteoklastogenese beteiligt und beeinflussen damit den Knochenumbau [71, 72].

### **1.2.3 Das Antioxidative Schutzsystem der Zellen**

Durch verschiedene Abwehrmechanismen sind die Zellen in der Lage, schädliche Einflüsse des oxidativen Stresses in einem gewissen Rahmen abzufangen und ein pro- und antioxidatives Gleichgewicht herzustellen. So können bereits entstandene Schädigungen durch DNA-Reparatursysteme und geregelten Proteinabbau behoben werden [73]. Weiterhin verfügt der Körper über ein Schutzsystem aus antioxidativ wirkenden Enzymen und nicht-enzymatischen Antioxidantien. Die drei folgenden Enzyme sind sowohl besonders an der intrazellulären, als auch der extrazellulären Umwandlung von ROS in weniger schädliche Sauerstoffverbindungen und Wasser beteiligt: Superoxid-Dismutasen (SOD), Katalasen (CAT) und das Glutathion-System [74, 75].

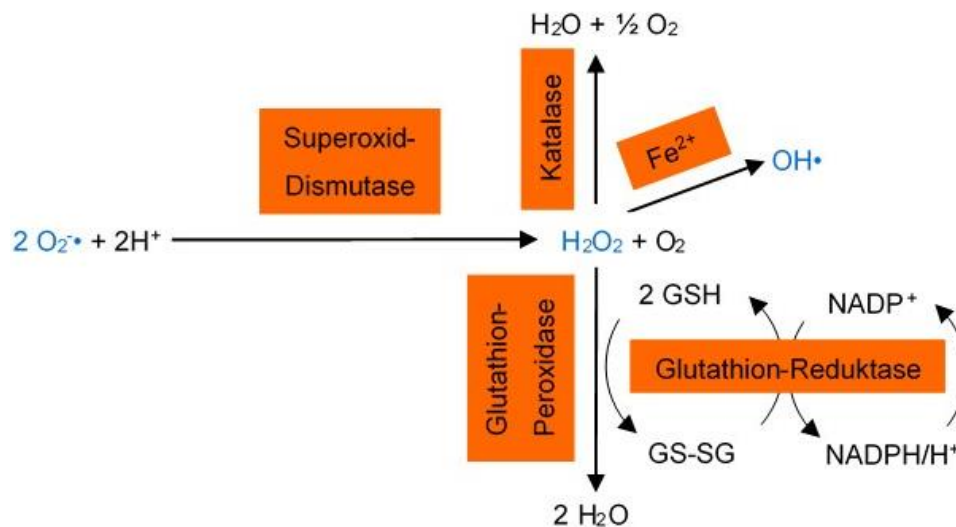
Die Elektronenübertragung auf molekularen Sauerstoff unter Bildung des Hyperoxidradikals ( $O_2^{\cdot-}$ ) leitet die Produktion von ROS ein.  $O_2^{\cdot-}$  ist relativ instabil und existiert folglich nur für wenige Millisekunden. Der größte Anteil des in der Atmungskette produzierten  $O_2^{\cdot-}$  wird anschließend in einer Disproportionierung zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Sauerstoff ( $O_2$ ) entgiftet [76]. Hierfür verantwortlich ist das induzierbare Enzym SOD, von welchem drei verschiedene Isoformen im Menschen existieren. Es kann zwischen einer mitochondrialen manganabhängigen, einer zytosolischen kupferzinkabhängigen und einer extrazellulären SOD unterschieden werden [77]. Das entstandene  $H_2O_2$  gilt als stabil, wenig reaktionsfreudig und kann Zellmembranen passieren. Ein Großteil des durch  $O_2^{\cdot-}$  und  $H_2O_2$  vermittelten Scha-



dens beruht auf der Umwandlung in das Hydroxylradikal ( $\text{OH}\cdot$ ), welches mit biologischen Makromolekülen reagieren kann und durch die  $\text{O}_2\cdot^-$  vermittelte Fenton-Reaktion entsteht [78]. Im weiteren Verlauf katalysieren die beiden Enzyme Katalase und Glutathion-Peroxidase (GPX) die Entgiftung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , wodurch  $\text{H}_2\text{O}$  (GPX) bzw.  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  (CAT) als Endprodukte entstehen [79].

GPX, welches L-Selenocystein in seinem katalytischen Zentrum enthält, benötigt für die ablaufende Reaktion das ubiquitär vorhandene Tripeptid Glutathion (GSH), welches aus den drei Aminosäuren Glycin, Cystein und Glutamat besteht und zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert wird. Unter Verbrauch der aus dem Pentosephosphatweg stammenden Reduktionsäquivalente  $\text{NADPH}/\text{H}^+$  wird GSSG durch das Enzym Glutathion-Reduktase (GSR) wieder zu GSH reduziert [80].

Zur Übersicht wurden die Reaktionen in der nachfolgenden Abb. 7 schematisch dargestellt.



**Abbildung 7: Entstehung Reaktiver Sauerstoffspezies und ihre Inaktivierung durch antioxidative Enzyme.** Das in der Atmungskette produzierte Radikal  $\text{O}_2\cdot^-$  wird durch das Enzym SOD zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2$  abgebaut, ehe  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch die Enzyme CAT und GPX unschädlich gemacht wird. GSH, welches in der Reaktion zu GSSG oxidiert wird, wird mit Hilfe der Reduktionsäquivalente  $\text{NADPH}/\text{H}^+$  wieder zu GSH reduziert.  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann in Anwesenheit von  $\text{Fe}^{2+}$  jedoch auch zum stark zytotoxischen  $\text{OH}\cdot$  reagieren. ROS wurden mit blauer Farbe dargestellt.

#### 1.2.4 Vitamin C

Auf der Suche nach einer Substanz, welche sowohl einen positiven Einfluss auf die Frakturheilung und den Knochenmetabolismus ausübt als auch die schädigenden Wirkungen der im Rauch enthaltenen ROS kompensiert, nimmt Vitamin C, auch bekannt als Ascorbinsäure, eine besondere Rolle ein. Menschen können Ascorbinsäure im Gegensatz zu vielen Tieren und Pflanzen aufgrund des ihnen fehlenden Enzyms L-Gulonolactonoxidase (GULO) nicht selbst synthetisieren, sodass es mit der Nahrung zugeführt werden muss [81]. Für einen gesunden Erwachsenen empfiehlt die „Deutsche Gesellschaft für Ernährung“ (DGE) die Zufuhr einer Tagesdosis von 100 mg, Raucher sollten aufgrund eines erhöhten Bedarfs noch weitere 35 mg Vitamin C pro Tag zu sich nehmen [36, 82]. Das in Obst und Gemüse -insbesondere in Hagebutten, Sanddorn, Paprika, Zitrus- und Beerenfrüchten- reichlich vorhandene Vitamin wird im Jejunum und im Ileum resorbiert und gelangt über apikal gelegene Na<sup>+</sup>-abhängige Vitamin C -Transporter (SVCT-1) von Epithelzellen in das Blut [83, 84]. Dabei gilt: je höher die oral zugeführte Dosis, desto weniger wird es im Darm aufgenommen und stattdessen unmetabolisiert ausgeschieden. Durch die Einhaltung der obengenannten Richtwerte wird eine Plasmakonzentration von rund 60 µmol/l erzielt, Werte über 100 µmol/l hingegen können fast nur durch zusätzliche Vitamin C Zufuhr erreicht werden [85, 86]. Padayatty *et al.* konnten durch Applikation der maximal tolerierbaren oralen Dosis von 3 g L-Ascorbat, welche alle vier Stunden erfolgte, Plasmakonzentrationen bis 220 µM erzielen. Hingegen führte die intravenöse Verabreichung von L-Ascorbat zu weitaus höheren Plasmakonzentrationen mit Werten um 800 µM [87]. Die intrazelluläre Vitamin C - Aufnahme erfolgt zum Großteil in Form von Dehydroascorbat über GLUT-1-Rezeptoren, während einige wenige metabolisch aktive Zellen auch über Na<sup>+</sup>-Ascorbat-Cotransporter (SVCT-2) verfügen [88]. Dabei kann eine deutlich höhere intrazelluläre Konzentration als die Plasmakonzentration erreicht werden, wie am Beispiel von Lymphozyten mit Konzentrationen im millimolaren Bereich sichtbar wird [89]. Überschüssiges Vitamin C kann aufgrund seiner osmotischen Wirkung bei fehlender Absorption im Darm zu Beschwerden im Gastrointestinaltrakt führen [83].

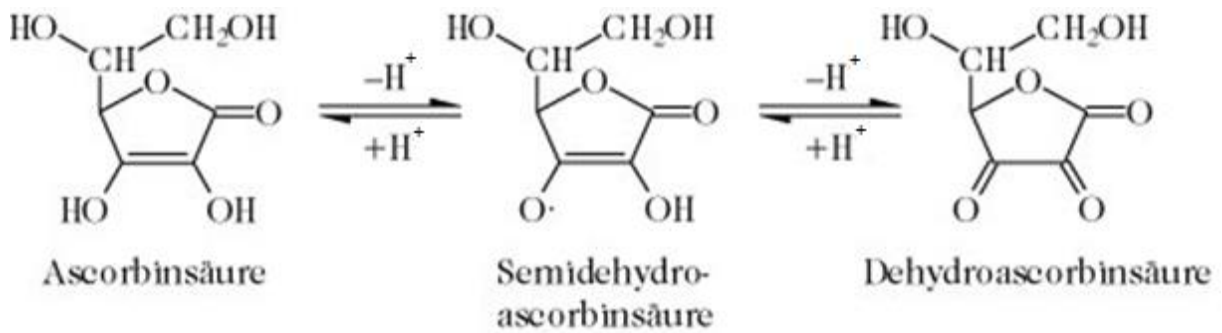


Im menschlichen Körper erfüllt Vitamin C vielfältige Aufgaben und ist in vielen ablaufenden Prozessen involviert. Durch die Hydroxylierung der Aminosäuren Prolin und Lysin, welche für die Herstellung der Tripelhelix von Kollagen benötigt werden, nimmt Vitamin C eine wichtige Schlüsselrolle bei dessen Synthese ein. Da Kollagen mit über 30 % den größten Anteil der im menschlichen Körper vorhandenen Proteine darstellt und als wichtiger Baustein des Bindegewebes gilt, manifestierte sich die früher bei Seefahrern gefürchtete Vitaminmangelkrankheit Skorbut vor allem an Knochen, Knorpeln, Bändern, Sehnen und Blutgefäßen. So litten viele Betroffene früher unter einer Vielzahl an Symptomen wie Zahnfleischbluten, Knochenschmerzen, vermehrt auftretenden Infektionen und verzögerter Wund- und Knochenheilung bei Frakturen [90]. In mehreren Studien wurden diese Zusammenhänge belegt, indem kultivierte Osteoblasten, welche mit Ascorbat stimuliert wurden, zur initialen Ablagerung von extrazellulärer kollagener Matrix stimuliert wurden [91, 92]. Besonders bekannt ist das Vitamin auch als Radikalfänger. In seiner reduzierten Form verfügt Ascorbat als Elektronendonator über stark antioxidative Eigenschaften. Bei Auftreten von oxidativem Stress wird es als eines der ersten Antioxidantien verbraucht und reagiert im Zytoplasma mit reaktiven Sauerstoffspezies nach folgenden Schemata [35, 93, 94]:



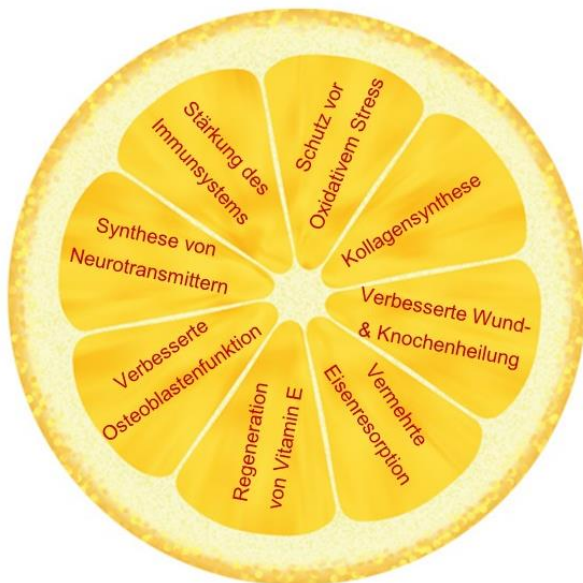
(AH<sub>2</sub> = Ascorbinsäure, AH• = Semidehydroascorbinsäure)

Unter Übertragung von zwei Elektronen auf Akzeptormoleküle wird Ascorbat schrittweise über Semidehydroascorbat zu Dehydroascorbat oxidiert, welches ein reversibles Redoxsystem darstellt. Semidehydroascorbat kann entweder durch eine Disproportionierung zu Ascorbat und Dehydroascorbat oder durch die Enzyme Dehydroascorbat-Reduktase und NADPH-Semidehydroascorbat-Reduktase regeneriert werden [95]. In Abb. 8 wurde das beschriebene Redoxsystem dargestellt.



**Abbildung 8: Redoxsystem der Ascorbinsäure.** Ascorbinsäure befindet sich mit Dehydroascorbinsäure über die Zwischenstufe Semidehydroascorbinsäure in einem Redoxsystem. Modifiziert nach [96].

Des Weiteren ist Vitamin C in der Lage, das lipophile Vitamin E zu regenerieren, welches ungesättigte Fettsäuren in Membranlipiden vor deren Oxidation durch ROS schützt. Dies ist insofern interessant, da sich eine Kombination aus Natriumselenit,



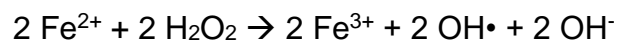
**Abbildung 5: Aufgaben von Vitamin C im menschlichen Körper.** Neben seinen Hauptaufgaben als Radikalfänger und der Beteiligung an der Kollagensynthese vollführt Vitamin C eine große Anzahl verschiedener Aufgaben.

Vitamin C und Vitamin E effektiver in der Wiederherstellung strukturell veränderten Knochengewebes als auch von osteoporotischen Knochen in Hasenmodellen gezeigt hat als die Applikation der Einzelsubstanzen [97, 98]. Zusätzlich bewirkt Vitamin C eine gesteigerte Aufnahme von Calcium in den Knochen und schützt diesen vor dem erneuten Verlust von Calcium [81]. Neben seinem positiven Effekt auf die Zellen des Immunsystems fördert es die Resorption von Eisen im Darm und dient außerdem in der Syn-

these von Neurotransmittern als wichtiger Co-Faktor. Einen Überblick über die wichtigsten Eigenschaften gibt Abb. 9 [99-103].

Unter bestimmten Voraussetzungen wie bspw. bei Eisenspeicherkrankheiten und vermehrten Eisenansammlungen im Körper (Hämochromatose und Thalassämie)

kann L-Ascorbat jedoch auch die Entstehung von ROS fördern [104]. Seine prooxidativen Eigenschaften kommen durch die Fähigkeit zustande, dass L-Ascorbat die Reduktion von Übergangsmetallionen wie dreiwertigem Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) zu zweiwertigem Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) katalysieren kann. In der nachfolgenden Fenton-Reaktion wird  $\text{H}_2\text{O}_2$  zum stark zytotoxischen  $\text{OH}\cdot$  unter Anwesenheit von Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) reduziert [95]:



( $\text{AH}_2$  = Ascorbinsäure, DHA = Dehydroascorbinsäure)

### **1.2.5 Einfluss von Vitamin C auf den Prozess der osteogenen Differenzierung**

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass L-Ascorbat essentiell an der Differenzierung von Osteoblasten beteiligt ist [105] [106]. So führte die Deletion des an der Ascorbatsynthese beteiligten Gens Gulonolactonoxidase (GULO) in Versuchen mit Mäusen zu einer Beeinträchtigung der Osteoblastendifferenzierung, zu vermehrten Knochenfrakturen und zum vorzeitigen Tod von „*spontaneous fracture mice*“ (sfx) [107]. Andererseits konnte eine gestörte Differenzierung von „bone marrow stromal cells“ (BMS) in sfx-Mäusen, welche unter Vitamin C-Mangel litten, vollständig durch die Behandlung mit Vitamin C gerettet werden. Des Weiteren gilt L-Ascorbat als Schlüsselspieler wichtiger Mechanismen der osteoblastären Differenzierung. So ist es z.B. in der Lage, den Verlust osteoblastärer Transkriptionsfaktoren zu schützen, Knochenverluste zu verzögern und Knochenwachstum zu fördern. In „*in vitro*“-Versuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass L-Ascorbat mit Dexamethason und  $\beta$ -Glycerophosphat als Nährmedienzusatz embryonale Stammzellen dazu anregt, sich in Osteoblasten zu differenzieren [108].

### 1.2.6 Der NRF2/ARE-Signalweg

Der „*NRF2-Antioxidative Response Element*“ (ARE)-Signalweg stellt einen wichtigen zellulären Abwehrmechanismus gegen oxidativen Stress dar. NRF2 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher an der Expression vieler antioxidativer Enzyme beteiligt ist [109]. Unter physiologischen Bedingungen befindet sich NRF2 im Zytoplasma und wird durch „*Kelch like-ECH-associated protein 1*“ (Keap1) degradiert. Bei oxidativem Stress werden jedoch Cysteinreste in Keap1 unterbrochen, wodurch NRF2 im Zytoplasma akkumuliert und in den Zellkern translozieren kann [110]. Dort ist es in der Lage, an ARE zu binden, welches sich in der Promotorregion antioxidativer Gene befindet und deren Transkription initiiert [111]. Ein NRF2-Mangel führt laut Rana *et al.* zu einem Anstieg der intrazellulären ROS-Produktion und zu einer Verringerung von antioxidativen Enzymen in osteoblastären Vorläuferzellen [112]. Daher stellt sich die Frage, welchen Einfluss CSE und Vitamin C auf NRF2 ausüben.

## 2 Fragestellung und Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Einflüsse von Zigarettenrauch und Vitamin C auf den Prozess der Frakturheilung zu untersuchen. Die in klinischen Studien beobachtete, verzögerte Heilung von Knochenbrüchen bei Rauchern soll an mesenchymalen Stammzellen (SCP-1) mit Hilfe verschiedener Modelle simuliert werden, welche einen bestimmten Teil des Frakturheilungsprozesses widerspiegeln. Dabei soll überprüft werden, ob CSE die Ankunft von MSCs und den Prozess der Differenzierung beeinträchtigt. Weiterhin wird in „*in vitro*“ Experimenten überprüft, ob auch die längerfristig-einwirkenden, schädigenden Auswirkungen des Zigarettenrauches auf den Prozess der osteogenen Differenzierung durch die Zugabe von Vitamin C reduziert werden können. Sabrina Ehnert *et al.* konnten bereits zeigen, dass Vitamin C Osteoblasten vor dem negativen Einfluss von „*Cigarette Smoke Extract*“ (CSE) über einen kurzen Zeitraum (4 h Inkubation) schützen konnte [113]. Das Antioxidans stellt aufgrund seiner einfachen Synthese sowie seiner großen Verfügbarkeit eine vielversprechende Therapieoption dar. Gerade Raucher können weniger Vitamin C absorbieren, wodurch deren Zellen unter vermehrtem oxidativem Stress leiden. Vitamin C gilt zwar als Radikalfänger, dessen Metabolismus wird jedoch durch Rauchen negativ beeinflusst [36]. Durch das Verständnis der involvierten Prozesse sowie der molekularen Mechanismen könnte eine verzögerte Frakturheilung verhindert und die Regeneration von Knochenbrüchen um ein Vielfaches beschleunigt werden.

Weiterhin sollen im Speziellen folgende Fragen geklärt werden:

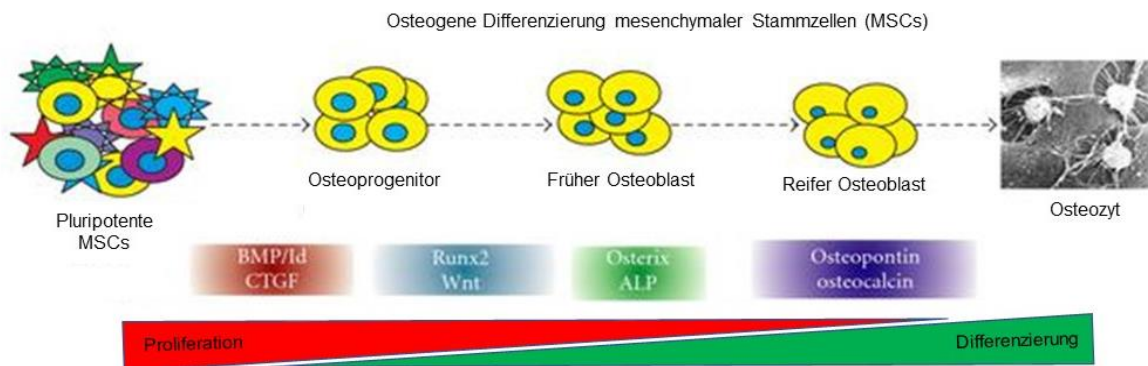
- Welchen Einfluss hat Vitamin C auf CSE-stimulierte Zellen bezüglich deren Migration und Differenzierung?
- Ist L-Ascorbat in der Lage, die durch Zigarettenrauch induzierten reaktiven Sauerstoffspezies zu eliminieren?
- Welche Auswirkungen werden von L-Ascorbat auf molekulargenetischer Ebene in Bezug auf die antioxidativen Enzyme hervorgerufen?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 „Single-cell derived human mesenchymal stem cell line“ (SCP-1)

Bei SCP-1-Zellen handelt es sich um immortalisierte Stammzellen, die über eine schnelle, unbegrenzte Proliferationskapazität und ein vielseitiges Differenzierungspotenzial verfügen und freundlicherweise von Prof. Schiecker (LMU München, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden [114]. Hierfür verantwortlich ist die mittels lentiviralem Gentransfer eingebrachte „humane Reverse Transkriptase“ (hTERT), deren Expression den Abbau der Telomerenden während der Zellteilung unterdrückt. Dabei konnte gezeigt werden, dass SCP-1-Zellen ihren Stammzellcharakter und ihre Funktionseigenschaften selbst nach mehrfachen Mitosezyklen beibehalten [114]. In ihrem weiteren Verlauf differenzieren sich SCP-1-Zellen über mehrere Stadien zu Osteoblasten, welche für die Bildung des Knochengewebes verantwortlich sind. Osteogene Differenzierungsmarker wie z.B. BMPs, RUNX2, ALP oder Osteopontin (u.a.) geben Hinweise darauf, wie weit die Differenzierung vorangeschritten ist (siehe Abb. 10).



**Abbildung 10: Osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen.** MSCs differenzieren über verschiedene Zwischenstufen (Osteoprogenitor, früherer und reifer Osteoblast) zu Osteozyten. Dabei werden je nach Reifestadium verschiedene osteogene Differenzierungsmarker exprimiert. Modifiziert nach [115].

### 3.1.2 Chemikalien

Eine Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Nährmedien mit Zusätzen, die Lösungen und Puffer und deren Konzentrationen findet sich in den nachfolgenden Tabellen. Des Weiteren sind die Antikörper für Western Blotting, die verwendeten Geräte und die Software sowie Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

**Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien.**

Chemikalien	Hersteller
Agarose	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Borsäure	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bromphenolblau	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
CuSO <sub>4</sub> *5 H <sub>2</sub> O	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Desoxycholsäure (DOC)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dinatriumsalz Hexahydrat (pNPP)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	PAA Lab. (Pasching, Österreich)
Essigsäure (≥ 99 %)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol (70 %, 99 %)	Apotheke Universitätsklinikum (Tübingen, Deutschland)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Folin's Reagenz	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung (30 %)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Apotheke Universitätsklinikum (Tübingen, Deutschland)
Leupeptin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Luminol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Mastermix	Genaxxon (Ulm, Deutschland)
Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
N,N,N',N'-TEMED	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Na-K-Tartrat	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumfluoride (NaF)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Paranitrophenol-Lösung (pNP)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Paranitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat (pNPP)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
p-Cumarsäure	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pepstatin A	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

peqGOLD TriFast	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ponceau S	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Resazurin Natriumsalz	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Roti-Mark 10-150 Protein Marker	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Sulforhodamin B Natriumsalz	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Taq DNA-Polymerase	Axon (Kaiserslautern, Deutschland)
Tergitol-Lösung (NP 40 Substitute)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
TRIS-Base	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblau (0,5 %)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin / EDTA	PAA Lab. (Pasching, Österreich)
Tween-20	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

### 3.1.3 Nährmedien und Zusätze

**Tabelle 2: Liste der verwendeten Zusätze für Nährmedien.**

Nährmedienzusätze	Hersteller
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dexamethason	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Lab. (Pasching, Österreich)
HEPES	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
L-Ascorbat-2-Phosphat	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	PAA Lab. (Pasching, Österreich)
β-Glycerophosphat	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

**Tabelle 3: Liste der verwendeten Nährmedien für SCP-1-Zellen.**

<b>KULTURMEDIUM</b>	<b>C<sub>final</sub></b>
500 ml MEM Alpha Modification	
5 ml Penicillin/Streptomycin	1 %
50 ml Fetales Kälberserum (FCS)	10 %
<b>DIFFERENZIERUNGSMEDIUM</b>	<b>C<sub>final</sub></b>
500 ml MEM Alpha Modification	
5 ml Penicillin/Streptomycin	1 %
5 ml Fetales Kälberserum (FCS)	1 %
29 mg L-Ascorbinsäure-2-phosphat	200 µM
1,08 g β-Glycerophosphat	10 mM
2,98 g HEPES	25 mM
83 mg Calciumchlorid	1,5 mM
500 µl Dexamethason-Stammlösung	100 nM
<b>ZIGARETTENRAUCHMEDIUM</b>	<b>C<sub>final</sub></b>
500 ml MEM Alpha Modification	
5 ml Penicillin/Streptomycin	1 %
29 mg L-Ascorbinsäure-2-phosphat	200 µM
1,08 g β-Glycerophosphat	10 mM
2,98 g HEPES	25 mM
83 mg Calciumchlorid	1,5 mM
500 µl Dexamethason-Stammlösung (5 mM)	100 nM



### 3.1.4 Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer.

<b>AP-SUBSTRATLÖSUNG</b> 1,3 mg 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz-Hexahydrat (pNPP) 1 ml AP Puffer (pH 10,5)	<b>C<sub>final</sub></b> 3,5 mM 0,1 M
<b>AP-PUFFER (pH 10,5)</b> 3,75 g Glycin 12,11 g TRIS-Base 203 mg MgCl <sub>2</sub> In 900 ml ddH <sub>2</sub> O lösen, auf pH 10,5 kalibrieren, mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen	<b>C<sub>final</sub></b> 50 mM 100 mM 1 mM
<b>BSA-STAMMLÖSUNG</b> 50 mg BSA 5 ml ddH <sub>2</sub> O	<b>C<sub>final</sub></b> 10 µg/µl
<b>p-CUMARSÄURE</b> 0,15 g p-Cumarsäure 10 ml DMSO (Dimethylsulfoxid)	<b>C<sub>final</sub></b> 90 mM
<b>CuSO<sub>4</sub>-STAMMLÖSUNG</b> 1 g CuSO <sub>4</sub> *5 H <sub>2</sub> O 100 ml dH <sub>2</sub> O	<b>C<sub>final</sub></b> 1 %
<b>DCFH-DA STAMMLÖSUNG</b> 100 mg DCFH-DA 10,26 ml DMSO (Dimethylsulfoxid)	<b>C<sub>final</sub></b> 20 mM
<b>DEPC H<sub>2</sub>O</b> 1 ml DEPC 1 L ddH <sub>2</sub> O 1 h Inkubation bei 37°C, Autoklavieren und bei RT abkühlen lassen	<b>C<sub>final</sub></b> 0,1 %
<b>ELEKTROPHORESE-PUFFER (5x)</b> 72 g Glycin 15 g TRIS 5 g SDS Mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen	<b>C<sub>final</sub></b> 1 M 125 mM 0,5 %
<b>ESSIGSÄURELÖSUNG</b> 1 ml Essigsäure (100 %) Mit ddH <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen	<b>C<sub>final</sub></b> 1 %
<b>LÄMMLI-LADEPUFFER (5x)</b> 6 ml 1 M TRIS (pH=6,8) 10 ml 99 % Glycerol 200 µl EDTA 2 g SDS 10 mg Bromphenolblau 2,5 ml 2-Mercaptoethanol Mit ddH <sub>2</sub> O auf 20 ml auffüllen	<b>C<sub>final</sub></b> 300 mM 50 % 5 mM 10 % 0,05 % 12,5 %
<b>LUMINOL-LÖSUNG</b> 0,88 g Luminol 20 ml DMSO	<b>C<sub>final</sub></b> 250 mM
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-STAMMLÖSUNG</b> 20 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 50 ml NaOH 950 ml ddH <sub>2</sub> O	<b>C<sub>final</sub></b> 2 %
<b>Na-K-TARTRAT-STAMMLÖSUNG</b> 2 g Na-K-Tartrate 100 ml ddH <sub>2</sub> O	<b>C<sub>final</sub></b> 2 %

<b>PONCEAU S-LÖSUNG</b> 0,2 g Ponceau S In 200 ml 1%iger Essigsäure lösen	<b>C<sub>final</sub></b> 0,1 %
<b>RESAZURIN-STAMMLÖSUNG (11x)</b> 0,125 g Resazurin Natriumsalz 500 ml DPBS	<b>C<sub>final</sub></b> 0,025 %
<b>RIPA-ARBEITSLÖSUNG</b> 500 µl RIPA Stammlösung 1 µl Pepstatin A Stammlösung (500x) 1 µl Leupeptin Stammlösung (500x) 1 µl PMSF Stammlösung (500x) 1 µl NaF Stammlösung (500x) 1 µl Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> Stammlösung (500x)	<b>C<sub>final</sub></b>  1 µg/ml 5 µg/ml 1 mM 5 mM 1 mM
<b>RIPA-STAMMLÖSUNG</b> 0,121 g TRIS Base 0,58 g NaCl 500 µl Tergitol-Lösung 0,3 g DOC (2,5-Dimethoxy-4-chloroamphetamin) 0,372 g EDTA In 50 ml ddH <sub>2</sub> O lösen, auf pH 7,6 kalibrieren, mit ddH <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen	<b>C<sub>final</sub></b> 10 mM 100 mM 0,5 % 0,5 % 10 mM
<b>SULFORHODAMIN B (SRB)-LÖSUNG</b> 0,2 g Sulforhodamin B Mit 1 % Essigsäure auf 50 ml auffüllen, lichtgeschützt lagern	<b>C<sub>final</sub></b> 0,4 %
<b>TANK-PUFFER (1x)</b> 200 ml Tank-Puffer (5x) 200 ml Methanol 600 ml ddH <sub>2</sub> O	<b>C<sub>final</sub></b> 1x 20 %
<b>TANK-PUFFER (5x)</b> 15,17 g TRIS 72,90 g Glycin Mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen	<b>C<sub>final</sub></b> 125 mM 960 mM
<b>TBE-PUFFER (10x KONZENTRIERT)</b> 540 g TRIS 275 g Borsäure 37,3 g EDTA Mit ddH <sub>2</sub> O auf 5 L auffüllen, auf pH 8,3 kalibrieren	<b>C<sub>final</sub></b> 0,89 M 0,89 M 20 mM
<b>TBS-T WASCHPUFFER</b> 100 ml TBS (10x) 10 ml 10 % Tween-20-Lösung Mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen	<b>C<sub>final</sub></b> 1x 0,1 %
<b>TRIS-PUFFER (TBS-10x)</b> 12,1 TRIS-Base 87,66 g NaCl In 800 ml ddH <sub>2</sub> O lösen, pH auf 7,6 kalibrieren, mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen	<b>C<sub>final</sub></b> 100 mM 1,5 M
<b>TRIS-PUFFER (pH=6,8)</b> 121,1 g TRIS In 900 ml ddH <sub>2</sub> O lösen, auf pH 6,8 kalibrieren, mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen	<b>C<sub>final</sub></b> 1 M
<b>TRIS-PUFFER (pH=8,8)</b> 181,7 g TRIS In 900 ml ddH <sub>2</sub> O lösen, auf pH 8,8 kalibrieren, mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen	<b>C<sub>final</sub></b> 1,5 M
<b>TWEEN-20 LÖSUNG</b> 100 ml Tween-20 900 ml ddH <sub>2</sub> O	<b>C<sub>final</sub></b> 10 %

<b>UNGEPUFFERTE TRIS-LÖSUNG (pH 10-10,5)</b> 1,2g TRIS Mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen	<b>C<sub>final</sub></b> 10 mM
---	-----------------------------------

### 3.1.5 Geräte

**Tabelle 5: Liste der verwendeten Geräte.**

Geräte	Hersteller
Absaugpumpe VacuSafe comfort	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
Agarosegelkammern (Stützgerüst)	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
CO <sub>2</sub> -Inkubator Binder	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Eismaschine AF 80	Scotsman (Berlin, Deutschland)
Elektrophorese PowerPac 200 Elektrophorese PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Feinwaage ABJ 120-4 M Feinwaage PCB 250-3	Kern & Sohn (Balingen, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop EVOS-fl	Peqlab Biosysteme (Erlangen, Deutschland)
FLUOstar Omega	BMG Labtech (Offenburg, Deutschland)
Gaswaschflasche	BRAND (Wertheim, Deutschland)
Geldokumentationssystem	Intas Science Imaging (Göttingen, Deutschland)
Kühlschrank +4°C Gefrierschrank -20°C Gefrierschrank -80°C	Liebherr-international (Lienz, Österreich)
Lichtmikroskop Primo Vert	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
LSE Vortex Mixer	Corning Incorporated (Corning, USA)
LVis Platte	BMG Labtech (Offenburg, Deutschland)
Mikrozentrifuge Fresco 17	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Pipetten Corning Lambda Plus 0,5-10 µl 2-20 µl 10-100 µl 20-200 µl 100-1000µl 8- und 12-Multikanalpipetten	Corning Incorporated (Corning, USA)
Sicherheitswerkbank S2020	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Thermoreaktor Arktik	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Thermoreaktor Veriti	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Wasserbad Aqualine AL 25	Lauda (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Wippschüttler DRS -12	LTF Labortechnik (Wasserburg, Deutschland)
Zentrifuge Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zigarettenpumpe Cyclo II	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

### 3.1.6 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 6: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.**

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Cellstar Falcon (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Cellstar Zellkulturflasche (25, 75 und 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Cellstar Zellkulturplatte, 96 Vertiefungen	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Costar Cell lifter 3008	Corning Incorporated (Corning, USA)

Falcon Zellkulturplatte, 6 Vertiefungen	Becton, Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Injectomat Luer Lock (1,8 x 40 mm 15 G)	Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland)
Marlboro-Zigaretten	Philip Morris (New York City, USA)
Nitrocellulose Membran	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pasteurpipetten (150 mm, 230 mm)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen blau (100 - 1000 µl)	Ratiolab (Dreieich, Deutschland)
Pipettenspitzen gelb (2 - 200 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen weiß (0,1 - 10 µl)	Sorensen Bio Science
Rothiophorese PROclamp MINI System	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Safe-Lock Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Sterile Filter MILLEX GP (0,22 µm)	Merck Millipore (Billerica, USA)
Stripetten Costar (5 ml, 10 ml, 25 ml und 50 ml)	Corning Incorporated (Corning, USA)
Whatman Papier	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

### 3.1.7 Primäre und sekundäre Antikörper für Western-Blotting

#### 3.1.7.1 Primäre Antikörper

Die Primären Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS-T gelöst.

