

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

Evaluation der gestörten Myofibroblastengnese in der Pathogenese des Morbus Dupuytren

Dissertation

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

vorgelegt von
Julia Laura Wille
2024

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

Gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Simon Thelen

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Markus Giessing

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- ePoster-Präsentation auf dem Deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie am 26.10.2021 in Berlin
- Illuminating the effect of beneficial blue light and ROS-modulating enzymes in Dupuytren's disease; Jaekel C, Thelen S, Oezel L, Wohltmann MH, Wille J, et al. (2021) Illuminating the effect of beneficial blue light and ROS-modulating enzymes in Dupuytren's disease. PLOS ONE 16(7):e0253777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253777>
- Dupuytren's Disease is mediated by insufficient TGF- β 1 release and Degradation; Oezel, L.; Wohltmann, M.; Gondorf, N.; Wille, J.; Güven, I.; Windolf, J.; Thelen, S.; Jaekel, C.; Grotheer, V. Dupuytren's Disease Is Mediated by Insufficient TGF- β 1 Release and Degradation. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 15097. <https://doi.org/10.3390/ijms242015097>

Zusammenfassung

Der Morbus Dupuytren (MD) ist eine fibroproliferative Erkrankung der Palmaraponeurose, die durch Knoten- und Strangbildung in der Hohlhand sowie eine konsekutive Beugekontraktur der betroffenen Finger charakterisiert ist. Es resultiert eine funktionelle Bewegungseinschränkung der Hand. Die Ätiologie ist bis heute nicht abschließend geklärt, jedoch gilt eine genetische Prädisposition als erwiesen. Zudem werden einige Risikofaktoren, wie z. B. Alkoholabusus, Diabetes mellitus oder rezidivierende Traumata der Hand, diskutiert. Molekularbiologisch ist hier eine vermehrte Myofibroblastengnese charakteristisch, die durch eine erhöhte Expression des *transforming growth factor-β* (TGF-β), indiziert wird. TGF-β bildet als Homodimer mit dem *latency-associated peptid* (LAP) einen Komplex, der *small latent complex* (SLC) genannt wird. Zusammen mit dem *latent-TGF-β binding protein* (LTBP) wird dieser Komplex als *large latent complex* (LLC) in die extrazelluläre Matrix sekretiert. Mittels verschiedener Mechanismen, wie z. B. durch die proteolytische Freisetzung durch Plasmin oder Thrombospondin, kann TGF-β aus diesem Komplex freigesetzt werden. Als erwiesen gilt bereits, dass eine gestörte Aktivierung des TGF-β Entzündungsprozesse, Autoimmunerkrankungen und auch Fibrosen zur Folge haben kann. Ziel dieser Arbeit war die proteolytische Freisetzung des TGF-β sowie weitere mögliche Einflussfaktoren und dessen Wirkung auf die Myofibroblastengnese im MD zu untersuchen. Dafür wurden Fibroblasten aus intraoperativ gewonnenem Aponeurosegewebe von MD- oder Karpalbandgewebe von Karpaltunnelsyndrom (CTS)- Patienten, die als Kontrollgruppe fungierten, isoliert. Die Fibroblasten wurden hinsichtlich ihrer mRNA- und Proteinexpression von LAP-TGF-β, LTBP sowie *alpha smooth muscle actin* (α -SMA) als Surrogatparameter der Myofibroblastengnese anhand der *real time* Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) bzw. Western Blot Technik analysiert. Die biologische Aktivität des TGF-β wurde mit Hilfe eines *plasminogen activator inhibitor 1* (PAI-1) ELISAs evaluiert. Als Induktoren der TGF-β-Aktivierung wurden Plasmin und Thrombospondin verwendet. Im Vergleich konnte ein signifikanter Unterschied in der LAP-TGF-β-Expression zugunsten der MD-Fibroblasten gezeigt werden. Weiterhin wurde untersucht, ob eine verminderte Prozessierung des LAP-TGF-β Einfluss auf die α -SMA-Expression im MD haben könnte. Durch die Zugabe von Plasmin konnte sowohl die Aktivität des TGF-β als auch die Myofibroblastengnese im MD signifikant reduziert werden. Dies ermöglicht die Schlussfolgerung, dass die fehlende Prozessierung des TGF-β maßgeblich an der Pathogenese des Morbus Dupuytren beteiligt ist.

Summary

Dupuytren's disease (MD) is a fibroproliferative disease of the palmar aponeurosis characterised by nodule and cord formation in the palm and a consecutive flexion contracture of the affected finger. The result is a functional restriction of hand movement. The aetiology has not been conclusively clarified, but a genetic predisposition has been proven. In addition, some risk factors such as alcohol abuse, diabetes mellitus or recurrent trauma to the hand, are also discussed. In terms of molecular biology, increased myofibroblast genesis is characteristic here, which is indicated by increased expression of transforming growth factor- β (TGF- β). TGF- β forms a complex as a homodimer with the latency-associated peptid (LAP), which is called a small latent complex (SLC). Together with the latent TGF- β binding protein (LTBP) this complex is secreted into the extracellular matrix as a large latent complex (LLC). TGF- β can be released from this complex by various mechanisms, such as proteolytic release by plasmin or thrombospondin. It has already been proven that a disturbed activation of TGF- β can result in inflammatory processes, autoimmune diseases and also fibrosis.

The aim of this study was to investigate the proteolytic release of TGF- β and other possible influencing factors and its effect on myofibroblast genesis in MD. For this purpose, fibroblasts were isolated from intraoperatively obtained aponeurosis tissue from MD or carpal ligament tissue from carpal tunnel syndrome (CTS) patients, who served as a control group. Fibroblasts were analysed regarding their mRNA and protein expression of LAP-TGF- β , LTBP and alpha smooth muscle actin (α -SMA) as surrogate parameters of myofibroblast genesis using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blot techniques, respectively. The biological activity of TGF- β was evaluated using a plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) ELISA. Plasmin and Thrombospondin were used as inducers of TGF- β activation.

In comparison, a significant difference in LAP-TGF- β expression was shown in favour of MD fibroblasts. Furthermore, it was investigated whether a reduced processing of LAP-TGF- β could have an influence on α -SMA expression in MD. The addition of plasmin significantly reduced both TGF- β activity and myofibroblast genesis in MD. It can therefore be concluded that the lack of processing of TGF- β is significantly involved in the pathogenesis of Dupuytren's disease.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
α-SMA	<i>α-Smooth Muscle Actin</i>
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μMol	Mikromolar
Abb.	Abbildung
a. e.	Am Ehesten
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Bovines Serumalbumin)
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i> (Komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
cm	Zentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CTS	Karpaltunnel-Syndrom
dest.	Destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphat-Buffered Saline</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzymimmunoassay)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Fetales Rinderserum)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray (Pro Masse absorbierte Energie)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethan-Sulfonat
h	<i>Hour</i> (Stunde)
H₂SO₄	Schwefelsäure
kHZ	Kilohertz
LAP-TGF-β	<i>Latency-associated peptid-TGF-β</i>
l	Liter
LLC	<i>Large latent complex</i>
LTBP	<i>Latent-TGF-β-binding protein</i>

max.	Maximal
MD	Morbus Dupuytren
min	<i>Minute</i> (Minute)
mind.	Mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MnSOD	<i>Manganese superoxid dismutase</i> (Mangan-abhängige Superoxid-Dismutase)
MnTBAP	<i>Manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin chloride</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (Messenger Ribonukleotidsäure)
MW	Mittelwert
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N₂	Stickstoff
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
p53	<i>Tumor suppressor protein p53</i>
RIPA	<i>Radio-immunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleotidsäure)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real-time polymerase chain reaction</i> (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
s.	Siehe
SLC	<i>Small latent complex</i>
sec	<i>Second</i> (Sekunde)
SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
U	<i>Unit</i> (Einheit)
u. a.	Unter anderem
V	Volt
v. a.	Vor allem
vs.	Versus
W	Watt
z. B.	Zum Beispiel
z. T.	Zum Teil

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Definition	1
1.2	Epidemiologie und Ätiologie des Morbus Dupuytren.....	1
1.3	Klinische Symptome bei Erkrankung mit Morbus Dupuytren.....	2
1.4	Anatomie der Hand und die Veränderungen bei Morbus Dupuytren.....	5
1.5	Pathophysiologie des Morbus Dupuytren	6
1.5.1	Fibroblasten und Myofibroblasten - Relevanz im Morbus Dupuytren.....	6
1.5.2	Einfluss des TGF- β im Morbus Dupuytren	7
1.5.3	Bedeutung von ROS und protektiven antioxidativen Redoxsystemen	10
1.6	Therapie und Prognose bei Erkrankung mit Morbus Dupuytren.....	12
1.7	Fragestellung und Ziele der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Ethikantrag und Patientenkollektiv	15
2.2	Geräte und Materialien	15
2.2.1	Antikörper, Marker und Primer	15
2.2.2	Kits	16
2.2.3	Laborgeräte	16
2.2.4	Software	19
2.2.5	Substanzen.....	19
2.2.6	Verbrauchsmaterialien.....	21
2.3	Methoden	23
2.3.1	Isolation der Fibroblasten.....	23
2.3.2	Auftauen und Einfrieren der Fibroblasten.....	23
2.3.3	Splitten und Aussäen der Fibroblasten	24
2.3.4	Zellen zählen	24
2.3.5	Kultivieren von Fibroblasten.....	25
2.3.6	Vorbereitung der Fibroblasten für die Analysen	25
2.3.7	Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung der Fibroblasten	25
2.3.8	Western Blot Analyse	26
2.3.9	Real Time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	29
2.3.10	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-) ELISA	31
2.3.11	Statistische Auswertung.....	32

3	Ergebnisse	33
3.1	Evaluation von ROS-modulierenden Enzymen im MD.....	33
3.1.1	Analyse der p53- und MnSOD-Proteinexpression.....	33
3.1.2	Evaluation des Einflusses antioxidativer Enzyme.....	34
3.2	Untersuchung und Modulation von TGF- β in MD.....	40
3.2.1	Analyse der LTBP-1-mRNA- und LAP-TGF- β -Proteinexpression.....	40
3.2.2	Bedeutung von Thrombospondin auf die TGF- β -Aktivierung im MD	41
3.2.3	Bedeutung von Plasmin auf die TGF- β -Aktivierung im MD	43
4	Diskussion.....	50
4.1	ROS-modulierende Enzyme und deren Beeinflussung durch Antioxidantien	50
4.2	Modulation der TGF- β -Prozessierung in MD-Fibroblasten.....	53
4.3	Methodendiskussion.....	55
4.4	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	55
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	57
6	Anhang.....	63
6.1	Anhang 1: Analyse des LAP-TGF- β -Amplifikons	63
6.2	Anhang 2: Einverständniserklärung	64
6.3	Anhang 3: Spenderliste	66

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Linke Hand einer an MD-erkrankten Frau in der palmaren Ansicht.....	2
Abb. 2: Linke Hand eines an MD-erkrankten 83-jährigen Mannes in der lateralen Ansicht.....	3
Abb. 3: Linke Hand des Patienten in der palmaren Ansicht.....	3
Abb. 4: Rechte Hand des Patienten in der palmaren Ansicht.....	3
Abb. 5: p53-Expression in CTS (n = 11) und MD (n = 7)	33
Abb. 6: MnSOD-Expression in CTS (n = 9) und MD (n = 9)	34
Abb. 7: α -SMA-Expression in MD (n = 6) nach 1 μ g/ml SOD	35
Abb. 8: α -SMA-Expression in MD (n = 3) nach 0,5 μ g/ml SOD	35
Abb. 9: PAI-Expression in MD (n = 3) nach 1 μ g/ml SOD	36
Abb. 10: α -SMA-Expression in MD (n = 8) nach 25 μ Mol MnTBAP	37
Abb. 11: PAI-Expression in MD (n = 3) nach 25 μ Mol MnTBAP	38
Abb. 12: α -SMA-Expression in MD (n = 5) nach 62 U/ml Katalase.....	39
Abb. 13: PAI-Expression in MD (n = 3) nach 62 U/ml Katalase.....	39
Abb. 14: LTBP-mRNA-Expression in CTS (n = 8) und MD (n = 9).....	40
Abb. 15: LAP-TGF- β -Expression in CTS (n = 11) und MD (n = 11) im Vergleich (links)	41
Abb. 16: Exemplarische Western Blot Analyse des LAP-TGF- β s bei MD und CTS (rechts) .	41
Abb. 17: LAP-TGF- β -Expression in MD (n = 2) nach Zugabe von Thrombospondin	42
Abb. 18: α -SMA-Expression in MD (n = 1) nach Zugabe von Thrombospondin.....	42
Abb. 19: PAI-Expression in MD (n = 2) nach Zugabe von Thrombospondin.....	43
Abb. 20: LAP-TGF- β -Expression in MD (n = 2) nach Zugabe von Plasmin	44
Abb. 21: α -SMA-Expression in MD (n = 1) nach Zugabe von Plasmin	44
Abb. 22: PAI-Expression in MD (n = 2) nach Zugabe von Plasmin.....	45
Abb. 23: PAI-Expression in MD (n = 2) nach 0,05 U/ml Plasmin	46
Abb. 24: LAP-TGF- β -Expression in MD (n = 3) nach 0,05 U/ml Plasmin.....	47
Abb. 25: LAP-TGF- β -Expression in CTS (n = 2) nach 0,05 U/ml Plasmin	47
Abb. 26: α -SMA-Expression in MD (n = 5) nach 0,05 U/ml Plasmin	48
Abb. 27: α -SMA-Expression in CTS (n = 2) nach 0,05 U/ml Plasmin	48
Abb. 28: PAI-Expression in MD (n = 7) nach 0,05 U/ml Plasmin	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation nach Tubiana.....	4
Tabelle 2: Antikörper, Marker und Primer.....	16
Tabelle 3: Kits.....	16
Tabelle 4: Laborgeräte.....	19
Tabelle 5: Software.....	19
Tabelle 6: Substanzen.....	21
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien.....	23
Tabelle 8: Substanzen für die Zellbehandlung.....	25
Tabelle 9: BSA Standard.....	26
Tabelle 10: Primärantikörper für die Western Blot Analyse.....	28
Tabelle 11: Sekundärantikörper für die Western Blot Analyse.....	28
Tabelle 12: Zusammensetzung des Master Mixes.....	29
Tabelle 13: Zusammensetzung des Master Mixes für die reverse Transkription.....	30
Tabelle 14: Human Serpin E1-Standard.....	31

1 Einleitung

1.1 Definition

Der Morbus Dupuytren (im Folgendem mit MD abgekürzt) ist eine meist idiopathische fibroproliferative Erkrankung der Palmaraponeurose. Es kommt hierbei krankheitsbedingt zu einer Knoten- und Strangbildung der sonst flach aufgespannten Faszie einzelner oder auch mehrerer Finger in der Hohlhand. Dies hat eine zunehmende Beugekontraktur der betroffenen Finger zur Folge, welche letzten Endes in einer mitunter erheblichen, funktionellen Bewegungseinschränkung resultiert.

1.2 Epidemiologie und Ätiologie des Morbus Dupuytren

Das Erkrankungsbild des MD wird in Europa mit einer Prävalenz von 0,6 bis 31,6 % angegeben und nimmt mit dem Alter zu [1]. MD tritt überdurchschnittlich häufig in der weißen männlichen Bevölkerung auf, wobei Männer bis zu fünfmal häufiger von der Kontraktur betroffen sind als Frauen [2] und sich die Erkrankung bei ihnen durchschnittlich 10 Jahre früher manifestiert [3]. Der Häufigkeitsgipfel liegt ungefähr um das 60. Lebensjahr [4]. Interessanterweise kann ein gehäuftes Auftreten in nordeuropäischen Ländern beobachtet werden [2], Personen anderer Ethnien erkranken seltener [5].

Die Entstehung des MD ist multifaktoriell bedingt, wobei die genaue Ätiologie noch nicht abschließend geklärt wurde und daher als „idiopathisch“ bezeichnet wird.

Eine genetische Prädisposition gilt zum aktuellen Zeitpunkt als erwiesen [6, 7].

Bisher ist es gelungen, über 20 verschiedene Gen-Loci zu identifizieren, die maßgeblich an der Pathogenese der Beugekontraktur beteiligt sind [8, 9]. Interessanterweise konnten die meisten Veränderungen in der Kategorie der Wnt-Gene gefunden werden. Die Wnt-Proteine werden zu den Wachstumsfaktoren gezählt, die die Zellproliferation und Differenzierung regulieren [10] und somit einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung von malignen Erkrankungen und Fibromatosen ausüben [5]. So konnten für die Wnt-Proteine auch eine bedeutende Funktion in der Entstehung der ähnlichen erscheinenden und dem MD verwandten Erkrankungen, der Fibromatose des Penis (Morbus Peyronie oder Induratio penis plastica) und der Plantarfibromatose (Morbus Ledderhose), nachgewiesen werden [11, 12].

Als weiterer assoziierter Risikofaktor der Dupuytren-Kontraktur wurde bereits sehr früh der Einfluss wiederholter Mikrotraumata auf die Hände diskutiert, die u. a. durch die Arbeit mit vibrierenden Geräten, wie beispielsweise einem Presslufthammer, entstehen können [13, 14].

Darüber hinaus lassen sich kontrovers diskutierte Risikofaktoren identifizieren, die als begünstigender Einflussfaktor der Beugekontraktur in Betracht gezogen werden und damit den Verlauf des MD negativ beeinflussen können. Descatha et al. stellten einen Zusammenhang zwischen der konsumierten Alkoholmenge und MD dar [14], wohingegen sie Nikotinabusus nicht als Risikofaktor einordneten. Burge et al. sowie Eckerdale et al. sahen jedoch eine deutliche Beziehung zwischen dem konsumierten Nikotin und der Entstehung des MD [15, 16]. In einigen Studien konnte auch ein Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und dem Auftreten von MD identifiziert werden [17, 18].

1.3 Klinische Symptome bei Erkrankung mit Morbus Dupuytren

Die betroffenen Patienten werden häufig vorstellig mit derben, sicht- und tastbaren Knötchen bzw. Strängen in der Hohlhand (s. Abb. 1). Darüber hinaus kommt es zu Einziehungen (Adhärenz) der Haut im Bereich der Stränge. Diese fallen häufig initial bei der Verrichtung von alltäglichen Aktivitäten, wie z. B. dem Umgreifen von Gegenständen, auf. In Einzelfällen kann es zur Ausbildung von Missempfindungen und Schmerzen bei Irritation von Nerven durch die Fibrosierung kommen. Zumeist erfolgt die ärztliche Vorstellung jedoch erst bei fortschreitender Kontraktur.



Abb.1: Linke Hand einer an MD-erkrankten Frau in der palmaren Ansicht Es lässt sich in der Hohlhand im Bereich des Ringfingers eine narbige Veränderung erkennen, wo sich ein derb tastbarer Knoten erahnen lässt (s. Pfeile). Die Einverständniserklärung zur Benutzung liegt vor (s. Anhang).



Abb. 2: Linke Hand eines an MD-erkrankten 83-jährigen Mannes in der lateralen Ansicht Es stellt sich sehr anschaulich die Beugekontraktur des kleinen Fingers bei Streckung der übrigen Finger dar. Hierbei handelt es sich um den Vater der in Abb. 1 abgebildeten Patientin. Die Erlaubnis zur Benutzung dieses sowie der nachfolgenden Bilder liegt vor (s. Anhang).



Abb. 3: Linke Hand des Patienten in der palmaren Ansicht Zum einen ist eine Narbe bei a. e. Zustand nach Aponeurektomie zu erkennen. Zum anderen lassen sich knotige Veränderungen, die vom Ringfinger auskommend sind, vermuten.



Abb. 4: Rechte Hand des Patienten in der palmaren Ansicht Auch hier lassen sich am Ring- sowie am kleinen Finger narbige Veränderungen erkennen. Erahnen lässt sich zudem der „Z“-Schnitt (s. Markierung) nach stattgefundener operativer Entfernung des erkrankten MD-Gewebes am Ringfinger.

Bei Voranschreiten der Erkrankung imponiert eine Beugekontraktur im proximalen Interphalangealgelenk bei gestrecktem distalen Interphalangealgelenk, wie man in Abb. 2 gut erkennen kann. Bei fortschreitender Erkrankung kommt eine Beugekontraktur im Metakarpophalangealgelenk hinzu und es resultiert ein stetiger Funktionsverlust der Hand. Bei maximaler Kontraktur kann der Fingernagel die Haut der Hohlhand perforieren und so zu Hautläsionen mit Schmerzen sowie Infekteintrittspforten führen. In gravierenden Fällen kann es zudem zur Unterbrechung der Blutversorgung mit daraus resultierender kritischer Minderdurchblutung und Ischämie des betroffenen Fingers kommen [19].

Zur klinischen Einteilung hat sich die Klassifikation nach Tubiana bewährt [20, 21], welche sich am Grad der Gesamtkontraktur orientiert und sich aus dem kumulierten Extensionsdefizit des metacarpophalangealen (MCP) sowie des proximalen (PIP) und distalen interphalangealen (DIP) Gelenks berechnen lässt. Es resultieren daraus folgende Stadien der Dupuytren'schen Kontraktur: Stadium 0 ohne Extensionsdefizit und ohne Fibrosen bzw. knotige oder strangartige aponeurotische Läsionen. Stadium N ebenfalls ohne Extensionsdefizit, aber mit aponeurotischer Läsion sowie tastbaren Knötchen. Stadium I mit einem Extensionsdefizit von 0 ° - 45 °. Stadium II mit 45 ° - 90 °. Stadium III mit 90 ° - 135 ° und schließlich Stadium IV mit einem kumulativen Extensionsdefizit von >135 ° [20, 21], siehe Tab. 1. Zur weiterführenden Beschreibung der Läsion stehen darüber hinaus die Buchstaben „P“ für palmare und „D“ für digitale Lokalisation zur Verfügung. „H“ wird verwendet für die Bezeichnung einer Hyperextension und „A“ für die Adhärenz der Haut an der Läsion. Bei bereits vorbehandelten MD Patienten finden ebenfalls die Buchstaben „G“ für *skin graft* und „R“ für das Auftreten einer rezidivierenden Läsion Verwendung [21].

Stadium 0	Kein Extensionsdefizit, ohne aponeurotische Läsion
Stadium N	Kein Extensionsdefizit, mit aponeurotischer Läsion
Stadium I	Gesamtes Extensionsdefizit 0 – 45 °
Stadium II	Gesamtes Extensionsdefizit 45 – 90 °
Stadium III	Gesamtes Extensionsdefizit 90 – 135 °
Stadium IV	Gesamtes Extensionsdefizit > 135 °

Tabelle 1: Klassifikation nach Tubiana [20, 21]

1.4 Anatomie der Hand und die Veränderungen bei Morbus Dupuytren

Die Palmaraponeurose ist eine stabilisierende Struktur der Hand. Physiologischerweise wird sie durch straffes Bindegewebe gebildet [22] und hat zur Handfläche hin eine flache, dreieckige Form [23] sowie eine dreidimensionale Struktur aus longitudinalen, transversalen und vertikalen Fasern [24]. Die Palmaraponeurose ist aufgrund ihrer Verspannungsfunktion der Grund, warum sich die Haut über der Handinnenfläche, im Gegensatz zur Streckseite, nicht anheben lässt. Sie hat ihren Ursprung am Retinaculum musculorum flexorum des Handgelenks, von wo aus sie sich aufteilt und longitudinal zu den einzelnen Fingern zieht [23]. Im distalen Verlauf teilt sich die Aponeurose sagittal in drei Ebenen auf. Die oberflächlichste Schicht zieht in die Haut, während die tiefste Schicht an den metacarpophalangealen Gelenkkapseln sowie den Sehnenscheiden der Flexoren inseriert [23]. Die Fasern der mittleren Schicht teilen sich, umschließen das Metakarpalköpfchen und bilden auf diese Weise das Spiralband [23].

Das Krankheitsbild des MD entsteht üblicherweise durch Verdickung des prä-tendinösen Bandes in einen Strang, meist beginnend über dem Ring- bzw. kleinen Finger [23]. Dabei kann es ebenfalls zur Kontraktur der umgebenden Ligamente kommen, welche mit der charakteristischen Fingerflexion einhergehen können [23]. Bei Fortschreiten der Erkrankung kommt es zur Infiltration der Palmarfaszie, wodurch sich die prä-tendinösen Bänder sowie die Spiralbänder ebenfalls verdicken und zusammenziehen [23].

Die mikroskopische Einteilung des MD gliedert sich nach Luck in drei aufeinanderfolgende progressive Stadien [25]. Die erste, proliferative Phase ist charakterisiert durch das zellreiche Auftreten von Fibroblasten, die zu einer Gewebsverdichtung führen. In der darauffolgenden Involutionsphase finden sich vermehrt Fibroblasten, die sich entlang bestimmter Kraftlinien anordnen. Auch lassen sich hier immunhistochemisch vermehrt Kollagenfasern finden. Ergänzend zu der Einteilung nach Luck konnte in dieser Phase auch eine Veränderung der Kollagenratio aufgezeigt werden. Vermutlich kommt es durch die zunehmende Fibroblastendichte zu einer Inhibierung der Produktion von Kollagen Typ 1, wodurch zunehmend Kollagen Typ 3 in diesem Gewebe dominiert [26]. Es entstehen hier die charakteristischen Knoten.

In der letzten Phase, der Residualphase, finden sich kaum noch Zellen und der Anteil des Kollagens überwiegt. Die Knoten bilden sich zurück und es kommt zur Ausbildung von fibromatösen Strängen [25].

1.5 Pathophysiologie des Morbus Dupuytren

1.5.1 Fibroblasten und Myofibroblasten - Relevanz im Morbus Dupuytren

Fibroblasten sind Zellen mesenchymalen Ursprungs und zählen zu den Hauptbestandteilen des Bindegewebes [27]. Histologisch stellen sich die Fibroblasten als spindelförmige Zellen mit verzweigten Fortsätzen dar, die sich zu einem Netzwerk konfigurieren können [27].

Sie tragen maßgeblich zur Bildung von Kollagen, Proteoglykanen, Elastin sowie Fibronectin und Proteasen bei, die zur Synthese und zum Umbau der extrazellulären Matrix (EZM) essenziell sind [27]. Somit übernehmen Fibroblasten mit ihren Produkten eine wichtige Funktion bei der physiologischen Wundheilung [28].

Normalerweise sind Fibroblasten durch eine intakte EZM vor zellulärem Stress geschützt [29]. Im Rahmen von Verletzungen können sich Fibroblasten während der Wundheilung weiter zu Myofibroblasten differenzieren, welche primär die Aufgabe der Wiederherstellung einer funktionierenden EZM übernehmen [30]. Im Falle eines Gewebetraumas oder bei Ausschüttung von Entzündungsmediatoren werden die Fibroblasten aktiviert und breiten sich in der Wunde aus. Es folgen lokale *Remodeling* Prozesse mit Ausbildung eines Proto-Myofibroblasten, welcher durch Stresszellen, die nur zytoplasmatisches Aktin beinhalten, gekennzeichnet ist. TGF- β 1 stimuliert den Proto-Myofibroblasten zur Ausbildung des α -SMA-positiven Myofibroblasten, welcher die entscheidende Phase der kontraktiven Wundheilung einleitet [29, 31]. Da Myofibroblasten folglich vermehrt α -SMA exprimieren, eignet sich die Analyse der α -SMA-Expression als Surrogatparameter für die pathologisch veränderte Myofibroblastengnese [32].

Auch die in den Myofibroblasten enthaltenden kontraktiven Aktin- und Myosinfilamente fördern entscheidend die Wundkontraktion und somit die Adaption der Wundränder [28]. Physiologischerweise wird die kontraktile Aktivität der Myofibroblasten beendet, wenn es zu einem Verschluss der Wunde gekommen ist. Die Myofibroblasten gehen anschließend über in die Apoptose und es kommt zu einer Reduzierung der α -SMA-Expression, welche eine Apoptose der Myofibroblasten induziert [33]. Allerdings kann

eine überschießende Reaktion sowie auch eine ausbleibende Apoptose an pathologischen Prozessen beteiligt sein, wie z. B. an der Ausbildung von Narben und Fibrosen [30, 34].

Folglich kann für die Entstehung des MD zum einen die vermehrte Myofibroblastengnese der Palmaraponeurose verantwortlich gemacht werden. Diese wird auch durch eine erhöhte TGF- β -Expression induziert, welche maßgeblich für die erhöhte Proliferation sowie die stark vermehrte Myofibroblastengnese mit verantwortlich ist [35, 36]. Zum anderen ist die pathologische Persistenz der Myofibroblasten durch eine verminderte Apoptose, welche zu einer Knotenbildung entlang der Palmaraponeurose führt, ursächlich für die Ausbildung des MD [29].

1.5.2 Einfluss des TGF- β im Morbus Dupuytren

TGF- β zählt zur großen Familie der TGF, welche über 30 verschiedene Wachstums- und Differenzierungsfaktoren umfasst [37]. TGF- β ist ein bifunktionales Zytokin [37], welches bei einer gestörten Aktivierung eine wichtige Funktion bei der Vermittlung von Entzündungsprozessen, Autoimmunerkrankungen, Tumorentstehung, aber auch bei der Bildung von Fibrosen übernimmt [38-40].

Es werden drei Isoformen des TGF- β unterschieden [41]. Im Allgemeinen wird TGF- β 1 in endothelialen, hämatopoetischen sowie bindegewebigen Zellen exprimiert, wohingegen TGF- β 2 in epithelialen und neuronalen Zellen vorzufinden ist. TGF- β 3 wird wesentlich in mesenchymalen Zellen exprimiert [41]. TGF- β 1 und TGF- β 3 lassen sich vor allem während der frühen Morphogenese finden, wohingegen man TGF- β 2 in differenzierteren Zellen nachweisen kann [42].

Im betroffenen Gewebe von Patienten mit MD können alle drei TGF- β -Isoformen identifiziert werden [43]. TGF- β 2 ist dabei nur in den Myofibroblasten der Knoten bzw. Stränge des erkrankten Gewebes exprimiert, wohingegen TGF- β 1 und TGF- β 3 ebenfalls in dem umgebenden Gewebe zu finden sind [44]. Zhang et al. verglichen die Genexpression mittels cDNA *Microarray* in MD mit gesundem Gewebe und zeigten ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression von TGF- β 2, sowie eine tendenzielle Vermehrung der TGF- β 3-Expression im MD [45]. Ein wesentlicher Unterschied in der TGF- β 1-Expression wurde in dieser Arbeit nicht dargestellt [45], allerdings konnte Badalamente et al. die Effekte von u. a. TGF- β 1 auf die Proliferation von Myofibroblasten im MD aufzeigen [36]. Folglich fördert TGF- β 1 die Differenzierung der Myofibroblasten und kann so die Expression von α -SMA bewirken [46], sodass sich

TGF- β 1 hervorragend für die experimentelle Induktion der Fibroblasten zu Myofibroblasten eignet.

TGF- β bildet als Homodimer nichtkovalent mit *latency-associated peptide* (LAP) einen inaktiven Komplex [47], der *small latent complex* (SLC) genannt wird [48]. Dieser Komplex ist an ein weiteres Protein gebunden, das *latent-TGF- β -binding protein* (LTBP) [48]. Diese als *large latent complex* (LLC) bezeichnete Formation wird in die EZM sekretiert [49]. Eine Vorgängerarbeit unserer Arbeitsgruppe konnte bereits eine erhöhte Expression von LAP-TGF- β in der durchflusszytometrischen Analyse in MD-Fibroblasten aufzeigen [50].

Schließlich kann TGF- β in der EZM über proteolytische Spaltung mittels Plasmin [51, 52] oder durch Thrombospondin aktiviert werden [49]. Ebenfalls kann TGF- β durch ionisierende Strahlung mit Bildung von *reactive oxygen species* (ROS) freigesetzt werden [53], wobei auch ROS alleine eine Aktivierung von TGF- β bewirken können [54]. Darüber hinaus konnten viele weitere Aktivatoren des TGF- β identifiziert werden [55]. So kann alternativ die Freisetzung des TGF- β aus dem LLC beispielsweise auch mittels LTBP-1-TGF- β -Interaktion über die Integrine $\alpha\beta$ 6 [56, 57], α 8 β 1 [58] und $\alpha\beta$ 3 [59], sowie über das Integrin $\alpha\beta$ 8 [60] erfolgen. Neuere Untersuchungen von Campbell et al. zur Wechselwirkung von $\alpha\beta$ 8 und TGF- β zeigen zudem einen alternativen Modus der TGF- β -Aktivierung auf, der keine Freisetzung des TGF- β s von dem LAP erforderlich macht [61]. Erwähnenswert ist ebenfalls, dass die Integrine α 8 β 1 und $\alpha\beta$ 3 bereits mit fibrotischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden [62, 63]. In der aktiven Form kann TGF- β nun als Zytokin verschiedene Signalwege induzieren. In Fibroblasten stellt die Regulation von α -SMA durch TGF- β über Smad-Proteine einen wesentlichen Mechanismus der Signaltransduktion von extra- nach intrazellulär dar [29, 64]. Smad Proteine übernehmen somit die Funktion von Transkriptionsfaktoren [65].

So phosphoryliert und rekrutiert TGF- β 1 durch die Bindung an den TGF- β -Rezeptor II, den TGF- β -Rezeptor I, woraufhin beide Rezeptoren an der Zelloberfläche einen heteromeren Rezeptorkomplex bilden [66]. Die Serin/Threonin-Kinase des aktivierten Rezeptors phosphoryliert daraufhin intrazellulär Smad 2 und Smad 3. Diese binden an Smad 4 und translozieren in den Zellkern, um dort im Zusammenspiel mit weiteren DNA-Transkriptionsfaktoren die Gentranskription von entsprechenden Zielgenen zu induzieren [67, 68]. Alternativ steht auch eine Smad-unabhängige Aktivierung des

TGF- β -Signalweges zur Verfügung [69], bei dem Krüppel-like Faktoren Sp1/3 an das TGF- β 1 Kontrollelement und die TGF- β 1 hypersensitive Region binden [70, 71].

Ein wichtiger Effektor und nachgeschaltetes Ziel des TGF- β 1/Smad3-Stoffwechselweges ist Plasminogen Aktivator Inhibitor-I (PAI-I), auch als Serin Protease Inhibitor-I (SERPINE-I) bekannt [72]. PAI-I ist ein wichtiger Faktor bei der Regulierung der perizellulären proteolytischen Mikroumgebung und der fibrotischen Reaktion auf Gewebsverletzungen. PAI-I bewirkt die Reaktion von Plasminogen zu Plasmin. Relevant dabei sind die Plasmin-erzeugenden Proteasen (uPA, tPA), die sowohl die Akkumulation als auch die Degeneration der EZM durch komplexe proteolytische Kaskaden beeinflussen. Dabei wird pro-uPA entweder durch membranverankerte Serinproteasen oder durch katalytische Mengen von Plasmin in das aktive Enzym uPA gespalten. Dieses induziert die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin und führt so zu einer Mobilisierung von Matrix-Metalloproteasen, welche mit Einfluss auf die EZM-Umbauprozesse nehmen [73]. PAI-I stellt somit einen wichtigen Inhibitor der Plasminbildung dar und kann auf diese Weise den Abbau der EZM vermindern [72]. Zudem erleichtert eine erhöhte PAI-I-Aktivität, welche oft durch TGF- β i. R. von Gewebsverletzungen induziert ist, die EZM-Akkumulation und verhindert gleichzeitig einen Abbau der EZM [73, 74]. PAI-I kann dadurch wesentlichen Einfluss auf vaskuläre Umbauprozesse, die Zellmigration glatter Muskelzellen, die Proliferation sowie deren Apoptose nehmen [75] und trägt so nachweislich zur Fibrogenese bei [76]. Der Wachstumsfaktor TGF- β bewirkt folglich eine Erhöhung der PAI-I-Transkription und stellt somit einen Regulator der PAI-I-Expression dar [77]. Daher kann die PAI-I-Expression zum experimentellen Nachweis der TGF- β -Aktivität verwendet werden [78, 79].

Von großer Bedeutung erscheint auch, dass PAI-I ein nachgeschaltetes Ziel von p53 ist und an der Induktion der replikativen Seneszenz beteiligt zu sein scheint [80].