**Tabelle 7: Liste der verwendeten Primär-Antikörper.**

Antigen	Spezies/Klon Isotyp	Molekulargewicht in kDa	Firma
Katalase	Anti-Hase	60	Cell-Signaling (Danvers, USA)
GAPDH	Anti-Hase	36	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
GSR	Anti-Hase	65	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
p-Nrf2	Anti-Hase	90	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
p-ERK 1/2	Anti-Hase	42, 44	Cell Signaling (Danvers, USA)
p-p38 MAPK	Anti-Hase	40	Cell Signaling (Danvers, USA)
SOD 2	Anti-Hase	25	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)

#### 3.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Die sekundären Antikörper waren mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugiert und wurden in einer Verdünnung von 1:10.000 in TBS-T gelöst.

**Tabelle 8: Liste der verwendeten Sekundär-Antikörper.**

Antigen	Spezies/Klon	Firma
Anti-Hase IgG HRP-linked	Hase	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
Anti-Hase IgG-HRP-linked	Ziege	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)

### 3.1.8 Software

**Tabelle 9: Liste der verwendeten Software.**

Software	Hersteller
EndNote X8	Clarivate Analytics (Philadelphia, USA)
GraphPad Prism	GraphPad Software (La Jolla, USA)
Image J 1.51i	National Institute of Health (Bethesda, USA)
Intas Image Software	Intas Science Imaging (Göttingen, Deutschland)
OMEGA Software FLUOstar	BMG Labtech (Offenburg, Deutschland)

**Tabelle 10: Liste der verwendeten Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).**

Gen	Akzessionsnummer	Sequenz 5' --> 3' Forward-Primer	Reverser Primer	Hybridisierungstemperatur [°C]	Zykluslänge	Amplicongröße [bp]
CAT	NM_001752.3	ACCCTCGTGGGTTTGCAGTGA	CGAGCACGGTAGGGACAGTTCA	58	30	763
GPX3	NM_002084.3	CTGACGGGCCAGTACATTGA	TCCACCTGGTCGGACATACT	58	30	156
GSR	NM_000637.3	AGGAGCTGGAGAACGCTGGC	CAATGGCCCAGAGCAGGCA	60	30	162
NOX4	NM_016931.4	CGGGCTTCCACTCAGTCTTT	TCCTAGCCCCAACATCTGGT	59	30	297
SOD2	NM_00102446 5.1	GCAGCTGCACCACAGCAAGC	CGTGCTCCCACACATCAATCCCC	62	30	422
GAPDH	NM_002046.4	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	AGGGGTCTACATGGCAACTG	56	25	420

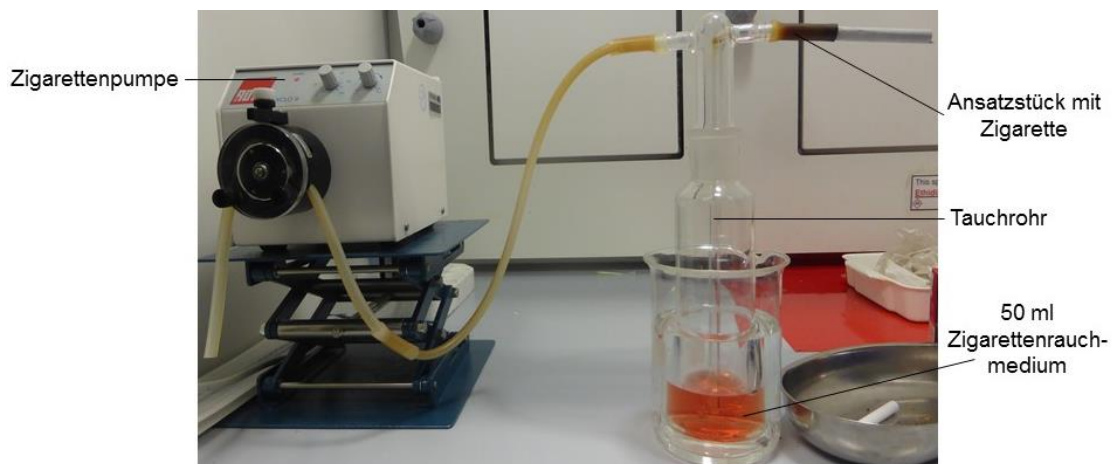
## 3.2 Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Methoden nach den „Standard Operating Procedures“ (SOP) des Siegfried-Weller-Institutes in Tübingen durchgeführt.

### 3.2.1 Zellkulturexperimente

#### 3.2.1.1 Herstellung des Zigarettenrauchmediums (CSE: „*cigarette smoke extract*“)

Eine Gaswaschflasche wurde mit 50 ml FCS-freiem Medium befüllt, welches vorher im Wasserbad auf 37°C erwärmt wurde. Anschließend wurden die Filter zweier handelsüblicher „Marlboro Red“-Zigaretten (Philip Morris, New York City, USA) entfernt und die filterlosen Zigaretten nacheinander in das Ansatzstück eines speziellen Zigarettenaufsatzes gesteckt. Nach dem Anzünden der Zigarette wurde dessen Rauch mit einer Geschwindigkeit von 95 Blasen/min durch eine Ansaugpumpe über ein Tauchrohr in das Medium geleitet, in dem die Rauchpartikel aufgefangen wurden. Um konstante Versuchsbedingungen gewährleisten zu können, wurde vor Beginn der Versuchsdurchführung die Geschwindigkeit der Pumpe mit Wasser als Testmedium überprüft [30]. Der Versuchsaufbau wird in Abb. 11 dargestellt.



**Abbildung 11: Herstellung des Zigarettenrauchmediums.** Durch den Sog einer Ansaugpumpe wurde der Zigarettenrauch über ein Tauchrohr in 50 ml Zigarettenrauchmedium geleitet. Anschließend wurde die Absorption des Mediums bei einer Wellenlänge von 320 nm ermittelt.

Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit erfolgte nach jeder Zigarette die dreimalige Entnahme von 100 µl Medium mit anschließender Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 320 nm mit dem Mikroplatten-Reader [116]. Die optimale optische Dichte für das Standardmedium betrug  $0,75 \pm 0,07$  Standardabweichung, welche als Referenz (100 % CSE) für alle nachfolgenden Versuche herangezogen wurde. Im Anschluss wurde das Medium steril filtriert und weiter verdünnt (0,1 %, 1 %, 5 % und 10 % CSE), um Zielkonzentrationen im Bereich von 3,2 ng/ml bis 320 ng/ml Nikotin zu erreichen ( $3200 \text{ ng Nikotin/ml} \triangleq 100 \text{ % CSE}$ ). Zum Vergleich entspricht dies der gerauchten Menge von 0,01 (0,1 % CSE) bis zu einer Packung Zigaretten (10 % CSE) pro Tag. Eine Standardzigarette (Philip Morris, New York City, USA) enthält dabei durchschnittlich 0,8 mg Nikotin und 10 mg Teer, wobei der menschliche Körper nur 1/10tel des Nikotins aufnehmen kann [30].

### **3.2.2 Passagieren und Ausplattieren von SCP-1-Zellen**

Wenn die Wachstumsfläche der Kulturflaschen zu 80 bis 90 % von kultivierten Zellen bedeckt war, wurden die Zellen passagiert, um ein Absinken der Proliferationsrate und das Absterben der Zellen zu verhindern. Das Medium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt. Zur Vorbereitung wurde Trypsin/EDTA und das entsprechende Zellkulturmedium im Wasserbad auf 37°C erwärmt und alle folgenden Arbeitsschritte steril unter der Werksicherheitsbank durchgeführt. Zu Beginn wurde das Medium aus dem Kulturgefäß abgesaugt und die Zellen für 10 min mit DPBS gewaschen. Je nach Flaschengröße (T25, T75, T175) wurde anschließend die entsprechende Menge Trypsin (0,5 ml, 1 ml, 2 ml) hinzugegeben. Dieses sorgt dafür, dass adhärent am Flaschenboden wachsende Zellen schonend vom Kulturgefäß getrennt werden, ohne diese zu beschädigen. Es erfolgte eine 10-minütige Inkubation im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C unter anschließender mikroskopischer Kontrolle. Die Zugabe von 10 ml SCP-1 Wachstumsmedium mit FCS (fetales Kälberserum) stoppte diesen Prozess und die restlichen losen Zellen wurden abgespült, suspendiert und in ein 15 ml Falcon gegeben. Nach dem Zentrifugieren (10 min, 600 x g, 20°C) wurde das gewonnene Pellet in 2 ml frischem Medium resuspendiert [114].

### 3.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypan-Blau [117]

Um das zelluläre Wachstum zu kontrollieren und quantitative Zellmengen pro Flächeneinheit auszuplattieren, wurde die Lebendzellzahl bestimmt. Hierfür wurden 20 µl der Zellsuspension entnommen und mit gleichen Teilen Trypan-Blau gemischt. 10 µl der vorbereiteten Zellsuspension wurden nun an der Grenze zwischen dem aufliegenden Deckglas und der Grundplatte einer Neubauer-Zählkammer (siehe Abb. 12) mit einer Kammertiefe von 0,100 mm pipettiert und durch Kapillarkräfte in den Spalt gesogen. Hierbei ist zu beachten, dass keine Luftblasen verbleiben. Dann werden die Zellen folgendermaßen gezählt: Bei gleichmäßiger Verteilung wird die Anzahl der Zellen in allen 4 Großquadraten mit jeweils 16 Kleinquadraten unter dem Lichtmikroskop bestimmt und der Mittelwert daraus berechnet. Perforierte und abgestorbene Zellen nehmen das Trypanblau auf, verfärben sich dunkelblau und werden nicht mitgezählt. Um die auf Grenzlinien liegenden Zellen nicht doppelt zu zählen, wurden diese mäanderförmig und nur solche ausgezählt, die entsprechend der „L-Form-Regel“ auf der linken oder auf der unteren Grenzlinie liegen oder diese gerade noch berühren. Die Gesamtzahl der Zellen berechnet sich nach folgender Gleichung:

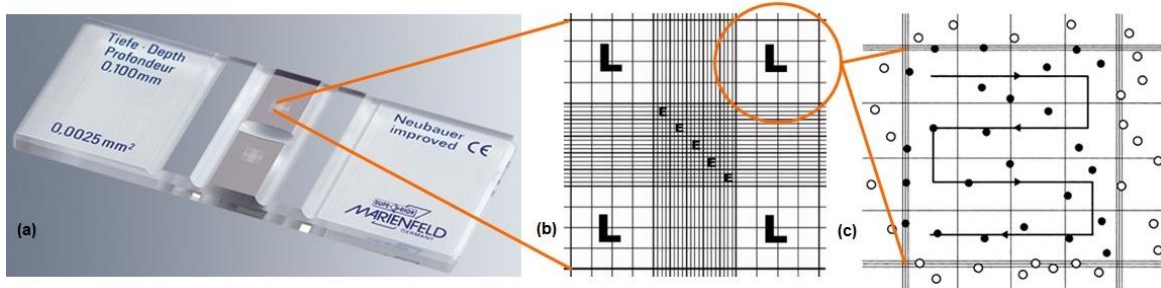
$$G = n \times V_f \times V \times 10^4$$

G = Gesamtzellzahl

n = Durchschnitt der ausgezählten Zellen

$V_f$  = Verdünnungsfaktor (hier 2)

V = Volumen der Zellsuspension



**Abbildung 12: Neubauer-Zählkammer mit eingraviertem Zählnetz und Erklärung der Zellzählung.** (a) Neubauer-Zählkammer, (b) vergrößerte Darstellung des eingravierten Zählnetzes, bestehend aus 4 Großquadraten, (c) Kleinquadraten (16 Stück in jedem Großquadrat) mit mäanderförmiger Zählrichtung. Modifiziert nach [118, 119].



Für die Durchführung der Versuche wurden die Zellen in 6, 24 oder 96 Well-Platten ausplattiert. Hierfür gelten folgende Bedingungen:

**Tabelle 11: Anzahl der auszuplattierten Zellen und Volumen bei 6,24 oder 96-Well-Platten.**

Anzahl Wells/Platte	Anzahl Zellen/Well	Volumen/Well
6	100.000	2 ml
24	35.000	500 µl
96	3.000	100 µl

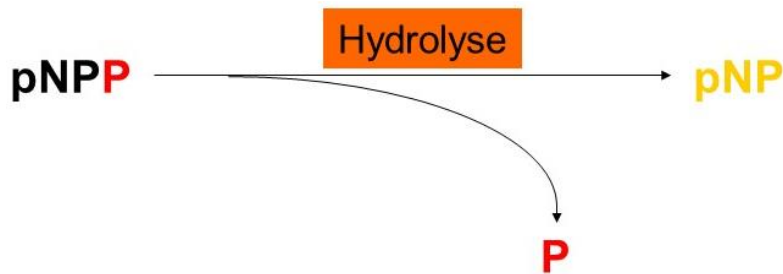
Die berechnete Anzahl der benötigten Zellen wurde der Zellsuspension entnommen und zu der vorbereiteten Menge Medium hinzupipettiert, um die entsprechende Zellzahl pro Volumen zu gewährleisten. Die verbliebenen Zellen der Suspension wurden in neu vorgelegte Kulturflaschen in einer entsprechenden Verdünnung mit Wachstumsmedium (maximal 1:20) ausgesät und im Inkubator bei 37°C inkubiert [114].

### 3.2.4 Zellviabilitätsmessung mittels Resazurin-Umsatz [120]

Zur indirekten Bestimmung der Zellproliferation, der Zellviabilität und der Zytotoxizität wurde der Resazurinumsatz ermittelt. Resazurin ist ein blauer Redoxfarbstoff, der in den Mitochondrien lebender Zellen irreversibel zum pinken Resorufin reduziert wird [121]. Hierbei gilt: je größer der erfolgte Resazurinumsatz ist, desto stärker ändert sich die Farberscheinung. Diese Form fluoresziert stark und kann damit zur Beurteilung der mitochondrialen Aktivität verwendet werden. Der Vorteil dieser Methode ist seine geringe Toxizität gegenüber lebenden Zellen [120]. Nach einem zweiwöchigen Differenzierungsvorgang wurden in jedes mit 100 µl Medium gefüllte Well 10 µl Resazurin (0,025 %, gelöst in PBS) hinzugegeben und anschließend für 30 min im Brutschrank inkubiert. Die anschließende Messung erfolgte laut Stokes-Regel bei einer Anregungs-Wellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm [122].

### 3.2.5 Messung der AP-Aktivität

Das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gilt als früher Marker in der osteogenen Differenzierung, welcher nach Beendigung der „*in vitro*“-Zellproliferation einen starken Anstieg erfährt und mit dem Beginn des Mineralisierungsvorganges wieder abfällt [123]. Neben der Expression im wachsenden Knochen finden sich auch bei Knochenbrüchen oder Knochenerkrankungen erhöhte Werte als indirektes Zeichen für einen gesteigerten Knochenmetabolismus. Neben diesen kann das Enzym auch in der Leber, der Plazenta und der Gallenblase nachgewiesen werden [124]. Im Versuchsansatz katalysiert AP die Hydrolyse des farblosen p-Nitrophenylphosphats (pNPP) zu para-Nitrophenol (pNP). Durch die Zunahme der Konzentration von pNP, das während der Enzymreaktion gebildet wird, kann dessen gelbliche Farbe in der Lösung photometrisch gemessen werden [125]. Dieser Vorgang wird in Abb. 13 dargestellt.



**Abbildung 13: Reaktionsschema der Alkalischen Phosphatase-Aktivität.** Das Enzym Alkalische Phosphatase katalysiert die Reaktion von pNPP zu pNP, dessen gelbliche Farbe bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert werden kann.

Die Versuchsdurchführung erfolgte im Anschluss an die Resazurin-Messung. Die Zellen einer 96-Well-Kulturplatte wurden zweifach mit DPBS gewaschen und anschließend mit je 100 µl AP-Substrat bedeckt. Nach je 20, 40 und 60 min im Inkubator bei 37°C erfolgte die Messung des Farbumschlages ins Gelbe, welche mittels Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm mit dem Mikroplatten-Reader detektiert werden konnte.

### **3.2.6 Sulforhodamin B (SRB)-Färbung**

Mit Hilfe dieser empfindlichen, kolorimetrischen Methode kann der Gesamtprotein-gehalt von Zellen im sauren Milieu ermittelt werden [126]. SRB lagert sich dabei an die Oberflächenproteine. Der Proteingehalt der Zellen korreliert linear mit den erhaltenen Messwerten und kann Aufschlüsse über die Zellzahl geben.

Im Anschluss an die AP-Messung konnte mit der SRB-Färbung fortgefahren werden. Zuerst wurden die Zellen mit 100 µl 99%igem Ethanol bedeckt und für mindestens 1 h bei -20°C fixiert. Daraufhin erfolgte ein Waschschrift mit Leitungswasser und das Trocknen der Platten. Anschließend wurden 50 µl SRB-Lösung zu jedem Well hinzugegeben, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubationszeit bei RT im Dunkeln. Nach 3-maligem Waschen mit 1%iger Essigsäure und der Zugabe von 10 mM TRIS (pH = 10 - 10,5) in die Vertiefungen zum Lösen wurde die Absorption des Farbstoffes bei 565 nm gemessen. Zum Ausschluss von Verunreinigungen erfolgte eine zweite Messung bei 690 nm, welche nicht im charakteristischen Absorptionsspektrum von SRB enthalten ist [127].

### **3.2.7 Alizarinrot-Färbung**

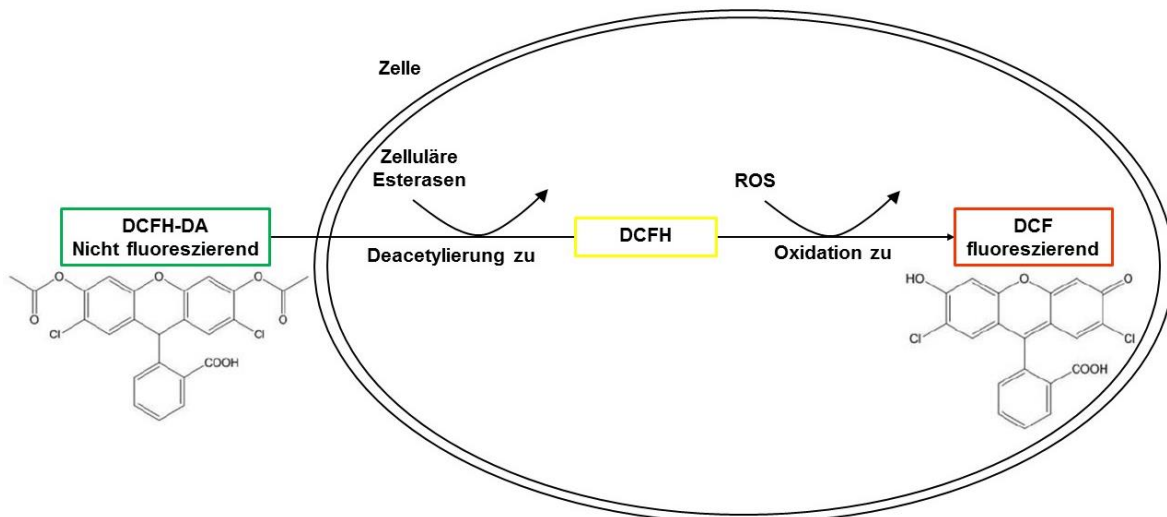
Um Calciumablagerungen im Gewebe und Knochenwachstum nachzuweisen, wird der Farbstoff Alizarinrot verwendet [128]. Hierfür wurden SCP-1-Zellen bei -20°C mit 99%igem Ethanol fixiert, ehe sie dreimal mit Leitungswasser gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit 0,5 % Alizarinrot (pH 4,0) bei RT gefärbt wurden. Nach drei weiteren Waschvorgängen konnte der Farbstoff in 10 % Cetylpyridiumchloridlösung gelöst und anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert werden [129].

### **3.2.8 Intrazelluläre ROS-Bestimmung mittels DCFH-DA-Assay**

Zur Detektion und Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies kommt der DCFH-DA-Assay zum Einsatz. Der nicht fluoreszierende Farbstoff Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) gelangt durch Diffusion in das Zellinnere, wo er von zellulären Esterasen zu Dichlorofluorescein (DCFH) deacetyliert wird. Im nachfolgenden Schritt erfolgt die Oxidation von DCFH durch ROS, wodurch 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF)

entsteht, welches bei einer Wellenlänge von 485 nm eine Anregung erfährt und dessen Fluoreszenz bei 525 nm gemessen werden kann [116]. Eine Positivkontrolle (0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) wurde für die Überprüfung der Durchführbarkeit des Assays herangezogen. Die ablaufende Reaktion wird in Abb. 14 dargestellt.

Zu konfluent gewachsenen Zellen einer 96-Well-Platte mit je 100 µl Medium wurden 10 µl DCFH-DA-Arbeitslösung pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubationszeit bei 37°C erfolgten zwei zügige Waschungen mit PBS und anschließend eine Stimulation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen CSE (0,1 %, 1 %, 5 % und 10 %), L-Ascorbat (100 µM und 200 µM) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Positivkontrolle. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit und Reaktionsfreudigkeit von ROS mit O<sub>2</sub> wurde die Platte in Aluminiumfolie gewickelt und die Waschschrte so kurz wie möglich gehalten. Mit dem Mikroplatten-Reader wurde die Fluoreszenz über 20 Zyklen (à 90 sec) gemessen.



**Abbildung 14: Messung der Aktivität reaktiver Sauerstoffverbindungen.** DCFH-DA gelangt durch Diffusion in das Zellinnere und wird über das Zwischenprodukt DCFH durch ROS zu DCF oxidiert. DCF erfährt dabei eine Anregung und kann bei einer Wellenlänge von 525 nm detektiert werden.

### 3.2.9 Scratch Assay

Der Scratch Assay dient der anschaulichen Darstellung der zweidimensionalen Migration und Interaktion von Zellen „*in vitro*“ [130]. Mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze wurde in die Monolage aus SCP-1-Zellen eine waagrechte Linie gezogen, um eine definierte Wunde oder Verletzung zu setzen. Hierdurch werden die Zellen angeregt,

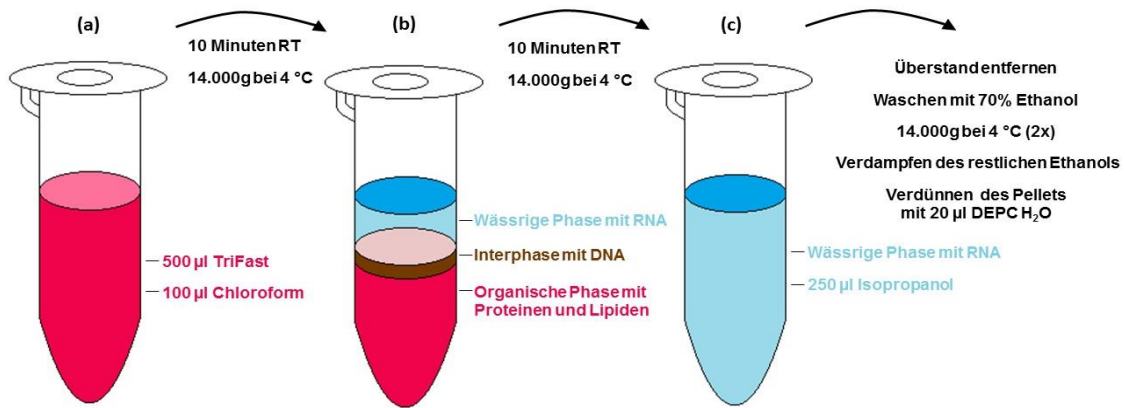
in die freie Fläche einzuwandern und eine Überbrückung des Wundspaltes zu simulieren, wodurch indirekt auch auf die Wachstumsgeschwindigkeit geschlossen werden kann. Nach Auszählung der trypsinierten Zellen wurden 35.000 SCP-1-Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz (24 - 48 h) wurde mit einer sterilen Pipettenspitze (2 - 200 µl) eine gerade Linie durch die Mitte des Wells gezogen und die Zellen anschließend mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen CSE (5 %, 10 %) und L-Ascorbat (100 µM, 200 µM) in unterschiedlichen Zusammensetzungen. Mit einem Mikroskop wurde in regelmäßigen Abständen (0 h, 16 h, 24 h und 48 h) der Fortschritt der Migration in den verschiedenen Versuchsansätzen durch Bilder dokumentiert und anschließend mit der Software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, USA) ausgewertet.

### **3.2.10 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.10.1 RNA-Isolierung mit TriFast**

Nach Absaugen des Kulturmediums wurden je 250 µl TriFast zu den Wells einer 6-Well-Platte pipettiert und die darin befindlichen Zellen mit einem Zellschaber in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Beruhend auf der „*single-step*“-Isolationsmethode nach Chomczynski und Sacchi [131] lassen sich Zellen mit TriFast lysieren und gleichzeitig die RNA aus diesen extrahieren. Hierbei spielt das im TriFast enthaltene Guanidinisothiocyanat für die Lyse und die Inaktivierung von RNAsen eine wichtige Rolle, wohingegen sich die RNA in Phenol, einem weiteren Bestandteil von TriFast, löst. Nach 5-minütiger Lysezeit bei RT wurden 100 µl Chloroform pro 500 µl TriFast zugegeben und die Suspension kräftig gemischt (siehe Abb. 15 a). Erneut wurde für 10 Minuten bei RT inkubiert und anschließend bei 14000 g und 4°C zentrifugiert, wobei sich drei verschiedenen Phasen bildeten: eine obere, wässrige Phase mit RNA, eine Interphase mit größeren DNA-Fragmenten und eine untere, chloroformhaltige Phase mit Proteinen (siehe Abb. 15 b). Die obere, wässrige RNA-

haltige Phase wurde zur Präzipitation vorsichtig in ein mit 250 µl vorgelegtes Reaktionsgefäß mit Isopropanol transferiert und wiederholt zentrifugiert (siehe Abb. 15 c).



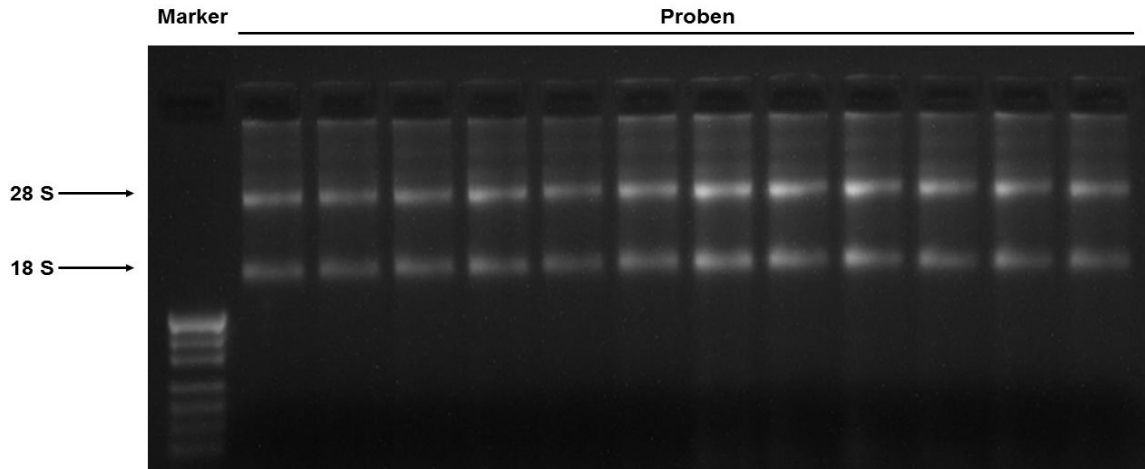
**Abbildung 15: RNA-Isolierung mit TriFast.** Nach mehrmaligen Zentrifugationsschritten, unter anderem mit TriFast, Isopropanol und Ethanol, konnte RNA in Form eines Zellpellets gewonnen werden, welches anschließend in DEPC-Wasser gelöst wurde.