Das p53-Protein, auch Wächter der Zelle genannt, nimmt eine sehr wichtige Rolle als Tumorsuppressor ein [81]. Es ist generell an der Regulierung des Wachstums, der Zell-Seneszenz sowie der Apoptose von Zellen beteiligt [82]. Zudem deuten neuere Untersuchungen darauf hin, dass p53 ebenfalls eine bedeutende Funktion in biologischen Prozessen wie Autophagie, Fruchtbarkeit, Metabolismus und Immunantwort übernimmt [82-85].

P53 wird als Reaktion auf verschiedene Signale, wie z. B. DNA-Schäden und oxidativer Stress, durch Phosphorylierung des ATM/ATR-Signalweges mobilisiert [73].

Auch TGF- β kann die Transkriptionsaktivität von p53 induzieren, in dem es durch Phosphorylierung und Acetylierung die Interaktion von p53 mit Smad-Proteinen fördert [73]. Dieser Komplex kann selektiv durch Acetylierung PAI-I aktivieren [86]. Overstreet et al. konnten bereits eine ausgeprägte Co-Induktion von Smad3, p53 und PAI-I im Tubulusepithel der Niere darstellen [87]. Interessanterweise konnte die Arbeitsgruppe auch eine Abhängigkeit der TGF- β -induzierten Phosphorylierung von p53 und der erhöhten Expression mehrerer profibrotischer Gene zu der schnellen Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) aufzeigen [87]. Darüberhinaus zeigten Wu et al. hinsichtlich der pulmonalen Fibrose, dass eine erhöhte Expression von p53 zu vermehrtem oxidativen Stress zu führen scheint, was in einer schnelleren Alterung der Fibroblasten resultiert [88]. Diese Beobachtungen legen eine wichtige wechselseitige Beziehung zwischen p53 und ROS nah [89].

1.5.3 Bedeutung von ROS und protektiven antioxidativen Redoxsystemen

ROS sind O₂-enthaltende Moleküle mit großer Reaktionsbereitschaft. Zu ihnen werden u. a. das Hyperoxid-Anion O₂^{•-}, das hochreaktive Hydroxyl-Radikal OH[•] und Wasserperoxid H₂O₂ gezählt, welche durch die Aufnahme zusätzlicher Elektronen durch das O₂ gekennzeichnet sind [90]. ROS entstehen nicht nur durch Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung [91], sondern auch als Nebenreaktion einiger Oxdasen, wie z. B. der NADPH-Oxidase [92]. Auch als zelluläre Antwort auf Entzündungsprozesse werden ROS gebildet [93]. ROS verändern die Proteinfunktion hauptsächlich durch die Redox-Regulierung von reaktiven Cystein-Resten. Bei dieser Oxidation wird Sulfensäure gebildet, die mit nah gelegenen Cysteinen Disulfidbindungen bilden kann oder weiter zu Sulfinsäure bzw. Sulfonsäure oxidiert wird [94]. ROS sind essentielle Bestandteile vieler Signalkaskaden und übernehmen so z. B. wichtige Funktionen wie es bei der Signaltransduktion im Gehirn der Fall ist [95]. Entsteht ein Ungleichgewicht zu Gunsten von ROS entsteht oxidativer Stress, welcher zytotoxisch wirken kann. Es können molekulare Schäden an Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren resultieren, welche an der Ausbildung verschiedenster Krankheitsbilder beteiligt sind [94]. Eine Korrelation von ROS und oxidativem Stress konnte bereits durch Dekhuijzen et al. in der Atemluft sowie durch Praticò et al. im Urin von Patienten mit Lungenfibrose deutlich gemacht werden [96, 97].

Erhöhte Konzentrationen von ROS wurden ebenfalls im MD-Gewebe detektiert [32, 98]. Murrell et al. stellten die Hypothese auf, dass die nachgewiesenen erhöhten

Konzentrationen von Hypoxanthin durch Reaktion mit der Xanthin Oxidase im weiteren Verlauf in einer vermehrten Freisetzung von ROS resultiert [98].

Vermutlich beeinflussen ROS und TGF- β auch wechselseitig die Pathogenese des MD, wie es bereits schon für die Tumorgenese und deren Progression gezeigt werden konnte [99]. ROS fördern, wie oben beschrieben, die Freisetzung von TGF- β aus seinem inaktiven latenten Komplex (LAP-TGF- β), wodurch TGF- β frei verfügbar wird [49, 54, 100]. TGF- β wiederum kann die ROS-Konzentration erhöhen, in dem es dessen Generierung über die Expression der NOX4 und der daraus resultierenden Aktivitätszunahme induziert [101].

Ursächlich für die erhöhten Konzentrationen an ROS auf die Reaktion von TGF- β könnte auch die verminderte Expression antioxidativer Systeme sein, da der Abbau von ROS enzymatisch über diese erfolgen kann [101].

Die Superoxiddismutase (SOD) ist beispielsweise ein solches antioxidatives Enzym. Es katalysiert die Reaktion von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff und schützt somit die Zelle vor potenziell schädigenden Einflüssen durch ROS und oxidativem Stress [101]. Man unterscheidet die zytoplasmatische SOD1 und die mitochondriale SOD2 von der extrazellulären SOD3 [101].

Die SOD1 (CuZn-Superoxiddismutase) befindet sich im Zytoplasma von Säugetieren und ist verantwortlich für den Abbau von ROS im Körper [102]. Es wurde bereits dargestellt, dass eine Applikation der SOD1 *in vivo* eine Rückbildung des fibrotischen Gewebes induzieren kann [103]. Vozenin-Brotons et al. konnten durch die Zugabe der SOD1 zu Myofibroblasten die TGF- β 1-Expression signifikant verringern, welches SOD1 als potenten Regulator des fibrogenen Wachstums vermuten lässt [104].

Die SOD2 (Mn-Superoxiddismutase) ist ein wichtiges Antioxidans, welches in den Mitochondrien lokalisiert ist. Dort schützt es die Zelle u. a. vor dem hochreaktiven Superoxid, indem es dies, wie oben beschrieben, abbaut und somit der Zellalterung vorbeugt. Es konnte bereits demonstriert werden, dass TGF- β die MnSOD *in vitro* maßgeblich inhibieren kann [105, 106]. So sind in Tumorzellen verminderte Konzentration von MnSOD nachweisbar, was zu einer Dysbalance und folglich einer Tumorprogression führen könnte [107].

Bei chronischer Niereninsuffizienz konnte bereits demonstriert werden, dass durch MnTBAP (*manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin chloride*), eine molekulare Mimikry der SOD [108], eine verringerte fibrotische Reaktion in Folge einer

verminderten Ablagerung von sowohl extrazellulärer als auch kollagener Matrix erzielt werden kann [109]. Ähnliche Effekte wurden bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose beobachtet [110].

Ein weiteres hochpotentes ROS-abbauendes Enzym ist die Katalase, welches im Cytosol und in den Peroxisomen lokalisiert ist [111]. Sie katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff und vermindert somit weiter den oxidativen Schaden [112, 113]. Ein protektiver Effekt der Katalase konnte bereits für die Leberfibrose dargestellt werden, wo Katalase die Hemmung der Aktivierung der stellatischen Leberzellen bewirkt und somit die Leberfibrose verbessern kann [114].

1.6 Therapie und Prognose bei Erkrankung mit Morbus Dupuytren

Das Hauptziel bei der Behandlung des MD ist der Erhalt bzw. die Wiederherstellung der Fähigkeit, die Finger zu strecken (Fingerextension) und somit der Handfunktion [115]. In frühen Stadien und bei geringer Beeinträchtigung des Patienten im Alltag kann zunächst ein abwartendes Verhalten bei der Therapie des MD angestrebt werden [116]. Darüber hinaus kann das Durchführen einer Physiotherapie subjektiv ein Herauszögern der Kontrakturbildung bewirken bzw. eine Beschwerdelinderung erzielen [117]. Da es sich hierbei meistens um eine progrediente Erkrankung handelt, sind rein konservative Maßnahmen jedoch meist ohne Erfolg.

Interventionell kann die Durchführung einer Radiotherapie mit einer Gesamtdosis von 30 Gy den Krankheitsprogress zumindest in den frühen Phasen des MD reduzieren [118]. Als weitere nicht-operative Maßnahmen können die Injektion von Steroiden oder auch Vitamin E in Betracht gezogen werden, allerdings ist deren Therapieerfolg eher umstritten [117].

Eine weiteres Behandlungskonzept stellt die Injektion von kommerziell hergestellter Kollagenase dar. Diese kann, im Vergleich zum chirurgischen Verfahren, relativ nebenwirkungsarm zu einer signifikanten Reduktion der Kontrakturen und somit zu einer Funktionsbesserung der Hand führen [119]. Da die Rezidivrate allerdings hoch und das Medikament teuer ist, wird es in Deutschland nicht von den Kostenträgern erstattet und steht somit hierzulande nicht zur Verfügung. Als weiteres minimal-invasives operatives Verfahren kommt die perkutane Nadelfasziotomie zum Einsatz, wobei die Kontrakturen mit einer Nadel perkutan eingestochen und bei anschließender Streckung des Fingers aufgedehnt werden. Die unmittelbaren Behandlungserfolge

sind gut, allerdings ist auch dieses Verfahren durch eine ausgesprochen hohe Rezidivrate gekennzeichnet [120].

Als Goldstandard in der Versorgung der Dupuytren'schen Kontraktur gilt weiterhin die offene chirurgische Entfernung des erkrankten Faszien- und Aponeurosegewebes, die partielle Aponeurektomie. Dabei wird erkranktes Gewebe operativ entfernt und nicht befallene Band- und Aponeurosestrukturen werden belassen [121, 122]. Die besondere Schwierigkeit der Operation liegt in der Darstellung sowie Schonung der sensiblen Fingernerven, die regelhaft mit dem Bindegewebssträngen verwachsen sind und feinsäuberlich in mikrochirurgischer Technik herauspräpariert (neurolysiert) werden müssen [123]. Es wird empfohlen, diesen Eingriff nur von Ärztinnen und Ärzten mit ausgewiesener handchirurgischer Expertise durchführen zu lassen. Für einen bleibenden Therapieerfolg wird postoperativ unmittelbar eine Nachbehandlung mittels intermittierender Kompression und aktiver Mobilisation empfohlen [124].

Bei kritischer Minderversorgung der betroffenen Finger und mehrfachen erfolglosen Versuchen der operativen Aponeurektomie ist als ultima ratio die Amputation des betroffenen Fingers in Betracht zu ziehen, die sich trotz optimaler Versorgung nicht in jedem Fall verhindern lässt [19].

Unabhängig vom gewählten Therapieverfahren wird die Behandlung und Prognose des MD durch hohe Rezidivquoten erschwert [125]. Im Rahmen eines Therapieansatzes mittels Nadelfasziotomie oder Kollagenase-Injektion bilden 65 % der Betroffenen innerhalb der ersten drei Jahre nach Behandlung ein Rezidiv aus, wohingegen bei der partiellen Aponeurektomie nach 6 Jahren die Rezidivquote nur bei 8,4 % liegt [126].

1.7 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Bekannt ist bereits, dass im MD sowohl erhöhte Konzentrationen von ROS als auch TGF- β nachzuweisen sind, die sich wechselseitig beeinflussen können.

Daraus ableitend ließen sich folgende Fragestellungen definieren, die im Rahmen dieser Dissertation analysiert werden sollten:

1. Wie kommt es im MD zu der Ausbildung der erhöhten Konzentrationen von ROS und welchen Einfluss hat das auf die Myofibroblastengenesese?

Zur Untersuchung dieser Frage wurden ROS-modulierende Proteine in MD- und CTS-Fibroblasten untersucht und mittels Western Blot hinsichtlich ihrer Proteinexpression verglichen. Anschließend wurde untersucht, welchen Effekt die Zugabe von Antioxidantien auf die MD-Fibroblasten hat und welchen Einfluss dies auf die Myofibroblastengnese, gemessen an der α -SMA-Expression und TGF- β -Aktivität, im MD ausübt.

Des Weiteren sollte folgende Fragestellung evaluiert werden:

2. Welchen Einfluss könnte die Freisetzung des TGF- β aus dem extrazellulären Komplex auf die gestörte Myofibroblastengnese im MD haben?

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung sollten MD- und CTS-Fibroblasten hinsichtlich der LTBP1-Expression sowie der LAP-TGF- β -Expression miteinander verglichen werden. Ebenfalls wurde evaluiert, inwiefern einer eventuellen dysfunktionalen Prozessierung des LAP-TGF- β s Bedeutung in der Pathogenese des MD beigemessen werden könnte. Hierfür wurden MD-Fibroblasten mit Proteasen behandelt, die an der proteolytischen Freisetzung des TGF- β aus dem LLC beteiligt sein könnten und hinsichtlich der α -SMA-Expression als Hinweis auf einen möglichen Effekt der Myofibroblastendifferenzierung im MD untersucht. Zudem erfolgte eine Analyse der Auswirkung auf die biologische Aktivität des TGF- β .

2 Material und Methoden

2.1 Ethikantrag und Patientenkollektiv

Die in dieser Dissertation für experimentelle Zwecke benötigten Fibroblasten wurden aus Gewebeproben der Palmaraponeurose von Patienten gewonnen, die wegen eines MD oder eines CTS in der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf operativ behandelt wurden.

Ein positives Ethikvotum zur „Erstellung einer Biobank zur Erforschung des Morbus Dupuytren“ liegt unter der Studiennummer 5882R vor. Nach schriftlicher Einwilligung der Patienten zur Probenentnahme und Teilnahme an der Studie wurde das Gewebe chirurgisch aus der Palmarfaszie extrahiert. Insgesamt nahmen in der MD-Gruppe 26 Spender mit einem Durchschnittsalter von 61,27 Jahren (6 weibliche und 20 männliche Spender) und in der CTS-Gruppe 23 Spender mit einem Durchschnittsalter von 68,35 Jahren (17 weibliche und 6 männliche Spender) teil.

2.2 Geräte und Materialien

2.2.1 Antikörper, Marker und Primer

Produkt	Produktbezeichnung	Produzent
α-SMA	Anti-alpha smooth muscle Actin antibody, ab7817	Abcam, Cambridge, UK
MnSOD	Anti-MnSOD Human, SPC-118D	StressMarq Bioscience, Victoria, CA
p53	p53 Antibody, #9282	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
LAP-AK konjugiert	Human LAP (TGF-β1) APC-conjugated Antibody (Monoclonal Mouse IgG1), FAB2463A	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
LAP-AK unkonjugiert	Human LAP (TGF-β1) Antibody (Polyclonal Goat IgG), AB-246-NA	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
LTBP1-Primer	Homo sapiens latent transforming growth factor beta binding protein 1 (LTBP1), transcript variant X14, mRNA. Forward: GCCCTGTTACCGACTTGT	Eurofins Genomics, Ebersberg, DE

	CA, Reverse: TACCTGGAAACT GTGGATGCAG	
2.AK: goat anti mouse	Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulines/HRP, P0447	DAKO Denmark A/S, Glostrup, DK
2.AK: goat anti rabbit	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulines/HRP, P0448	DAKO Denmark A/S, Glostrup, DK
2.AK: rabbit anti goat	Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulines/HRP, P0449	DAKO Denmark A/S, Glostrup, DK
Western Blot Protein Marker	Roti Mark Western Plus Protein-Marker, 2245.2	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Western Substrat	Immoblion Forte Western HRP Substrate, WBLUF0100	Merck Millipore, Massachusetts, USA

Tabelle 2: Antikörper, Marker und Primer

2.2.2 Kits

Produkt	Produktbezeichnung	Produzent
Protein-Kit	Pierce BCA Protein Assay Kit, 23225	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
PCR-Kit	Rneasy Mini Kit (250), 74106; QIAshredder (250), 79656	Qiagen, Hilden, DE
PAI-ELISA-KIT	DuoSet Human Serpin E1/PAI-1, DY1786; Ancillary Reagent Kit 2, DY008	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA

Tabelle 3: Kits

2.2.3 Laborgeräte

Produkt	Produktbezeichnung	Produzent
Absaugpumpe	Laboport Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, DE
Abzug	Laborsystem mc6 - TA 1500 x 900 - 900	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co.KG, Wangen, DE
Autoklav	Laboklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, DE
Autoklav	Systec DX-90	Systec GmbH, Linden, DE
Bechergläser	Duran Becher	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, DE

Blotting Gerät	Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Brutschrank 37 °C	Kelvitron t, Typ: B6060	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Bunsenbrenner	Fuego SCS basic	WLD-Tec, Göttingen, DE
ChemiDoc	ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
CO ₂ -Brutschrank	Heracell 150i CO ₂ -Inkubator	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Eisbox zur Lagerung der Proben	NeoLab Eisbad aus PS	NeoLab migge GmbH, Heidelberg, DE
Eismaschine	Scotsman AF80 Ice Flaker	Scotsman Ice Systems, Ipswich, GB
Eismaschine	RF 0244 A	Manitowoc Ice, Manitowoc, USA
Gefrierschrank -20 °C	GUw1213	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, DE
Gefrierschrank -80 °C	Herafreeze HFU T Serie – 86 °C Ultratiefkühlschrank	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Heizplatte	Fisherbrand Single Block Dry Bath FB15101	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Kryobehälter	Cryo 1 °C Mr. Frosty, Freezing Container	Nalge Nunc International Corp., Rochester, USA
Kühlschrank 4 °C	Kuw 1740	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, DE
Kühlschrank 4 °C	Nunc Kühlschrank mit Glastür	Nalge Nunc International Corp., Rochester, USA
Magnetrührer	620 Standrad	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Messzylinder	Messzylinder, PP, Klasse B mit Skala	Vitlab GmbH, Grossostheim, DE
Messzylinder	Borosilkatglas 3.3, Klasse b	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Mikroreaktionsgefäß-Ständer aus Metall	Rotilabo-Alu.Rack 1.5	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Mikroskop	Axio Vert.A1 - inverses Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
N ₂ -Tank	Model 8207	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE

Netzgerät für Elektrophorese	PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Ohrenschützer	Peltor Optime I Kapselgehörschutz H510A	3M Deutschland GmbH, Neuss, DE
Pipetus (Pipettierhilfe)	Accu-jet pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Pipetus (Pipettierhilfe)	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, DE
Pipetus (Pipettierhilfe)	Omega Pipettor	Argos Technologies Inc., Vernon Hills, USA
Roller	Multi-Axle-Rotating-Mixer	Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen, DE
RT-System	Step One™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Rüttler	Kleinschüttler KM-2	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, DE
Sonifizierer	Sonotrode Ms1, UP50H	Hielscher Ultrasonics GmbH, teltow, DE
Sterile Werkbank	Herasafe KS 18	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Sterile Werkbank	Euroflow EFA5	Clean Air Technik bv, Woerden, NL
Thermalcycler	T100™ ThermalCycler	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Thermostat	ThermoStat plus	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Victor	Multilabel plate reader Victor3	Perkin Elmer Inc., Woonsocket, USA
Vortex	IKA MS3 basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Vortex	Vortex Mixer	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Vortex	L46 Power Mixer	Labinco BV, Breda, NL
Vortex	Reax Top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Waage	ABJ 220-4M	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE

Wasserbad	Aqualine AL 12	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, DE
Zählkammer	Neubauer Zählkammer mit 0,1 mm Kammertiefe	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, DE
Zentrifuge	Heraeus Fresco 17	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 16R	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Zentrifuge klein	MiniSpin	Eppendorf AG, Hamburg, DE

Tabelle 4: Laborgeräte

2.2.4 Software

Produkt	Produktbezeichnung	Produzent
Bildanalyse Software für Western Blot	Image Lab (Version 6.0.1) build 34, Standard Edition	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Spektralphotometer-Software	Messsoftware für NanoDrop	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Statistik-Software	Prism 9 for macOS (Version 9.2.0, 283)	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Tabellenkalkulations-Software	Mircosoft Excel für Mac (Version 16.37, 20051002)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Schreib-Software	Mircosoft Word für Mac (Version 16.28, 20061401)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Victor-Software	WorkOut 2.0	DAZDAQ LTD., Brighton, UK

Tabelle 5: Software

2.2.5 Substanzen

Produkt	Produktbezeichnung	Produzent
2-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol	SIGMA Aldrich Co., St. Louis, USA
Bromphenolblau	Bromphenolblau Natriumsalz für die Gelelektrophorese	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
BSA	Albumin Fraktion V für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
CO ₂ -Gas	Kohlendioxid UN1013	Linde AG, Pullach im Isartal, DE
destilliertes Wasser	Demi-Wasser	Otto Fischar GmbH & Co.KG, Saarbrücken, DE

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, 41965-039	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
DMSO	Dimethylsulfoxide, D4540	SIGMA Aldrich Co., St. Louis, USA
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, D853	SIGMA Aldrich Co., St. Louis, USA
Ethanol	Technisolv Ethanol (70%)	VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, FR
FBS	Sera Plus EU approved regions special processed FBS 0.2 um sterile filtered, P30-3072	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Flächendesinfektion	Indicin Rapid	Ecolab GmbH & Co.KG, Düsseldorf, DE
Hanks	Hanks' Balanced Salt Solution, H8264	SIGMA Aldrich Co., St. Louis, USA
HEPES	Hepes Solution 1 M, pH 7.0 - 7.6, steril filtered, BioReagent, suitable for cell culture, H0887	SIGMA Aldrich Co., St. Louis, USA
hLAP-TGF- β	Recombinant Human LAP (TGF-beta 1) Protein, 246-LP	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
Katalase	Catalase from bovine liver 11895 units/mg protein, C30	SIGMA Aldrich Co., St. Louis, USA
Methanol	Methanol Rotipuran ACS, ISO	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
MnTBAP	Cell-permeable superoxide dismutase (SOD) mimetic and peroxynitrite scavenger, 475870	SIGMA Aldrich Co., St. Louis, USA
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin: 10.000 U/ml Penicillin; 10 mg/ml Streptomycin, P06-07100	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Plasmin	Plasmin from human plasma, P1867	SIGMA Aldrich Co., St. Louis, USA
Ponceau	Ponceau S, BioReagent	SIGMA Aldrich Co., St. Louis, USA
SOD	Bacterial Recombinant SOD-A, SRP6107	SIGMA Aldrich Co., St. Louis, USA
TGF- β	Recombinant Human TGF- β 1 (HEK293 derived)	PeptoTech Inc., Rocky Hill, USA

Thrombospondin	PeptoTech Inc., Rocky Hill, USA	SIGMA Aldrich Co., St. Louis, USA
TRIS	TRIS Pufferan, Buffer Grad	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Trypsin	Trypsin - EDTA Solution, T4174	SIGMA Aldrich Co., St. Louis, USA
Tryptanblau	Trypan blue Solution, T8154	SIGMA Aldrich Co., St. Louis, USA
Tween	Tween 20 for molecular biology	SIGMA Aldrich Co., St. Louis, USA
Wasser	Ampuwa Spüllösung Plastipur	Fresenius Kabi France, Severes, FR

Tabelle 6: Substanzen

2.2.6 Verbrauchsmaterialien

	Produktbezeichnung	Produzent
6-Well-Platte	6 well plate, cell culture treated, with lid, lid with condensation ring, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
96-Well-Platte (Mikrotiterplatte)	96-Well-Platte (Mikrotiterplatte)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Abwurfbeutel	Vernichtungsbeutel 200 x 300 mm, PP, transparent, Stärke 50 µm, autoklavierbar	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Blottingmembran	Nitrocellulose Blotting-Membran (Porengröße 0,2 µm)	VWR International LLC.; Radnir, USA
Blottingpads	Blotting Filter Paper, 2,5 mm thick, 7,5 x 8,4 cm	Invitrogen, Carlsbad, USA
Desinfektionstücher	Schülke Wipes, Feuchttuchspender für Flächendesinfektionsmittel	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, DE
Falcon 15 ml	15 ml tubes, sterile, graduation and writing area	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Falcon 50 ml	50 ml tubes, sterile, graduation and writing area	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Folie zum Zukleben	Parafilm "M" All-Purpose Laboratory Film	Bemis Company Inc., Neenah, USA
Glaspipettenspitzen	Pasteurpipette, Natron-Kalk-Glas mit feiner Spitze, 225mm	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE

Handschuhe, Größe M	Micro-Touch Nitra-Tex Nitrile Powder-Free Examination Gloves	Ansell GmbH, München, DE
Indikatorband für Autoklaviergerät	Comply Steam Indicator Tape, Class 1	3M Deutschland GmbH, Neuss, DE
Kosmetiktücher	tapira Plus Kosmetiktücher	GVS Großverbraucher-spezialisten eG, Heidenheim, DE
Kryoröhren	Cryo.s Kryoröhrchen mit Innengewinde, 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Mikroreaktionsgefäße 0,5 ml	Micro tube 0,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Mikroreaktionsgefäße 0,5 – 2 ml SafeSeal	SafeSeal Tube 0,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Mikroreaktionsgefäße 2 ml	Micro tube 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Mikrotiterfolie	Microtiter Selaing Tape	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Müllbeutel	Sekuroka-Entsorgungsbeutel, PP, Folienstärke 100 µm, 700 x 1100 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Mülleimer für kontaminierte Gegenstände	Kontaminationsabfall, wiva medical waste container	Mauser Corporate GmbH, Brühl, DE
Papiertücher	KIMTECH SCIENCE, Präzisionstücher	Kimberly-Clark Global Sales inc., Roswell, USA
Pasteurpipetten aus Glas	Glass Pasteur Pipettes	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Petrischale	TC-Schale 100, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Petrischale	TC-Schale 150, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Pipettenspitzen 0,5 - 10 µl, 2 - 20 µl, 10 - 100 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl	Eppendorf Research/Research Plus/Reference	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipettenspitze 10/20 µl, 200 µl, 1000 µl	Graduated Tip/Filter Tip	STARLAB GmbH, Hamburg, DE
Pipettenspitzen 300 µl	epT.I.P.S Motion Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Protein Gel 12%	Mini-Protean TGX Stain-Free Gels, #4568046	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA

Protein Gel 4 - 15%	Mini-Protean TGX Stain-Free Gels, #4568086	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Skalpell	Feather Disposable Scalpel	Feather Safety Razor Co, Ltd., Osaka, JP
Stripette 5 - 50 ml	Costar stripette 5 – 50 ml serological pipet, individually wrapped	Corning Inc., Corning, USA
Wiegeschale	Diamond weighing boats, antistatic	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Zellschaber	Cell Lifter, Polyethylene, sterile	Corning Inc., Corning, USA

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

2.3 Methoden

2.3.1 Isolation der Fibroblasten

Um aus dem gespendeten Gewebe die Fibroblasten zu isolieren, wurde zunächst das überflüssige Fettgewebe abpräpariert. Anschließend wurden die Gewebestücke in einer Petrischale mittels eines Skalpells jeweils zu einer Größe von ungefähr 5 x 5 mm zerkleinert. Die Gewebeproben wurden in Nährmedium bestehend aus „*Dulbecco´s modified Eagle´s Medium*“ (DMEM 4,5 g/l Glucose) mit Zusatz von 10 %-igem fetalem Rinderserum (FBS) und Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Innerhalb einiger Tage hatten sich die Fibroblasten aus dem Gewebe abgelöst und wurden am Boden der Petrischale adhärent.

2.3.2 Auftauen und Einfrieren der Fibroblasten

Die bei -80 °C gelagerten Fibroblasten wurden angetaut und mittels 1 ml warmen Nährmedium vorsichtig auf- und abpipettiert, bis die angetaute Zellsuspension sich vollständig gelöst hatte. Es erfolgte die Aussaat in eine Petrischale mit einem Durchmesser von 8,5 cm und 13 ml frischem Nährmedium. Die Inkubation wurde im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ durchgeführt. Nach 24 h wurde das Nährmedium gewechselt, um toxische Rückstände und tote Zellen zu entfernen.

Überschüssige Fibroblasten wurden kryokonserviert, indem zunächst das Nährmedium abgesaugt wurde und die Fibroblasten mit *Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline* (DPBS) gewaschen wurden. Es folgte das Ablösen der Fibroblasten vom Boden der Petrischale mittels 10 %-igem Trypsin-EDTA in DPBS (5 ml Trypsin

und 45 ml DPBS). Nach ungefähr 5 min wurde die Trypsin-Reaktion unter mikroskopischer Kontrolle, nachdem sich die Fibroblasten vom Boden gelöst hatten, mit mindestens der gleichen Menge Nährmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon überführt und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Fibroblasten wurden gezählt und in einer Zellzahl 1×10^6 in Kryoröhrchen mittels 1 ml eisgekühltem Einfriermedium (10 % Dimethylsulfoxide (DMSO) und 90 % FBS) überführt und anschließend in einem Gefrierbehälter mit Isopropylalkohol (Mr. Frosty) bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert, um ein gleichmäßiges sowie kontrolliertes Herunterkühlen um 1°C pro/ Minute (min) der Fibroblasten zu gewährleisten. Für die längere Lagerung wurden die kryokonservierten Fibroblasten in N_2 überführt.

2.3.3 Splitten und Aussäen der Fibroblasten

Konfluente Fibroblasten wurden gesplittet. Dabei wurde zunächst das alte Nährmedium abgesaugt, die Fibroblasten mit DPBS gewaschen und danach mittels 10 %-igem Trypsin-EDTA für 5 – 10 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert. Nach erfolgreichem Ablösen der Zellen konnte die Trypsin-Reaktion durch Hinzufügen von Nährmedium gestoppt werden. Es folgte die Überführung der Zellsuspension in ein Falcon, welcher für 5 min bei 300 g in eine Zentrifuge gegeben wurde. Der Überstand wurde abgesaugt und ungefähr 5 ml frisches Nährmedium hinzugefügt. Das Zellpellet wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und anschließend in der Regel 1:3 oder 1:2 auf Petrischalen mit frischem Nährmedium aufgeteilt.

2.3.4 Zellen zählen

Die Fibroblasten wurden gewaschen, wie oben beschrieben mit Trypsin-EDTA inkubiert und das Zellpellet in frischem Nährmedium gelöst. Nun erfolgte die Entnahme von $10\text{ }\mu\text{l}$ Zellsuspension, welche mit $10\text{ }\mu\text{l}$ Trypanblau vermischt und anschließend in eine Neubauer-Zählkammer gegeben wurde. Die Fibroblasten wurden gezählt und mit folgender Formel die Gesamtzellzahl pro 1 ml ermittelt.

$$\text{Zellzahl pro 1 ml} = \frac{\text{Zahl der gezählten Zellen}}{4 \text{ (Anzahl Großquadrate)}} \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10 \text{ Kammerfaktor}^4$$

Die gewünschte Zellkonzentration von 5×10^4 pro Well wurde wie folgt erreicht:

$$\text{Zellvolumen} = \frac{\text{Zielkonzentration der Zellen pro ml (soll)}}{\text{Zellzahl pro ml (haben)}} \times \text{gewünschtes Volumen}$$

Nach dieser Bestimmung wurde jedes Well jeweils mit 1 ml der Zellsuspension sowie 1 ml frischem Nährmedium befüllt und nach leichtem Schwenken für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.3.5 Kultivieren von Fibroblasten

2.3.5.1 Behandlung der Fibroblasten

Die Fibroblasten wurden für die Versuche teils mit unterschiedlichen Zusätzen im Medium behandelt.

	Konzentration im Medium
TGF-β	1 ng/ml
SOD	0,5 µg/ml
MnTBAP	25 µMol
Katalase	62 U/ml
Plasmin	Konzentrationsreihe: 0,01 – 0,1 U/ml Arbeitskonzentration: 0,05 U/ml
Thrombospondin	0,1 – 25 µg/ml

Tabelle 8: Substanzen für die Zellbehandlung

2.3.6 Vorbereitung der Fibroblasten für die Analysen

Das Nährmedium wurde entfernt und wie oben beschrieben die Trypsinierung der Fibroblasten durchgeführt. Die Reaktion wurde mittels Nährmedium gestoppt. Die Fibroblasten wurden danach in ein Falcon überführt und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Probe mit frischem Nährmedium auf- und abpipettiert und in ein Mikroreaktionsgefäß (hier: Eppendorf Tube 1,5 ml) überführt. Es wurde nun in einer MiniSpin-Zentrifuge bei 400 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Gemäß der Weiterverarbeitung wurden die Proben in der Regel mit 30 µl RIPA für die Western Blot Analyse resuspendiert und bei -80 °C konserviert oder die cDNA isoliert.

2.3.7 Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung der Fibroblasten

Die Proteinbestimmung erfolgte mithilfe des BCA Protein Assay Kit von ThermoFisher. Der BSA-Standard wurde laut Protokoll wie folgt durchgeführt:

Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Bezeichnung	BSA Standard (μl)	PBS (μl)
2	A	300	0
1,5	B	375	125
1	C	325	325
0,75	D	175 von B	175
0,5	E	325 von C	325
0,25	F	325 von E	325
0,125	G	325 von F	325
0,025	H	100 von G	400
0 = Blank	I	0	400

Tabelle 9: BSA Standard

Die vorbereiteten Fibroblasten wurden zunächst zum weiteren Aufschluss der Zellwände mit einer Einstellung von *Cycle 0,5 Impulse pro sec* und Amplitude 80 % bei 50 Watt (W) mit einer Ultraschallfrequenz von 30 kHz mit 10 Stößen sonifiziert. Anschließend wurden jeweils 4 μl Zellsuspension mit 20 μl DPBS durch auf- und abpipettieren in einem 1,5 ml Mikroreagenzgefäß gut durchmischt. Im nächsten Schritt wurde das *Working Reagent* nach Anleitung zubereitet, wobei die Verdünnung 1:50 für Teil A und Teil B des Reagenzes betrug. In einer 96-Well-Platte wurde in Doppelbestimmung nun zuerst der BSA-Standard aufgetragen und folgend jeweils 10 μl der Proben, ebenfalls in Doppelbestimmung. Zu jeder Probe wurde 200 μl *Working Reagent* gegeben, die Platte anschließend mittels Folie versiegelt und für 30 min in einen Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Analyse erfolgte nach der Wartezeit mittels Photometrie per Plattenphotometer (Victor X3) bei einem Absorptionsspektrum von $\lambda = 540 \text{ nm}$.

2.3.8 Western Blot Analyse

Für die Western Blot Analysen wurde eine Proteinmenge von jeweils 10 μg benötigt. Dafür wurden die Proteinproben wie unter 2.3.6 und 2.3.7 beschrieben vorbereitet. Die entsprechende Proteinmenge wurde mit aqua dest. auf 10 μl aufgefüllt. Die Proben wurden entweder direkt verarbeitet oder bei -80 °C aufbewahrt.

Für das weitere Vorgehen wurde der Laemmlipuffer hergestellt, bestehend aus 80 % Laemmli und 20 % Mercaptoethanol, welcher zu je 5 μl jeder Probe zugefügt wurde. Die Proben wurden für 2 min bei 300 g zentrifugiert, für 5 min bei 95 °C in den Wärmeblock gegeben und abschließend auf Eis gelagert. Parallel wurden die Mini-

Protean Precast Gel, je nach Versuch 4, 12- oder 15 %-ig in die Kammer gespannt und mit dem Laufpuffer (10 % 10-facher Laufpuffer zu 90 % aqua dest.) großzügig befüllt. Die Proben wurden nun in die einzelnen Taschen pipettiert, wobei die erste Tasche für die Proteinleiter reserviert war. Nach Befüllen der Gele wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Die Gele wurden für 10 – 15 min beobachtet. Nachdem die Proteine die Grenze von Sammel- und Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 120 – 140 V für ungefähr 40 min erhöht, wodurch sich die Proteine der Größe nach im Gel auftrennten. Das Gel wurde im ChemiDoc Imager per *rapid auto exposure* für 45 sec aktiviert und dokumentiert. Zwischengelagert wurde das Gel in einem Transferpuffer, bestehend aus 10 % Methanol, 8 % 25-facher Transferpuffer und 82 % aqua dest..