Nach zwei abschließenden Wasch- und Zentrifugationsschritten mit je 1 ml 70%igem Ethanol wurde der Überstand verworfen und das gewonnene Pellet nach kurzem Trocknen an der Luft in 20 µl DEPC-Wasser gelöst.

### 3.2.10.2 Quantitative Nukleinsäureanalyse und Integrität der Gesamt-RNA

Die Bestimmung der RNA-Menge und der Reinheit der isolierten RNA-Proben erfolgte photometrisch mit einer LVis-Platte (BMG Labtech, Offenburg, Deutschland), mit welcher sich kleinste Konzentrationen von RNA bestimmen lassen [132]. Hierfür wurden den unverdünnten Proben 2 µl entnommen und basierend aus dem gemessenen Absorptionsquotienten (260 nm zu 280 nm) auf die Reinheit zurückgeschlossen. Dieser soll für eine gute Reinheit zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die anschließende Qualitätsbeurteilung der Gesamt-RNA erfolgte mit der Agarose-Gel-elektrophorese. Pro Probe wurde ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgetragen, bestehend aus vier Teilen RNA (0,5 µg) mit ddH<sub>2</sub>O und einem Teil PCR-Ladepuffer. Nach Auftrennung der RNA-Proben im elektrischen Feld (85 V, 40 min) waren die Banden

der 18 und 28 S-Untereinheiten der rRNA sichtbar, welches als Anzeichen einer intakten mRNA gilt. Die rRNA macht dabei rund 90 % am Gesamtanteil der RNA aus. Die nachfolgende Abb. 16 zeigt ein Beispiel der RNA-Integrität:



**Abbildung 16: Kontrolle der RNA-Integrität.** Nach Auftrennung der RNA im elektrischen Feld zeigten sich die Banden der 28 S Untereinheit im oberen und die der 18 S Untereinheit der rRNA im unteren Bildabschnitt.

### 3.2.10.3 Erststrang-cDNA-Synthese

Unter Verwendung des Enzyms „Reverse Transkriptase“ wurde mit einem cDNA-Synthese-Kit (Thermo Fisher, Waltham, USA) mRNA in cDNA umgeschrieben. Die Sequenz der mRNA dient dieser sog. „RNA-abhängigen DNA-Polymerase“ dabei als Vorlage. Hinzugegebene Oligo(dT)-Primer binden am polyadenylierten 3´-Ende der mRNA und dienen neben „*random primer*“ als Startpunkt der Synthese. Diese wird anschließend von der Reversen Transkriptase unter Zugabe von dNTPs zur komplementären DNA vervollständigt und der mRNA-Strang degradiert [133].

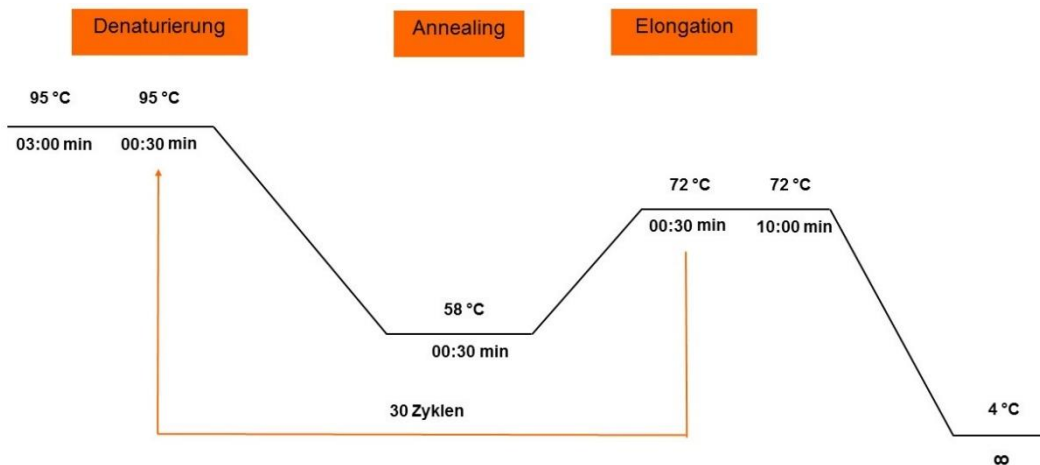
Die entsprechende Menge an einzusetzender RNA wurde berechnet, um die benötigte Zielkonzentration (2500 ng/µl) zu erreichen. Auf Eis gelagerte RNA-Proben wurden zu Beginn mit je 1 µl Oligo(dT)-Primer und 1 µl Random-Hexamer-Primer versetzt und mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 11 µl aufpipettiert. Um die RNA zu denaturieren, erfolgte eine 5-minütige Inkubation im Thermocycler Arktik (Thermo Fisher, Waltham, USA) bei 95°C. Anschließend wurde in einer kurzen Pause ein zwischenzeitlich vorbereitetes Gemisch aus 4 µl Reaktionspuffer, 1 µl RiboLock, 2 µl

dNTP-Mix (10 mM) und 1 µl M-MuLVRT (200 U/µl) hinzugegeben und die Reaktion für weitere 60 Minuten bei 37°C zur optimalen Enzymwirkung inkubiert. Ein abschließender fünfminütiger Temperaturanstieg auf 70°C mit Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase beendete die cDNA-Synthese. Danach wurden die Proben auf eine Konzentration von 10 ng/µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt und bei -20°C gelagert.

#### **3.2.10.4 RT-PCR**

Die „*in vitro*“-Vervielfältigung von DNA erfolgt mittels Polymerase-Kettenreaktion. Unter Verwendung des hitzestabilen Enzyms DNA-Polymerase werden kurze, bis zu 300 bp lange definierte Teile des DNA-Stranges reproduziert. Bei dem Vorgang werden 20 bis 35 Zyklen durchgeführt, welche wiederum aus drei Schritten bestehen. Diese sind die Denaturierung, die Primerhybridisierung („Annealing“) und die Elongation [134]. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige Template-DNA auf 95°C erhitzt, um die beiden Stränge aufzutrennen. Durch die anschließende Senkung auf primerspezifische Temperaturen wird den Primern im zweiten Schritt ermöglicht, an die DNA zu hybridisieren. Abschließend wird im dritten Schritt durch eine erneute Temperaturanhebung auf 72°C das Arbeitsoptimum der Polymerase erhöht, die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden aufgefüllt und der Zweitstrang synthetisiert. Im letzten Durchgang wird zur Sicherheit die Elongation bei 72°C länger durchgeführt, sodass die Polymerase ihre Arbeit komplett abschließen kann. Die Reaktionen liefen im Thermoreaktor am Beispiel der GAPDH nach in Abb. 17 dargestelltem Schema ab:





**Abbildung 17: Standard-Schema für eine GAPDH-PCR.** Zur Vervielfältigung von DNA müssen die Phasen „Denaturierung“, „Annealing“ und „Elongation“ in einer PCR mehrfach durchlaufen werden. Für den korrekten Ablauf benötigt jede Phase dabei einen bestimmten Temperaturbereich und eine entsprechende Zeitdauer.

Die Annealingtemperatur und die Zykluszahl wurden dabei abhängig von den verwendeten Primerpaaren für jede PCR individuell festgelegt. Die eingesetzte Menge an cDNA betrug 20 ng pro PCR. Der fertig pipettierte PCR-Ansatz (20 µl) bestand dabei aus 2 µl cDNA-Probe (10 ng/µl), 6 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, je 1 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer sowie 10 µl Mastermix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), welcher dNTPs sowie Taq DNA-Polymerase enthielt. In Tabelle 10 finden sich wichtige Angaben zu den verwendeten Primern, ihrer Größe, der Basensequenz und der Annealing-Temperatur.

### 3.2.10.5 Agarose-Gelelektrophorese

Als vielseitige und einfache Methode ermöglicht die Agarose-Gelelektrophorese, DNA-Fragmente nach ihrer Länge aufzutrennen und ihr Molekulargewicht anhand eines mitlaufenden Markers zu bestimmen [135].

Zur Herstellung von 1,5%igen Agarosegelen wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TBE-Laufpuffer gegeben und durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurden 7 µl Ethidiumbromid hinzupipettiert und daraus eine rund 1 cm di-

cke Gelmatrix gegossen. Ethidiumbromid, welches in die DNA-Doppelhelix interkaliert, ermöglicht es, die im Gel enthaltenen DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen. Nach Erkalten des Gels konnten jeweils 8 µl des PCR-Produkts und 3 µl einer DNA-Leiter (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) als Größenstandard in die vorbereiteten Geltaschen geladen werden. Anschließend wurden die negativ geladenen DNA-Moleküle mit einem elektrischen Feld (85 V, 45 min) zur positiv geladenen Anode durch im Gel vorhandene Poren gezogen, bis eine ausreichende Bandentrennung erreicht wurde. Kleinere DNA-Fragmente können sich dabei schneller durch die Poren bewegen als Größere, wodurch es zu einer charakteristischen Auftrennung der Banden kam, welche mit einem Geldokumentationssystem (Intas Science Imaging, Göttingen, Deutschland) unter UV-Licht fotografiert und dokumentiert wurden. Mit der Software ImageJ erfolgte die anschließende Analyse unter Normalisierung zu GAPDH.

### **3.2.11 Western Blot**

Der Western Blot wird zur Detektion spezifischer Proteine verwendet, welche in mehreren Zwischenschritten anhand ihrer Molekülmasse elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Trägermembran übertragen und nachgewiesen werden können [136]. Im Folgenden werden die durchgeführten Zwischenschritte kurz erläutert.

#### **3.2.11.1 Herstellung totaler Proteinlysate mit RIPA (*“modified radioimmunoprecipitation”*)**

Über 14 Tage lang fand die osteogene Differenzierung von SCP-1-Zellen unter Co-Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen CSE (5 %, 10 %) und L-Ascorbat (100 µM, 200 µM) statt, bevor die adhärent gewachsenen Zellen mit 100 µl RIPA-Arbeitslösung versetzt, mit einem Zellschaber in ein Eppendorfgefäß überführt und für 10 min bei 13.000 g und 4°C zentrifugiert wurden. Dadurch konnte eine Trennung der Proteine von den angedauten Zellmembranen erreicht und der Überstand als Proteinlysate abgenommen werden.

### 3.2.11.2 Proteinbestimmung nach Lowry

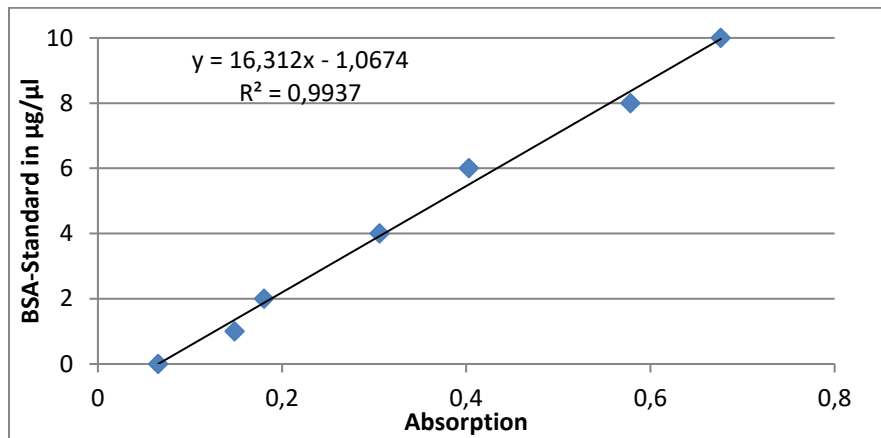
Zur Bestimmung der quantitativen Proteinkonzentration in Lösungen wurde die zwei-stufige Reaktion nach Lowry verwendet [137]. Im ersten Schritt werden Peptidbin-dungen mittels des Biuret-Tests nachgewiesen. In alkalischer Lösung kommt es zwischen den Proteinen und  $\text{Cu}^{2+}$  zu einer Komplexbildung mit blau-violetterm Far-bumschlag. Im darauffolgenden Schritt erfolgt die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen zu  $\text{Cu}^+$ . Die Reduktion des gelben Folin-Ciocalteu-Reagenz zu Molybdänblau durch eben-dieses  $\text{Cu}^+$  führt zu einer intensiven dunkelblauen Färbung, welcher den photomet-rischen Nachweis von Proteinen in Lösungen ermöglicht.

Vor der Messung wurden Lösung A und Lösung B jeweils frisch angesetzt:

**Tabelle 13: Liste der benötigten Chemikalien für Lösung A und B.**

<b>Lösung A</b>	<b>C<sub>final</sub></b>	<b>Lösung B</b>	<b>C<sub>final</sub></b>
20 µl Na-K-Tartrate Stammlösung	0,02 %	500 µl Folin Reagenz	33 %
20 µl $\text{CuSO}_4$ Stammlösung	0,01 %	1000 µl ddH <sub>2</sub> O	
Mit $\text{Na}_2\text{CO}_3$ Stammlösung auf 2 ml auffüllen			

Für die Versuchsproben sowie die 8 Proben der Standardkurve wurden je 150 µl von Lösung A in Duplikaten in eine 96-Well-Platte pipettiert. Danach gab man 2 µl der Proteinlysate oder 2 µl von jeder BSA-Standardkonzentration in das zugehörige Well hinzu mit anschließender Inkubation für 10 Minuten bei RT. Danach wurden 30 µl der Lösung B zu jedem Well verabreicht, sofort gemischt und anschließend für 1 bis 6 Stunden bei RT geschüttelt. Nach homogener Färbung der Lösungen konnte die Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm mit dem Mikroplatten-Reader be-stimmt und gegen einen Leerwert vermessen werden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der generierten Standardkurve, bei der die Konzentration der Standardproben (y-Achse) gegen die Absorption (x-Achse) aufgetragen wurde (siehe Abb. 18).



**Abbildung 18: Standard-Eichgerade für die Proteinbestimmung nach Lowry.** Der Proteingehalt der Proben kann mit Hilfe der generierten Formel durch Interpolation der Messdaten berechnet werden.

### 3.2.11.3 Herstellung der Polyacrylamidgele und SDS-Page

Die zu analysierenden Proteine sollten anschließend nach ihrem Molekulargewicht mit Gelen definierter Porengrößen im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Hierfür durchwandern die Proteine zuerst ein Sammelgel mit weiten Poren, wodurch eine einheitliche Lauffront der Proben entsteht. Ein darauf zu passierendes kleinporiges Trenngel ermöglicht im Anschluss die Proteintrennung anhand der Größe.

Durch Variation der Acrylamidkonzentration wurden 10%ige Trenngele und 3%ige Sammelgele nach folgendem Schema (siehe Tabelle 14) hergestellt:

**Tabelle 14: Benötigte Chemikalien zur Herstellung der Western Blot Gele.**

Chemikalien	Trenngel 10 %	Sammelgel 3 %
ddH <sub>2</sub> O [ml]	10	4,2
1,5 M TRIS [ml]	6,4	-
1 M TRIS [µl]	-	760
30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung [ml]	8,60	1,0
10 % SDS Lösung [µl]	255	60
TEMED [µl]	25,6	6
10 % APS-Lösung [µl]	255	60

Zuerst wurde das Trenngel vorbereitet und zwischen die eingespannten Glasplatten in eine Gelkammer gegossen, welches von Isopropanol zur Ausbildung einer geraden Grenzfläche überlagert wurde. Nach stattgefundenener Polymerisation konnte die

Isopropanol-Phase entfernt und das Sammelgel inklusive eines Kammes für 12 Taschen eingebracht werden. Nach der vollständigen Polymerisation des Gels wurde der Kamm vorsichtig entfernt. Zwischenzeitlich wurden die zu analysierenden Proben vorbereitet: vier Teile davon wurden mit einem Teil Lämmli-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 25 µl vermischt. Im Lämmli-Puffer enthaltenes, negativ-geladenes SDS bindet an die Proteine und führt durch gegenseitige Abstoßung seiner Ladung zur Linearisierung. Auch das 10-minütige Erhitzen auf 100°C im Heizblock mit Denaturierung förderte die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht [138]. Anschließend wurden die Proben und ein Marker (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in die 12 vorbereiteten Taschen des Gels überführt und die Gelkammer in eine Elektrophorese-Apparatur unter Beschickung mit 1x Laufpuffer eingebracht. Mit einer Spannung von 200 V und nicht limitierter Stromstärke fand nun die Auftrennung der Proben statt, bis das in den Proben enthaltene Bromphenolblau am Ende des Trenngels angelangt war.

#### **3.2.11.4 Tank Blot**

Da die Proteine in dieser Form noch nicht detektiert werden können, fand als nächstes ein „Abklatsch“ („Blot“) der Proteinbanden auf eine Nitrocellulosemembran statt. Dazu wurde das Acrylamidgel wie in einem Sandwich zwischen einer Anoden- und einer Kathodenplatte, Schwämme und Whatmann Papier in direkten Kontakt mit der Nitrocellulosemembran gebracht und für 10 h Übernacht komplett bedeckt mit Transferpuffer bei 25 mA laufen gelassen.

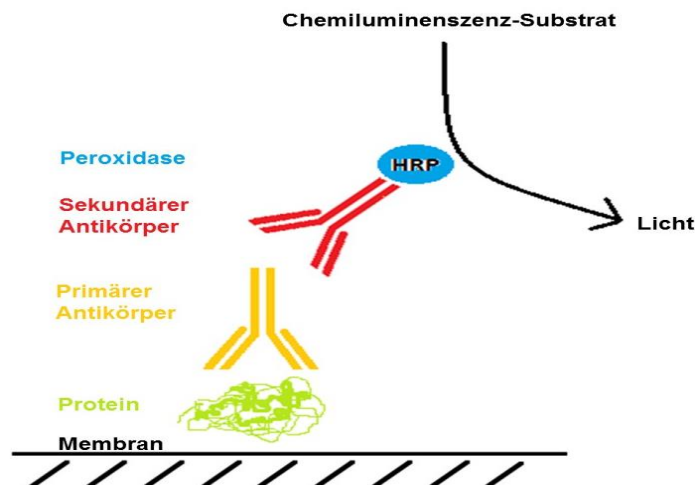
#### **3.2.11.5 Proteindetektion mit Ponceau S Lösung [139]**

Der rote Azofarbstoff Ponceau S diente zur Überprüfung des Proteintransfers auf die Nitrocellulosemembran. In einer kleinen Wanne wurde diese 5 Minuten bei RT mit Ponceau S Lösung bedeckt und anschließend wurden die sichtbar gewordenen Proteinbanden mit dem Geldokumentationssystem (Intas Science Imaging, Göttingen, Deutschland) dokumentiert.

### 3.2.11.6 Blockierung und Immunodetektion mittels Antikörpern

Bei erstmaliger Antikörperwirkung wurde die Nitrocellulosemembran für eine Stunde mit 50 ml 5 % BSA-Blockierlösung bedeckt. Hierdurch wird erzielt, dass Antikörper nicht an freie, unspezifische Bindungsstellen der Membran anhaften. Nach drei jeweils 10-minütigen Waschungen mit TBS-T-Puffer folgte eine 3-stündige Inkubation eines monoklonalen Primärantikörpers (Verdünnung 1:1000) gegen das gesuchte Protein.

Als Zwischenschritt erfolgten erneut drei Waschungen mit TBS-T-Waschpuffer für jeweils 10 Minuten. Danach wurde die Membran mit 10 ml eines mit HRP gekoppelten Sekundärantikörpers (1:10.000) für 2 h inkubiert, welcher sich an den Primärantikörper anlagert (siehe Abb. 19). An dieser Stelle werden die drei o.g. Waschschrte mit TBS-T-Waschpuffer wiederholt, um störende Hintergrundsignale in der Detektion zu vermeiden.



**Abbildung 19: Proteindetektion mit Primär- und Sekundärantikörpern.** Ein spezifischer Primärantikörper bindet an das zu detektierende Protein. Über einen sekundären Antikörper, welcher an den primären Antikörper bindet und mit HRP gekoppelt ist, kann das Protein nachfolgend mit einem Detektionssystem nachgewiesen werden.

### 3.2.11.7 Detektion der Proteinbanden mit ECL-Substrat

Luminol wird von „horse radish peroxidase“ (HRP) in seine oxidierte Form umgesetzt, welches anschließend durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden kann [140]. Zur Detektion mit der „ChemoCam“ (Intas Science Imaging, Göttingen,

Deutschland) wurden folgende in Tabelle 15 zusammengefasste Lösungen vorbereitet:

**Tabelle 15: Benötigte Chemikalien zur Herstellung von Lösung A und B.**

<b>Lösung A</b>	<b>C<sub>final</sub></b>	<b>Lösung B</b>	<b>C<sub>final</sub></b>
2,5 ml TRIS (100 mM)	2,5 mM	2,5 ml TRIS (100 mM)	
25 µl Luminol (250 mM)	0,4 mM	5 µl Wasserstoffperoxid (30 %)	0,2 %
1 µl p-Cumarsäure (90 mM)			

Unmittelbar vor Detektion mit der „Chemocam“ wurden die beiden Lösungen in einem separaten Falcon im gleichen Verhältnis gemischt und die Membranstücke im Anschluss damit bedeckt. Bei verschiedenen langen Belichtungszeiten wurden die Proteinbanden dokumentiert und mit ImageJ quantifiziert...

### 3.2.11.8 Stripping

Nach erfolgreicher Immunodetektion kann der gebundene Antikörper mittels Stripping entfernt und die Membran für weitere Analysen verwendet werden. Die Methode beruht auf einer bestimmten Abfolge von jeweils 5-minütigen Waschschritten, in denen die Membranen nacheinander von den Lösungen TBS-T, salzfreiem Wasser, NaOH (200 mM), salzfreiem Wasser und TBS-T bedeckt wurden, bevor wieder von vorne mit dem Blockieren der Membran begonnen werden konnte.

### 3.2.12 Auswertung und Statistik

Die Ergebnisse wurden mittels GraphPad Prism analysiert. Die anschließende Auswertung erfolgte mit dem One-Way ANOVA, Kruskal-Wallis-Test zur Testung zentraler Tendenzen mehrerer unabhängiger Stichproben. Wenn lediglich 2 Konditionen miteinander verglichen wurden, erfolgte dies mit dem t-Test, Mann-Whitney-Test. Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung von Dr. Sabrina Ehnert und Romina Aspera-Werz.

## 4 Ergebnisse

Im ersten Teil der Ergebnisse wird diese Dissertation die Interaktion von SCP-1-Zellen, welche mit CSE behandelt wurden, unter „*in vitro*“-Bedingungen und unter der Betrachtung funktioneller Parameter analysieren. Hierzu wurden wichtige zelluläre Marker wie die Zellviabilität, die osteogene Differenzierung, die Matrixmineralisierung, die Zellmigration und die ROS-Produktion erhoben. Anschließend konnten mittels Toxizitätstest diejenigen Konzentrationen von L-Ascorbat ermittelt werden, welche eine Verbesserung der Zellfunktionalität herbeiführten, ohne dabei negative Auswirkungen auf die Zellen auszuüben. Hierauf aufbauend wurde im zweiten Teil ein Vergleich zwischen CSE-vorbehandelten Zellen und solchen, welche einer Co-Inkubation mit CSE und L-Ascorbat zugeführt wurden, angestellt. Abschließend erfolgte die Erhebung der Gen- und Proteinexpression von antioxidativen Enzymen, welche an der Elimination von ROS beteiligt sind.

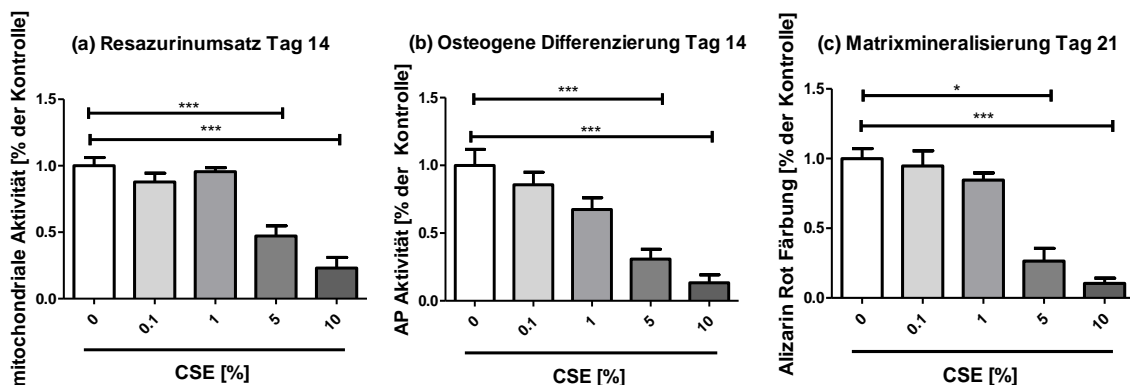
### 4.1 Beeinträchtigung der Viabilität, der AP-Aktivität und der Matrixmineralisierung unter CSE-Exposition

Um die Auswirkungen von CSE während der osteogenen Differenzierung zu untersuchen, wurden SCP-1-Zellen über 14 bzw. 21 Tage in SCP-1-Differenzierungsmedium kultiviert, welches mit verschiedenen Konzentrationen CSE (0 %, 0,1 %, 1 %, 5 % und 10 %) angereichert wurde. Die Versuchsergebnisse wurden in Abb. 20 dargestellt.

Durch die Messung des Resazurinumsatzes (a) konnte eine signifikante Abnahme der mitochondrialen Aktivität unter 5 % und 10 % CSE im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (5 %, \*\*\*  $p \leq 0,001$  und 10 %, \*\*\*  $p \leq 0,001$ ), wobei die mitochondriale Aktivität auch als ein indirektes Maß für die Viabilität gilt. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch in der frühen und späten osteogenen Differenzierung, welche mit Hilfe der AP-Aktivität (b) und der Matrixmineralisierung (c) bestimmt wurden.



In ersterer ließ sich eine konzentrationsabhängige, signifikante Reduktion um 69,2 % bei 5 % CSE und 86,6 % bei 10 % CSE erheben (5 %, \*\*\*  $p \leq 0,001$  und 10 %, \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Auch in der Matrixmineralisierung konnte ein negativer Effekt von CSE beobachtet werden. Hier kam es nach 21 Tagen in den höheren Konzentrationen CSE ebenfalls zu einem signifikanten Abfall um 73,5 % (5 % CSE) und um 89,6 % (10 % CSE) im Vergleich zur Kontrolle (5 %, \*  $p \leq 0,05$  und 10 %, \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hohe Konzentrationen CSE in allen drei Zellparametern zu einer signifikanten Reduktion führten. Bei diesen Daten handelt es sich um bereits publizierte Ergebnisse [123].



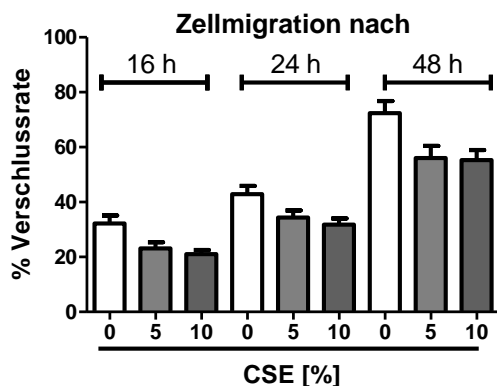
**Abbildung 20: CSE-Exposition beeinträchtigt den Resazurinumsatz (a), die AP-Aktivität (b) und die Matrixmineralisierung (c) von SCP-1-Zellen.** In allen drei Grafiken kann unter hohen CSE-Konzentrationen (5 % und 10 %) eine signifikante Abnahme der funktionellen Parameter nach 14 bzw. 21 Tagen beobachtet werden. Alle Versuche wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und anschließend mittels Dunn-Test ausgewertet. (a) und (b): (N=9, n=3), (c): (N=4, n=2). (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

## 4.2 Verminderte Migrationsfähigkeit von SCP-1-Zellen unter Einfluss von CSE

Die Ergebnisse des Scratch-Assays zur Untersuchung der Zellmigration und der Wachstumsgeschwindigkeit wurden in Abb. 21 dargestellt. Die SCP-1-Zellen in der Kontrollgruppe (0 % CSE) zeigten zu allen drei Zeitpunkten (16, 24 und 48 h) eine höhere Migration im Vergleich zu 5 % und 10 % CSE. Die Differenz der Verschlussrate betrug zwischen der Kontrollgruppe zu 5 % und 10 % CSE durchschnittlich 9,8

% und ist zwischen 16 h und 24 h annähernd konstant geblieben, während sie nach 48 h weiter auf 16,3 % angewachsen ist.

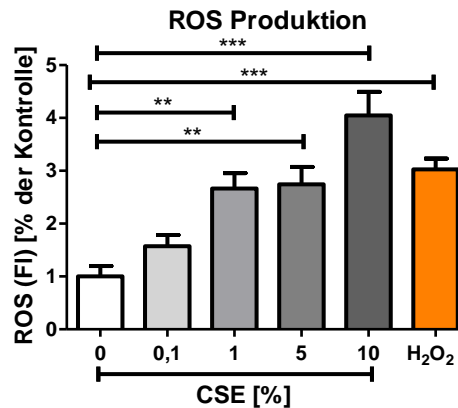
Im Anhang ist weiterhin eine Bilderstrecke von „Scratch Assays“ unter verschiedenen Versuchsbedingungen abgebildet (siehe Abb. 46, Abb. 47 und Abb. 48).



**Abbildung 21: Zellmigration von SCP-1-Zellen unter Inkubation mit CSE nach 16, 24 und 48 h.** Nach allen drei Zeitpunkten zeigte sich eine verminderte Verschlussrate unter 5 % und 10 % CSE. (N=4, n=4).

### 4.3 Vermehrte Messung von ROS unter CSE-Exposition

Das Ergebnis der ROS-Messung wurde in Abb. 22 dargestellt. Im Zigarettenrauch enthaltene ROS sowie deren ROS-fördernde Inhaltsstoffe werden oftmals für die schädlichen Auswirkungen des Rauchens verantwortlich gemacht [64], weshalb der ROS-Gehalt unter verschiedenen CSE-Konzentrationen mit Hilfe des DCFH-DA-Assays gemessen wurde. In der Grafik ist ein ausgeprägter, konzentrationsabhängiger Anstieg der ROS-Produktion unter CSE-Inkubation erkennbar. 10 % CSE erhöhten signifikant die nachgewiesene Menge an ROS um das Vierfache im Vergleich zur Kontrolle, gefolgt von 5 % und 1 % CSE mit einem signifikant resultierenden 2,7-fachen ROS-Anstieg (1 %, \*\*  $p \leq 0,01$ , 5 %, \*\*  $p \leq 0,01$  und 10 %, \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).  $H_2O_2$  wurde als Positivkontrolle verwendet.



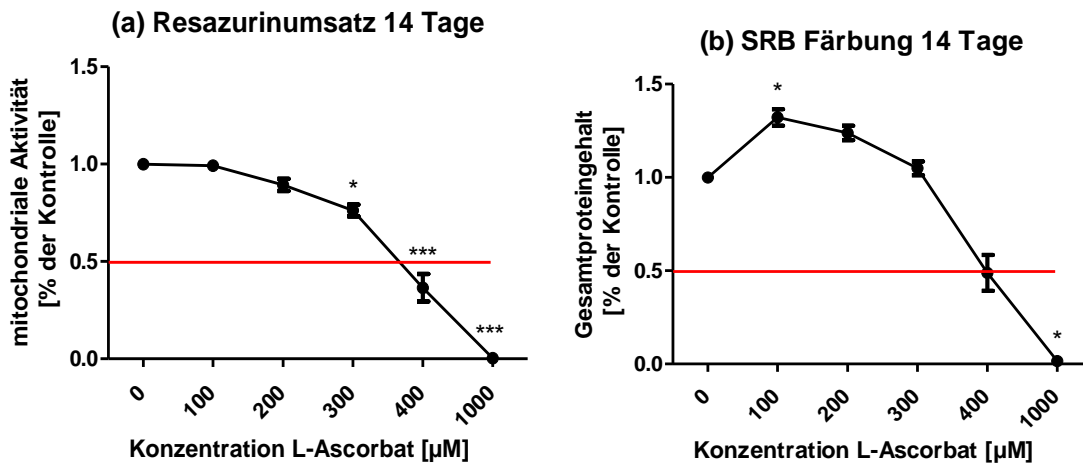
**Abbildung 22: ROS-Produktion von SCP-1-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen CSE-Konzentrationen.** Es zeigte sich ein Anstieg der ROS-Produktion mit zunehmender CSE-Konzentration mit nahezu Vervielfachung der ROS-Menge unter 10 % CSE im Vergleich zur Kontrolle. Die Ergebnisse wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und anschließend mittels Dunn-Test ausgewertet. (N=4, n=3). (\*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

#### 4.4 Gesteigerter Proteingehalt unter 100 und 200 $\mu\text{M}$ L-Ascorbat im Toxizitätstest von Vitamin C

Um die wirksamsten Konzentrationen von L-Ascorbat für die nachfolgenden Versuchsbedingungen und mögliche Therapieansätze zu ermitteln, wurden SCP-1-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen L-Ascorbat (0-1000  $\mu\text{M}$ ) über einen Zeitraum von 14 Tagen behandelt. Nachfolgende Abb. 23 zeigt die zugehörigen Dosis-Wirkungskurven. Im linken Diagramm (a) konnte ein konzentrationsabhängiger Abfall des Resazurinumsatzes mit zunehmender L-Ascorbat-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Hiervon abweichend zeigte sich in der SRB-Färbung (b) für 100  $\mu\text{M}$  ein signifikant gesteigerter Gesamtproteingehalt um 32,1 % (100  $\mu\text{M}$ , \*  $p \leq 0,05$ ) und ein tendenzieller Anstieg um 23,8 % unter 200  $\mu\text{M}$ , während höhere Dosen L-Ascorbat hingegen zu einer Reduktion des Gesamtproteingehaltes führten.

Auf Grundlage der Überlebensrate sowie des vermehrten Proteingehaltes wurden die beiden Werte 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  über der ED<sub>50</sub>-Linie (rot) für umfassendere Studien ausgewählt. Konzentrationen bis zu 100  $\mu\text{M}$  können durch eine vielseitige

Ernährung gerade noch erreicht werden und spiegeln auf der einen Seite physiologische Bedingungen wider, während mit 200  $\mu\text{M}$  die pharmakologische Substitution von L-Ascorbat simuliert wird. Weiterhin wurden die  $\text{ED}_{50}$ -Werte von L-Ascorbat im Resazurinumsatz und der SRB-Färbung berechnet, welche 368,12  $\mu\text{M}$  bzw. 377,91  $\mu\text{M}$  betragen.



**Abbildung 23: Resazurinumsatz (a) und SRB-Färbung (b) in SCP-1-Zellen unter wiederholter Gabe verschiedener Konzentrationen L-Ascorbat (0-1000  $\mu\text{M}$ ).** SCP-1-Zellen wurden mit L-Ascorbat über 14 Tage behandelt und die Ergebnisse zur unbehandelten Kontrolle normalisiert. Die rote Linie repräsentiert den  $\text{ED}_{50}$ -Wert. Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Abfall des Resazurinumsatzes und der SRB-Färbung mit zunehmenden Konzentrationen L-Ascorbat. 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  führten in (b) zu einem Anstieg des Gesamtproteingehaltes der Zellen. Anschließend wurden die Ergebnisse durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. (N=5, n=3). (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

#### 4.5 Anstieg der Viabilität, der AP-Aktivität und teilweise der Matrixmineralisierung unter Co-Inkubation von CSE und L-Ascorbat

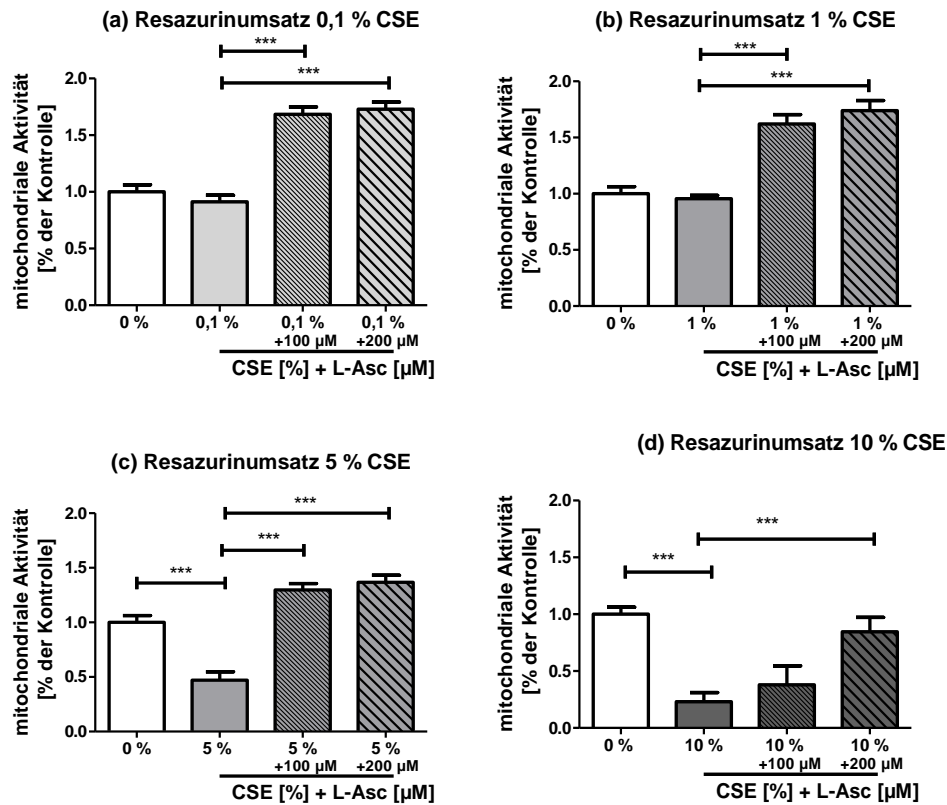
Die Abb. 24, Abb. 25 und Abb. 26 repräsentieren den Resazurinumsatz, die AP-Aktivität und die Matrixmineralisierung von SCP-1-Zellen unter Co-Inkubation von CSE und L-Ascorbat nach 14 bzw. 21 Tagen während der osteogenen Differenzierung. Unter Co-Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat konnte in den niedrigen CSE-Konzentrationen (Abb. 24 und Abb. 25: (a) 0,1 % CSE und (b) 1 % CSE) ein signifikanter Anstieg der Viabilität um das 1,7-fache bzw. der AP-Aktivität um das

3-fache der Kontrolle nachgewiesen werden. Dabei war der Effekt unter 200  $\mu\text{M}$  unter allen Bedingungen nochmals stärker als unter 100  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat.

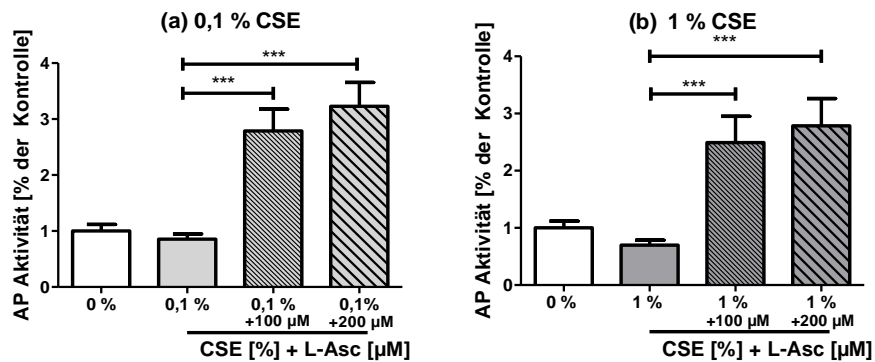
Interessante Ergebnisse wurden unter Co-Inkubation von höheren Konzentrationen CSE (5 % und 10 %) mit 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat beobachtet. Der Resazurinumsatz konnte unter Co-Inkubation im Vergleich zu 5 % CSE von 0,47 auf durchschnittlich den 1,36-fachen Wert der Kontrolle (0 % CSE) gesteigert werden, was nahezu eine Verdreifachung darstellt (Abb. 24 (c)). Unter 10 % CSE und 100  $\mu\text{M}$  war im Resazurinumsatz eine aufwärtsgerichtete Tendenz zu erkennen, während in Kombination mit 200  $\mu\text{M}$  eine signifikante Steigerung von 0,23 auf das 0,85-fache des Kontrollwertes möglich war (Abb. 24 (d)).

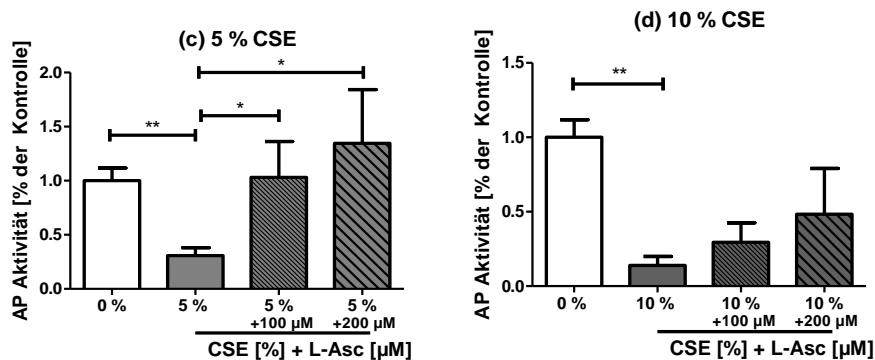
Gleiche Beobachtungen konnten auch in der AP-Aktivität festgestellt werden. Hier zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg unter Co-Inkubation mit 5 % CSE und L-Ascorbat im Vergleich zur alleinigen Applikation von 5 % CSE (Abb. 25 (c)). Unter 10 % CSE zeigte sich mit L-Ascorbat lediglich eine Tendenz zum Wiederanstieg der AP-Aktivität von ursprünglich 0,14 unter 10 % CSE auf das durchschnittlich 0,38-fache der Kontrolle (Abb. 25 (d)).

In der Matrixmineralisierung fanden sich unter niedrigen CSE-Konzentrationen (Abb. 26 (a): 0,1 % und (b): 1 %) sowohl alleine als auch mit L-Ascorbat keine relevanten Unterschiede im Vergleich zum Ausgangswert. Bei den höheren Konzentrationen CSE (Abb. 26 (c): 5 % und (d): 10 % CSE) konnte unter Co-Inkubation mit L-Ascorbat jeweils eine geringfügige, tendenzielle Verbesserung der Situation erreicht werden, welche unter 200  $\mu\text{M}$  stets größer ausfiel als unter 100  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat.

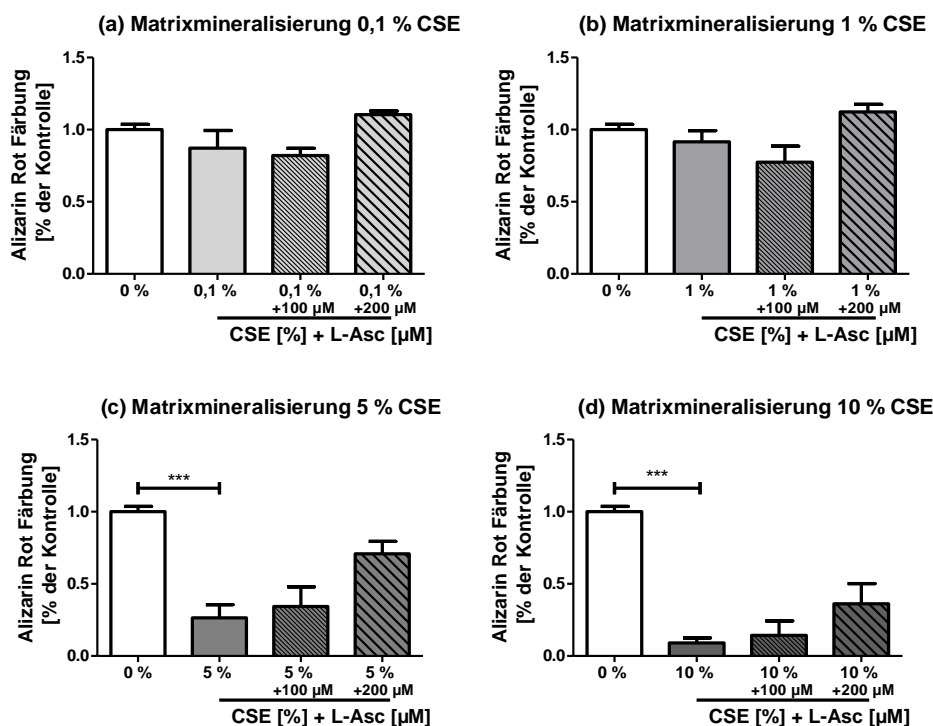


**Abbildung 24: Resazurinumsatz in SCP-1-Zellen nach 14-tägiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen CSE (%) und L-Ascorbat (100 µM und 200 µM).** (a) 0,1 % CSE, (b) 1 % CSE, (c) 5 % CSE und (d) 10 % CSE. L-Ascorbat führt unter niedrigen Dosen CSE (a und b) zu einer Steigerung des Resazurinumsatzes, während es unter hohen Dosen CSE (d) zu einer Abmilderung der durch CSE vermittelten, negativen Effekte führt. Anschließend wurden die Ergebnisse zur unbehandelten Kontrolle normalisiert, durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. (N=4, n=3). (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .





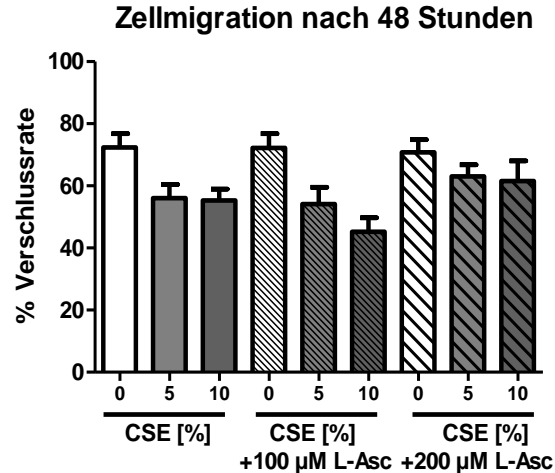
**Abbildung 25: AP-Aktivität in SCP-1-Zellen nach 14-tägiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen CSE (%) und L-Ascorbat (100 µM und 200 µM).** (a) 0,1 % CSE, (b) 1 % CSE, (c) 5 % CSE und (d) 10 % CSE. L-Ascorbat führt unter niedrigen Dosen CSE (a und b) zu einer Steigerung der AP-Aktivität, während es unter hohen Dosen CSE (d) zu einer Abmilderung der durch CSE vermittelten, negativen Effekte führt. Anschließend wurden die Ergebnisse zur unbehandelten Kontrolle normalisiert, durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. (N=4, n=3). (\* p ≤ 0,05, \*\* p ≤ 0,01, \*\*\* p ≤ 0,001).



**Abbildung 26: Matrixmineralisierung in SCP-1-Zellen nach 21-tägiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen CSE (%) und L-Ascorbat (100 µM und 200 µM).** (a) 0,1 % CSE, (b) 1 % CSE, (c) 5 % CSE und (d) 10 % CSE. L-Ascorbat zeigte unter Co-Inkubation mit niedrigen Dosen CSE (a und b) keine auffälligen Veränderungen. Unter hohen Dosen CSE konnte durch die gleichzeitige Inkubation mit L-Ascorbat eine tendenzielle Verbesserung der CSE-vermittelten Effekte erreicht werden. Diese fielen unter 200 µM größer aus als unter 100 µM L-Ascorbat. Anschließend wurden die Ergebnisse zur unbehandelten Kontrolle normalisiert, durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. (N=4, n=2). (\*\*\*) p ≤ 0,001).

## 4.6 Förderung der Zellmigration unter Inkubation mit CSE und 200 $\mu$ M L-Ascorbat

In Abb. 27 wurden die Ergebnisse der Zellmigration unter kombinierter Behandlung mit CSE und L-Ascorbat nach 48 h dargestellt. Zunächst ist erkennbar, dass die Verschlussrate (%) mit zunehmenden CSE-Konzentrationen langsamer angestiegen ist als die Kontrolle (0 % CSE). Weiterhin fällt auf, dass der Zusatz von L-Ascorbat zu unbehandelten SCP-1-Zellen zu keiner erhöhten Verschlussrate des „Scratches“ führte. Interessante Ergebnisse zeigten sich nun unter Co-Inkubation beider Substanzen: Während unter Applikation von 100  $\mu$ M L-Ascorbat mit 5 % und 10 % CSE keine signifikanten Unterschiede bzw. ein geringes Absinken im Vergleich zur Einzelapplikation von CSE festgestellt werden konnten, zeigte sich unter Zugabe von 200  $\mu$ M L-Ascorbat zu 5 % und 10 % CSE bereits nach 16 h (nicht dargestellt) eine leicht erhöhte Verschlussrate, welche auch nach 24 h (nicht dargestellt) und 48 h bestehen blieb.

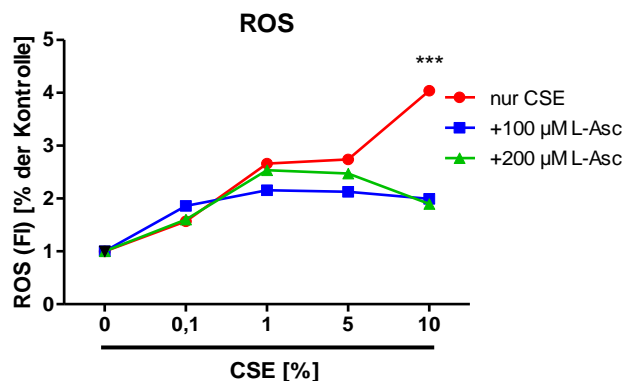


**Abbildung 27: Zellmigration von SCP-1-Zellen nach 48 h unter Co-Inkubation mit CSE (5 % und 10 %) und L-Ascorbat (100  $\mu$ M und 200  $\mu$ M).** Es zeigte sich tendenziell eine erhöhte Verschlussrate unter Co-Inkubation von CSE und 200  $\mu$ M L-Ascorbat im Vergleich zur Einzelapplikation von CSE. (N=4, n=4).



## 4.7 Abnehmende ROS-Produktion unter Co-Inkubation mit hohen CSE-Konzentrationen und L-Ascorbat bereits 15 Minuten nach singulärer Exposition

Die Ergebnisse der ROS-Messung unter Co-Inkubation von CSE und L-Ascorbat sind in Abb. 28 dargestellt. Es ist allgemein bekannt, dass Antioxidantien als Radikalfänger gelten [141]. Um herauszufinden, ob L-Ascorbat die im Zigarettenrauch befindlichen ROS sowie die ROS-Produktion, welche durch die Inhaltsstoffe des Rauches hervorgerufen wird, eliminieren kann, wurden SCP-1-Zellen mit 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat inkubiert. Zu Beginn fällt auf, dass es in allen drei Versuchsbedingungen im Vergleich zur Kontrolle zu einem Anstieg in der Produktion von ROS gekommen ist. Im Vergleich zur Einzelapplikation von CSE (rote Kurve) zeigt sich, dass L-Ascorbat vor allem unter Co-Inkubation mit hohen Konzentrationen CSE, insbesondere 10 % CSE, zu einer deutlichen Reduktion der gemessenen ROS geführt hat. Unter niedrigeren CSE-Konzentrationen konnte dieser Effekt deutlich weniger stark beobachtet werden (1 % und 5 % CSE).



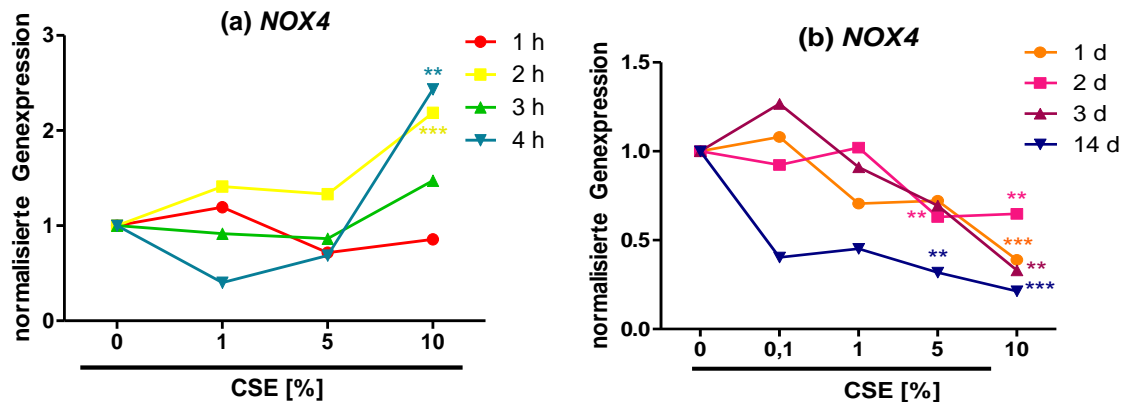
**Abbildung 28:** ROS-Produktion von SCP-1-Zellen unter CSE (rote Kurve) und unter Co-Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  (blaue Kurve) und 200  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat (grüne Kurve). Es zeigte sich ein Anstieg von ROS unter allen Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle (0 % CSE). Eine hohe ROS-Produktion unter 10 % CSE konnte durch die Behandlung mit L-Ascorbat deutlich gesenkt werden. Beim Vergleich der Ascorbatkonzentrationen untereinander konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Anschließend wurden die Ergebnisse zur unbehandelten Kontrolle normalisiert, durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. (N=2, n=3). (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

## **4.8 Bestimmung der Expressionsmuster antioxidativer Enzyme**

In den folgenden Abbildungen werden die Ergebnisse der Genexpressionen mehrerer antioxidativer Enzyme nach einem kurzen (1-4 Stunden) und einem längeren Zeitraum (1-14 Tage) präsentiert und miteinander verglichen. Hierfür wurden SCP-1-Zellen in mehreren Versuchsansätzen mit verschiedenen Konzentrationen CSE als auch unter Co-Inkubation mit L-Ascorbat behandelt. Ziel war es, das Expressionsmuster der antioxidativen Enzyme im Verlauf der osteogenen Differenzierung zu bestimmen. In manchen Fällen konnten die erhobenen Ergebnisse anschließend mit den korrelierenden Proteinexpressionen gegenübergestellt werden.

### **4.8.1 Absinken der *NOX4*-Genexpression unter Stimulation mit CSE nach mehrtägiger osteogener Differenzierung**

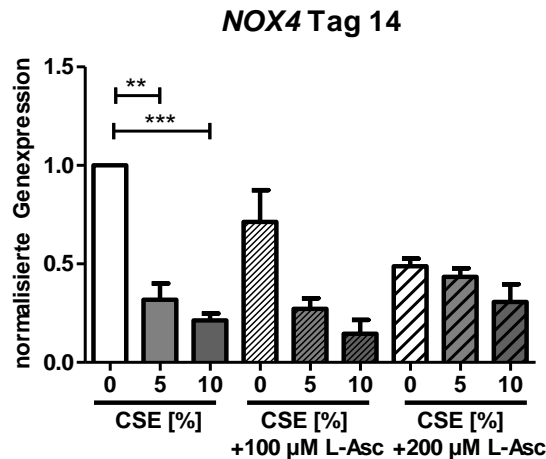
In Abb. 29 wurden die Ergebnisse der Genexpression von *NOX4* dargestellt. Beim Vergleich der beiden Zeiträume ließ sich feststellen, dass *NOX4* besonders nach zwei und vier Stunden unter 10 % CSE signifikant angestiegen ist, während es im Zeitraum zwischen einem bis 14 Tagen unter hohen Konzentrationen CSE signifikant und zunehmend reprimiert wurde. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Veränderungen der Genexpression zwischen einem und 14 Tagen persistierten und bereits ab dem ersten Tag durchgehend reguliert wurden. Unterstützend zeigte sich ebenfalls, dass die Veränderung der Expression bei Tag 14 zunehmend größer wurde und damit stärker abnahm.



**Abbildung 29: Expressionsänderung von reguliertem NOX4 in SCP-1-Zellen im Zeitverlauf von einer bis vier Stunden (a) und von einem bis 14 Tagen (b).** Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg von NOX4 nach 2 h und 4 h, während es zwischen einem und 14 Tagen mit zunehmenden Konzentrationen CSE zu einer signifikanten Reprimierung kam. Die Ergebnisse wurden zur entsprechenden GAPDH normalisiert, anschließend wurde Grafik (a) durch einen T-Test und Grafik (b) durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. (N=3, n=3). Tag 14: (N=3, n=2). (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

#### 4.8.2 Wiederanstieg von NOX4 unter Co-Inkubation mit 200 $\mu\text{M}$ L-Ascorbat

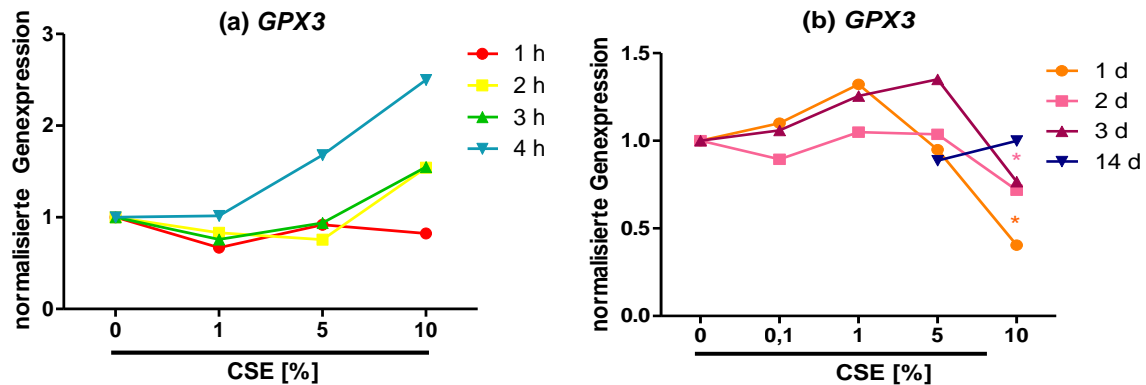
Auf den vorherigen Ergebnissen aufbauend, zeigte sich unter 14-tägiger Behandlung mit L-Ascorbat (siehe Abb. 30) folgendes Bild: sichtbar ist eine konzentrationsabhängige Abnahme von NOX4 unter alleiniger Gabe von L-Ascorbat im Vergleich zur Kontrolle (0 % CSE). Weiterhin konnte kein signifikanter Unterschied unter Co-Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat im Vergleich zur Einzelapplikation von CSE festgestellt werden. Jedoch zeigte sich ein leichter, tendenzieller Anstieg unter Co-Inkubation von CSE mit 200  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat im Vergleich zur Einzelapplikation von CSE und im Vergleich zur Co-Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat.



**Abbildung 30: Änderung der Genexpression von NOX4 nach 14-tägiger Behandlung mit CSE und L-Ascorbat.** Vorangehend wurden die Ergebnisse zur entsprechenden GAPDH normalisiert, anschließend durch einen Kruskal-Wallis-H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. (N=2, n=3). 5 % und 10 % CSE: (N=4, n=3). (\*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

#### 4.8.3 Tendenzieller Anstieg von GPX3 nach vierstündiger Inkubation mit CSE und anschließender Reprimierung nach einem und zwei Tagen

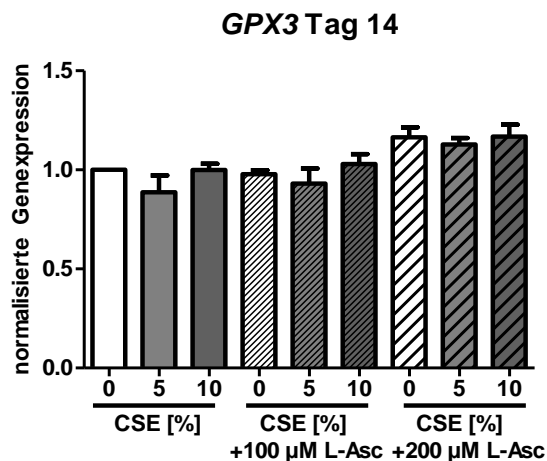
Die Ergebnisse von GPX3 wurden in Abb. 31 dargestellt. In Abbildung (a) konnte nach vier Stunden erstmals ein tendenzieller Anstieg der Genexpressionsveränderung von GPX3 beobachtet werden (hellblaue Linie). Nach einem bis drei Tagen folgte hingegen eine anschließende Reprimierung von GPX3 unter dem Einfluss von hohen Konzentrationen CSE, welche sich im weiteren zeitlichen Verlauf nach 14 Tagen (dunkelblaue Linie) wieder normalisiert hatte. Die Reprimierung war nach einem und zwei Tagen für hohe CSE-Konzentrationen signifikant.



**Abbildung 31.: Expressionsänderung von reguliertem GPX3 in SCP-1-Zellen im Zeitverlauf von einer bis vier Stunden (a) und von einem bis 14 Tagen (b).** Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Genexpression nach vierstündiger Inkubation mit 10 % CSE. Im Zeitraum von einem bis drei Tagen ließ sich hingegen eine Reprimierung von GPX3 unter hohen Konzentrationen CSE erkennen. Die Ergebnisse wurden zur entsprechenden GAPDH normalisiert, anschließend durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. Abb. (a): (N=3, n=1), Abb. (b): (N=3, n=3). (\*  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.8.4 Keine signifikanten Veränderungen der Genexpression von GPX3 nach 14-tägiger Co-Inkubation mit CSE und L-Ascorbat

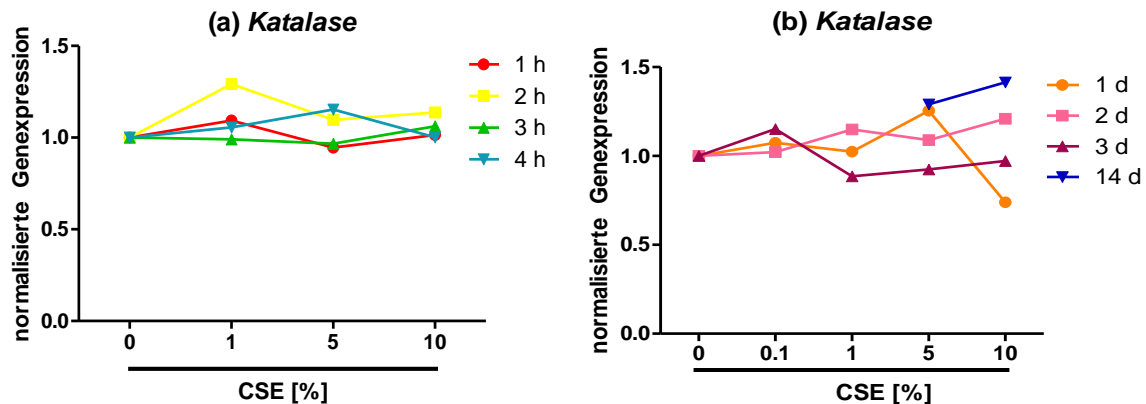
In Abb. 32 wurden die Ergebnisse von GPX3 unter Co-Inkubation präsentiert. Nach einer 14-tägigen Behandlung mit L-Ascorbat und CSE zeigten sich keine auffälligen Veränderungen in der Genexpression.



**Abbildung 32: Änderung der Genexpression von GPX3 nach 14-tägiger Behandlung mit CSE und L-Ascorbat.** Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der Genexpression von GPX3. Vorangehend wurden die Ergebnisse zur entsprechenden GAPDH normalisiert, anschließend durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. (N=3, n=2).