Nun folgte das *Blotting*, wobei die sich im Gel befindenden Proteine per Trans Blot Turbo Blotter der Firma BioRad auf eine Nitrocellulosemembran transferiert wurden. Dafür wurde zunächst ein Filterpapier in Transferpuffer aquilibriert und in die Blottingkassette gelegt. Darauf legte man die Nitrocellulosemembran, welche ebenfalls in Transferpuffer getränkt war, dann das Gel und abschließend erneut ein feuchtes Filterpapier. Wichtig dabei war, Luftblasen zu verhindern, da diese die Auswertung erschweren bzw. verfälschen würden. Nach Einbringen der Kassette in das Gerät folgte die Übertragung auf die Membran bei 25 V für 20 min. Es folgte das Blockieren unspezifischer Bindungen auf der Nitrocellulosemembran mittels 5 % BSA in TBS-Tween (10 % TBS, 0,1 % Tween in aqua dest.) bei RT für 1 h. Daraufhin erfolgte über Nacht auf einem Rollenmischer bei 4 °C die entsprechende Primär-Antikörperinkubation (s. Tab. 10).

Am nächsten Tag folgte zunächst ein Waschprozess mit 10 ml TBS-T für 5 min, welcher insgesamt dreimal wiederholt wurde. Der Sekundärantikörper (s. Tab. 11) konnte nun eingesetzt werden und wurde für 1 h bei RT auf die Nitrocellulosemembran gegeben. Danach erfolgten weitere Waschvorgänge wie oben beschrieben. Die Membran wurden abschließend noch für einige min in TBS (10 % 10-faches TBS und 90 % aqua dest.) gewaschen. In einem letzten Schritt erfolgte die Dokumentation der Antikörperbindung mittels ChemiDoc Imager. Die Auswertung wurde mit Image Lab durchgeführt, wobei auf das Totalprotein normalisiert wurde.

Produkt	Produktbezeichnung	Produzent	Block	Konzentration	Spezies
α -SMA	Anti-alpha smooth muscle Actin antibody, ab7817	Abcam	5 %-iges BSA	1:3000	Mouse
MnSOD	Anti-MnSOD Human, SPC-118D	StressMarq Bioscience	5 %-iges BSA	1:3000	Rabbit
p53	p53 Antibody, #9282	Cell Signaling Technology	5 %-iges BSA	1:1000	Rabbit
hLAP-AK konjugiert	Human LAP (TGF- β 1) APC-conjugated Antibody (Monoclonal Mouse IgG1), FAB2463A	R&D Systems	5 %-iges BSA	1:300	-
hLAP-AK unkonjugiert	Human LAP (TGF- β 1) Antibody (Polyclonal Goat IgG), AB-246-NA	R&D Systems	5 %-iges BSA	1000:1	Goat

Tabelle 10: Primärantikörper für die Western Blot Analyse

Produkt	Produktbezeichnung	Produzent	Konzentration	Spezies
Rabbit anti-goat	Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulines/HRP, P0449	DAKO	1:1000	Rabbit
Goat anti-rabbit	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulines/HRP, P0448	DAKO	1:1000	Goat
Goat anti-mouse	Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulines/HRP, P0447	DAKO	1:1000	Goat

Tabelle 11: Sekundärantikörper für die Western Blot Analyse

2.3.9 Real Time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

2.3.9.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte unter Zuhilfenahme der *QIAshredder* und des *RNeasy Mini Kits* der Firma Qiagen. Laut Protokoll des Herstellers wurde zunächst RLT-Lysepuffer mit Mercaptoethanol im Verhältnis 1:100 versetzt, in welchem die Zellen mit 350 µl resuspendiert wurden. Es folgte die RNA-Isolierung bis zum Vorhandensein eines Eluats, welches im Verhältnis 1:10 mit *DNase Buffer* versetzt und durchmischt wurde. In einem nächsten Schritt wurde 1 µl des Enzyms hinzugegeben und die Proben bei 37 °C für 30 min inkubiert. Jede Probe wurde anschließend mit 0,1 Volumenprozent *DNase inactivation reagent* versetzt und nach einer kurzen Verweildauer für 2 min zentrifugiert. Die isolierte RNA wurde in ein steriles Mikroreaktionsgefäß überführt und anschließend einer Konzentrations- und Reinheitsbestimmung unterzogen. Diese Bestimmung erfolgte nach dem Prinzip der spektralphotometrischen Messung unter Zuhilfenahme des Mikrovolumen-Spektralphotometers NanoDrop 2000. Nach der Messung eines Referenzwertes mit RNase freiem Wasser wurden Absorptionsspektren der isolierten RNA bestimmt. Die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm erbrachte die RNA-Konzentration und die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm die Reinheit der isolierten RNA. Der Quotient aus Absorption bei $\lambda = 260$ nm zu $\lambda = 280$ nm sollte $> 1,7$ sein.

2.3.9.2 Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion

Die Proben wurden zunächst allesamt auf 500 ng/10 µl mit RNase freiem Wasser verdünnt. Es folgte die Herstellung des Master Mixes RT nach folgendem Schema:

	Ansatz pro Probe (µl)
RNase freies Wasser	4,5
10-facher RT-Puffer	2
dNTP Mix	2
Oligo dT Primermix	1
RNase Inhibitor	0,25
Omniscrypt Reverse Transcriptase	0,25
TOTAL	10

Tabelle 12: Zusammensetzung des Master Mixes

Jede Probe wurde mit 10 µl des Master Mixes versetzt, woraus ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Probe resultierte. Daraus ergab sich eine Konzentration von 500 ng/20 µl

bzw. 25 ng/μl. Anschließend erfolgte im *Thermal Cycler* in 30 min bei 37 °C die Transkription in cDNA. Für die nachfolgende RT-PCR wurde spezifisch für das zu untersuchende Gen, hier LTBP-1 (Forward: GCCCTGTTACCGACTTGTC A, Reverse: TACCTGGAAACTGTGGATGCAG) und dem Referenzgen GAPDH (Forward CCCTTCATTGACCTC, Reverse ATGACAAGCTTCCCG), ein Master Mix nach folgendem Schema erstellt:

	Ansatz pro Probe (μl)
RNase freies Wasser	7
SyBR Green MasterMix	12,5
Primer F	0,75
Primer R	0,75
TOTAL	21

Tabelle 13: Zusammensetzung des Master Mixes für die reverse Transkription

Auf einer 96–Well-Platte wurde zu jedem Well 4 μl Probe und jeweils 21 μl des Master Mixes pipettiert, wobei die Proben jeweils im Triplet bestimmt wurden. Als Kontrolle wurde immer ein *non template control*, bestehend aus 4 μl RNase freiem Wasser und 21 μl des Master Mixes, mitgeführt. Die 96–Well-Platte wurde anschließend in den RT-Thermocycler überführt, in dem die Analyse erfolgte. Die RT-PCR wurde mit der Denaturierung bei 95 °C für 2 min gestartet und anschließend wurden nach 30 sec Primerhybridisierung, 1 min Elongation und 30 sec Strangenaturierung 45 Amplifikationszyklen bei 60 °C durchgeführt.

Zur weiteren Auswertung wurden die CT-Werte des *House Keeping Gen* Glycerinaldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) normiert.

2.3.9.3 Gelelektrophoretischer Nachweis

Hierfür wurde Agarose für ein 1,8 % Gel in einem großen Erlenmeyerkolben abgewogen und mit TAE-Puffer vermischt. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle für mehrere Minuten bei 600 W erhitzt. Im Folgenden wurden die Kammern, die zuvor an den Enden mit Klebeband abgedichtet wurden, mit der etwas abgekühlten aber noch flüssigen Agarose befüllt und die Kämme zur Taschenbildung eingesetzt. Nun wurde mindestens 30 min gewartet, bis das Gel ausgehärtet war.

In einem nächsten Schritt wurde das gegossene Agarose-Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt, großzügig mit TAE-Puffer bedeckt und anschließend der Kamm vorsichtig entfernt. Die in einem Mikroreaktionsgefäß vorbereiteten PCR-

Proben, bestehend aus 20 µl Probe, 2 µl *SYBR Gold* und 4 µl *Condng Dye*, wurden in je eine Tasche des Agarose-Gels pipettiert. Die erste Tasche war dabei für den Marker, bestehend aus 2 µl *SYBR Gold* und 5 µl Fermentas, *DNA Ladder Express*, vorgesehen. Nach Befüllen des Gels wurde die Kammer verschlossen und an eine elektrische Spannung von 80 V für 45 min gelegt. Anschließend wurde mittels ChemiDoc Imager ein Bild angefertigt.

2.3.10 Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-) ELISA

Die Bestimmung des Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 erfolgte nach dem Protokoll des *Human Serpin E1 / PAI-1 DuoSet ELISA Kits* von R&D Systems.

Eine 96-Well-Platte wurde wie folgt vorbereitet: Es wurde 61,1 µl des *Capture Antibodies* in 11.000 µl PBS gelöst. Jedes Well wurde anschließend mit 100 µl des Antikörpers befüllt. Die Platte wurde über Nacht mittels Folie versiegelt und an einem dunklen Ort bei RT inkubiert.

Nach 24 h wurde der *Capture Antibody* abgenommen, die Platte mit 300 µl *Wash Buffer* insgesamt dreimal gewaschen und auf Papiertüchern trocken geklopft. Daraufhin wurde jedem Well 300 µl *Reagent Diluent* hinzugefügt, wodurch unspezifische Bindungen abgesättigt werden sollten. Die Platte wurde wieder mittels Folie versiegelt und 1 h bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Standard wie folgt angesetzt:

Konzentration (ng/ml)	Bezeichnung	Standard (µl)	Reagent Diluent (µl)
20	A	74	1000
10	B	500 aus A	500
5	C	500 aus B	500
2,5	D	500 aus C	500
1,25	E	500 aus D	500
0,625	F	500 aus E	500
0,313	G	500 aus F	500
Blank	H	-	1000

Tabelle 14: Human Serpin E1-Standard

Das zuvor aus dem -80 °C Tiefkühlschrank geholte Zelllysate wurde langsam auf Eis aufgetaut und anschließend gut gevortext. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 1 h wurde die Platte erneut dreimal mittels *Wash Buffer* gewaschen und trocken geklopft. Anschließend wurde je 100 µl des Standards und 100 µl der Proben in Doppelbestimmung auf die Platte aufgetragen. Die Platte wurde wieder mittels Folie

versiegelt und für 2 h bei RT gelagert. Nach Ablauf dieser Wartezeit wurde die Platte ein weiteres Mal einem dreimaligen Waschvorgang, sowie dem Trockenklopfen unterzogen. Nun wurden die Wells mittels *Detection Antibody*, bestehend aus 7,64 μl *Detection*, 220 μl *Normal Goat Serum* (NGS) und 10.780 μl *Reagent Diluent*, mit je 100 μl befüllt. Nach 2 h wurde die Streptavidin-HRP Verdünnung hergestellt. Hierzu wurden 55 μl Streptavidin-HRP in 11.000 μl *Reagent Diluent* gelöst und lichtgeschützt inkubiert. Die Platte wurde mittels *Wash Buffer* dreimal gewaschen, getrocknet und mit je 100 μl /Well mit der Streptavidin-HRP-Lösung gefüllt. Die Platte wurde anschließend dunkel und bei RT für 20 min inkubiert. Es wurde in dieser Zeit die *Substrate Solution*, bestehend aus 6 ml *Color Reagent A* und 6 ml *Color Reagent B* erstellt, welche bis zum Einsatz ebenfalls vor Licht geschützt gelagert wurde. Nachdem die Platte einem letzten dreimaligen Waschprozess unterzogen wurde, konnte je Well 100 μl *Substrate Solution* hinzugefügt werden. Die Platte wurde erneut bei RT und lichtgeschützt für ungefähr 20 min gelagert, wobei in dieser Zeit ein Farbumschlag von gelb zu blau beobachtet werden konnte. Die Reaktion wurde mittels 50 μl *Stop Solution* bestehend aus H_2SO_4 gestoppt. Die Analyse erfolgte nun für jede Probe mittels Plattenphotometer (Victor X3) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450 \text{ nm}$ für 0,1 sec.

2.3.11 Statistische Auswertung

Die statistische und graphische Datenauswertung erfolgte mittels *Graph Pad Prism 9* für macOS. Die Rohdaten wurden auf die jeweilige Kontrolle normiert.

Zur Prüfung der Gaußschen Normalverteilung wurde der Kolmogorov – Smirnov Test mit Dallal – Wilkinson – Lillie für den p – Wert bzw. bei einem kleineren Probenkollektiv der Shapiro – Wilk Test durchgeführt. Im Falle einer Normalverteilung erfolgte eine Analyse mittels *t*-Test, wohingegen bei nicht normalverteilten Daten ein Wilcoxon Test angewandt wurde.

3 Ergebnisse

Die dargestellten Ergebnisse sind als Mittelwert mit 95 %-Konfidenzintervall angegeben. Die Signifikanzen sind unter den jeweiligen Graphen definiert.

3.1 Evaluation von ROS-modulierenden Enzymen im MD

Aus vorherigen Untersuchungen ist bereits bekannt, dass im MD-Gewebe vermehrt ROS generiert werden. Es sollte nun untersucht werden so, ob diese erhöhten Level durch eine vermehrte Produktion oder durch einen verminderten Abbau zustande kommen. Im Rahmen dessen wurden MD-Fibroblasten hin auf ihre Expression von p53, welches bei erhöhter Expression zu vermehrtem oxidativem Stress führen kann, und MnSOD, welches als antioxidatives Enzym zum Abbau von ROS beiträgt, untersucht. Als Kontrollen wurden CTS-Fibroblasten verwendet.

3.1.1 Analyse der p53- und MnSOD-Proteinexpression

In MD-Fibroblasten ließ sich eine fast dreifach erhöhte p53-Proteinexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen (Abb. 5).

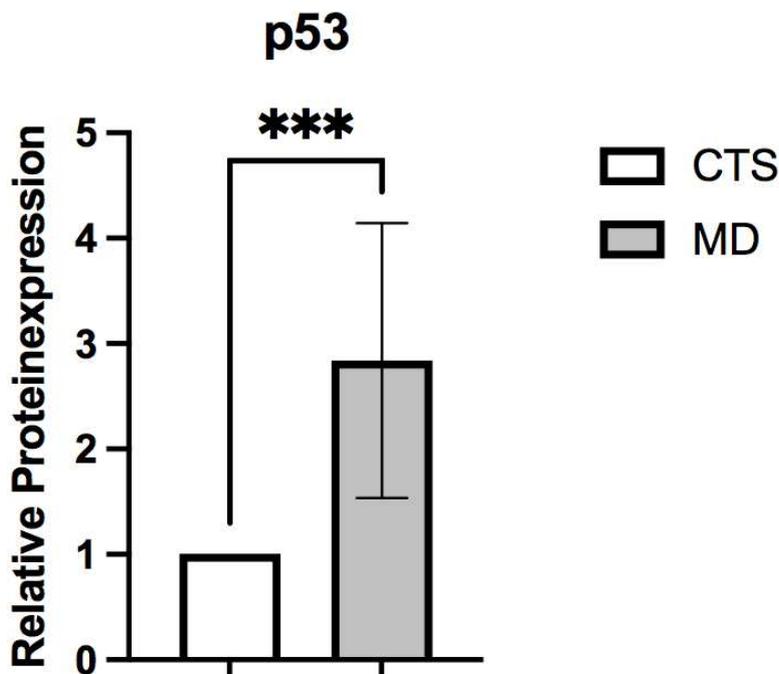


Abb. 5: p53-Expression in CTS (n = 11) und MD (n = 7) Relative Proteinexpression in unbehandelten Fibroblasten. *** p 0,007 (CTS vs. MD)

Im Vergleich zu den als Referenz genutzten CTS-Fibroblasten ist die MnSOD-Proteinexpression in den MD-Fibroblasten um ca. 65 % reduziert (Abb. 6).

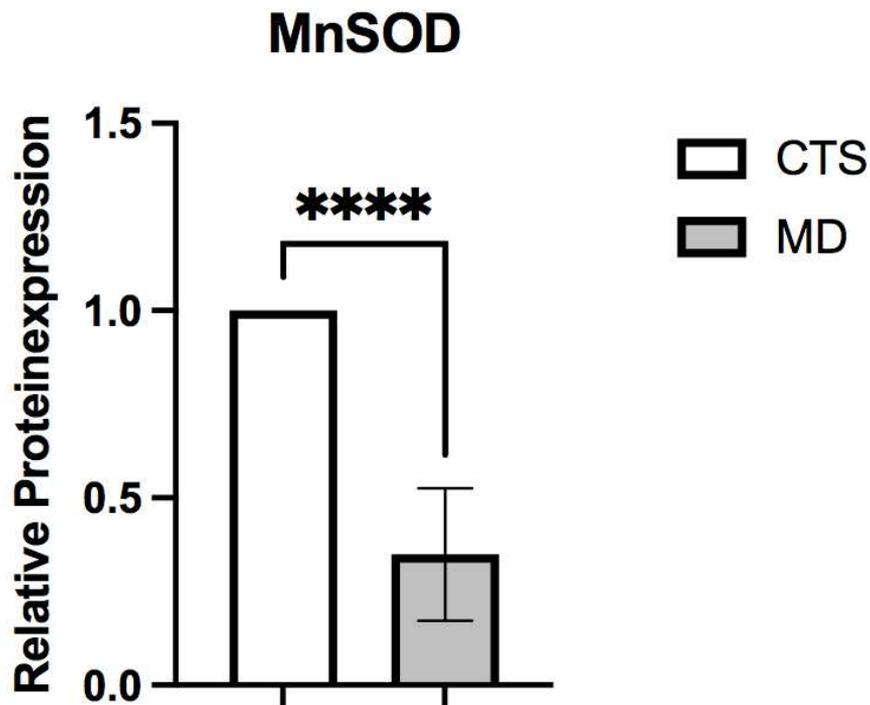


Abb. 6: MnSOD-Expression in CTS (n = 9) und MD (n = 9) Relative Proteinexpression in unbehandelten Fibroblasten. **** p < 0,0001 (CTS vs. MD)

3.1.2 Evaluation des Einflusses antioxidativer Enzyme

Entsprechend der Ergebnisse aus Abb. 6 sollte untersucht werden, ob exogen hinzugefügte antioxidative Enzyme einen positiven Effekt auf die pathologisch verstärkte Myofibroblastengnese in MD-Fibroblasten ausüben könnten.

Hierfür wurden die MD-Fibroblasten über drei Tage mit verschiedenen antioxidativen Enzymen in verschiedenen Konzentrationen behandelt, nachdem sie mit TGF- β 1 aktiviert worden waren. Anschließend wurde die α -SMA-Proteinexpression, als Surrogatparameter der Myofibroblastengnese, und die PAI-Expression, als TGF- β -responsives Element analysiert.