#### 4.8.5 Keine signifikanten Genexpressionsveränderungen der *Katalase* unter CSE im Zeitraum von einer Stunde bis 14 Tagen

Die Ergebnisse der Genexpressionsänderungen von *Katalase* unter CSE-Inkubation wurden in Abb. 33 dargestellt. Über einen Zeitraum von einer Stunde bis zu drei Tagen zeigten sich nur unspezifische Schwankungen in der Genexpression, jedoch keine auffällig-signifikanten Veränderungen. Nach 14-tägiger Behandlung hingegen konnte ein tendenzieller Anstieg unter 5 % und 10 % CSE festgestellt werden.

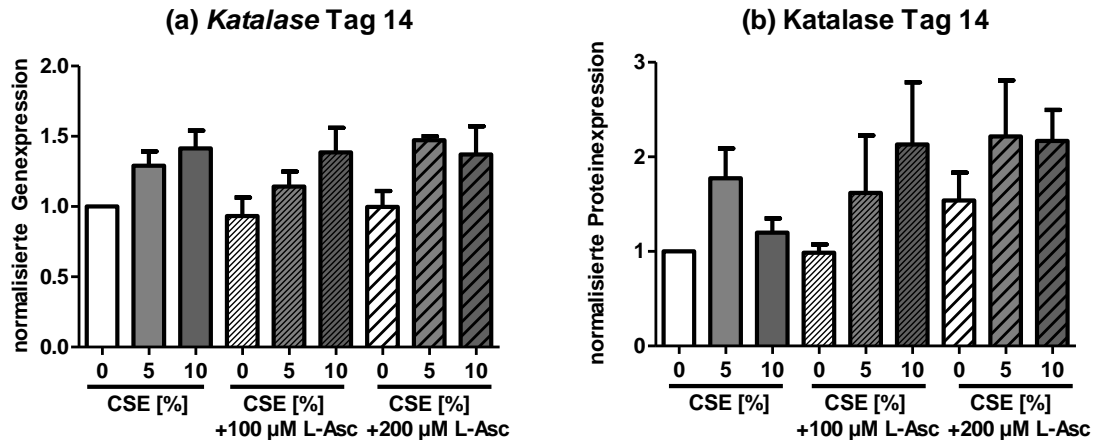


**Abbildung 33: Expressionsänderung von regulierter *Katalase* in SCP-1-Zellen im Zeitverlauf von einer bis vier Stunden (a) und von einem bis 14 Tagen (b).** Es zeigte sich keine spezifische Veränderung der *Katalase* mit unspezifischen Schwankungen über die Zeitperiode. Vorangehend wurden die Ergebnisse zur entsprechenden *GAPDH* normalisiert, anschließend durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. (N=3, n=2).

#### 4.8.6 Hohe Korrelation in der Gen- und Proteinexpression von *Katalase* nach 14 Tagen unter Co-Inkubation mit L-Ascorbat und CSE

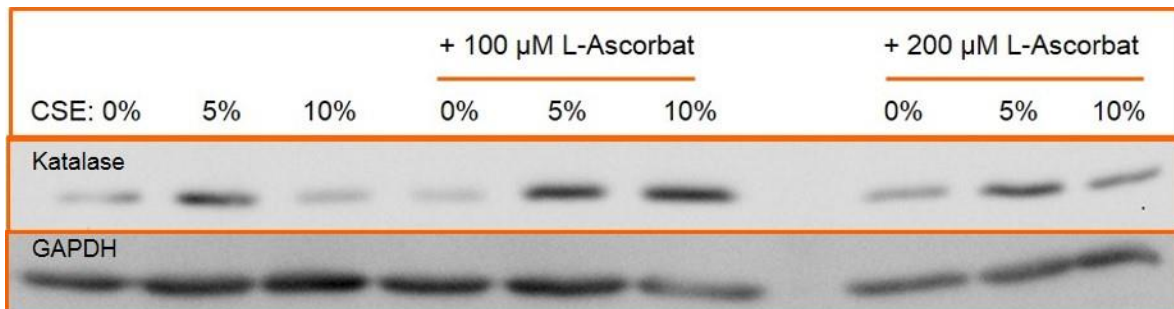
Interessante Ergebnisse zeigte die direkte Gegenüberstellung der Veränderung der Genexpression im Vergleich zur Proteinexpression, welche in Abb. 34 dargestellt wurde. Unter alleiniger CSE-Inkubation ergab sich nach 14-tägiger Behandlung ein tendenzieller Anstieg der Genexpression in (a). Hierzu konnten durch eine Behandlung mit L-Ascorbat keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Diese Ergebnisse können auch in der Proteinexpression in Abbildung (b) beobachtet werden, wenn auch nicht so deutlich. Hier fällt ein auffällig erniedrigter Anstieg bei 10 % CSE ins Auge. Zwischen den beiden Abbildungen lässt sich insgesamt eine hohe Korrelation erkennen aufgrund des überwiegend gleichgerichteten tendenziellen Verlaufs.

Dabei zeigte sich eine leicht erhöhte Regulation in der Stärke der Proteinexpression, allerdings auch mit erhöhten Standardfehlern.



**Abbildung 34: Direkter Vergleich von Änderungen der Gen- und Proteinexpression der Katalase nach 14-tägiger Behandlung mit CSE und L-Ascorbat.** In (a) konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg unter CSE beobachtet werden, welcher sich auch unter Behandlung mit L-Ascorbat nur wenig veränderte. Es besteht außerdem eine hohe Korrelation zu (b) mit auffälligem Abfall der Proteinexpression unter 10 % CSE. Vorangehend wurden die Ergebnisse zur entsprechenden GAPDH normalisiert, anschließend durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. Abb. (a): (N=3, n=2), Abb. (b): (N=3, n=3).

Nachfolgende Abb. 35 eines Western Blots zeigt nochmals die Proteinexpression der Katalase mittels eines repräsentativen Bandenausschnittes, welcher dem in Abb. 34 (b) bekanntem Verlauf nachempfunden ist.



**Abbildung 35: Western Blot von Katalase mit SCP-1-Zellen.** Es wurden 32 µg des Proteinlysates mit Hilfe der SDS-Page (10 %) aufgetrennt. Mit dem monoklonalen Antikörper gegen Katalase konnte anschließend eine Bande im Bereich von 60 kDa auf dem Blot erzeugt werden.

#### 4.8.7 Keine signifikanten Genexpressionsveränderungen von *SOD2* durch CSE

In Abb. 36 wurden die Ergebnisse der Genexpression von *SOD2* dargestellt. In dem Zeitraum über mehrere Stunden (a) konnte beobachtet werden, dass keine signifikanten Abweichungen in der Expression von *SOD2* bestehen. Dieser Trend wurde im Zeitraum zwischen einem und 14 Tagen weiter fortgesetzt (b). Lediglich an Tag 3 gab es vereinzelte, nicht signifikante Schwankungen im Bereich bei 0,1 % und 10 % CSE.

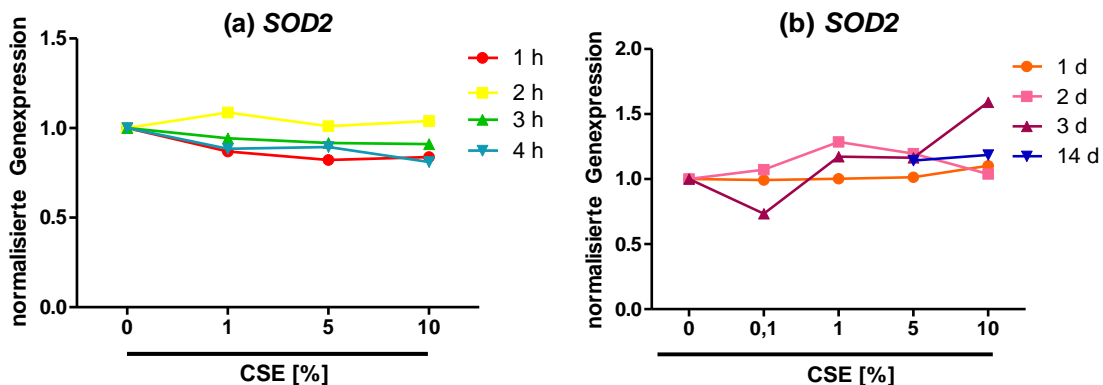


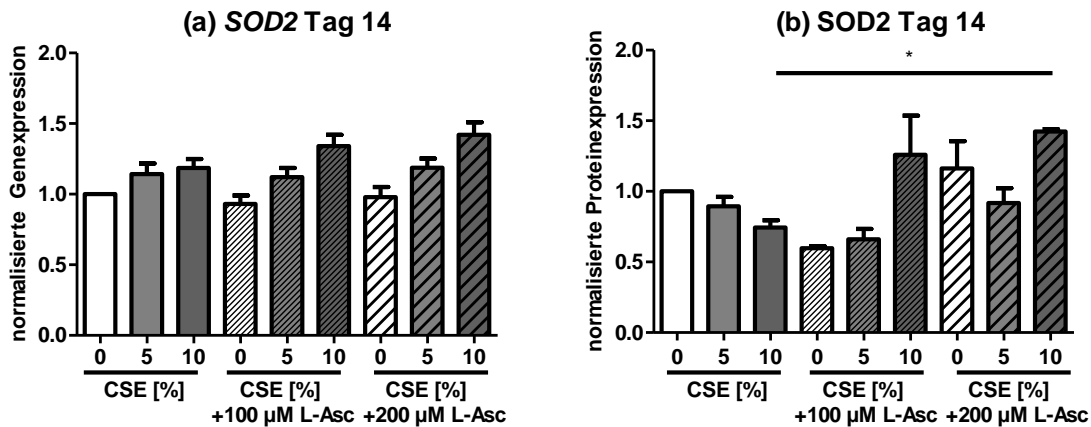
Abbildung 36: Expressionsänderung von regulierter *SOD2* in SCP-1-Zellen im Zeitverlauf von einer bis vier Stunden (a) und von einem bis 14 Tagen (b). Es zeigte sich keine spezifische Veränderung von *SOD2* mit unspezifischen Schwankungen nach 3 Tagen. Vorangehend wurden die Ergebnisse zur entsprechenden *GAPDH* normalisiert, anschließend durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. Abb. (a): (N=2, n=2), Abb. (b): (N=3, n=2).

#### 4.8.8 Unterschiedliche Regulation in der Gen- und Proteinexpression von *SOD2*

In der nachstehenden Abb. 37 finden sich die Ergebnisse der Gen- und Proteinexpression von *SOD2* nach 14-tägiger Behandlung mit L-Ascorbat und CSE. In (a) ist eine tendenzielle Induktion der Genexpression unter 5 % und 10 % CSE erkennbar, welche unter Einwirkung von L-Ascorbat keine signifikanten Veränderungen erfuhr. Auf der Proteinebene (b) kam es unter CSE-Einfluss hingegen zu einer Erniedrigung der mRNA-Level. Auffällig ist weiterhin der markante Anstieg unter Co-Inkubation von 10 % CSE mit 100  $\mu$ M L-Ascorbat, denn schließlich führte die Einzelapplikation der beiden Substanzen jeweils zu einer Reprimierung. Unter 200  $\mu$ M L-Ascorbat wurden wiederum ähnliche Werte wie in der Genexpression gefunden, wenn man



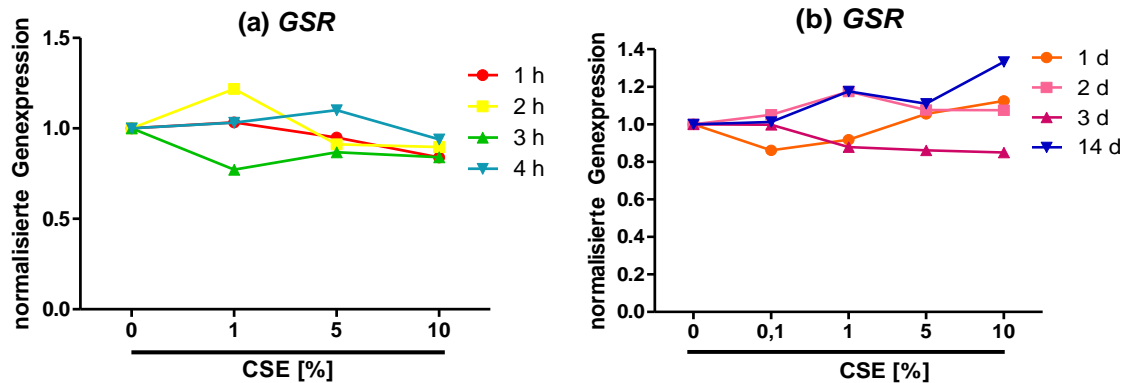
den atypischen Abfall bei Co-Inkubation mit 5 % CSE und 200  $\mu$ M L-Ascorbat außer Betracht lässt. Bei dem vorliegenden Gen konnten somit nur geringe Korrelationen zwischen erhobener Gen- und Proteinexpression gefunden werden.



**Abbildung 37: Direkter Vergleich von Änderungen der Gen- und Proteinexpression von SOD2 nach 14-tägiger Behandlung mit CSE und L-Ascorbat.** In (a) zeigte sich ein Anstieg unter CSE, welcher unter gemeinsamer Gabe mit L-Ascorbat aufrechterhalten blieb. Hingegen gab es starke Abweichungen auf mRNA-Ebene (b) im Vergleich zu (a). Vorangehend wurden die Ergebnisse zur entsprechenden GAPDH normalisiert, anschließend durch einen Kruskal-Wallis Wallis H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. Abb. (a): (N=3, n=2). Abb. (b): (N=2, n=4). (\*  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.8.9 CSE ruft keine signifikanten Expressionsveränderungen in GSR hervor

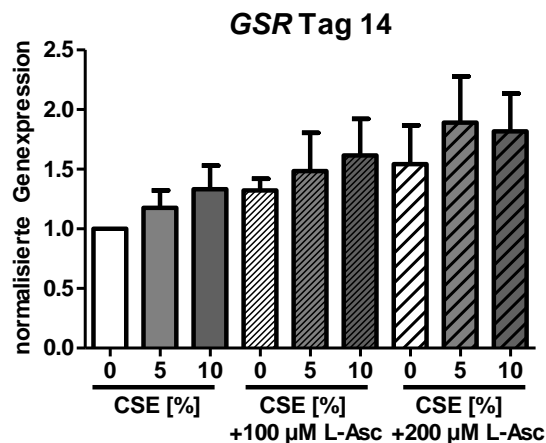
Wie in Abb. 38 ersichtlich wird, konnten durch die Stimulation mit CSE keine nennenswerten Veränderungen in der Genexpression von GSR hervorgerufen werden, welche im Zeitraum von einer Stunde bis 14 Tagen ermittelt wurde. Im Stundenbereich zeigten sich unter 1 % CSE vereinzelte Schwankungen um den Kontrollwert. Erst längerfristig konnte im Tageschart ein tendenzieller Anstieg unter höheren Konzentrationen CSE nach 14 Tagen beobachtet werden.



**Abbildung 38: Expressionsänderung von regulierter GSR in SCP-1-Zellen im Zeitverlauf von einer bis vier Stunden (a) und von einem bis 14 Tagen (b).** Im Stundenverlauf zeigte sich keine spezifische Veränderung von GSR (a) mit tendenziellem Anstieg unter 10 % CSE nach 14 Tagen (b). Vorangehend wurden die Ergebnisse zur entsprechenden GAPDH normalisiert, anschließend durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. (N=2, n=2).

#### 4.8.10 Tendenzieller Anstieg von GSR unter Co-Inkubation von CSE und L-Ascorbat

Nach 14-tägiger Co-Inkubation mit L-Ascorbat und CSE zeichnete sich das in Abb. 39 bezifferte Bild ab: tendenzieller Anstieg der Genexpression unter alleiniger Applikation von L-Ascorbat oder CSE. Die Kombination aus beiden Substanzen führte ebenfalls zu einem nicht-signifikanten Anstieg der Genexpression von GSR.



**Abbildung 39: Änderung der Genexpression von GSR nach 14-tägiger Behandlung mit CSE und L-Ascorbat.** Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger, nicht-signifikanter Anstieg unter Einwirkung von CSE und L-Ascorbat. Vorangehend wurden die Ergebnisse zur entsprechenden GAPDH normalisiert, anschließend durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. (N=2, n=2).

## 4.9 Einfluss von L-Ascorbat auf die Expression weiterer wichtiger Signaltransduktionswege nach 14 Tagen

Von den nachfolgend aufgeführten Signaltransduktionswegen wurde die Proteinexpression mittels Western Blot erhoben.

### 4.9.1 Unterschiedliche Proteinexpression von pNRF2 unter Co-Inkubation von CSE mit verschiedenen Konzentrationen L-Ascorbat

Die von dem redoxsensitiven Transkriptionsfaktor „*nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*“ (NRF2) determinierten Zielgene codieren vorwiegend für antioxidative Enzyme [109]. Daher war eines der Ziele, herauszufinden, welchen Einfluss oxidativer Stress in Form von CSE auf NRF2 ausübt. Hierzu wurde mit Hilfe von Western Blots der Gehalt von pNRF2 analysiert, welcher in Abb. 40 dargestellt wurde. Unter 5 % CSE zeigte sich ein Anstieg auf das 1,5-fache des Ausgangswertes, während unter 10 % CSE das Proteinlevel wieder Werte um den Ausgangspunkt erreichte. Unter dem Einfluss von 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat konnte jeweils ein leichter Anstieg im Vergleich zu 0 % CSE beobachtet werden, der unter Co-Inkubation mit CSE und 100  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat noch stärker zugenommen hat. Unter 200  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat wurde hierzu ein gegensätzliches Ergebnis mit abfallenden Werten unter Co-Inkubation mit 10 % CSE festgestellt.

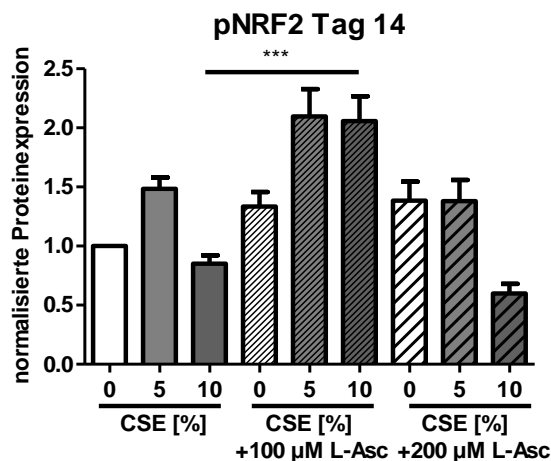
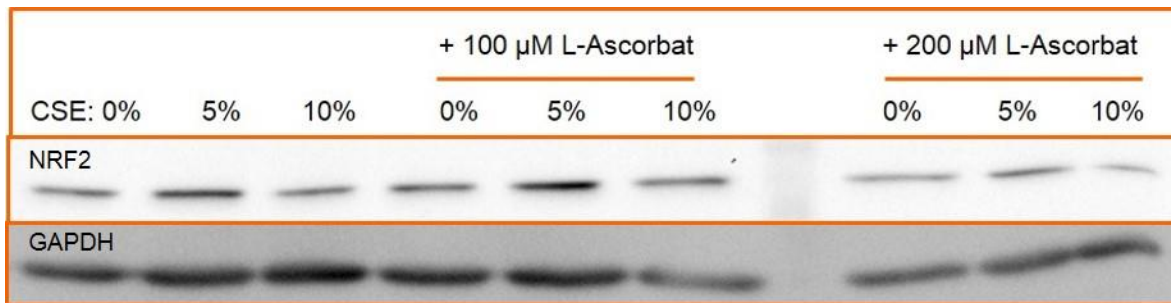


Abbildung 40: Änderung der Proteinexpression von pNRF2 nach 14-tägiger Behandlung mit CSE und L-Ascorbat. Es zeigte sich ein Anstieg bei 5 % CSE mit Egalisierung des Wertes unter 10

% CSE. Die Kombination aus 100  $\mu$ M L-Ascorbat und CSE führte zu einem weiteren Anstieg, während unter Co-Inkubation mit 200  $\mu$ M L-Ascorbat eine Reprimierung beobachtet wurde. Vorangehend wurden die Ergebnisse zur entsprechenden GAPDH normalisiert, anschließend durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. (N=3, n=4). (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

In Abb. 41 wurde nochmals ein repräsentativer Bandenausschnitt eines Western Blots von pNRF2 dargestellt, welcher mit den oben dargestellten Werten korreliert.

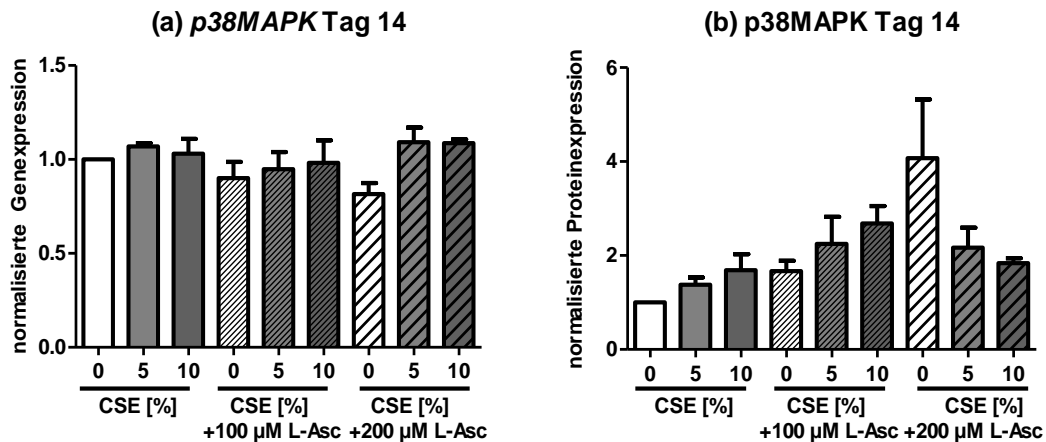


**Abbildung 41: Repräsentativer Western Blot von pNRF2 unter Inkubation mit CSE und L-Ascorbat nach 14-tägiger Behandlung.** Es wurden 32  $\mu$ g des Proteinlysates mit Hilfe der SDS-Page (10 %) aufgetrennt. Mit dem monoklonalen Antikörper gegen pNRF2 konnte anschließend eine Bande im Bereich von 90 kDa auf dem Blot erzeugt werden.

#### 4.9.2 Geringe Korrelation zwischen Gen- und Proteinexpression von p38MAPK

Über den MAPK-Signalweg (mitogen-aktivierte Proteinkinasen) sind Zellen in der Lage, auf schnelle Art und Weise durch eine Kaskade von Phosphorylierungen auf äußere Einflüsse wie Entzündungen, Apoptose und Stress zu reagieren [142]. So üben ROS über diesen Signalweg bspw. Einflüsse auf die Genexpression, das Zellwachstum oder auf die Signaltransduktion aus. Hierdurch können wiederum weitere Transkriptionsfaktoren für die Induktion antioxidativer Enzyme aktiviert werden [75]. In Abb. 42 wurden die Ergebnisse von p38MAPK dargestellt. In (a) fallen nur geringfügige, nicht-signifikante Schwankungen in der Genexpression auf. Hier zeigt sich ein tendenzielles Absinken unter alleiniger Applikation von L-Ascorbat. In der Proteinexpression (b) hingegen ist ein Anstieg unter 5 % und 10 % CSE erkennbar, welcher unter Co-Inkubation mit 100  $\mu$ M L-Ascorbat weiter zunahm. Stark auffällig ist der 4-fache Anstieg unter 200  $\mu$ M L-Ascorbat, welcher allerdings auch einen erhöhten Standardfehler aufweist. Unter Co-Inkubation mit 200  $\mu$ M L-Ascorbat und CSE

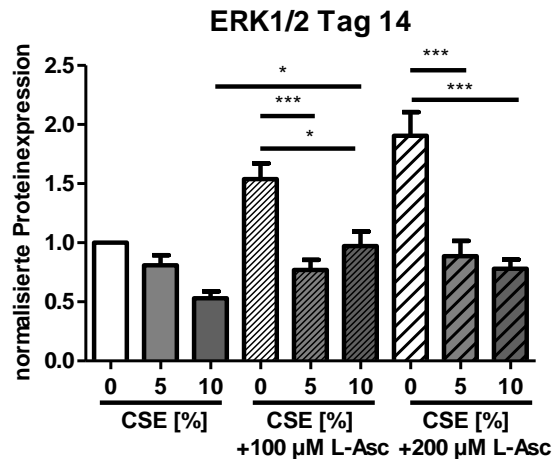
pendelten sich die Werte abschließend wieder leicht erhöht über dem Ausgangsniveau ein.



**Abbildung 42: Direkter Vergleich von Änderungen der Gen- und Proteinexpression von p38MAPK nach 14-tägiger Behandlung mit CSE und L-Ascorbat.** In (a) zeigten sich nur geringfügige Schwankungen in der Genexpression. Hingegen gab es starke Abweichungen auf mRNA-Ebene (b) im Vergleich zu (a) mit einem markanten 4-fachen Anstieg unter 200 µM L-Ascorbat. Vorrangend wurden die Ergebnisse zur entsprechenden GAPDH normalisiert, anschließend durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. (N=3, n=1).

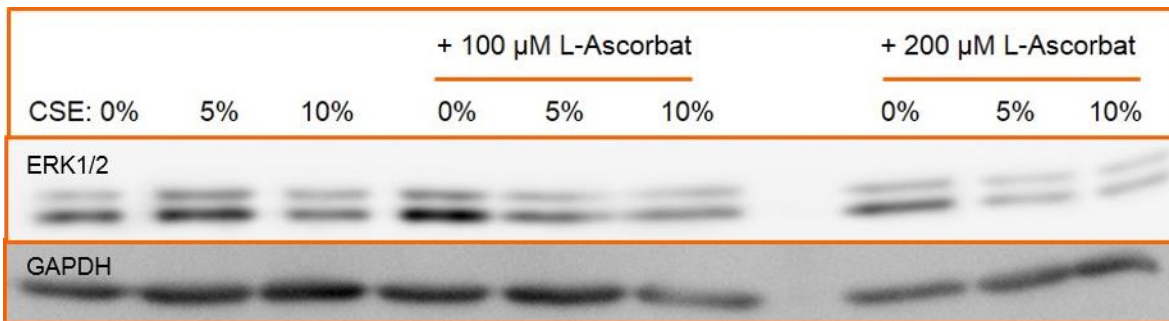
#### 4.9.3 Induktion von ERK1/2 unter singulärer Applikation von L-Ascorbat

Die Proteinexpression von ERK 1/2 ist in Abb. 43 dargestellt. Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Abfall unter Inkubation mit CSE. Eine Behandlung von SCP-1-Zellen mit L-Ascorbat führte hingegen zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg. Unter Co-Inkubation von CSE und L-Ascorbat schwankten die erzielten Werte wiederum um den Kontrollbereich.



**Abbildung 43: Änderung der Proteinexpression von ERK1/2 nach 14-tägiger Behandlung mit CSE und L-Ascorbat.** Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg unter L-Ascorbat, während die Inkubation mit CSE zu einer Reprimierung der Proteinexpression geführt hat. Unter kombinierter Gabe beider Substanzen schwankten die Werte um den Kontrollbereich. Vorangehend wurden die Ergebnisse zur entsprechenden GAPDH normalisiert, anschließend durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und nachfolgend mittels Dunn-Test ausgewertet. (N=3, n=4). (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

In nachfolgender Abb. 44 wurden die in Abb. 43 präsentierten Ergebnisse nochmals mit Hilfe eines Bandenausschnittes eines Western Blots dargestellt.



**Abbildung 44: Repräsentativer Western Blot von ERK1/2 unter Inkubation mit CSE und L-Ascorbat nach 14-tägiger Behandlung.** Es wurden 32 µg des Proteinlysates mit Hilfe der SDS-Page (10 %) aufgetrennt. Mit dem monoklonalen Antikörper gegen ERK 1/2 konnte anschließend eine Doppelbande im Bereich von 42 kDa und 44 kDa auf dem Blot erzeugt werden.

## 5 Diskussion

Es ist allgemein bekannt, dass der menschliche Körper durch die vielzähligen, schädlichen Inhaltsstoffe des Zigarettenrauches vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt ist [143, 144]. Vorangehende Publikationen [2, 64, 75] deuten darauf hin, dass dieser durch Zigarettenrauch verursachte oxidative Stress vor allem durch stabile, wasserlösliche ROS hervorgerufen wird. Diese verteilen sich über den Blutkreislauf im Körper und sind in der Lage, wichtige Organe wie die Lunge, das Herz oder die Knochen zu schädigen [35]. Dabei wurden maßgebende Zusammenhänge zwischen vermehrt anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies und dem Absterben von Osteoblasten gefunden [116, 145, 146]. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die DNA als auch Makromoleküle, Proteine und Lipide durch oxidativen Stress geschädigt werden [147, 148]. Hieraus ergeben sich weitreichende Konsequenzen wie z.B. eine verzögerte oder überschießende Frakturheilung, eine verminderte Knochendichte als auch verlängerte Regenerationszeiten [22].

Das Ziel dieser Dissertation war es, die negativen Auswirkungen des Rauchens auf den Prozess der Frakturheilung unter Berücksichtigung funktioneller Zellparameter und Expressionsveränderungen zu ermitteln. Anschließend wurden SCP-1-Zellen einer gleichzeitigen Behandlung mit CSE und dem Radikalfänger Vitamin C unterworfen, um zu untersuchen, ob sich die schädlichen Folgen des Zigarettenrauchextraktes minimieren lassen. Schlussendlich sollen hierdurch zukünftig eine verbesserte Genesung und ein beschleunigter Heilungsprozess von Frakturen erzielt werden. Eine Schlüsselrolle in der Frakturheilung stellt dabei die früh stattfindende, osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (MSCs) dar [50]. Daher wirft sich die Frage auf, welche langfristigen Konsequenzen durch eine physiologische Exposition mit CSE und Vitamin C an humanen, immortalisierten Stammzellen (SCP-1-Zellen) während der osteogenen Differenzierung hervorgerufen werden.

## 5.1 Einfluss von CSE auf funktionelle Parameter im Prozess der osteogenen Differenzierung

Nicht mit CSE behandelte SCP-1-Zellen dienten einerseits als Kontrolle. Andererseits konnte unter singulärer Exposition mit L-Ascorbat auch dessen singuläre Wirkung auf die Zellen untersucht werden.

Das Konzept dieser Studie basiert auf den Ergebnissen von Ehnert *et al.*, welche die Wirkung verschiedener Antioxidantien, darunter Vitamin C, auf CSE-geschädigte Osteoblasten über einen vierstündigen Zeitraum getestet haben und dabei einen ROS-vermittelten, toxischen Einfluss von CSE auf Osteoblasten nachweisen konnten [113]. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit unseren initialen Zellversuchen an osteogenen Vorläuferzellen (SCP-1) nach 14- bzw. 21-tägiger Behandlung. In diesen konnte eine konzentrationsabhängige, signifikante Beeinträchtigung der Zellviabilität sowie weiterer funktioneller Zellparameter unter Applikation hoher Dosen Zigarettenrauchextrakt (5 % und 10 % CSE) während der osteogenen Differenzierung nachgewiesen werden, welches auf einen induzierten Zelltod von SCP-1-Zellen hindeutet [123]. Weiterhin fand sich eine erniedrigte AP-Aktivität als Zeichen einer verminderten, frühen osteogenen Differenzierung, während die unter CSE herabgesetzte Matrixmineralisierung auf eine verringerte Knochenstabilität hinweist und mit den bekannten klinischen Beobachtungen einer verzögerten Frakturheilung übereinstimmt [149]. So konnten Ueng *et al.* in Versuchen mit Hasen, welche mit CSE behandelt wurden, eine verringerte Knochendichte (BMD) als auch ein herabgesetztes Biegemoment an frakturierten Knochen im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen [150]. Zusätzlich wurde in klinischen Studien beobachtet, dass die intestinale Absorption von Calcium, welches für die Matrixmineralisierung benötigt wird, bei Rauchern signifikant vermindert ist [151].