3.1.2.1 Effekt von SOD auf die Myofibroblastengnese

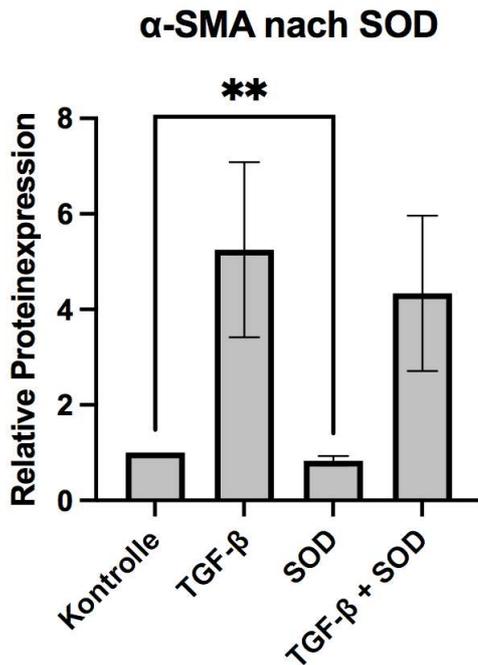


Abb. 7: α -SMA-Expression in MD (n = 6) nach 1 μ g/ml SOD Relative Proteinexpression, bezogen auf die Kontrolle. Die MD-Fibroblasten wurden mit 1 ng/ml TGF- β 1 aktiviert und mit 1 μ g/ml SOD über 3 Tage behandelt. ** p 0,0081 (Kontrolle vs. SOD)

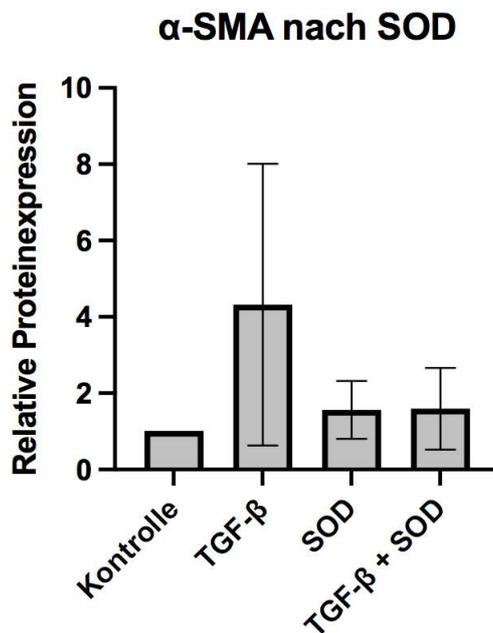


Abb. 8: α -SMA-Expression in MD (n = 3) nach 0,5 μ g/ml SOD Relative Proteinexpression, bezogen auf die Kontrolle. Die MD-Fibroblasten wurden mit 1 ng/ml TGF- β 1 aktiviert und mit 0,5 μ g/ml SOD über 3 Tage behandelt.

Durch die Behandlung der MD-Fibroblasten mit 1 $\mu\text{g/ml}$ SOD reduzierte sich die α -SMA-Expression um knapp 20 %, in der Gruppe Kontrolle vs. SOD stellte sich diese sogar signifikant dar (Abb. 7). Wurden die MD-Fibroblasten aber mit einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ SOD behandelt, zeigten auch die zuvor mit TGF- β 1 aktivierten MD-Fibroblasten eine Reduzierung der α -SMA-Expression (Abb. 8).

Hinsichtlich der PAI-Konzentration wurde kein wesentlicher Unterschied sowohl zwischen den mit SOD und TGF- β 1 behandelten MD-Fibroblasten als auch zwischen den verschiedenen Tagen dargestellt (Abb. 9).

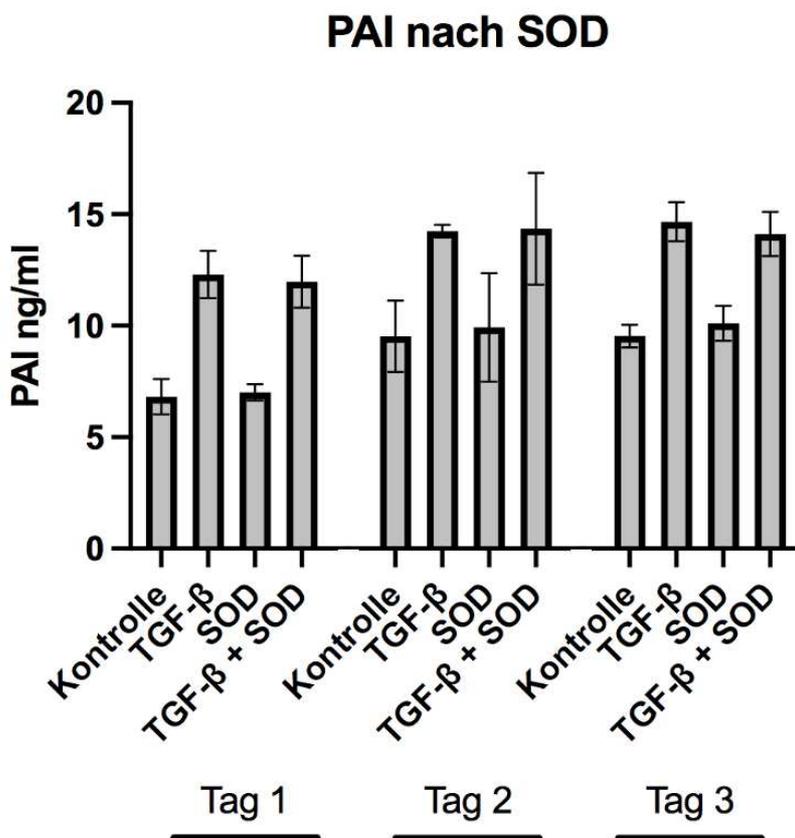


Abb. 9: PAI-Expression in MD (n = 3) nach 1 $\mu\text{g/ml}$ SOD Biologische Aktivität des TGF- β gemessen anhand der PAI-Expression in ng/ml. Die MD-Fibroblasten wurden über 3 Tage mit 1 ng/ml TGF- β 1 aktiviert sowie mit 1 $\mu\text{g/ml}$ SOD behandelt.

3.1.2.2 Effekt von MnTBAP auf die Myofibroblastengnese

Wurden die MD-Fibroblasten mit MnTBAP behandelt, reduzierte sich die α -SMA-Proteinexpression um 20 – 25 % und stellte sich somit im Vergleich Kontrolle vs. MnTBAP auch als signifikant dar (Abb.10). Durch die Zugabe von MnTBAP kam es zu einer nicht-signifikanten Reduktion der Myofibroblastengnese.

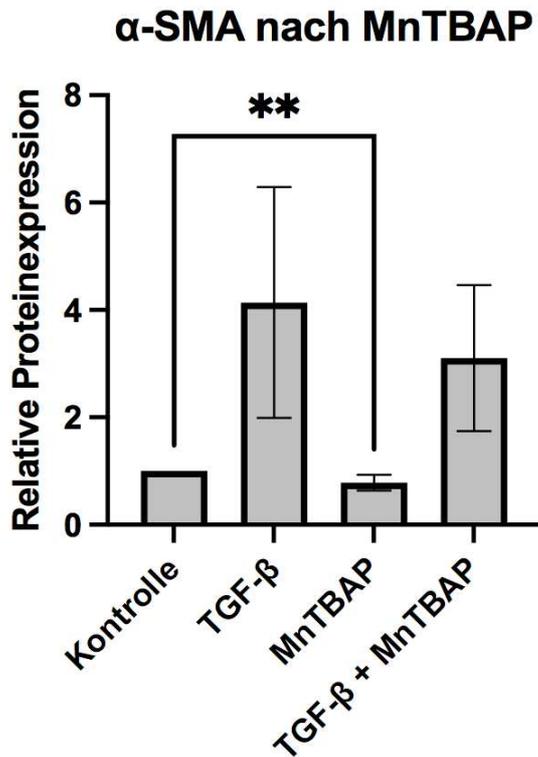


Abb. 10: α -SMA-Expression in MD (n = 8) und 25 μ Mol MnTBAP Die MD-Fibroblasten wurden über 3 Tage mit 1 ng/ml TGF- β 1 aktiviert sowie 25 μ Mol MnTBAP behandelt. ** p < 0,05 (Kontrolle vs. MnTBAP)

Untersuchte man den Einfluss von MnTBAP hinsichtlich der TGF- β 1-Aktivität in MD-Fibroblasten, ließ sich eine signifikante Reduzierung dieser nachweisen (Abb. 11). Die PAI-Expression reduzierte sich an allen Tagen jeweils zwischen 14 – 21 % in den mit MnTBAP behandelten MD-Fibroblasten vergleichend zur Kontrolle. Bei den zuvor mit TGF- β 1 aktivierten MD-Fibroblasten ließ sich lediglich eine Reduzierung der PAI-Expression zwischen 5 – 7 % nachweisen.

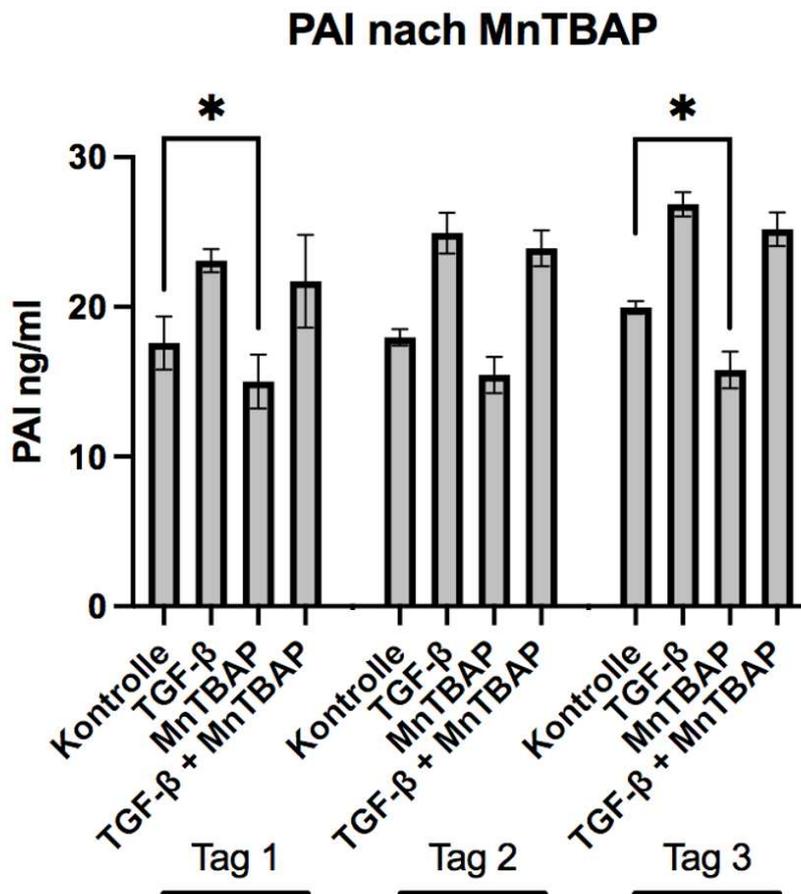


Abb. 11: PAI-Expression in MD (n = 3) nach 25 μ Mol MnTBAP Die MD-Fibroblasten wurden über 3 Tage mit 1 ng/ml TGF- β 1 sowie 25 μ Mol MnTBAP behandelt. * p < 0,05 (Kontrolle vs. MnTBAP an Tag 1, Kontrolle vs. MnTBAP an Tag 3).

3.1.2.3 Effekt von Katalase auf die Myofibroblastengnese

Die Katalase bewirkte in MD-Fibroblasten eine deutlich messbare, aber nicht-signifikante, Reduzierung der α -SMA-Expression um 20 % (Kontrolle vs. Katalase) bzw. um ca. 45 % (TGF- β vs. TGF- β + Katalase), wie Abb. 12 zu entnehmen ist.

Die PAI-Expression wurde durch die Wirkung von Katalase auf die MD-Fibroblasten erhöht (Abb. 13). Zwischen der Kontrolle und den mit Katalase behandelten MD-Fibroblasten konnte an Tag 3 eine 2 %-ige signifikante Steigerung beobachtet werden. Bei den zuvor mittels TGF- β -1aktivierten MD-Fibroblasten induzierte die Katalase ebenfalls eine geringfügige Steigerung der PAI-Expression bis zu 2 %.

α-SMA nach Katalase

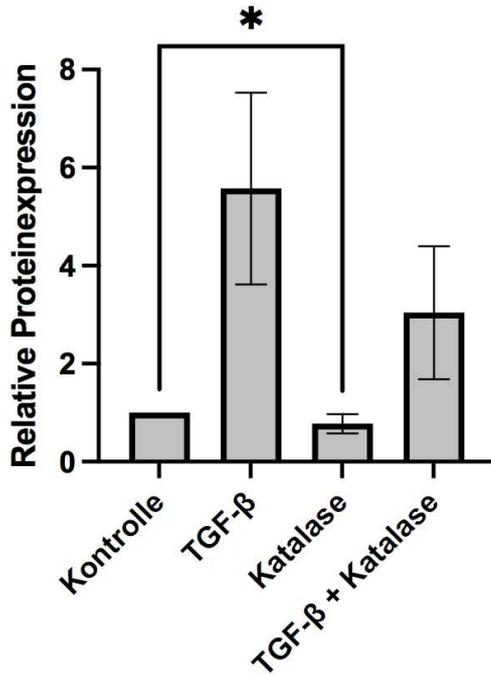


Abb. 12: α-SMA-Expression in MD (n = 5) nach 62 U/ml Katalase Relative Proteinexpression, bezogen auf die Kontrolle. Die MD-Fibroblasten wurden über 3 Tage mit 1 ng/ml TGF-β1 sowie 62 U/ml Katalase behandelt. * p < 0,05 (Kontrolle vs. Katalase).

PAI nach Katalase

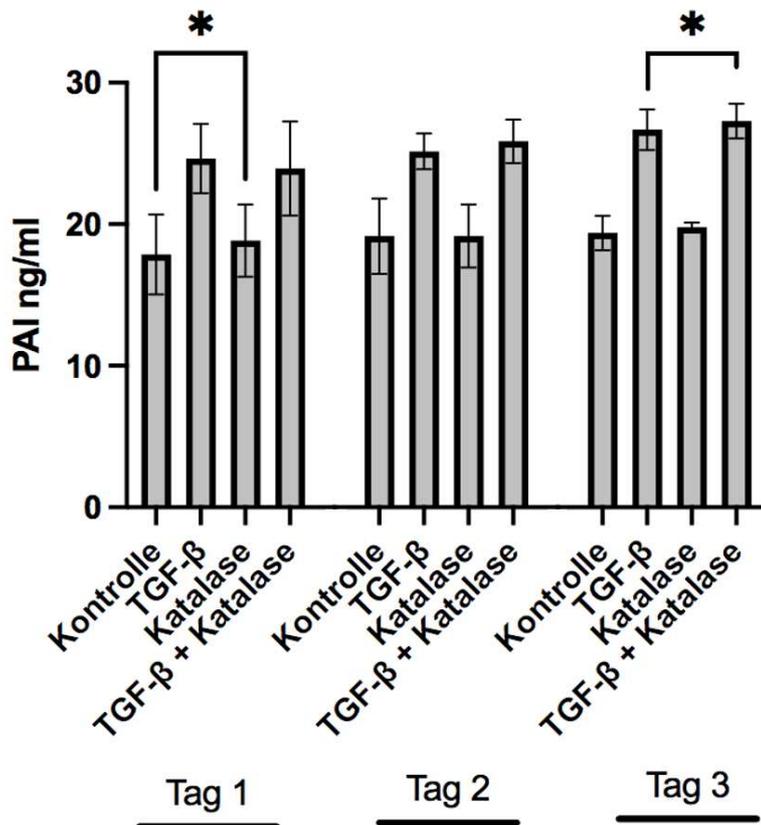


Abb. 13: PAI-Expression in MD (n = 3) nach 62 U/ml Katalase Die MD-Fibroblasten wurden über 3 Tage mit 1 ng/ml TGF-β1 sowie 62 U/ml Katalase behandelt. * p < 0,05 (Kontrolle vs. Katalase an Tag 1, TGF vs. Katalase + TGF an Tag 3)

3.2 Untersuchung und Modulation von TGF- β in MD

Weiterhin ist bekannt, dass in MD-Fibroblasten vermehrt TGF- β exprimiert wird. Wie bereits erwähnt, wird TGF- β als ein inaktiver LLC, bestehend aus TGF- β als Homodimer gebunden an LTBP und LAP, in die EZM sekretiert. Es wurde untersucht, ob bereits hier schon Unterschiede im Vergleich zur CTS-Kontrollgruppe zu finden sind. Weiter kann TGF- β nun rasch in seine aktive Form durch ROS oder proteolytische Spaltung freigesetzt werden. Zwei mögliche Proteasen, die daran beteiligt sein könnten, sind Plasmin und Thrombospondin. Diese wurden zur weiteren Evaluierung der TGF- β 1-Prozessierung im MD näher analysiert, um deren Einfluss auf die Myofibroblastengnese zu beobachten.

3.2.1 Analyse der LTBP-1-mRNA- und LAP-TGF- β -Proteinexpression

Zum Überprüfen der mittels *Primer-BLAST* generierten Primer wurde das LTBP-Amplifikat gelelektrophoretisch untersucht. Wie gewünscht, konnte das LTBP-1 als PCR-Produkt in CTS- und MD- Fibroblasten auf der erforderlichen Größe dargestellt werden (s. Anhang).

Anschließend wurden CTS- und MD-Fibroblasten hinsichtlich der LTBP-mRNA-Expression miteinander verglichen. Es ließ sich kein Unterschied in der mRNA-Expression des LTBP zwischen MD- und CTS-Fibroblasten darstellen (Abb. 14).

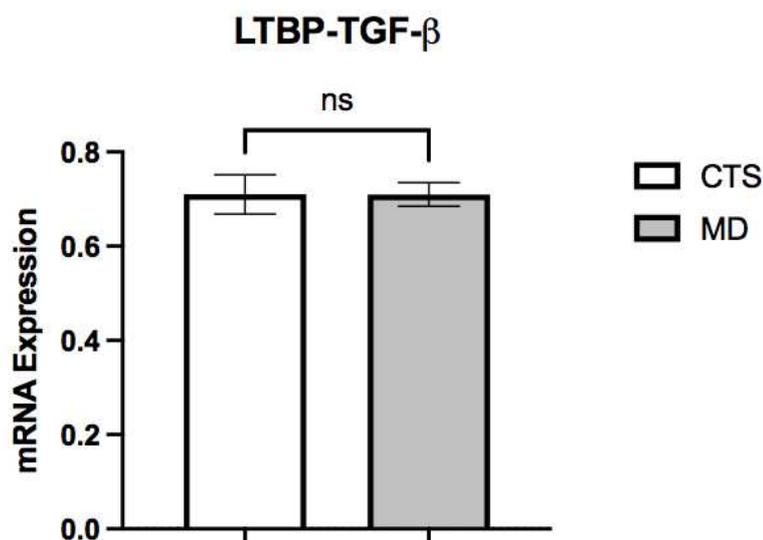


Abb. 14: LTBP-mRNA-Expression in CTS (n = 8) und MD (n = 9) Relative mRNA-Expression in unbehandelten Fibroblasten, normiert wurde dabei auf GAPDH. ns = nicht signifikant MW (CTS) = 0,710 vs. MW (MD) = 0,701

Die LAP-TGF- β -Proteinexpression in CTS-Fibroblasten hingegen unterschied sich signifikant von der in den MD-Fibroblasten. In MD-Fibroblasten wurde fast viermal so viel LAP-TGF- β exprimiert (Abb. 15). Dieser Unterschied ließ sich auch in der exemplarisch dargestellten Western Blot Analyse des LAP-TGF- β s entnehmen, wo sich die Bande der MD-Fibroblasten dunkler als die der CTS-Fibroblasten darstellt (Abb. 16).

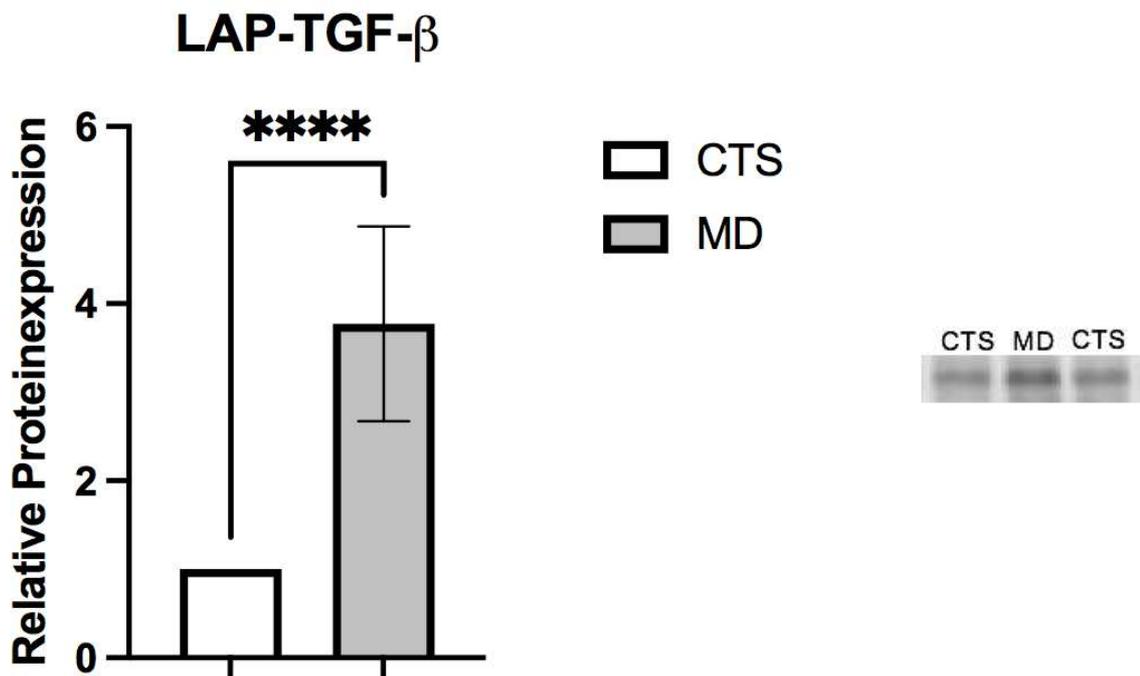


Abb. 15: LAP-TGF- β -Expression in CTS (n = 11) und MD (n = 11) im Vergleich (links) Relative Proteinexpression in unbehandelten CTS- und MD-Fibroblasten (links). **** p < 0,0001

Abb. 16: Exemplarische Western Blot Analyse des LAP-TGF- β s bei MD und CTS (rechts)

3.2.2 Bedeutung von Thrombospondin auf die TGF- β -Aktivierung im MD

Die MD-Fibroblasten wurden zunächst über 6 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Thrombospondin behandelt und anschließend hinsichtlich ihrer Proteinexpression von LAP-TGF- β und α -SMA sowie der TGF- β -Aktivität untersucht.

Unabhängig von der Thrombospondin-Konzentration wurde weder eine Veränderung der LAP-TGF- β -Expression noch der TGF- β -Aktivität in den MD-Fibroblasten beobachtet (Abb. 17, Abb. 19). Auch bei der Analyse der α -SMA-Expression ließ sich kein Effekt des Thrombospondins auf die MD-Fibroblasten beobachten (Abb. 18).

LAP-TGF- β nach Thrombospondin

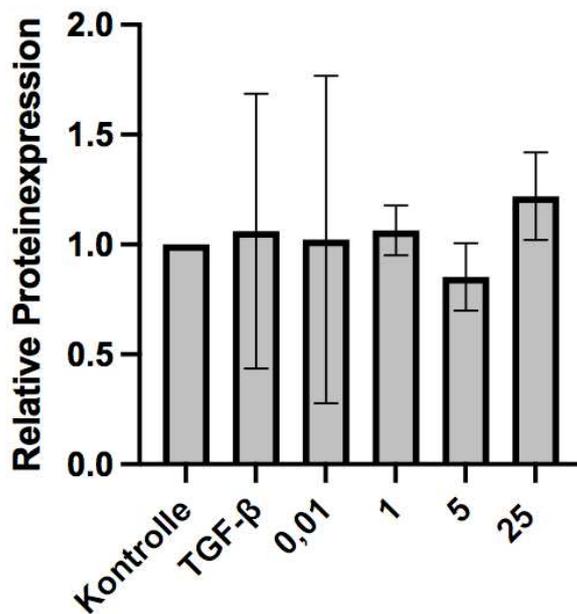


Abb. 17: LAP-TGF- β -Expression in MD (n = 2) nach Zugabe von Thrombospondin Relative Proteinexpression. Die MD-Fibroblasten wurden über 6 h mit 0,01 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ und 25 $\mu\text{g/ml}$ Thrombospondin behandelt sowie eine Kontrolle mit 1 ng/ml TGF- β 1.

α -SMA nach Thrombospondin

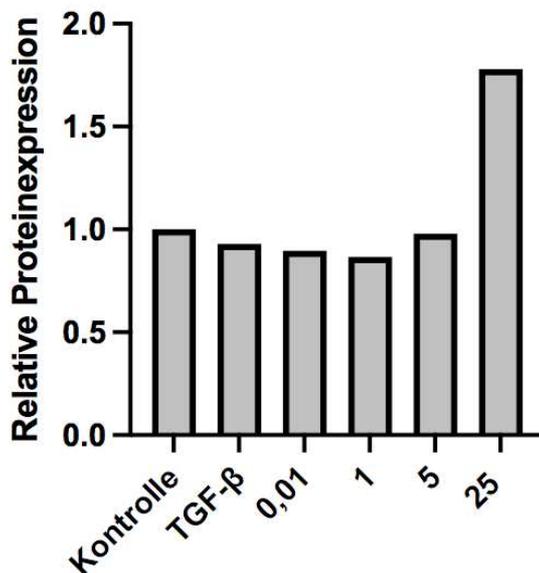


Abb. 18: α -SMA-Expression in MD (n = 1) nach Zugabe von Thrombospondin Relative Proteinexpression. Die MD-Fibroblasten wurden über 6 h mit 0,01 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ und 25 $\mu\text{g/ml}$ Thrombospondin behandelt sowie eine Kontrolle mit 1 ng/ml TGF- β 1.

PAI nach Thrombospondin

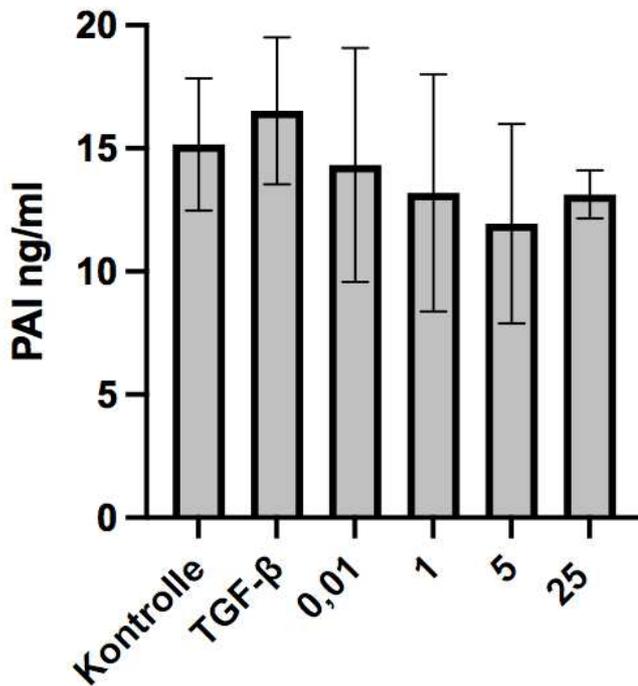


Abb. 19: PAI-Expression in MD (n = 2) nach Zugabe von Thrombospondin Biologische Aktivität des TGF- β gemessen anhand der PAI-Expression. Die MD-Fibroblasten wurden über 6 h mit mit 0,01 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ und 25 $\mu\text{g/ml}$ Thrombospondin behandelt sowie eine Kontrolle mit 1 ng/ml TGF- β 1.

3.2.3 Bedeutung von Plasmin auf die TGF- β -Aktivierung im MD

3.2.3.1 Evaluation der Plasmin-Konzentration

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration von Plasmin wurden die MD-Fibroblasten mit unterschiedlichen Konzentrationen über 6 h behandelt und anschließend ebenfalls einer Analyse der Proteinexpression von LAP-TGF- β und α -SMA sowie der TGF- β -Aktivität unterzogen.

Alle verwendeten Konzentrationen Plasmin bewirkten eine deutliche Reduzierung der LAP-TGF- β -Expression, wobei sich diese mit einer Reduktion von 60 % bei 0,05 U/ml Plasmin am eindrucklichsten zeigte (Abb. 20). Außerdem bewirkte die Zugabe von 0,05 U/ml Plasmin eine Halbierung der α -SMA-Expression in den MD-Fibroblasten (Abb. 21). Auch die verwendeten Konzentrationen 0,01 U/ml und 0,1 U/ml Plasmin bewirkten einen Rückgang der α -SMA-Expression (Abb. 21). Gleichermäßen ließ sich auch eine bemerkenswerte Reduzierung der biologischen Aktivität des TGF- β s in MD-Fibroblasten bei jeder eingesetzten Konzentration von Plasmin nachweisen (Abb. 23).

LAP-TGF- β nach Plasmin

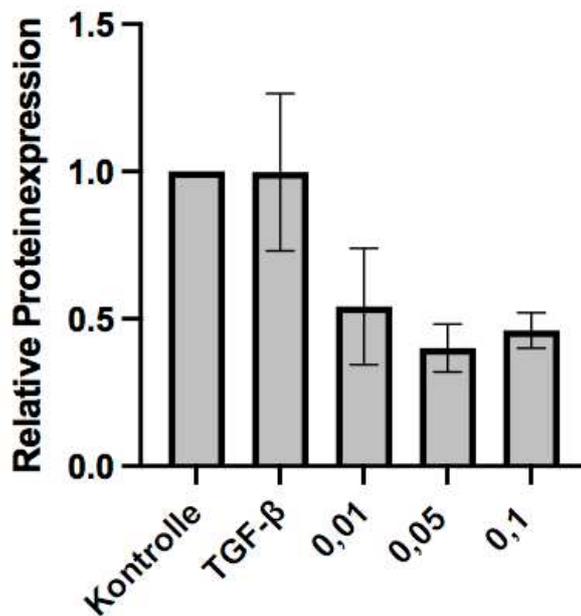


Abb. 20: LAP-TGF- β -Expression in MD (n = 2) nach Zugabe von Plasmin Die MD-Fibroblasten wurden über 6 h mit 0,01 U/ml, 0,05 U/ml und 0,1 U/ml Plasmin behandelt, sowie eine Kontrolle mit 1 ng/ml TGF- β 1. Man erkennt eine deutliche Reduzierung der LAP-TGF- β -Expression, welche am stärksten bei der Verwendung von 0,05 U/ml Plasmin ist.

α -SMA nach Plasmin

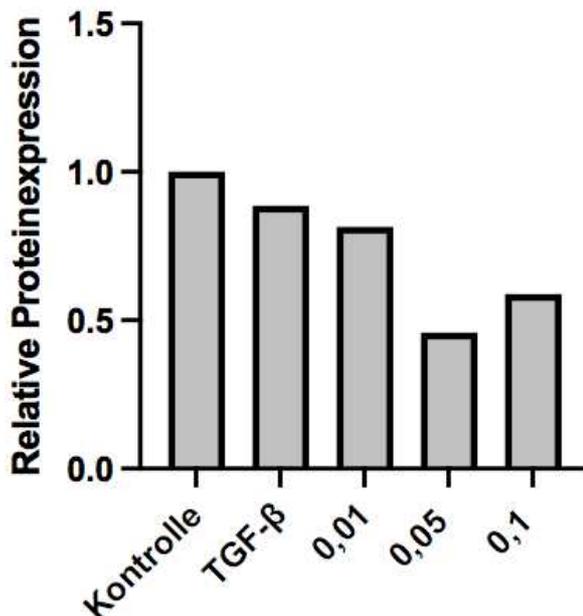


Abb. 21: α -SMA-Expression in MD (n = 1) nach Zugabe von Plasmin Die MD-Fibroblasten wurden über 6 h mit 0,01 U/ml, 0,05 U/ml und 0,1 U/ml Plasmin behandelt, sowie eine Kontrolle mit 1 ng/ml TGF- β 1. Nach Zugabe von 0,05 U/ml Plasmin erkennt man am eindeutigsten die Reduzierung der Proteinexpression von α -SMA, welches folglich eine verminderte Myofibroblastengnese in MD-Fibroblasten vermuten lässt.

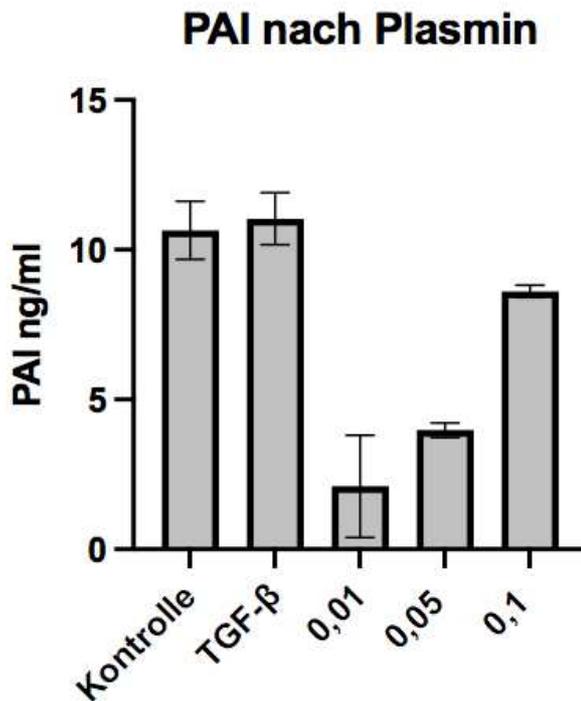


Abb. 22: PAI-Expression in MD (n = 2) nach Zugabe von Plasmin Die MD-Fibroblasten wurden über 6 h mit 0,01 U/ml, 0,05 U/ml und 0,1 U/ml Plasmin behandelt sowie eine Kontrolle mit 1 ng/ml TGF-β1. Es zeigte sich eine enorme Reduzierung der biologischen Aktivität des TGF-βs, v. a. nach Zugabe von 0,01 U/ml und 0,05 U/ml.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse wurde daraufhin für die folgenden Versuche eine Plasmin-Konzentration von 0,05 U/ml verwendet.

3.2.3.2 Kinetik des PAI nach Behandlung mit Plasmin

Es wurde analysiert, wie sich die TGF-β-Aktivität in MD-Fibroblasten, welche über verschiedene Zeitperioden mit Plasmin behandelt wurden, verhält. Dazu wurde eine Kinetik über 24 h erstellt. MD-Fibroblasten wurden hierfür mit der ermittelten Konzentration von 0,05 U/ml Plasmin behandelt und hinsichtlich der PAI-Expression nach 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 12 h und 24 h beurteilt.

Hierbei zeigte sich zu jedem Zeitpunkt eine überaus deutliche Verringerung der PAI-Expression (Abb. 23). Nach 6 h ließ sich sowohl bei den zuvor mit TGF-β1 aktivierten als auch bei den nativen MD-Fibroblasten eine Reduktion der TGF-β-Aktivität um bis zu 60 % nachweisen. Im weiteren Versuchsteil wurde daraufhin die MD-Fibroblasten 6 h mit Plasmin behandelt.