Die histologische Betrachtung der Zellmigration passt ebenfalls gut zu den bisher gewonnenen Ergebnissen. Unter physiologischen Bedingungen ermöglicht die Zellmigration den Stammzellen, sich aktiv zur verletzten Stelle zu bewegen, wo diese durch Reparatur und Gewebeumstrukturierung aktiv zum Heilungsprozess beitragen



können [152]. Während niedrige Konzentrationen CSE (0,5 %) durchaus in der Lage sein können, die Proliferation und Wundheilung zu beschleunigen [153], zeigte sich unter Inkubation mit hohen Dosen CSE in unseren Versuchen eine konzentrationsabhängige, herabgesetzte Verschlussrate des „Scratches“. Auch in einer Studie mit periodontal-ligamentären Stammzellen (PDLSC) konnte in den Zellen von Rauchern eine herabgesetzte Migration und Proliferation festgestellt werden [154]. Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass CSE in der Lage ist, die Chemotaxis humaner mesenchymaler Stammzellen zu unterdrücken und sowohl proangiogenetische Faktoren und Immunmodulatoren im Prozess der Wundheilung als auch die Produktion von Chemokinen durch Immunzellen zu beeinflussen [153, 155, 156]. Weiterhin kann oxidativer Stress das Zytoskelett und die Zilien von Osteoblasten beschädigen, welche für die Migration von Zellen eine wichtige Bedeutung haben [123, 157, 158]. Es ist vielfach untersucht, dass die Bildung und Ansammlung von ROS eine entscheidende Rolle im Pathomechanismus von Zigarettenrauch spielen und auch der Knochenstoffwechsel durch oxidativen Stress stark beeinflusst wird [64, 145, 159]. In der Tat rufen ROS in Osteoblasten eine Vielzahl verschiedenster Reaktionen hervor, welche von einer verringerten Proliferation und Differenzierung bis hin zur Apoptose reichen können [160]. In unseren Versuchen mit SCP-1-Zellen zeigte sich unter CSE bereits nach 15 Minuten eine konzentrationsabhängige, erhöhte Produktion von ROS, welche wiederum die bekannte, positive Korrelation zwischen oxidativem Stress und dem oben angedeuteten induzierten Zelltod unterstreicht [123]. So ist  $H_2O_2$ , welches zu den stabilsten und in Zigarettenrauch vorkommenden ROS gehört, in hohen Konzentrationen in der Lage, die osteoblastäre Apoptose über das Adaptorprotein p66<sup>Shc</sup> zu induzieren, in dessen Folge die mitochondriale Apoptosekaskade eingeleitet wird [161].

## 5.2 Auswirkungen von L-Ascorbat auf SCP-1-Zellen

Die hier geschilderten Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit einer adäquaten Therapie der durch CSE hervorgerufenen Zellschädigung. Neben der lokalen Blutversorgung spielt auch der Ernährungszustand als einer der wichtigsten Einflussfaktoren eine entscheidende Rolle im Heilungsprozess von verletztem Gewebe, darunter auch die Versorgung mit Vitamin C [162]. Letzteres gilt als gut erforschtes, wasserlösliches Antioxidans, welches unterschiedliche Aufgaben im Prozess der Frakturheilung und auf die verschiedenen Knochenzellen ausübt. In mehreren Studien konnte durch die Zugabe von L-Ascorbat zu Osteoblasten-ähnlichen-Zellen die Ablagerung von extrazellulärer kollagener Matrix gefördert werden [106, 163]. Weiterhin gibt es Berichte darüber, dass L-Ascorbat in der frühen Phase der Osteoklastogenese an der Förderung TRAP-positiver Osteoklasten beteiligt ist, während es in der späten Phase die Apoptose von Osteoklasten beschleunigt [164]. Hieraus wird eine duale Rolle von Vitamin C in der Knochenhomöostase ersichtlich, wobei wir uns auf die Heranreifung von SCP-1-Zellen zu Osteoblasten fokussierten.

Im Toxizitätsversuch mit L-Ascorbat konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen bis 200  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat förderlich und ab 300  $\mu\text{M}$  und höher „toxisch“ auf SCP-1-Zellen wirken. Weitere Forschergruppen kamen zu ähnlichen Ergebnissen [165, 166]. Der Grund für den toxischen Einfluss hoher Konzentrationen L-Ascorbat „*in vitro*“ kann laut einer Studie dadurch zustande kommen, dass durch L-Ascorbat je nach verwendetem Nährmedium unterschiedlich große Mengen an  $\text{H}_2\text{O}_2$  erzeugt werden, welche für die induzierten Zellschäden verantwortlich gemacht werden können [167].

In den anschließenden Versuchen mit dem Antioxidans Vitamin C konnte demonstriert werden, wie sowohl mit physiologischen (100  $\mu\text{M}$ ) als auch pharmakologischen (200  $\mu\text{M}$ ) Konzentrationen L-Ascorbat sowohl die Viabilität, die AP-Aktivität und die Matrixmineralisierung von SCP-1-Zellen unter Co-Inkubation mit CSE im Gegensatz zur singulären Exposition mit CSE verbessert wurde. Neuere Studien aus unserem Labor haben nachgewiesen, dass Zitrusfrüchte am effektivsten unter Prä- und Co-

Inkubation in der Lage sind, Osteoblasten vor den negativen Einflüssen von CSE zu beschützen, weswegen die Versuche mit L-Ascorbat und CSE unter Co-Inkubation durchgeführt wurden [113]. Die unterstützende Rolle von L-Ascorbat im Prozess der osteogenen Differenzierung konnte auch in anderen Zellkulturversuchen mit MC3T3-E1 Zellen und ST2-Zellen bestätigt werden [106, 168]. Auf der anderen Seite zeigten an Skorbut leidende Meerschweinchen, welchen das Enzym L-Gulonolactonoxidase (GULO) zur Synthese von Vitamin C fehlt, eine deutlich verringerte AP-Aktivität sowohl im Knochen als auch im Serum im Gegensatz zur Kontrollgruppe [169].

Auf molekularer Ebene können hohe Dosen Vitamin C die Expression von Typ-X-Kollagen erhöhen, wodurch der Mineralisierungsprozess in der Frakturheilung beschleunigt werden kann [91, 92].

Die genauen Mechanismen, mit welchen L-Ascorbat die CSE-vermittelte Zellschädigung verhindern kann, sind bisher nicht ausreichend verstanden. In den durchgeführten Versuchen mit SCP-1-Zellen konnte jedoch die Menge an produziertem ROS unter Co-Inkubation von CSE und L-Ascorbat bereits nach 15 Minuten erfolgsversprechend vermindert werden und damit auch der dadurch hervorgerufene oxidative Stress. Dieses durch Vitamin C hervorgerufene Resultat in SCP-1-Zellen stimmt auch mit den von Ehnert *et al.* gewonnenen Ergebnissen in Osteoblasten überein [113] und unterstreicht die Tatsache, dass L-Ascorbat durch die im CSE vorkommenden, stabilen und hochreaktiven ROS sehr schnell oxidiert wird [35]. Hierdurch könnte auch erklärt werden, wieso chronische Raucher über niedrigere Plasmaspiegel von Vitamin C verfügen als Nichtraucher und demzufolge eine erhöhte tägliche Einnahme von Vitamin C benötigen (140 mg statt 100 mg) [36]. Dieser Umstand wird oftmals noch dadurch verstärkt, dass Raucher im Allgemeinen eine geringere Vitamin C-Aufnahme aufweisen als Nichtraucher [170].

Die Zellmigration stellt ein wichtiges Charakteristikum der Fraktur- und Wundheilung dar. Hier zeigt sich in unseren Versuchen, dass durch CSE-vermittelter, oxidativer Stress die Wundheilung verzögert, während in Kombination mit 200  $\mu$ M L-Ascorbat

und CSE eine verbesserte Verschlussrate erzielt wurde. Eine geringere Supplementation mit L-Ascorbat (100  $\mu$ M) konnte die SCP-1-Zellen vermutlich nicht ausreichend vor oxidativem Stress beschützen. Fulzele *et al.* fanden heraus, dass oxidativer Stress zu einer verminderten Aktivität des Vitamin-C-Transporters führt, indessen Folge auch weniger Vitamin C in die Zellen aufgenommen wird [171]. So kann vermehrt ROS akkumulieren, sodass die bereitgestellte Menge an L-Ascorbat nicht mehr in der Lage ist, ROS ausreichend zu eliminieren [172].

Sangani *et al.* konnten im Wundheilungassay mit „*Bone marrow stromal cells*“ (BMSC) eine signifikant beschleunigte Migration durch eine Vitamin-C-Supplementation im Vergleich zu Kontrollzellen erzielen [172]. Auch in „*in vivo*“-Versuchen mit Ratten konnten sowohl Yilmaz *et al.* als auch Sarisözen *et al.* feststellen, dass Vitamin C zu einer beschleunigten Frakturheilungsrate beitrug [91, 173]. Giordano *et al.* hingegen konnten keinen Vorteil von Vitamin C als Nahrungsergänzung im Knochenstoffwechsel und der Frakturheilung von Ratten ermitteln und hielten dieses Tiermodell aufgrund der autologen Ascorbatsynthese von Ratten für ungeeignet [174]. Wegen der vielfältigen Methoden zur Untersuchung der Auswirkungen von CSE oder L-Ascorbat auf den Knochenstoffwechsel verwundert es jedoch nicht, dass unterschiedliche Resultate in den berichteten Ergebnissen festgestellt werden können.

### **5.3 Molekulargenetische Auswirkungen von CSE und L-Ascorbat**

Um herauszufinden, ob CSE und Vitamin C einen direkten Einfluss auf die Zellen ausüben oder über indirekte Wege Veränderungen in der Genexpression anregen, galt es anschließend, die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der antioxidativen Enzyme zu untersuchen.

Zunächst fokussierten wir uns auf das in Zellen konstitutiv exprimierte Enzym *NOX4*, da *NOX4*, wie bspw. Mandal *et al.* aufzeigen konnten, eine wichtige Rolle in der osteogenen Differenzierung spielt [175]. Dabei fanden sie an Osteoblastenvorläuferzellen (2T3-Mauszellen) heraus, dass *BMP-2* über die Aktivierung von *NOX4* zu

einer ROS-vermittelten, osteoblastären Zelldifferenzierung führte. Diese sei vorwiegend durch  $H_2O_2$  bedingt und resultiere in dem Anstieg des Enzyms Alkalische Phosphatase. Goettsch *et al.* konnten zeigen, dass *NOX4*<sup>-/-</sup>-Mäuse sowohl eine höhere Knochendichte als auch eine geringere Menge an Osteoklasten und osteoklastären Markern aufwiesen. In Versuchen mit NCSC-Zellen („*neuronal crest stem cells*“) traten diese nach Herunterregulierung von *NOX4*-mRNA in die Apoptose über [176]. An diesen Beispielen wird eine duale Rolle von *NOX4* in der Knochenhomöostase ersichtlich. In unseren SCP-1-Zellen konnte bereits nach mehrtägiger Behandlung mit CSE ein Absinken in der Genexpression von *NOX4* beobachtet werden. Hierdurch ließe sich das beobachtete Absinken in der Alkalischen Phosphatase unter CSE und der einhergehenden verminderten osteogenen Differenzierung in den SCP-1-Zellversuchen erklären. Weiterhin spielen antioxidative Enzyme eine wichtige Rolle in der zellulären Abwehr gegen ROS. Unter Bedingungen des oxidativen Stresses sind Katalase und GPX an der Beseitigung von überschüssigem  $H_2O_2$  beteiligt, während durch SOD die Eliminierung von  $O_2^{\bullet}$  erfolgt [177, 178]. In den durchgeführten SCP-1-Zellversuchen konnten unter Inkubation mit CSE keine veränderten Genexpressionsmuster von *SOD2* als auch *Katalase* im Zeitraum von einer Stunde bis zu drei Tagen festgestellt werden. Yong *et al.* untersuchten die Auswirkungen von Nikotin, einem wichtigen Inhaltsstoff von Zigaretten, auf Osteoblasten. Dabei konnten sie innerhalb von 24 h ein Absinken in der SOD2-Enzymaktivität, nicht jedoch in der Aktivität von Katalase feststellen. In zusätzlich durchgeführten qPCRs und Western Blots konnten jedoch auch Yong *et al.* keine Veränderungen in der Genexpression von *SOD2* und *Katalase* über einen Zeitraum von 24 h erheben [179]. Bei nicht ausreichender SOD-Aktivität kann  $O_2^{\bullet}$  dabei mit NO interagieren und Peroxynitrit bilden. Nachfolgend kann dieses zu, für DNA und Lipiden stark schädlichen, OH- und Stickstoffradikalen ( $NO_2$ ) weiterreagieren [180]. Gilks *et al.* fanden wiederum in den Lungen von CSE-exponierten Ratten einen Anstieg in der Genexpression von *SOD2* innerhalb eines Tages und postulierten, dass dies einen primären Schutzmechanismus gegen oxidativ induzierte Zellschäden darstellen könnte [181].

Einzig *GPX3*, welches an der Umsetzung von  $H_2O_2$  zu Wasser und oxidiertem Glutathion beteiligt ist, zeigte unter vierstündiger Inkubation mit CSE eine tendenzielle Hochregulierung in der Genexpression von SCP-1-Zellen, was auch von Bazzini *et al.* in 16HBE-Zellen („*human bronchial epithelial cell line*“) beobachtet werden konnte [182]. Die reduzierte Form von *GSH* dient *GPX* dabei als Ausgangssubstrat. Dabei ist Zigarettenrauch in der Lage, die intrazellulären *GSH*-Level zu reduzieren [182-184], was wiederum mit dem Anstieg von *GPX3* in Verbindung gebracht werden könnte.

Nach 14-tägiger Inkubation von SCP-1-Zellen erfolgte in der Gegenwart von CSE ein tendenzieller Anstieg in der Genexpression der antioxidativen Enzyme *Katalase* und *SOD2*. Eine zusätzliche Behandlung mit L-Ascorbat führte nach diesem Zeitraum zu keinen zusätzlichen Veränderungen in deren Expressionsverhalten. Dies deutet darauf hin, dass Vitamin C nach einem verlängerten Stresszustand unter CSE (14 Tage) seinen positiven Einfluss vermehrt durch eine Eliminierung von ROS und weniger durch eine Veränderung in der Genexpression geltend machen konnte. Der verzögerte Anstieg in der Genexpression der beiden antioxidativen Enzyme kann zudem Hinweise auf längerfristige Anpassungen an das Zigarettenrauchen liefern. So konnten in klinischen Studien bspw. erhöhte Aktivitäten von *SOD*, *GSH* und *Katalase* in der Gingiva von Rauchern im Gegensatz zu Nichtrauchern beobachtet werden [185].

Diese Erhöhung kann, wie auch die Enzymerhöhung in der ELF („*epithelial lining fluid*“) von Atemwegen, als Abwehrmechanismus dienen, um die langfristig schädlichen Auswirkungen des Rauchen zu begrenzen [186]. Der in SCP-1 festgestellte, tendenzielle Anstieg von *Katalase* nach 14 Tagen unter mehrfacher Stimulation mit 5 % und 10 % CSE kann außerdem einen wichtigen Einfluss auf die Zelldifferenzierung ausüben. Mandal *et al.* zeigten, dass durch die Induktion von *Katalase* die *BMP-2* vermittelte ROS-Produktion und damit die Expression von AP unterdrückt werden konnte [175], wie sie auch unter 5 % und 10 % CSE in unseren Versuchen beobachtet wurde.

Auch *NRF2*, welches in Osteoblasten exprimiert wird und ein wichtiger Regulator zytoprotektiver Enzyme ist, zeigte unter dem Einfluss von CSE und L-Ascorbat Veränderungen in seinem Expressionsverhalten. In SCP-1-Zellen konnte unter 5 % CSE eine Steigerung von *NRF2* erzielt werden, während 10 % CSE keine Veränderungen bewirken konnte. Dieses Ergebnis steht mit „*in vitro*“ und „*in vivo*“-Untersuchungen von Garbin *et al.* im Einklang [187]. In PBMC-Zellen („*peripheral blood mononuclear cells*“) von moderaten Rauchern (10 Zigaretten / d) konnten sie eine erhöhte Expression von *NRF2* im Vergleich zu Nichtrauchern feststellen, nicht jedoch in starken Rauchern, wo der *NRF2*/ARE-Signalweg nicht aktiviert oder sogar unterdrückt wurde. Hierdurch kann mitunter erklärt werden, weshalb starke Raucher nicht aprobat auf längerfristig-einwirkenden, oxidativen Stress reagieren können [188]. Auch konnte in dieser und einer weiteren Studie gezeigt werden, dass Vitamin C in der Lage ist, die Expression von *NRF2* zu unterdrücken [189]. In unseren Ergebnissen zeigte sich unter Einwirkung von L-Ascorbat hingegen ein leichter Anstieg von p*NRF2*, welcher auf eine Interaktion von L-Ascorbat mit dem Repressorprotein Keap1 zurückführbar sein könnte [190]. Hierbei ist vorstellbar, dass Vitamin C bspw. mit Thiolgruppen von Keap1 interagiert, wodurch letzteres nicht mehr an *NRF2* bindet und hierdurch *NRF2* stabilisiert, welches daraufhin in den Nukleus translozieren kann [191]. Hier kann es nun an ARE binden und zur Expression von *NRF2*-determinierten Zielgenen führen. Zusätzlich konnte *SOD1* als wichtiges Zielgen von *NRF2* identifiziert werden, welches die durch CSE hervorgerufene Apoptosekaskade unterdrücken kann [192]. Weiterhin ist bekannt, dass *NRF2* im Prozess der Frakturheilung aktiviert wird. So zeigen *NRF2*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine verzögerte Frakturheilung [193], welche laut Sun *et al.* mit einer Reduktion von *VEGF* einhergeht [194]. Bei noch länger anhaltender CSE-Exposition (16-wöchige Behandlung) konnte in CSE-exponierten Mäusen durch Thirumalai *et al.* ein Absinken in der Enzymaktivität von *SOD*, *Katalase*, *GPX* und Vitamin C-Serumspiegel nachgewiesen werden. Dies ist ein möglicher Hinweis darauf, dass chronische Zigarettenexposition zu einer Adaptation der antioxidativen Enzyme mit vermehrt anfallendem oxidativem Stress führt [195].

ERK1/2 vermittelt wichtige Aufgaben im Bereich der osteoblastären Zelldifferenzierung und des Wachstums [196] [197]. In ATDC5-Zellen (chondroblastäre Zellen) und PDL-Zellen („*periodontal ligament progenitor cells*“) führte die Inkubation mit L-Ascorbat jeweils zu einer Aktivierung von ERK. Umgekehrt bewirkte die Inhibierung von ERK eine Verzögerung in der L-Ascorbat-vermittelten Differenzierung von ATDC5-Zellen und der Matrixmineralisierung von PDL-Zellen [198] [199]. Besonders die Quervernetzung von Kollagen mit Integrinen scheint in der Aktivierung von ERK eine wichtige Rolle zu spielen [200], zumal Vitamin C als wichtiger Co-Faktor in der Biosynthese von Kollagen agiert [201]. Auch in SCP-1-Zellen steigerte L-Ascorbat nach 14-tägiger Inkubation bevorzugt die Proteinexpression von ERK1/2, während unter Exposition mit CSE keine wesentlichen Veränderungen in dessen Proteinexpression festgestellt wurden.

Ebenfalls wurde die Phosphorylierung von *p38MAPK* untersucht, da diese wichtige Aufgaben bei oxidativem Stress, bei der Zelldifferenzierung, in der Migration als auch in der Organisation des Cytoskeletts ausübt [202] [203]. So war es interessant zu sehen, ob eine Induktion von NRF2 durch p38MAPK vermittelt würde. Nach 14 Tagen konnte in SCP-1-Zellen allerdings kein Einfluss in der Genexpression von p38MAPK durch CSE oder L-Ascorbat festgestellt werden. Dies muss jedoch nicht bedeuten, dass p38MAPK nicht an der osteogenen Differenzierung beteiligt ist oder zu einem anderen Zeitpunkt exprimiert werden könnte, wie einschlägige Literatur beweist [204] [205]. Sangani *et al.* konnten bspw. unter dem Einfluss von oxidativem Stress eine Phosphorylierung von p38MAPK im Zeitraum von zwei bis vier Stunden in BMSC-Zellen nachweisen, welche unter Zugabe von L-Ascorbat inhibiert wurde [172]. Auch Guicheux *et al.* erzielten Phosphorylierungen von p38MAPK zu ähnlichen Zeitpunkten [204]. Weiterhin untersuchten Lai und Cheng die Induktion von BMP-2 durch ERK und p38MAPK und fanden durch Genreporter-Assays heraus, dass beide Transkriptionsfaktoren auf unterschiedliche Weise ihren Effekt auf BMP-2 vermitteln [206].

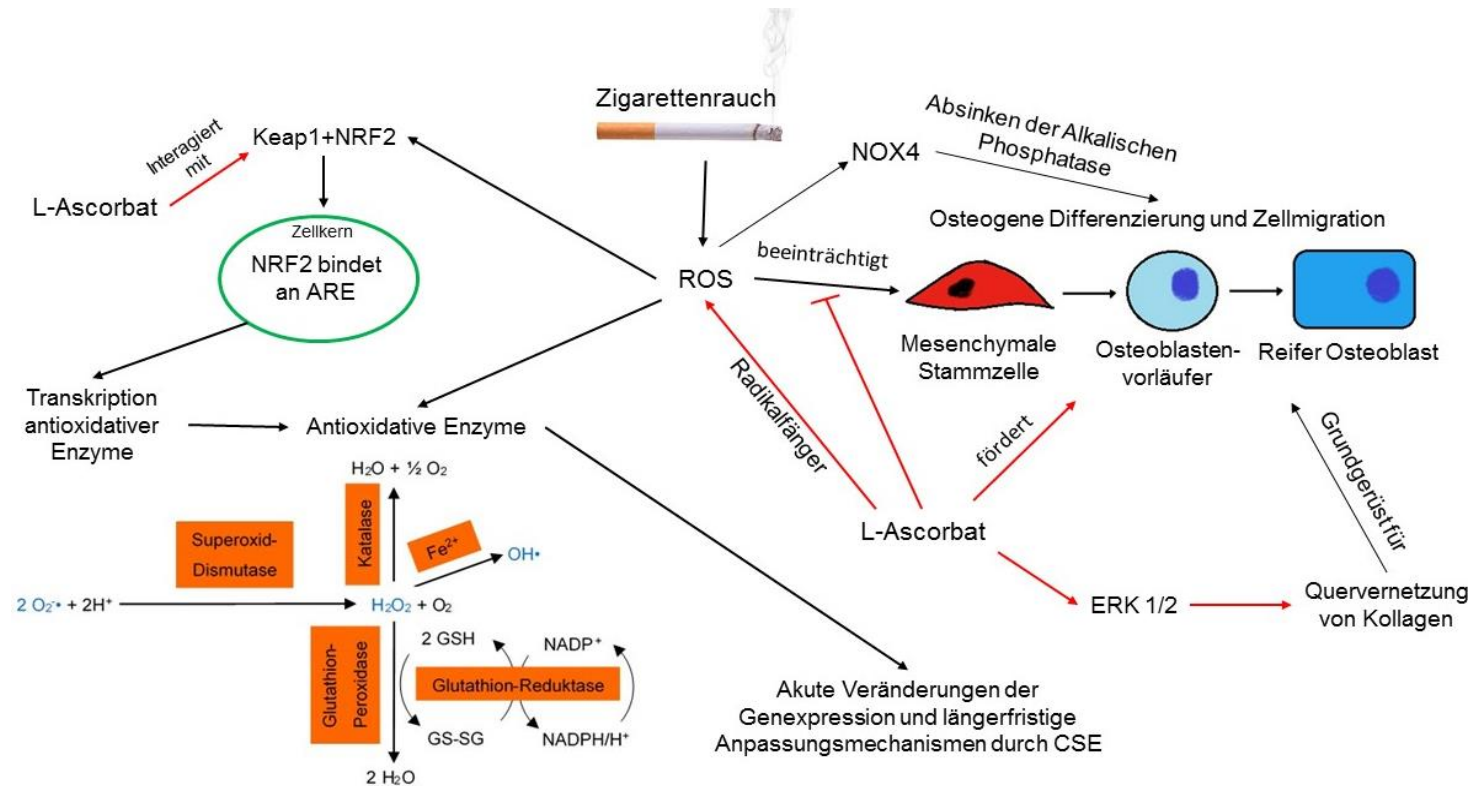
Der scheinbare Widerspruch, dass in der Proteinexpression von p38MAPK in SCP-1 eine starke Erhöhung unter L-Ascorbat resultiert, während keine Veränderungen in



der Genexpression sichtbar sind, ist nicht mit letzter Sicherheit erklärbar. So könnte aufgrund einer Vielzahl an verschiedenen Regulationsmechanismen nicht immer von einer direkten Korrelation zwischen Transkription und Translation ausgegangen werden [207].

## 5.4 Übersicht über die Ergebnisse und die Diskussion

In Abb. 45 wurden nochmals die wichtigsten Ergebnisse und Diskussionspunkte übersichtlich zusammengefasst.



**Abbildung 45: Übersicht der relevanten Ergebnisse und Diskussionspunkte.** L-Ascorbat fördert die osteogene Differenzierung von SCP-1-Zellen und dient als wichtiger Radikalfänger von ROS. Durch CSE hervorgerufener oxidativer Stress ist in der Lage, die osteogene Differenzierung und die Zellmigration zu beeinträchtigen. Außerdem kann ROS eine Dissoziation von NRF2 von Keap1 hervorrufen, wodurch NRF2 anschließend in den Zellkern translozieren kann und dort über die Bindung an ARE zu einer verstärkten Genexpression von antioxidativen Enzymen führt. Die antioxidativen Enzyme SOD2, Katalase, GPX3 und GSR reagieren ihrerseits individuell auf CSE oder L-Ascorbat durch eine akute oder längerfristige Anpassung in ihrer Gen- und Proteinexpression.

## 5.5 Ausblick

Weitere Studien werden notwendig sein, um die tatsächlichen Auswirkungen des Rauchens zu verstehen und eine gewinnbringende Anwendung von Antioxidantien in der Behandlung der Frakturheilung und Rauchern zu etablieren. Dies erfordert Kenntnisse in den komplex abgestimmten Vorgängen der körperlichen Schutzmechanismen gegen Rauchen, welche noch tiefer ergründet werden sollten.

Auch über eine prophylaktische Anwendung von Vitamin C könnte nachgedacht werden. In einer epidemiologischen Studie konnte ein protektiver Effekt von Vitamin C bezüglich der Inzidenz von Hüftfrakturen beobachtet werden [208].

Man darf dabei letztendlich nicht vergessen, dass Vitamin C in ein antioxidatives Schutzsystem integriert ist. Entscheidend für dessen funktionstüchtige Arbeit ist das Zusammenspiel aus den Vitaminen C und E, den Spurenelementen Kupfer, Selen und Mangan sowie dem Mineralstoff Zink [209, 210]. Daher stellt sich die Frage, ob eine klinische Beurteilung durch Applikation der o.g. Substanzen sinnvoller erscheint als die Zufuhr von Einzelsubstanzen.

Die beste Prävention stellt auf langfristige Weise jedoch nach wie vor der Rauchverzicht dar. Mehreren Querschnittsstudien zufolge liegt die Knochenmasse ehemaliger Raucher zwischen den Werten von Personen, die noch nie geraucht haben und denen von Rauchern oder ist denen von Nichtrauchern ähnlich [211-213]. Auch müssen weitere wichtige Einflussgrößen wie das Körpergewicht, die körperliche Aktivität, der Gesundheitsstatus als auch die Knochenqualität berücksichtigt werden, welche die Knochendichte verändern können [214]. Allerdings zählt Rauchen zu den am stärksten abhängig machenden Substanzen und Versuche, das Rauchen zu unterbinden, haben oftmals nur einen eingeschränkten Erfolg [215].

Umso spannender gestalteten sich interessante Forschungsansätze, um die Auswirkungen der schädlichen Inhaltsstoffe des Rauchens auf den menschlichen Körper zu unterbinden. Hier sind z.B. ein schadstoffreduzierender Zigarettenfilter zu erwähnen, welcher mit Vitaminlösungen präpariert werden kann [216]. Große Fortschritte sind auch mit der elektrischen Zigarette errungen worden. Dabei handelt es

sich um ein elektrisch betriebenes Gerät, welches eine Flüssigkeit, auch „*Liquid*“ genannt, über eine Wendel zum Verdampfen bringt [217]. Dieser Dampf wird vom Konsumenten anschließend eingeatmet. Das „*Liquid*“ besteht aus Propylenglykol, Glycerol, destilliertem Wasser, Nikotin und verschiedenen Geschmacksstoffen [218]. Hier ergäbe sich ein möglicher therapeutischer Ansatz, indem man die von Rauchern benötigten Antioxidantien wie Vitamin C direkt zum „*Liquid*“ hinzufügt. Insgesamt deutet die aktuelle Studienlage darauf hin, dass die elektrische Zigarette aufgrund ihrer geringeren schädlichen Auswirkungen einen Vorteil gegenüber herkömmlichen Zigaretten bietet, jedoch müssen auch hier weitere Untersuchungen durchgeführt werden [219, 220].

Vielversprechende Ergebnisse zeigte auch ein bioaktives „*Scaffold*“ von Wang *et al.*, welches mit Ascorbinsäure,  $\beta$ -Glycerophosphat und Dexamethason versetzt und anschließend in präparierte Wunden von Ratten implantiert wurde. Dabei konnten ähnliche Ergebnisse in der osteogenen Differenzierung erzielt werden wie unter „*in vitro*“-Bedingungen [221]. Weitere additive Therapien wie bspw. Knochentransplantationen, der Einsatz von Wachstumsfaktoren oder gepulstem Ultraschall sollten außerdem zur Unterstützung der Frakturheilung in Rauchern erwogen werden [222-224].

## **5.6 Limitationen der Arbeit**

Inhalierter Zigarettenrauch beeinflusst eine Vielzahl der im Körper ablaufenden Mechanismen. Neben seinen Auswirkungen auf Osteoblasten wirkt Rauchen bspw. auch auf Osteoklasten und Immunzellen, welche über die Ausschüttung von Zytokinen ihren Einfluss auf das Knochengewebe geltend machen und wiederum mit den Osteoblasten interagieren können. Des Weiteren ist Zigarettenrauch in der Lage, in verschiedene Regelkreise wie in den calcitropen und in den adrenal-kortikalen Hormonmetabolismus einzugreifen, welche ihrerseits die Knochenresorption fördern [20].

Bezüglich des osteogenen Differenzierungsmediums lässt sich aussagen, dass dieses standardmäßig eine Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat-2-Phosphat enthält. L-Ascorbat-2-Phosphat gilt als stabiles Derivat von L-Ascorbat in Nährmedien. In unseren Versuchen supplementierten wir das Medium jedoch zusätzlich noch mit 100  $\mu\text{M}$  oder 200  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat, wodurch pharmakologische Konzentrationen von L-Ascorbat erreicht wurden. Hier kann durchaus über eine Reduktion der L-Ascorbat-Konzentration nachgedacht werden, um physiologischere Blutkonzentrationen im Bereich bis 60  $\mu\text{M}$  nachempfinden zu können [85, 86]. Auf der anderen Seite zeigten Substitutionen bis 200  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat gute Ergebnisse im Toxizitätstest von SCP-1-Zellen, sodass über eine Erhöhung von L-Ascorbat-2-Phosphat als Nährmedienzusatz nachgedacht werden kann.

Weiterhin kann die Häufigkeit der Applikation von CSE variiert werden, um die Regelmäßigkeit des Rauchvorganges noch getreuer widerzuspiegeln.

Neben der Ermittlung der Genexpression mittels PCR und der Proteinexpression mittels Western Blot kann zusätzlich noch eine Bestimmung der Enzymaktivität zur genaueren Beurteilung des antioxidativen Enzymstatus durchgeführt werden.

Auch in den Ergebnissen des Western Blots muss berücksichtigt werden, dass dieser nur bei Vorhandensein eines Primärantikörpers gegen das gesuchte Zielprotein durchführbar ist. Um bspw. posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen zu detektieren, würden wiederum spezifische Antikörper gegen phosphorylierte Residuen benötigt werden. Die Ergebnisse dieser Dissertation sind durch kleine Stichprobenzahlen begrenzt und sollten in einer größeren Studie sowie in klinischen Versuchen bestätigt werden, welche direkte zeitliche Veränderungen als Reaktion auf das Rauchen der Zigaretten untersuchen.

## 6 Zusammenfassung

Rauchen ist bekannt dafür, zu einem verzögerten Heilungsprozess von Frakturen als auch zu vermehrt auftretenden, postoperativen Komplikationen zu führen. Als einer der Hauptverursacher der zellulären Schädigung gelten im Zigarettenrauch enthaltene reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowie durch dessen Inhaltstoffe induzierte ROS. Durch ein Ungleichgewicht in der Freisetzung von ROS einerseits und einer Abnahme schützender Antioxidantien andererseits wird der menschliche Organismus mit oxidativem Stress belastet. Diese Dissertation beschäftigt sich damit, welche Einflüsse der von Zigarettenrauchextrakt (CSE) hervorgerufene oxidative Stress auf mesenchymale Stammzellen (SCP-1) im Prozess der osteogenen Differenzierung ausübt. Außerdem thematisiert sie, inwiefern Vitamin C ein geeignetes Therapeutikum in der Bekämpfung der von CSE hervorgerufenen ROS darstellt. SCP-1-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen CSE (0 %, 0,1 %, 1 %, 5 % und 10 %) über einen Zeitraum von 21 Tagen inkubiert. Mit Hilfe funktioneller Zellparameter wie dem Resazurinumsatz, der AP-Aktivität, der Matrixmineralisierung, der Zellmigration und der ROS-Produktion konnte unter CSE eine konzentrationsabhängige Beeinträchtigung festgestellt werden. Basierend auf den Vorstufen von Ehnert *et al.* wurden SCP-1-Zellen anschließend unter Co-Inkubation mit CSE und L-Ascorbat über 21 Tage inkubiert und es konnte demonstriert werden, dass Vitamin C die Funktionalität CSE-geschädigter SCP-1-Zellen verbessern kann [113]. Unsere Untersuchungen der Genexpression konnten einen frühen Anstieg von *GPX3* als mögliche Akutreaktion auf CSE identifizieren, während die Erhöhung der antioxidativen Enzyme *SOD2* und *Katalase* nach 14-tägiger Behandlung mit CSE als adaptiver Prozess gewertet werden kann. Nach 14 Tagen konnte Vitamin C nur geringe Veränderungen in der Genexpression hervorrufen, was darauf hindeutet, dass dieses seinen positiven Einfluss vorwiegend durch die Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies zur Geltung bringt. Ebenfalls erfolgte die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NRF2 nur in einem engen, konzentrationsabhängigen Bereich von

CSE. Während ein Absinken von *NOX4* unter CSE in Verbindung mit einer verzögerten Zelldifferenzierung steht, konnte ERK1/2 unter dem Einfluss von L-Ascorbat die Zelldifferenzierung von SCP-1-Zellen beschleunigen, während p38MAPK keine signifikanten Veränderungen aufwies. Das komplexe Zusammenspiel der antioxidativen Enzyme, einschließlich ihrer Dysbalance in der Auf- und Abregulation, sowie weitere kontroverse Ergebnisse deuten darauf hin, dass darüber hinaus zusätzliche Forschung notwendig sein wird, um die zugrundeliegenden Mechanismen von CSE während der Frakturheilung zu verstehen und um entsprechende Gegenmaßnahmen zu entwickeln. Eine ausgewogene Ernährung mit Vitamin C als auch dessen Supplementation scheint dabei eine entsprechend einfache und effektive Maßnahme in der Reduktion von ROS bei Rauchern darzustellen.

## 7 Abstract

Smoking is known to result in a delayed healing process of fractures as well as increased post-operative complications. One of the main causes of cellular damage is delivered by reactive oxygen species (ROS) contained and induced by cigarette smoke. Due to an imbalance in the release of reactive oxygen species (ROS) on the one hand and the reduced capability of sheltering antioxidants on the other hand, the human organism is burdened with a vast amount of oxidative stress. This study investigates the impact of oxidative stress induced by cigarette smoke extract (CSE) on mesenchymal stem cells (SCP-1) in the process of osteogenic differentiation. Additionally it thematises how Vitamin C acts as a suitable therapeutic in the fight against CSE-induced ROS. SCP-1 cells were incubated with various concentrations of CSE (0 %, 0,1 % ,1 %, 5 % and 10 %) over a period of 21 days. Functional cell parameters such as resazurin conversion, AP activity, matrix mineralization, cell migration and ROS production revealed a concentration-dependent impairment under treatment with CSE.

Based on the former findings of Ehnert *et al.* SCP-1 cells were incubated with ascorbate for 21 days and it could be demonstrated, that Vitamin C can improve the functionality of SCP-1 impaired by CSE. Our gene expression studies identified an early increase of *GPX3* as a potential acute response to CSE, while an increase in the antioxidative enzymes *SOD2* and *Catalase* after a 14-day treatment with CSE can be considered as an adaptive process to smoking. After 14 days, Vitamin C revealed little changes in gene expression, suggesting that it exerts its positive influence predominantly through the elimination of reactive oxygen species. Also, activation of the transcription factor NRF2 occurred only in a small concentration-dependent manner of CSE. While a decrease in *NOX4* under CSE is associated with delayed cell differentiation, ERK1/2 beneficially accelerated cell differentiation of SCP-1 cells under the influence of ascorbate. However, p38MAPK did not show significant abnormalities at our selected time points. The complex interaction of antioxidative enzymes, including the dysbalance in up- and downregulation, as well as further controversial



results indicate that further research will be needed to understand the underlying mechanisms of CSE during fracture healing and to develop appropriate counter strategies. A balanced diet with Vitamin C as well as its supplementation seems to represent a correspondingly simple and effective measure in the reduction of ROS in smokers.

## 8 Literaturverzeichnis

1. *Fracture Healing*. Verfügbar unter: <http://vet.uga.edu/ivcvm/courses/vpat5215/musculoskeletal/skl/bones02/healing01.htm>. [abgerufen am 30.04.2018, 16.51 Uhr].
2. Dr. Martina Pötschke-Langer, D.-B.S.K., Dr. Katrin Schaller, Dr. Verena Viariso, Dipl.-Biol., Christopher Heidt, Susanne Schunk, Dr. Ute Mons, Kristin Fode, *Tabakatlas Deutschland 2015*. 2015, Deutsches Krebsforschungszentrum.
3. Reitsma, M.B., et al., *Smoking prevalence and attributable disease burden in 195 countries and territories, 1990–2015: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2015*. *The Lancet*, 2017. **389**(10082): p. 1885-1906.
4. Thakur, J., et al., *Tobacco use: a major risk factor for non communicable diseases in South-East Asia region*. *Indian journal of public health*, 2011. **55**(3): p. 155.
5. Sasco, A., M. Secretan, and K. Straif, *Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence*. *Lung cancer*, 2004. **45**: p. S3-S9.
6. Domagala-Kulawik, J., *Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity*. *J Physiol Pharmacol*, 2008. **59**(Suppl 6): p. 19-34.
7. Benowitz, N.L., *Cigarette smoking and cardiovascular disease: pathophysiology and implications for treatment*. *Progress in cardiovascular diseases*, 2003. **46**(1): p. 91-111.
8. Rodgman, A. and T.A. Perfetti, *The chemical components of tobacco and tobacco smoke*. 2016: CRC press.
9. Benowitz, N.L., J. Hukkanen, and P. Jacob, 3rd, *Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers*. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(192): p. 29-60.
10. Lunell, E., et al., *Site of nicotine absorption from a vapour inhaler–comparison with cigarette smoking*. *European journal of clinical pharmacology*, 2000. **55**(10): p. 737-741.
11. Rose, J.E., et al., *Arterial nicotine kinetics during cigarette smoking and intravenous nicotine administration: implications for addiction*. *Drug & Alcohol Dependence*, 1999. **56**(2): p. 99-107.
12. Gourlay, S.G. and N.L. Benowitz, *Arteriovenous differences in plasma concentration of nicotine and catecholamines and related cardiovascular effects after smoking, nicotine nasal spray, and intravenous nicotine*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1997. **62**(4): p. 453-463.
13. *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease*. 2010: Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Office of Surgeon General.
14. Saha, S.P., D.K. Bhalla, and T.F. Wayne, *Cigarette smoke and adverse health effects: An overview of research trends and future needs*. *International Journal of Angiology*, 2007. **16**(3): p. 77-83.

15. Cohen, A. and O. George, *Animal models of nicotine exposure: relevance to second-hand smoking, electronic cigarette use, and compulsive smoking*. Front Psychiatry, 2013. **4**: p. 41.
16. Singh, J.A., et al., *Current tobacco use is associated with higher rates of implant revision and deep infection after total hip or knee arthroplasty: a prospective cohort study*. BMC Med, 2015. **13**: p. 283.
17. Høidrup, S., et al., *Tobacco smoking and risk of hip fracture in men and women*. International journal of epidemiology, 2000. **29**(2): p. 253-259.
18. Yoon, V., N. Maalouf, and K. Sakhaee, *The effects of smoking on bone metabolism*. Osteoporosis International, 2012. **23**(8): p. 2081-2092.
19. Guo, S.a. and L.A. DiPietro, *Factors affecting wound healing*. Journal of dental research, 2010. **89**(3): p. 219-229.
20. Abrahamsen, B., et al., *A review of lifestyle, smoking and other modifiable risk factors for osteoporotic fractures*. Bonekey Rep, 2014. **3**: p. 574.
21. Niethard, U.F. and J. Pfei, *Duale Reihe Orthopädie*. 2005: Georg Thieme Verlag. 598.
22. R. A. Patel, et al., *The effect of smoking on bone healing*. Bone & Joint Research, 2013. **2 no.6**.
23. Sloan, A., et al., *The effects of smoking on fracture healing*. Surgeon, 2010. **8**(2): p. 111-6.
24. Scolaro, J.A., et al., *Cigarette smoking increases complications following fracture: a systematic review*. J Bone Joint Surg Am, 2014. **96**(8): p. 674-81.
25. Effertz, D.T. and D.V. Viarisio. *Die Kosten des Rauchens in Deutschland*. 2015; Verfügbar unter: [www.dkfz.de/de/tabakkontrolle/Aus\\_der\\_Wissenschaft\\_fuer\\_die\\_Politik.html](http://www.dkfz.de/de/tabakkontrolle/Aus_der_Wissenschaft_fuer_die_Politik.html) . [abgerufen am 30.04.2018, 15.39 Uhr].
26. Ward, K.D. and R.C. Klesges, *A Meta-Analysis of the Effects of Cigarette Smoking on Bone Mineral Density*. Calcif Tissue Int, 2001. **68**(5): p. 259-270.
27. Forrest, C.R., C.Y. Pang, and W.K. Lindsay, *Dose and time effects of nicotine treatment on the capillary blood flow and viability of random pattern skin flaps in the rat*. British journal of plastic surgery, 1987. **40**(3): p. 295-299.
28. Lange, V., et al., *The Association between Bone Quality and Atherosclerosis: Results from Two Large Population-Based Studies*. Int J Endocrinol, 2017. **2017**: p. 3946569.
29. Kharitonov, S.A., et al., *Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide*. American journal of respiratory and critical care medicine, 1995. **152**(2): p. 609-612.
30. Su, Y., et al., *Effect of Cigarette Smoke Extract on Nitric Oxide Synthase in Pulmonary Artery Endothelial Cells*. AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, 1998. **19**.
31. Tura-Ceide, O., et al., *Cigarette smoke challenges bone marrow mesenchymal stem cell capacities in guinea pig*. Respir Res, 2017. **18**(1): p. 50.

32. Qu, Q., et al., *Bidirectional Regulation of Mouse Embryonic Stem Cell Proliferation by Nicotine Is Mediated Through Wnt Signaling Pathway*. Dose Response, 2017. **15**(4): p. 1559325817739760.
33. Daffner, S.D., et al., *Nicotine Increases Osteoblast Activity of Induced Bone Marrow Stromal Cells in a Dose-Dependent Manner: An in vitro Cell Culture Experiment*. Global Spine J, 2012. **2**(3): p. 153-8.
34. Rapuri, P., et al., *Smoking and bone metabolism in elderly women*. Bone, 2000. **27**(3): p. 429-436.
35. PANDA, K., et al., *Vitamin C prevents cigarette smoke induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis*. Free Radical Biology & Medicine, 1999. **27**: p. 1064-1079.
36. Kallner, A., D. Hartmann, and D. Hornig, *On the requirements of ascorbic acid in man: steady-state turnover and body pool in smokers*. The American Journal of Clinical Nutrition, 1981. **34**(7): p. 1347-1355.
37. Bagaitkar, J., D.R. Demuth, and D.A. Scott, *Tobacco use increases susceptibility to bacterial infection*. Tobacco induced diseases, 2008. **4**(1): p. 12.
38. Palmer, R.M., et al., *Mechanisms of action of environmental factors—tobacco smoking*. Journal of clinical periodontology, 2005. **32**: p. 180-195.
39. Stringer, K.A., et al., *Cigarette smoke extract-induced suppression of caspase-3-like activity impairs human neutrophil phagocytosis*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2007. **292**(6): p. L1572-L1579.
40. Thatcher, T.H., et al., *High-dose but not low-dose mainstream cigarette smoke suppresses allergic airway inflammation by inhibiting T cell function*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2008. **295**(3): p. L412-L421.
41. Sopori, M.L., et al., *Cigarette smoke causes inhibition of the immune response to intratracheally administered antigens*. Toxicology and applied pharmacology, 1989. **97**(3): p. 489-499.
42. Huttunen, R., T. Heikkinen, and J. Syrjänen, *Smoking and the outcome of infection*. Journal of internal medicine, 2011. **269**(3): p. 258-269.
43. Qiu, F., et al., *Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down?* Oncotarget, 2017. **8**(1): p. 268.
44. Hadjidakis, D.J. and I.I. Androulakis, *Bone remodeling*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. **1092**(1): p. 385-396.
45. Tanaka, Y., S. Nakayamada, and Y. Okada, *Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation*. Current Drug Targets-Inflammation & Allergy, 2005. **4**(3): p. 325-328.
46. Marsell, R. and T.A. Einhorn, *The biology of fracture healing*. Injury, 2011. **42**(6): p. 551-5.
47. Lopez, M.J. and M.D. Markel, *Bone biology and fracture healing*, in *Equine Surgery (Fourth Edition)*. 2012, Elsevier. p. 1025-1040.

48. Kolar, P., et al., *The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing*. Tissue Engineering Part B: Reviews, 2010. **16**(4): p. 427-434.
49. Fassbender, M., et al., *Stimulation of bone healing by sustained bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) delivery*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(5): p. 8539-52.
50. Wang, X., et al., *Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review*. Int Orthop, 2013. **37**(12): p. 2491-8.
51. Loi, F., et al., *Inflammation, fracture and bone repair*. Bone, 2016. **86**: p. 119-30.
52. Harada, S.-i. and G.A. Rodan, *Control of osteoblast function and regulation of bone mass*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 349.
53. Lüllmann-Rauch, R. and F. Paulsen, *Taschenlehrbuch Histologie*. 2012: Georg Thieme Verlag.
54. El-Zawawy, H.B., et al., *Smoking delays chondrogenesis in a mouse model of closed tibial fracture healing*. J Orthop Res, 2006. **24**(12): p. 2150-8.
55. *Division of Histology: Knochengewebe, Lamellenknochen*. Verfügbar unter: <http://www.unifr.ch/anatomy/elearning/de/stuetzgewebe/knochen/aufbau/d-aufbau.php>. [abgerufen am 30.04.2018, 17.09 Uhr].
56. Mortaz, E., et al., *Effect of cigarette smoke extract on dendritic cells and their impact on T-cell proliferation*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4946.
57. Giorgetti, A.P.O., et al., *Cigarette smoke inhalation modulates gene expression in sites of bone healing: a study in rats*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics, 2010. **110**(4): p. 447-452.
58. César-Neto, J., et al., *Smoking modulates interleukin-6: interleukin-10 and RANKL: osteoprotegerin ratios in the periodontal tissues*. Journal of periodontal research, 2007. **42**(2): p. 184-191.
59. Huang, M.-F., W.-L. Lin, and Y.-C. Ma, *A study of reactive oxygen species in mainstream of cigarette*. Indoor air, 2005. **15**(2): p. 135-140.
60. Turrens, J.F., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol, 2003. **552**(Pt 2): p. 335-44.
61. Lenaz, G., *The Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species: Mechanisms and Implications in Human Pathology*. Life, 2001: p. 159-164.
62. Jaimes, E.A., C. Sweeney, and L. Raij, *Effects of the Reactive Oxygen Species Hydrogen Peroxide and Hypochlorite on Endothelial Nitric Oxide Production*. Hypertension, 2001.
63. Orosz, Z., et al., *Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD (P) H oxidase activation*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2007. **292**(1): p. H130-H139.
64. Valavanidis, A., T. Vlachogianni, and K. Fiotakis, *Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects*

- with other respirable particles*. Int J Environ Res Public Health, 2009. **6**(2): p. 445-62.
65. Finkel, T., *Signal transduction by reactive oxygen species*. J Cell Biol, 2011. **194**(1): p. 7-15.
  66. Liou, G.Y. and P. Storz, *Reactive oxygen species in cancer*. Free Radic Res, 2010. **44**(5): p. 479-96.
  67. Carol, R.J. and L. Dolan, *The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs*. J Exp Bot, 2006. **57**(8): p. 1829-34.
  68. Sies, H., *Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine*. Redox Biol, 2015. **4**: p. 180-3.
  69. Stark, G., *Functional consequences of oxidative membrane damage*. The Journal of membrane biology, 2005. **205**(1): p. 1-16.
  70. Barrera, G., *Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy*. ISRN Oncol, 2012. **2012**: p. 137289.
  71. Filaire, E. and H. Toumi, *Reactive oxygen species and exercise on bone metabolism: friend or enemy?* Joint Bone Spine, 2012. **79**(4): p. 341-346.
  72. Yamaguchi, Y., et al., *Dimethyl fumarate inhibits osteoclasts via attenuation of reactive oxygen species signalling by augmented antioxidation*. Journal of cellular and molecular medicine, 2018. **22**(2): p. 1138-1147.
  73. Schmidt, R.F., F. Lang, and M. Heckmann, *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. 2011: Springer-Verlag.
  74. Ighodaro, O.M. and O.A. Akinloye, *First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid*. Alexandria Journal of Medicine, 2017.
  75. Birben, E., et al., *Oxidative Stress and Antioxidant Defense*. Worl Allergy Organization Journal, 2012: p. 9-19.
  76. Perry, J.J., et al., *The structural biochemistry of the superoxide dismutases*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(2): p. 245-62.
  77. McCord, J.M. and M.A. Edeas, *SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision*. 2005, Elsevier.
  78. Lloyd, R.V., P.M. Hanna, and R.P. Mason, *The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction*. Free radical biology and medicine, 1997. **22**(5): p. 885-888.
  79. Rubin, R., D.S. Strayer, and E. Rubin, *Rubin's pathology: clinicopathologic foundations of medicine*. 2008: Lippincott Williams & Wilkins.
  80. Wu, G., et al., *Glutathione metabolism and its implications for health*. The Journal of nutrition, 2004. **134**(3): p. 489-492.
  81. Gabbay, K.H., et al., *Ascorbate synthesis pathway: dual role of ascorbate in bone homeostasis*. J Biol Chem, 2010. **285**(25): p. 19510-20.
  82. *Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., Vitamin C*. 29.04.2018, 15.59 Uhr]; Verfügbar unter: <https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/vitamin-c/>. [abgerufen am 29.04.2018, 15.59 Uhr].

83. Naidu, K.A., *Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview*. Nutrition Journal, 2003. **2**(1): p. 7.
84. Savini, I., et al., *SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake*. Amino acids, 2008. **34**(3): p. 347-355.
85. Carr, A.C., et al., *Marginal Ascorbate Status (Hypovitaminosis C) Results in an Attenuated Response to Vitamin C Supplementation*. Nutrients, 2016. **8**(6).
86. Padayatty, S.J. and M. Levine, *New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C*. Canadian Medical Association Journal, 2001. **164**(3): p. 353-355.
87. Padayatty, S.J., et al., *Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use*. Annals of internal medicine, 2004. **140**(7): p. 533-537.
88. Lee, Y.C., et al., *Mitochondrial GLUT10 facilitates dehydroascorbic acid import and protects cells against oxidative stress: mechanistic insight into arterial tortuosity syndrome*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(19): p. 3721-33.
89. Bergsten, P., et al., *Millimolar concentrations of ascorbic acid in purified human mononuclear leukocytes. Depletion and reaccumulation*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(5): p. 2584-2587.
90. Aghajanian, P., et al., *The Roles and Mechanisms of Actions of Vitamin C in Bone: New Developments*. J Bone Miner Res, 2015. **30**(11): p. 1945-55.
91. Yilmaz, C., et al., *The contribution of vitamin C to healing of experimental fractures*. Archives of orthopaedic and trauma surgery, 2001. **121**(7): p. 426-428.
92. BRADDOCK, R., et al., *Gamma-Linoleic Acid and Ascorbate Improves Skeletal Ossification in Offspring of Diabetic Rats*. PEDIATRIC RESEARCH, 2002. **51**(5): p. 647-652.
93. Halliwell, B., J.M. Gutteridge, and C.E. Cross, *Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?* The Journal of laboratory and clinical medicine, 1992. **119**(6): p. 598-620.
94. Schünke, G., D. Kuhlmann, and W. Lau, *Orthomolekulare Medizin; Vitamine, Mineralstoffe, Spurenelemente*. 1997.
95. Siems, W., K. Krämer, and T. Grune, *Oxidativer Stress und Pharmaka*. 2005.
96. Könneker, P.D.C. *Ascorbinsäure*. [cited 2018 01.05.2018, 00.01 Uhr]; Verfügbar unter: <http://www.spektrum.de/lexikon/ernaehrung/ascorbinsaure/754>. [abgerufen am 01.05.2018, 00.01 Uhr];
97. Chan, A.C., *Partners in defense, vitamin E and vitamin C*. Canadian journal of physiology and pharmacology, 1993. **71**(9): p. 725-731.
98. Turan, B., B. Can, and E. Delilbasi, *Selenium combined with vitamin E and vitamin C restores structural alterations of bones in heparin-induced osteoporosis*. Clinical rheumatology, 2003. **22**(6): p. 432-436.
99. May, J.M., *Vitamin C transport and its role in the central nervous system*, in *Water Soluble Vitamins*. 2012, Springer. p. 85-103.

100. Catani, M.V., et al., *Biological role of vitamin C in keratinocytes*. Nutrition reviews, 2005. **63**(3): p. 81-90.
101. Urban, K., et al., *An in vitro study of osteoblast vitality influenced by the vitamins C and E*. Head Face Med, 2012. **8**: p. 25.
102. Niki, E., et al., *Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene*. The American journal of clinical nutrition, 1995. **62**(6): p. 1322S-1326S.
103. Hallberg, L., M. Brune, and L. Rossander, *The role of vitamin C in iron absorption*. International journal for vitamin and nutrition research. Supplement= Internationale Zeitschrift fur Vitamin-und Ernährungsforschung. Supplement, 1989. **30**: p. 103-108.
104. Chakraborty, A., et al., *Antioxidant and pro-oxidant activity of Vitamin C in oral environment*. Indian Journal of Dental Research, 2014. **25**(4): p. 499.
105. Hadzir, S.N., et al., *Ascorbic acid induces osteoblast differentiation of human suspension mononuclear cells*. Cytotherapy, 2014. **16**(5): p. 674-682.
106. Franceschi, R.T., B.S. Iyer, and Y. Cui, *Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells*. Journal of Bone and Mineral Research, 1994. **9**(6): p. 843-854.
107. Mohan, S., et al., *Spontaneous fractures in the mouse mutant sfx are caused by deletion of the gulonolactone oxidase gene, causing vitamin C deficiency*. Journal of Bone and Mineral Research, 2005. **20**(9): p. 1597-1610.
108. Buttery, L., et al., *Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells*. Tissue engineering, 2001. **7**(1): p. 89-99.
109. Nguyen, T., P. Nioi, and C.B. Pickett, *The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress*. J Biol Chem, 2009. **284**(20): p. 13291-5.
110. Yamamoto, T., et al., *Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity*. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(8): p. 2758-2770.
111. Itoh, K., et al., *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements*. Biochemical and biophysical research communications, 1997. **236**(2): p. 313-322.
112. Rana, T., et al., *Loss of Nrf2 accelerates ionizing radiation-induced bone loss by upregulating RANKL*. Free Radical Biology and Medicine, 2012. **53**(12): p. 2298-2307.
113. Ehnert, S., et al., *N-acetylcysteine and flavonoid rich diet: The protective effect of 15 different antioxidants on cigarette smoke-damaged primary human osteoblasts*. Advances in Bioscience and Biotechnology, 2012. **03**(08): p. 1129-1139.
114. Böcker, W., et al., *Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer*. Journal of cellular and molecular medicine, 2008. **12**(4): p. 1347-1359.



115. Wagner, E.R., et al., *Defective osteogenic differentiation in the development of osteosarcoma*. Sarcoma, 2011. **2011**.
116. Braun, K.F., et al., *Quercetin protects primary human osteoblasts exposed to cigarette smoke through activation of the antioxidative enzymes HO-1 and SOD-1*. ScientificWorldJournal, 2011. **11**: p. 2348-57.
117. Strober, W., *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Current protocols in immunology, 1997. **21**(1): p. A. 3B. 1-A. 3B. 2.
118. *Zählkammern*. Verfügbar unter: <http://www.marienfeld-superior.com/zaehlkammern-1849.html>. [abgerufen am 01.05.2018, 20.42 Uhr];
119. Gutzeit, P.H.O., D.S. Richter, and Y. Henker. *Entwicklungs- und Zellbiologie*. 2013; Verfügbar unter: <http://docplayer.org/45499126-Entwicklungs-und-zellbiologie.html>. [abgerufen am 30.04.2018, 20.45 Uhr];
120. O'brien, J., et al., *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. The FEBS Journal, 2000. **267**(17): p. 5421-5426.
121. McMillian, M., et al., *An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells*. Cell biology and toxicology, 2002. **18**(3): p. 157-173.
122. Ehnert, S., et al., *Distinct Gene Expression Patterns Defining Human Osteoblasts' Response to BMP2 Treatment: Is the Therapeutic Success All a Matter of Timing?* European Surgical Research, 2016. **57**(3-4): p. 197-210.
123. Aspera-Werz, R., et al., *Resveratrol protects primary cilia integrity of human mesenchymal stem cells from cigarette smoke to improve osteogenic differentiation in vitro*. Archives of toxicology, 2017: p. 1-14.
124. Millan, J.L., *Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 335-41.
125. Ehnert, S., et al., *TGF- $\beta$ 1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation*. PloS one, 2010. **5**(11): p. e14073.
126. Vichai, V. and K. Kirtikara, *Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening*. Nature Protocols, 2006. **1**: p. 1112.
127. Skehan, P., et al., *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 1990. **82**(13): p. 1107-1112.
128. Paul, H., A.J. Reginato, and H. Ralph Schumacher, *Alizarin red S staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid*. Arthritis & Rheumatology, 1983. **26**(2): p. 191-200.
129. Sheehan, D.C. and B.B. Hrapchak, *Theory and Practice of Histotechnology*. 2 ed. 1980: Mosby, Incorporated.
130. Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. Nat Protoc, 2007. **2**(2): p. 329-33.

131. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Analytical biochemistry, 1987. **162**(1): p. 156-159.
132. *LVis Plate*. 2018; Verfügbar unter: <https://www.bmglabtech.com/de/lvis-plate/>. [abgerufen am 02.05.2018, 13.34 Uhr];
133. Inc., T.S. *Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit*. 2013; Verfügbar unter: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012716\\_RevertAid\\_FirstStrand\\_cDNA\\_Syn\\_K1622\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012716_RevertAid_FirstStrand_cDNA_Syn_K1622_UG.pdf). [abgerufen am 02.05.2018, 13.40 Uhr];
134. Garibyan, L. and N. Avashia, *Polymerase chain reaction*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(3): p. 1-4.
135. Johansson, B., *Agarose gel electrophoresis*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 1972. **29**(sup124): p. 7-19.
136. Ghosh, R., J.E. Gilda, and A.V. Gomes, *The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots*. Expert Rev Proteomics, 2014. **11**(5): p. 549-60.
137. Peterson, G.L., *A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable*. Analytical biochemistry, 1977. **83**(2): p. 346-356.
138. Al-Tubuly, A.A., *SDS-PAGE and western blotting*, in *Diagnostic and Therapeutic Antibodies*. 2000, Springer. p. 391-405.
139. Goldman, A., S. Harper, and D.W. Speicher, *Detection of proteins on blot membranes*. Current protocols in protein science, 2016. **86**(1): p. 10.8. 1-10.8. 11.
140. Mruk, D.D. and C.Y. Cheng, *Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: An inexpensive alternative to commercially available kits*. Spermatogenesis, 2011. **1**(2): p. 121-122.
141. Lobo, V., et al., *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health*. Pharmacognosy reviews, 2010. **4**(8): p. 118.
142. Rodriguez-Carballo, E., B. Gamez, and F. Ventura, *p38 MAPK Signaling in Osteoblast Differentiation*. Front Cell Dev Biol, 2016. **4**: p. 40.
143. Donohue, J.F., *Ageing, smoking and oxidative stress*. Thorax, 2006. **61**(6): p. 461-2.
144. van der Vaart, H., et al., *Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review*. Thorax, 2004. **59**(8): p. 713-21.
145. Holzer, N., et al., *Green tea protects human osteoblasts from cigarette smoke-induced injury: possible clinical implication*. Langenbecks Arch Surg, 2012. **397**(3): p. 467-74.
146. Ehnert, S., et al., *Diallyl-disulphide is the effective ingredient of garlic oil that protects primary human osteoblasts from damage due to cigarette smoke*. Food chemistry, 2012. **132**(2): p. 724-729.
147. Glasauer, A. and N.S. Chandel, *Ros*. Curr Biol, 2013. **23**(3): p. R100-2.
148. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.

149. Kostenuik, P. and F.M. Mirza, *Fracture healing physiology and the quest for therapies for delayed healing and nonunion*. J Orthop Res, 2017. **35**(2): p. 213-223.
150. Ueng, S., et al., *Bone Healing of Tibial Lengthening Is Delayed by Cigarette Smoking: Study of Bone Mineral Density and Torsional Strength on Rabbits* The Journal of Trauma 1999. **46** (1): p. 110-115.
151. Krall, E.A. and B. DAWSON-HUGHES, *Smoking Increases Bone Loss and Decreases Intestinal Calcium Absorption*. JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, 1999. **14**, **2**.
152. Gibon, E., et al., *MC3T3-E1 osteoprogenitor cells migrate systemically to a bone defect and enhance bone healing*. 2012.
153. Wahl, E.A., et al., *Acute stimulation of mesenchymal stem cells with cigarette smoke extract affects their migration, differentiation, and paracrine potential*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 22957.
154. Ng, T.K., et al., *Cigarette smoking hinders human periodontal ligament-derived stem cell proliferation, migration and differentiation potentials*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 7828.
155. Liu, X., et al., *Cigarette smoke extract inhibits chemotaxis and collagen gel contraction mediated by human bone marrow osteoprogenitor cells and osteoblast-like cells*. Osteoporosis international, 2003. **14**(3): p. 235-242.
156. Mortaz, E., et al., *Cigarette smoke stimulates the production of chemokines in mast cells*. Journal of Leukocyte Biology, 2008. **83**(3): p. 575-580.
157. Temiyasathit, S. and C.R. Jacobs, *Osteocyte primary cilium and its role in bone mechanotransduction*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1192**: p. 422-8.
158. Xiao, Z.S. and L.D. Quarles, *Role of the polycystin-primary cilia complex in bone development and mechanosensing*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1192**: p. 410-21.
159. Murray, D.R., *The role of smoking in the progressive decline of the body's major systems*. 2014, Public Health England.
160. Domazetovic, V., et al., *Oxidative stress in bone remodeling role of antioxidants*. Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism, 2017. **14** (2): p. 209-216.
161. Armstrong, D. and R.D. Stratton, *Oxidative Stress and Antioxidant Protection: The Science of Free Radical Biology and Disease*. 2016, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
162. MacKay, D. and A.L. Miller, *Nutritional Support for Wound Healing*. Alternative Medicine Review, 2003. **8**(4): p. 359-377.
163. Xing, W., S. Pourteymoor, and S. Mohan, *Ascorbic acid regulates osterix expression in osteoblasts by activation of prolyl hydroxylase and ubiquitination-mediated proteosomal degradation pathway*. Physiological genomics, 2011. **43**(12): p. 749-757.
164. OTSUKA, E., et al., *Role of Ascorbic Acid in the Osteoclast Formation: Induction of Osteoclast Differentiation Factor with Formation of the Extracellular Collagen Matrix*. 2000. **141**(8): p. 3006-3011.

165. Urban, K., et al., *An in vitro study of osteoblast vitality influenced by the vitamins C and E*. HEAD & FACE MEDICINE, 2012. **8:25**: p. 1-10.
166. Sakagami, H., et al., *Apoptosis-inducing activity of vitamin C and vitamin K*. Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France), 2000. **46(1)**: p. 129-143.
167. Clément, M.-V., et al., *The in vitro cytotoxicity of ascorbate depends on the culture medium used to perform the assay and involves hydrogen peroxide*. Antioxidants and redox signaling, 2001. **3(1)**: p. 157-163.
168. Otsuka, E., et al., *Characterization of osteoblastic differentiation of stromal cell line ST2 that is induced by ascorbic acid*. American Journal of Physiology, 1999: p. 132-138.
169. Gould, B.S. and H. Shwachman, *Bone and tissue phosphatase in experimental scurvy and studies on the source of serum phosphatase*. American Journal of Physiology-Legacy Content, 1941. **135(2)**: p. 485-491.
170. SCHECTMAN, G., J.C. BYRD, and H.W. GRUCHOW, *The Influence of Smoking on Vitamin C Status in Adults*. American Journal of Public Health, 1989. **79(2)**.
171. Fulzele, S., et al., *Sodium-dependent vitamin C transporter SVCT2: expression and function in bone marrow stromal cells and in osteogenesis*. Stem Cell Res, 2013. **10(1)**: p. 36-47.
172. Sangani, R., et al., *Knockdown of SVCT2 impairs in-vitro cell attachment, migration and wound healing in bone marrow stromal cells*. Stem Cell Res, 2014. **12(2)**: p. 354-63.
173. Sarisözen, B., et al., *The effects of vitamins E and C on fracture healing in rats*. Journal of international medical research, 2002. **30(3)**: p. 309-313.
174. Giordano, V., et al., *Supplementary vitamin C does not accelerate bone healing in a rat tibia fracture model*. Acta Ortopedica Brasileira, 2012. **20**: p. 1-12.
175. Mandal, C.C., et al., *Reactive oxygen species derived from Nox4 mediate BMP2 gene transcription and osteoblast differentiation*. Biochem J, 2011. **433(2)**: p. 393-402.
176. Lee, J.E., et al., *Nox4-mediated cell signaling regulates differentiation and survival of neural crest stem cells*. Mol Cells, 2014. **37(12)**: p. 907-11.
177. Michiels, C., et al., *Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress*. Free radical Biology and medicine, 1994. **17(3)**: p. 235-248.
178. Fukai, T. and M. Ushio-Fukai, *Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15(6)**: p. 1583-606.
179. Li, Y., et al., *Sirt3-MnSOD axis represses nicotine-induced mitochondrial oxidative stress and mtDNA damage in osteoblasts*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2015. **47(4)**: p. 306-12.
180. Radi, R., *Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration*. 2004. **101**: p. 4003-4008.

181. Gilks, C.B., et al., *Antioxidant Gene Expression in Rat Lung after Exposure to Cigarette Smoke*. American Journal of Pathology, 1998. **152**: p. 269-278.
182. Bazzini, C., et al., *Short- and long- term effects of cigarette smoke exposure on glutathione homeostasis in human bronchial epithelial cells*. Cell Physiol Biochem, 2013. **32**(7): p. 129-45.
183. Rahman, I., et al., *Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and lung in vivo under oxidative stress*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 1995. **269**(3): p. L285-L292.
184. Nicks, M.E., M.M. O'Brien, and R.P. Bowler, *Plasma antioxidants are associated with impaired lung function and COPD exacerbations in smokers*. COPD, 2011. **8**(4): p. 264-9.
185. Trivedi, S. and N. Lal, *Antioxidant enzymes in periodontitis*. J Oral Biol Craniofac Res, 2017. **7**(1): p. 54-57.
186. Kinnula, V.L., *Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases*. Thorax, 2005. **60**(8): p. 693-700.
187. Garbin, U., et al., *Cigarette smoking blocks the protective expression of Nrf2/ARE pathway in peripheral mononuclear cells of young heavy smokers favouring inflammation*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8225.
188. Barreiro, E., et al., *Cigarette smoke-induced oxidative stress: A role in chronic obstructive pulmonary disease skeletal muscle dysfunction*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**(4): p. 477-88.
189. Mostafavi-Pour, Z., et al., *The role of quercetin and vitamin C in Nrf2-dependent oxidative stress production in breast cancer cells*. Oncol Lett, 2017. **13**(3): p. 1965-1973.
190. Aspera-Werz, R.H., et al., *Oxidative Medicine and Cellular Longevity Nicotine and cotinine inhibit catalase and glutathione reductase activity contributing to the impaired osteogenesis of SCP-1 cells exposed to cigarette smoke*.
191. Kansanen, E., et al., *The Keap1-Nrf2 pathway: mechanisms of activation and dysregulation in cancer*. Redox biology, 2013. **1**(1): p. 45-49.
192. Petrache, I., et al., *Superoxide dismutase protects against apoptosis and alveolar enlargement induced by ceramide*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2008. **295**(1): p. L44-L53.
193. Lippross, S., et al., *Nrf2 deficiency impairs fracture healing in mice*. Calcified tissue international, 2014. **95**(4): p. 349-361.
194. Sun, Y.X., et al., *Role of Nrf2 in bone metabolism*. J Biomed Sci, 2015. **22**: p. 101.
195. Thirumalai, T., et al., *Effect In Vivo of Cigarette Smoke on Lipid Peroxidation and Antioxidant status in Male albino Mice*. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2010. **2**(9): p. 579-582.
196. Ziros, P.G., et al., *The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23934-41.

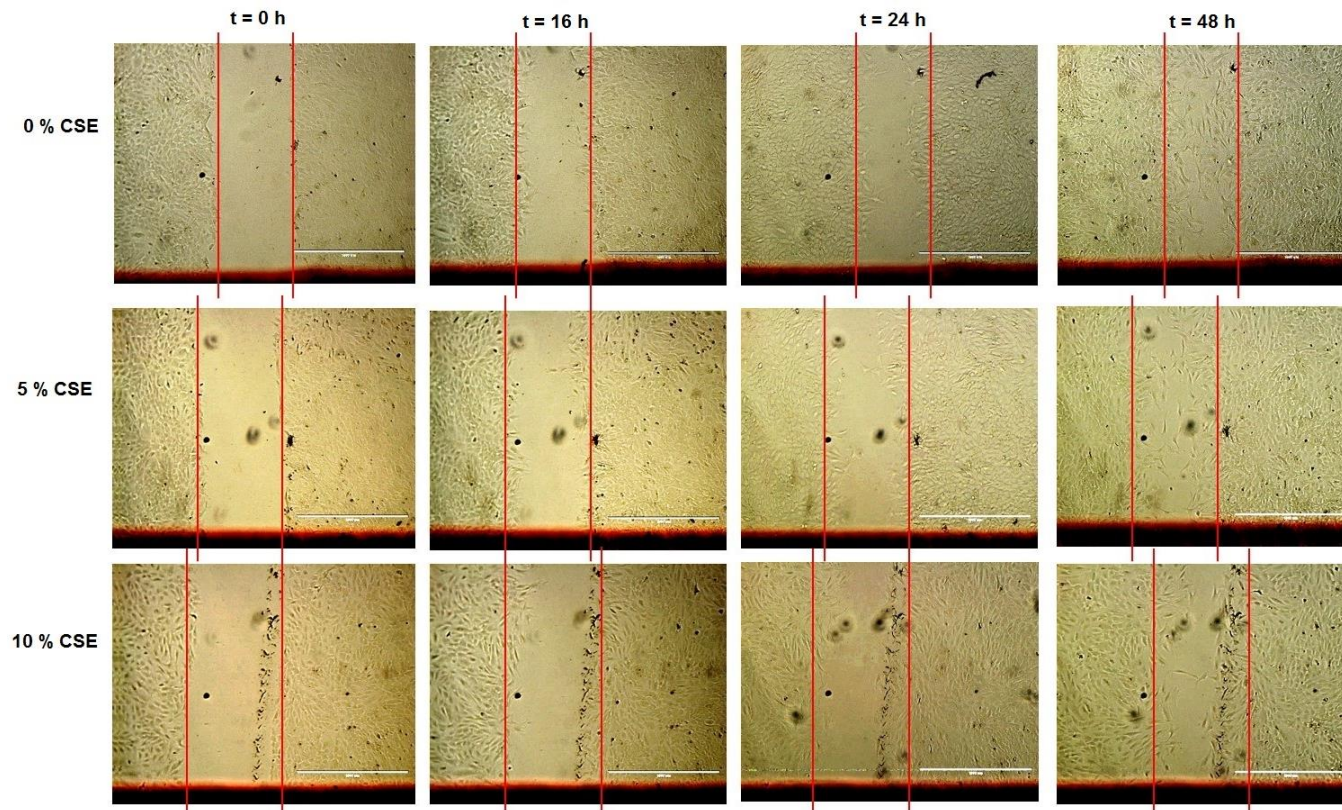
197. Lai, C.F., et al., *Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 14443-50.
198. Temu, T.M., et al., *The mechanism of ascorbic acid-induced differentiation of ATDC5 chondrogenic cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **299**(2): p. E325-34.
199. Yan, Y., et al., *Vitamin C induces periodontal ligament progenitor cell differentiation via activation of ERK pathway mediated by PELP1*. Protein Cell, 2013. **4**(8): p. 620-7.
200. Salasznyk, R.M., et al., *ERK signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on collagen I and vitronectin*. Cell Commun Adhes, 2004. **11**(5-6): p. 137-53.
201. SHAKIBAEI, M., et al., *Signal transduction by  $\beta$ 1 integrin receptors in human chondrocytes in vitro : collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor*. Biochemical Journal, 1999: p. 615-623.
202. Nöth, U., et al., *Activation of p38 and Smads mediates BMP-2 effects on human trabecular bone-derived osteoblasts*. Experimental cell research, 2003. **291**(1): p. 201-211.
203. Ingram, A.J., et al., *NO inhibits stretch-induced MAPK activity by cytoskeletal disruption*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 40301-6.
204. GUICHEUX, J., et al., *Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Jun-NH<sub>2</sub>-Terminal Kinase by BMP-2 and Their Implication in the Stimulation of Osteoblastic Cell Differentiation*. JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, 2003. **18**(11).
205. Hu, Y., et al., *Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for osteoblast differentiation*. Endocrinology, 2003. **144**(5): p. 2068-74.
206. Lai, C.F. and S.L. Cheng, *Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 15514-22.
207. Thouverey, C. and J. Caverzasio, *Focus on the p38 MAPK signaling pathway in bone development and maintenance*. Bonekey Rep, 2015. **4**: p. 711.
208. MELHUS, H., et al., *Smoking, Antioxidant Vitamins, and the Risk of Hip Fracture*. JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, 1999. **14**(1): p. 129-135.
209. Hill, K.E., et al., *Combined selenium and vitamin C deficiency causes cell death in guinea pig skeletal muscle*. Nutr Res, 2009. **29**(3): p. 213-9.
210. Sandukji, A., et al., *Oxidative stress and bone markers in plasma of patients with long-bone fixative surgery: role of antioxidants*. Human & experimental toxicology, 2011. **30**(6): p. 435-442.
211. Ward, K.D. and R.C. Klesges, *A Meta-Analysis of the Effects of Cigarette Smoking on Mineral Density*. Calcified Tissue International, 2001: p. 259-270.

212. Taes, Y., et al., *Early smoking is associated with peak bone mass and prevalent fractures in young, healthy men.* J Bone Miner Res, 2010. **25**(2): p. 379-87.
213. Wong, P.K., J.J. Christie, and J.D. Wark, *The effects of smoking on bone health.* Clin Sci (Lond), 2007. **113**(5): p. 233-41.
214. Ward, K.D. and R.C. Klesges, *A Meta-Analysis of the Effects of Cigarette Smoking on Bone Mineral Density.* Calcif Tissue Int, 2001.
215. Caponnetto, P. and R. Polosa, *Common predictors of smoking cessation in clinical practice.* Respir Med, 2008. **102**(8): p. 1182-92.
216. Pera, I.E., *TOBACCOSMOKE FILTER AND RELATIVE COMPOSITION MADE OF ANTIOXIDANT AND MINERAL SUBSTANCES* Sep. 9, 2003 p. 1-17.
217. Grana, R., N. Benowitz, and S.A. Glantz, *E-cigarettes: a scientific review.* Circulation, 2014. **129**(19): p. 1972-86.
218. Farsalinos, K.E. and R. Polosa, *Safety evaluation and risk assessment of electronic cigarettes as tobacco cigarette substitutes: a systematic review.* Ther Adv Drug Saf, 2014. **5**(2): p. 67-86.
219. Hua, M. and P. Talbot, *Potential health effects of electronic cigarettes: A systematic review of case reports.* Prev Med Rep, 2016. **4**: p. 169-78.
220. Callahan-Lyon, P., *Electronic cigarettes: human health effects.* Tob Control, 2014. **23 Suppl 2**: p. ii36-40.
221. Wang, C.-R.M., X. Cao, and Y. Zhang, *A novel bioactive osteogenesis scaffold delivers ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate, and dexamethasone in vivo to promote bone regeneration.* Oncotarget, 2017. **8**(19).
222. Mundi, R., et al., *Low-intensity pulsed ultrasound: Fracture healing.* Indian journal of orthopaedics, 2009. **43**(2): p. 132.
223. Radomsky, M.L., et al., *Potential role of fibroblast growth factor in enhancement of fracture healing.* Clinical Orthopaedics and Related Research®, 1998. **355**: p. S283-S293.
224. Stevenson, S., *Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts.* Clinical Orthopaedics and Related Research®, 1998. **355**: p. S239-S246.



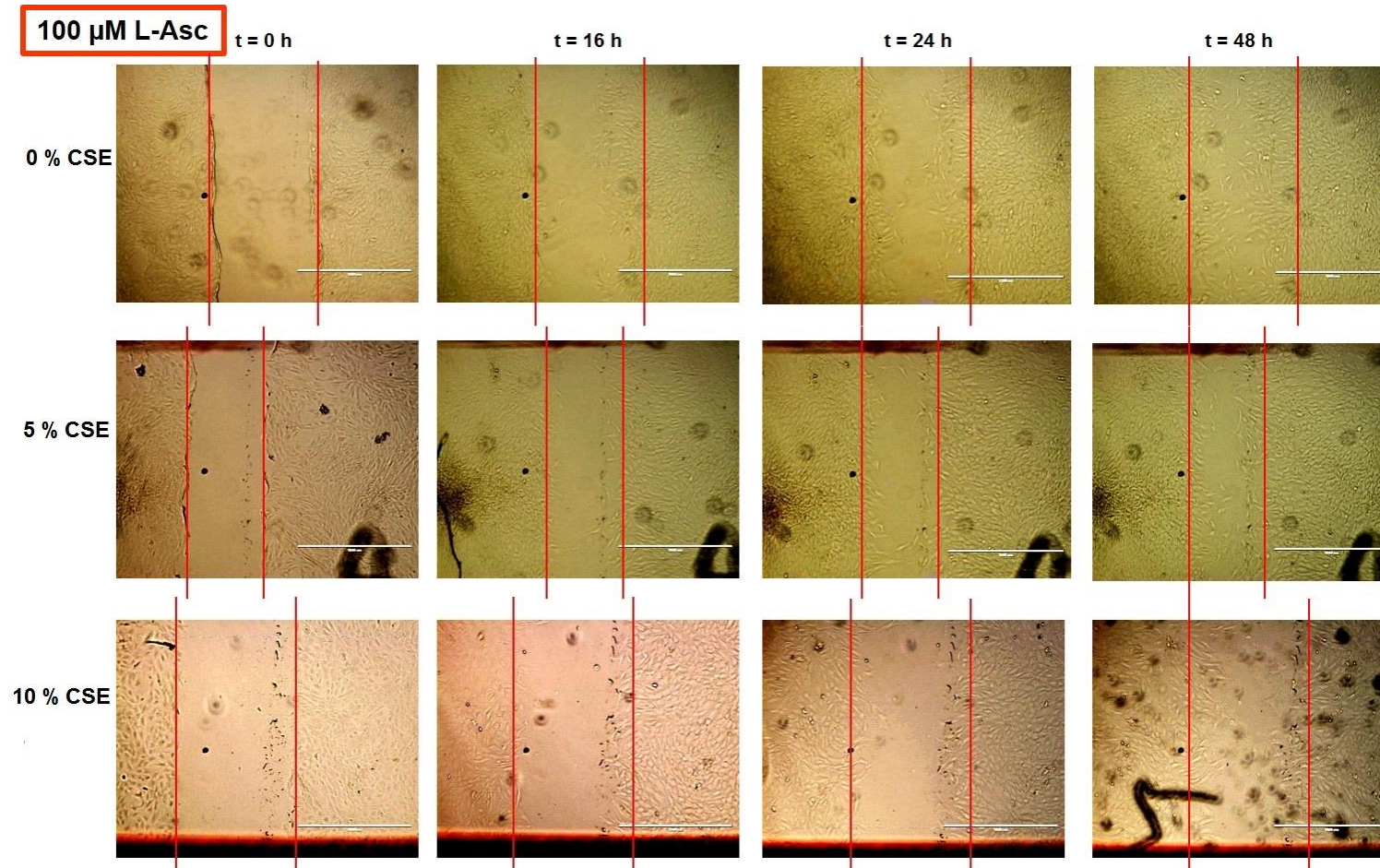
## 9 Anhang

### 9.1 Bilderstrecke des Scratch Assays

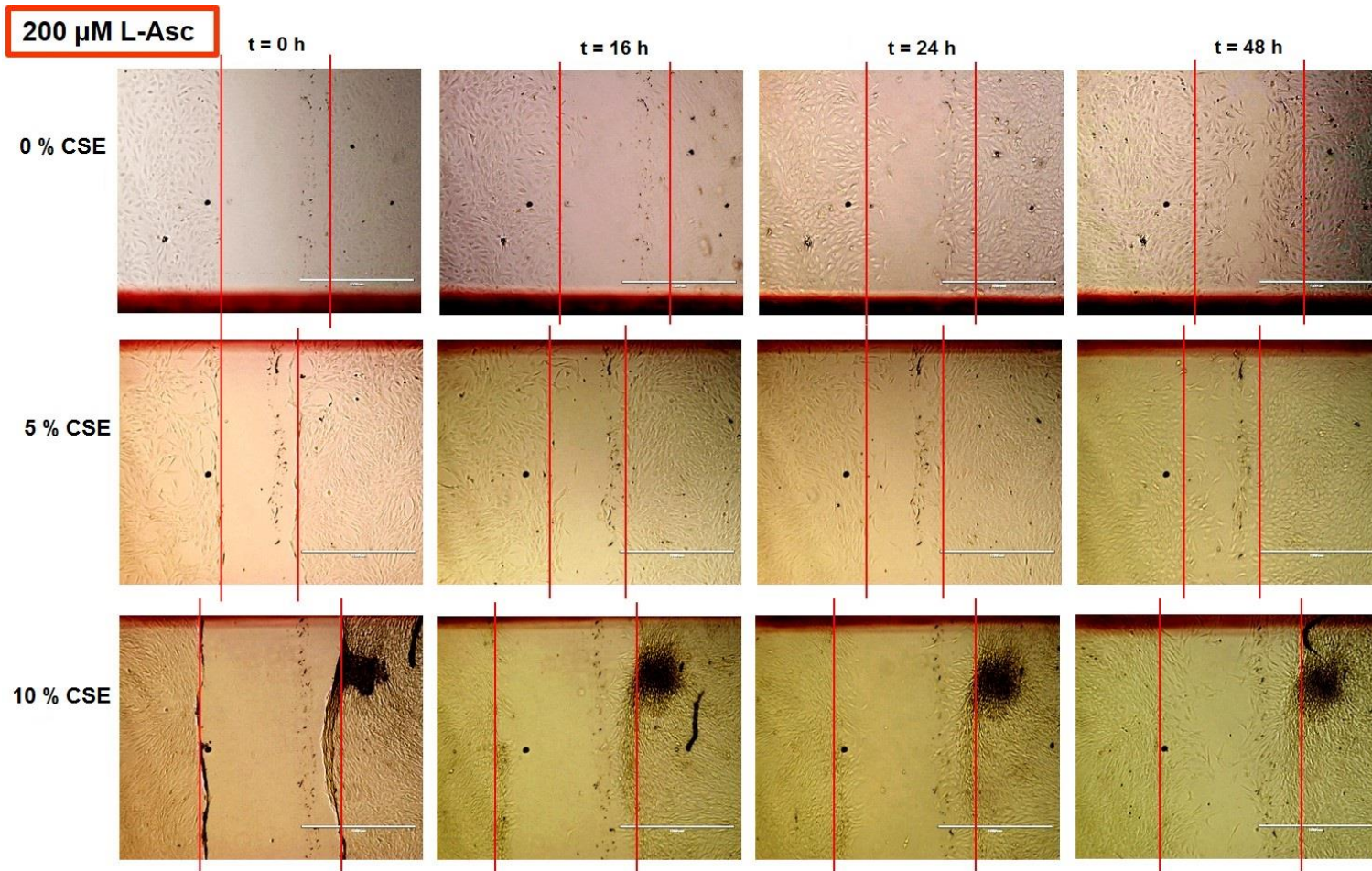


**Abbildung 46: Repräsentative Zellmigration von SCP-1-Zellen unter Inkubation mit CSE nach 0, 16, 24 und 48 h. Nach allen drei Zeitpunkten zeigte sich eine verminderte Verschlussrate unter 5 % und 10 % CSE. (N=4, n=4).**



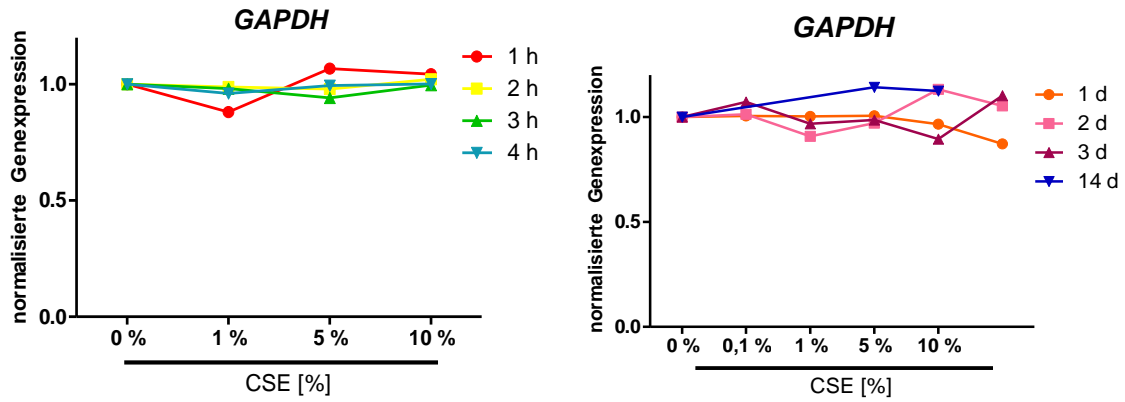


**Abbildung 47: Repräsentative Zellmigration von SCP-1-Zellen unter Inkubation mit CSE und 100  $\mu$ M L-Ascorbat nach 0, 16, 24 und 48 h.** Nach allen drei Zeitpunkten zeigte sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Co-Inkubation mit CSE und 100  $\mu$ M L-Ascorbat im Vergleich zur Einzelapplikation von CSE. (N=4, n=4).



**Abbildung 48: Repräsentative Zellmigration von SCP-1-Zellen unter Inkubation mit CSE und 200  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat nach 0, 16, 24 und 48 h. Unter Co-Inkubation von 200  $\mu\text{M}$  L-Ascorbat und CSE konnte eine leicht erhöhte Verschlussrate im Gegensatz zur Einzelapplikation von CSE erzielt werden. (N=4, n=4).**

## 9.2 Genexpression von *GAPDH*



**Abbildung 49: Expressionsänderung von regulierter *GAPDH* in SCP-1-Zellen im Zeitverlauf von einer bis vier Stunden (a) und von einem bis 14 Tagen (b).** Es zeigte sich keine spezifische Veränderung der *GAPDH* mit unspezifischen Schwankungen. Die Ergebnisse wurden mittels Dunn-Test ausgewertet. (N=3, n=3).



## 10 Publikationen

Teile der Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits in folgenden Publikationen und folgendem Poster veröffentlicht:

### Publikationen

Titel:

**Resveratrol protects primary cilia integrity of human mesenchymal stem cells from cigarette smoke to improve osteogenic differentiation in vitro.**

Autoren:

Sreekumar Vrinda, Aspera-Werz Romina, Ehnert Sabrina, Strobel Julius, Tendulkar Gauri, **Heid Daniel**, Schreiner Anna, Arnscheidt Christian, Nüssler Andreas

Journal:

Archives of Toxicology, 20. Dezember 2017, Volume 92

### Publikation im Annahmeprozess

Titel:

**Nicotine and cotinine interfere with the cells' antioxidative defense in smokers, by inhibiting catalase and glutathione reductase activity during osteogenic differentiation of SCP-1 cells.**

Autoren:

Aspera-Werz Romina, Ehnert Sabrina, **Heid Daniel**, Sheng Zhu, Chen Tao, Braun Bianca, Sreekumar Vrinda, Arnscheidt Christian, Nüssler Andreas

Journal:

Oxidative Medicine and Cellular Longevity, in press

### Poster

**Treffen der europäischen Abteilung der internationalen Gesellschaft für Gewebekonstruktion und Regenerative Medizin in Davos (TERMIS 2017)**

Titel:

**Protective effects of mechanical stimulation and extremely low frequency pulsed electromagnetic fields in human osteoblast exposed to cigarette smoke extract.**

Autoren:

Aspera-Werz Romina, Ehnert Sabrina, **Heid Daniel**, Sreekumar Vrinda, Nüssler Andreas

## **Kongresse mit mündlichen Präsentationen:**

### **21. Chirurgische Forschungstage (CFT)**

Titel:

Resveratrol protects primary cilia integrity of human mesenchymal stem cells from cigarette smoke to improve osteogenic differentiation.

Autoren:

Romina H. Aspera-Werz, Vrinda Sreekumar, Sabrina Ehnert, Julius Strobel, **Daniel Heid**, Elke Wintermeyer, Ingo Flesch, Andreas Nüssler

### **20. Internationaler Kongress von *In Vitro* Toxicology (ESTIV 2018)**

Titel:

Nicotine and cotinine interfere with the cells' antioxidative defense in smokers, by inhibiting catalase and glutathione reductase activity during osteogenic differentiation of SCP-1 cells.

Autoren:

Romina H. Aspera-Werz, Sabrina Ehnert, **Daniel Heid**, Sheng Zhu, Tao Chen, Bianca Braun, Monja Müller, Andreas Nüssler

### **Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2018)**

Titel:

Oxidative stress induced by cigarette smoke impairs primary cilia integrity and osteogenesis of human mesenchymal stem cells.

Autoren:

Romina H. Aspera-Werz, Vrinda Sreekumar, Sabrina Ehnert, Julius Strobel, **Daniel Heid**, Anna Schreiner, Christian Amscheidt, Andreas Nüssler

## 11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich aufrichtig und herzlich bei Herrn Professor Andreas Nüssler, dem Leiter des Siegfried Weller Institutes für Unfallmedizinische Forschung der BG Klinik Tübingen, bedanken, dass mir die Arbeit in der von ihm geleiteten Abteilung angeboten und durchgeführt werden durfte. Unter seiner vertrauensvollen und freundschaftlichen Betreuung wurden mir stets eine hochqualifizierte Unterstützung in der Planung, Durchführung und Betreuung entgegengebracht sowie alle benötigten Geräte und Materialien zur Verfügung gestellt.

Weiterhin möchte ich mich bei der PhD Studentin Romina Aspera-Werz für ihre geduldige und unermüdliche Unterstützung bedanken. Ohne ihre hervorragende praktische und wissenschaftliche Betreuung, die weit über das normale Maß hinausging, wäre diese Arbeit sicher nicht zustande gekommen. Dabei ist sie mir bei jedem Problem immer freundlich und tatkräftig zur Seite gestanden und vermittelte mir auch nach dem Abschluss der Laborarbeit wertvolle Tipps bezüglich der Auswertung der Daten.

Mein abschließender Dank gilt meiner Schwester Susanne und meinen Eltern Manfred und Gerlinde, indem sie mir während der Zeit meines Studiums ihre stetige Unterstützung entgegengebracht haben und immer an meiner Seite standen, stets ein „offenes Ohr für mich hatten“ und mich immer wieder neu ermutigten, die Dissertation erfolgreich zu beenden.

## 12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation eigenständig verfasst, die für die Arbeit benutzten Hilfsmittel und Quellen genannt und die Ergebnisse beteiligter Mitarbeiter sowie anderer Autoren klar gekennzeichnet habe.

Die Arbeit wurde am Siegfried Weller Institut unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Andreas K. Nüssler durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Andreas K. Nüssler und Romina Aspera-Werz.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung von und unter Unterstützung durch Romina Aspera-Werz eigenständig durchgeführt. Die Messung und Auswertung der Daten „CSE-Exposition beeinträchtigt die Funktion von SCP-1-Zellen (Abbildung 20 und 22)“ erfolgte zusammen mit Romina Aspera-Werz. Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. Sabrina Ehnert und Romina Aspera-Werz eigenständig durch mich.

Ich versichere, die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten an der Eberhard Karls Universität beachtet zu haben. Ich habe weder die Dissertation oder Teile der Dissertation als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht noch ein Promotionsverfahren bei einer anderen Hochschule beantragt.

Tübingen, den 12.11.2018

.....

(Unterschrift)