PAI nach Plasmin

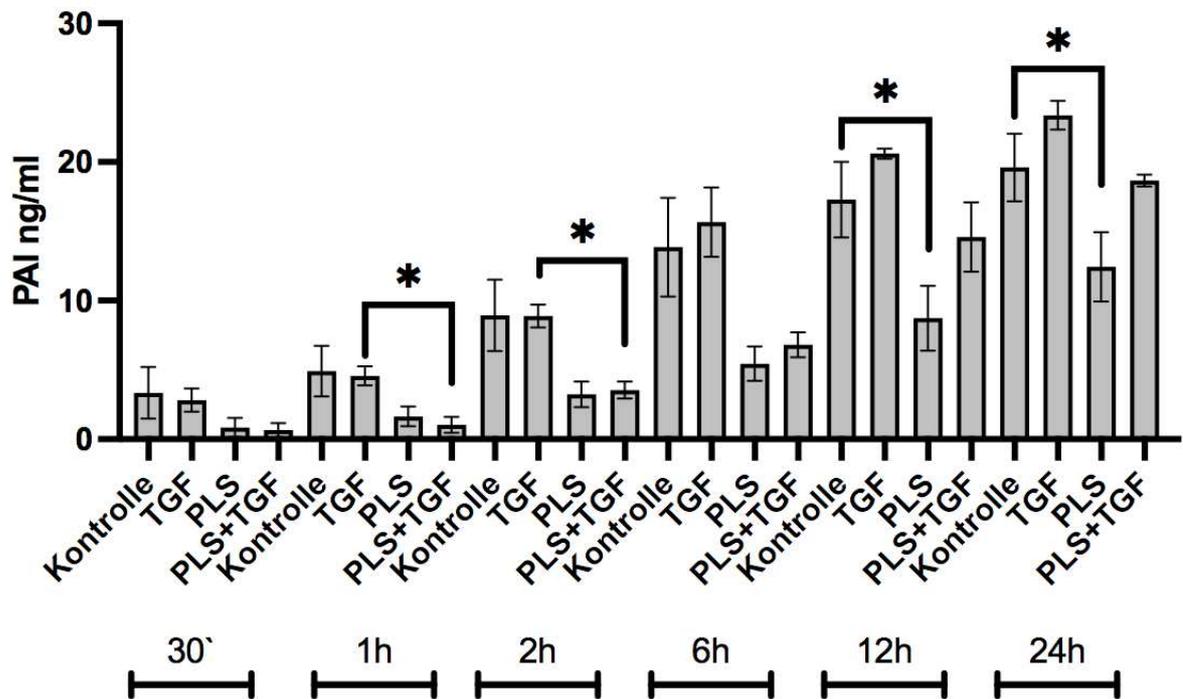


Abb. 23: PAI-Expression in MD (n = 2) nach der Zugabe von TGF- β 1 und 0,05 U/ml Plasmin

Biologische Aktivität des TGF- β gemessen anhand der PAI-Expression. Die MD-Fibroblasten wurden mit Plasmin sowie 1 ng/ml TGF- β 1 über 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 12 h und 24 h behandelt. Zu jedem dieser Zeitpunkte erkennt man eine Reduzierung der TGF- β -Aktivität.

* $p < 0,05$ (TGF vs. PLS+TGF nach 1 h, TGF vs. PLS+TGF nach 2 h, Kontrolle vs. PLS nach 12 h, Kontrolle vs. PLS nach 24 h).

3.2.3.3 Einfluss von Plasmin auf die LAP-TGF- β -Proteinexpression

Durch die Behandlung mit Plasmin wurde in MD-Fibroblasten mit ca. 30 % eine signifikante Reduzierung der LAP-TGF- β -Proteinexpression erzielt (Abb. 24).

Interessanterweise wurde durch die Zugabe von Plasmin zu CTS-Fibroblasten kein Effekt auf die LAP-TGF- β -Expression induziert, weder bei den zuvor mit TGF- β 1 aktivierten, noch bei den unbehandelten CTS-Fibroblasten (Abb. 25).

LAP-TGF- β nach Plasmin

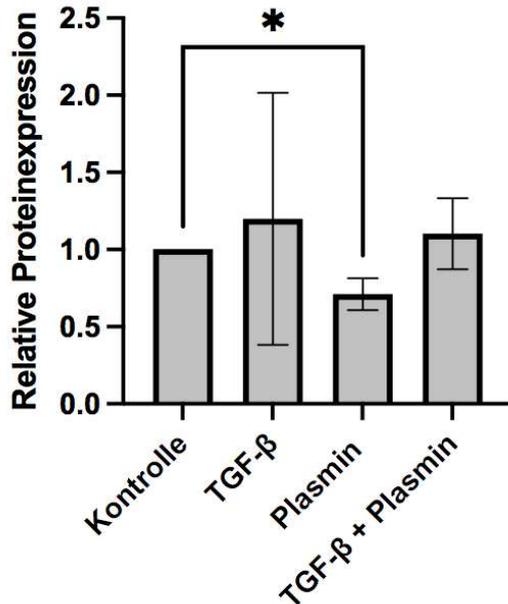


Abb. 24: LAP-TGF- β -Expression in MD (n = 3) nach 0,05 U/ml Plasmin und 1 ng/ml TGF- β

Die MD-Fibroblasten wurden über 6 h mit 0,05 U/ml Plasmin sowie 1 ng/ml TGF- β 1 behandelt. Bei den Plasmin-behandelten MD-Fibroblasten zeigt sich eine signifikante Reduzierung der LAP-TGF- β -Expression. Ebenfalls erkennt man bei den zuvor mit TGF- β 1 aktivierten MD-Fibroblasten eine nicht-signifikante Verminderung der LAP-TGF- β -Expression. * p < 0,05 (Kontrolle vs. Plasmin)

LAP-TGF- β nach Plasmin

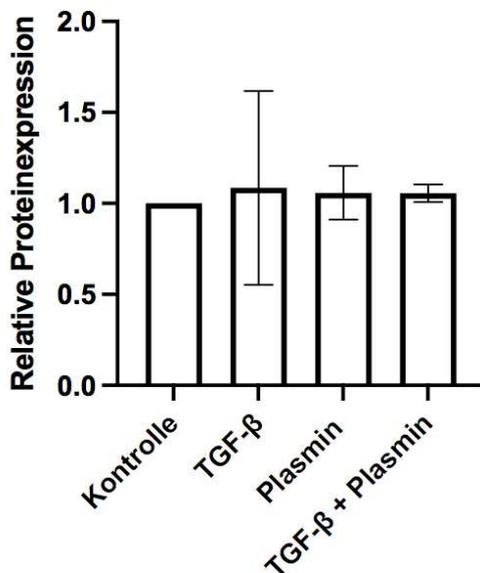


Abb. 25: LAP-TGF- β -Expression in CTS (n = 2) nach 0,05 U/ml Plasmin Die CTS-Fibroblasten wurden über 6 h mit 0,05 U/ml Plasmin sowie 1 ng/ml TGF- β 1 behandelt. Bei den Plasmin-behandelten CTS-Fibroblasten zeigt sich keine Veränderung der LAP-TGF- β -Expression.

3.2.3.4 Einfluss von Plasmin auf die α -SMA-Proteinexpression

Die Zugabe von Plasmin bewirkte in TGF- β 1 aktivierten MD-Fibroblasten eine signifikante Verminderung der α -SMA-Proteinexpression um 30 % (Abb. 26). Dies kann als Hinweis auf eine verminderte Differenzierung zu Myofibroblasten gewertet werden.

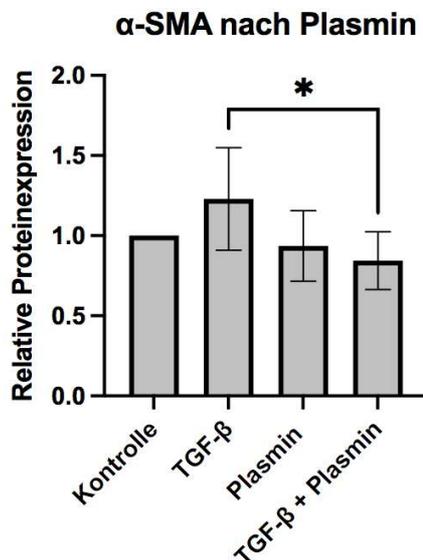


Abb. 26: α -SMA-Expression in MD (n = 5) nach 0,05 U/ml Plasmin Die MD-Fibroblasten wurden über 6 h mit 0,05 U/ml Plasmin sowie 1 ng/ml TGF- β 1 behandelt. Eine signifikante Reduzierung der α -SMA-Expression ist bei den zuvor mit TGF- β 1 aktivierten MD-Fibroblasten zu erkennen. * p < 0,05 (TGF vs. Plasmin + TGF)

Wurde dies mit Plasmin-behandelten CTS-Fibroblasten verglichen, zeigte sich, dass das Plasmin hier wieder zu keiner wesentlichen Beeinflussung der TGF- β 1 induzierten α -SMA-Proteinexpression führte (Abb. 27).

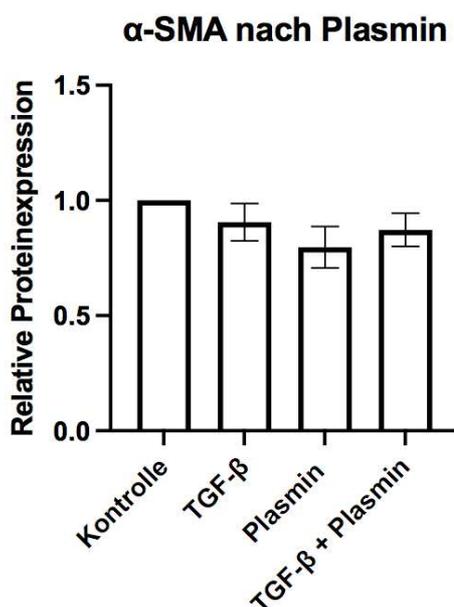


Abb. 27: α -SMA-Expression in CTS (n = 2) nach 0,05 U/ml Plasmin Die CTS-Fibroblasten wurden über 6 h mit 0,05 U/ml Plasmin sowie 1 ng/ml TGF- β 1 behandelt.

3.2.3.5 Evaluation der Aktivität von TGF- β nach Inkubation mit Plasmin

Plasmin bewirkte in den TGF- β aktivierten MD-Fibroblasten, gemessen anhand der PAI-Expression, eine 30 %-ige Verringerung der TGF- β -Aktivität und in den nativen MD-Fibroblasten sogar eine Reduzierung dieser um 35 % (Abb. 28).

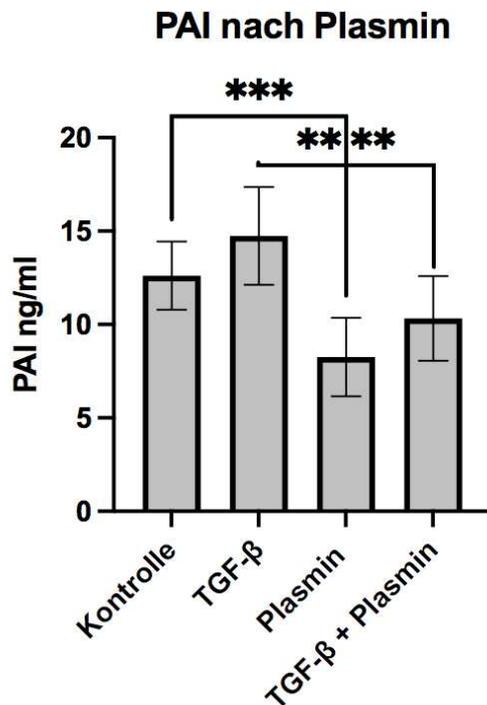


Abb. 28: PAI-Expression in MD (n = 7) nach 0,05 U/ml Plasmin Biologische Aktivität des TGF- β gemessen anhand der PAI-Expression in ng/ml. Die MD-Fibroblasten wurden über 6 h mit 0,05 U/ml Plasmin sowie 1 ng/ml TGF- β 1 behandelt. Es zeigt sich sowohl bei den nicht vorbehandelten als auch bei den mit TGF- β aktivierten MD-Fibroblasten eine deutlich signifikante Reduzierung der TGF- β -Aktivität. *** $p < 0,0005$ (Kontrolle vs. Plasmin) und **** $p < 0,0001$ (TGF vs. Plasmin + TGF)

4 Diskussion

ROS sind an der Pathogenese des MD beteiligt. Es ist bekannt, dass eine zusätzliche Applikation oder Generierung von ROS die gestörte Myofibroblastengnese weiter inhibieren kann. Im Rahmen dieser experimentellen Dissertation sollten weitere ROS-modulierenden Enzyme und Antioxidantien sowie deren Einfluss auf die Myofibroblastengnese identifiziert werden. Darüber hinaus sollte die Prozessierung des TGF- β detaillierter analysiert werden. TGF- β kann in der EZM aus seinem inaktiven Komplex durch ROS oder proteolytische Spaltung mittels Proteasen aktiviert werden. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob auch die Freisetzung aus diesem Komplex einen Einfluss auf die Myofibroblastengnese im MD hat und somit an der Pathogenese des MD beteiligt sein könnte.

Die in dieser Dissertation erhobenen Daten sind reproduzierbar und zeigen signifikante Unterschiede auf.

4.1 ROS-modulierende Enzyme und deren Beeinflussung durch Antioxidantien

Es konnten bereits erhöhte Konzentrationen von ROS in MD-Gewebe nachgewiesen werden, wofür aber bis dato die Hypoxanthinoxidase verantwortlich gemacht wurde [32]. ROS verändern die Proteinfunktion und übernehmen dadurch bei vielen zellulären Prozessen, wie z. B. der Signalweiterleitung, eine tragende Rolle [94, 95]. Bildet sich durch erhöhte Konzentration ein Ungleichgewicht, können ROS zytotoxische Effekte vermitteln und so schädigenden Einfluss, wie u. a. fibroproliferative Effekte auf Proteine ausüben [94, 127].

Die MnSOD ist ein mitochondriales Enzym mit antioxidativer Wirkung und katalysiert die Reaktion von Superoxidanion zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff, um so die Zellen vor den überwiegend schädigenden Einflüssen durch ROS zu schützen [94, 101]. Es konnte bereits eruiert werden, dass MnSOD in Tumorzellen verringert ist und so zusammen mit der ROS-Produktion die typischen Eigenschaften von Krebszellen entstehen [107]. Ebenso wurde eine Inhibition der MnSOD durch TGF- β in glatten Muskelzellen der Atemwege beschrieben, wodurch ihre antioxidative Wirkung abgeschwächt wird [106].

Es konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine signifikant verringerte Proteinexpression der MnSOD in MD-Fibroblasten gegenüber den CTS-Fibroblasten nachgewiesen werden (Abb. 6). Somit konnte im Rahmen dieser Dissertation ein weiteres ROS-generierendes Enzym identifiziert werden, welches signifikant an der Myofibroblastengnese und somit auch an der Pathogenese des MD beteiligt ist.

Ursächlich für die erniedrigte MnSOD in MD könnte hier eine Hemmung durch TGF- β sein. Dies könnte folglich die erhöhten ROS-Konzentration in MD bewirken, womit ein weiterer Erklärungsansatz zur Pathogenese des MD zur Verfügung stehen würde. Gestützt wird diese Theorie dadurch, dass die Zugabe des TGF- β -Inhibitors SB-431542 nachweislich zu einer vermehrten MnSOD-Expression in MD-Fibroblasten führt [50].

Da in dieser Dissertation eine signifikant verminderte Proteinexpression von MnSOD in MD-Fibroblasten detektiert werden konnte, wurde der Einfluss von weiteren antioxidativen Enzymen auf die Myofibroblastengnese in MD-Fibroblasten untersucht. Vozenin-Brotans et al. konnten bereits demonstrieren, dass die Zugabe von SOD1 eine verringerte TGF- β 1-Expression in Myofibroblasten bewirkt [104]. In dieser Arbeit zeigte sich ein ähnlicher Effekt: Nach drei Tagen ließ sich durch exogen zugeführtes SOD1 eine signifikante Reduktion der α -SMA-Expression in MD-Fibroblasten induzieren, wobei der Effekt dosisabhängig war und sich eine höhere Konzentration als wirksamer erwies (Abb. 7, Abb. 8). In TGF- β 1 induzierten MD-Fibroblasten ließen sich darüber hinaus nach Zugabe der SOD1 ebenfalls eine Reduzierung der TGF- β -Aktivität erkennen (Abb. 9). Dies identifizierte die SOD1 als weiteren möglichen Modulator der Myofibroblastengnese im MD.

MnTBAP, als molekulares Mimikry der SOD, vermittelte ebenfalls antioxidative Effekte [108]. Analog konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von MD-Fibroblasten mit MnTBAP sowohl in einer verringerten α -SMA-Expression als auch TGF- β -Aktivität resultiert (Abb. 10, Abb. 11). Es ergab sich der Hinweis auf eine verminderte Myofibroblastengnese durch die Zugabe von MnTBAP. Auch für die chronische Niereninsuffizienz und die Bleomycin-induzierte Fibrose konnte bereits eine Reduzierung der fibrotischen Reaktion durch MnTBAP aufgezeigt werden [109, 110], sodass mit MnTBAP ein weiteres potentes Antioxidans zur Reduzierung der ROS und somit auch der Myofibroblastengnese in MD-Fibroblasten zur Verfügung stehen könnte.

Eine verminderte Katalase-Aktivität kann zu einer erhöhten H_2O_2 -Konzentration führen, welches in erhöhten Konzentrationen von ROS resultiert und somit auch die Myofibroblastengnese fördern könnte [36, 54, 111]. Es konnte sowohl in glatten Muskelzellen der Atemwege als auch in Myofibroblasten gezeigt werden, dass TGF- β die Katalase-Expression hemmt [106, 128]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Katalase einerseits eine Reduzierung der TGF- β 1 induzierten α -SMA-Expression (Abb. 12) und andererseits jedoch eine Erhöhung der TGF- β -Aktivität in MD-Fibroblasten bewirkte (Abb. 13). Eine exogene Zugabe von Katalase könnte also hier eine vermehrte TGF- β -Aktivierung bewirkt haben, möglicherweise durch Freisetzung des TGF- β s aus seinem inaktiven Komplex durch die Katalase. Durchaus von Interesse könnte hier sein, wie sich dieser Sachverhalt zu einem anderen Zeitpunkt, z. B. einen Tag später, darstellen würde.

Zusammenfassend lässt sich anhand der in dieser Dissertation dargestellten Ergebnisse demonstrieren, dass eine verminderte Expression von antioxidativen Enzymen, wie der MnSOD, an der Pathogenese des MD beteiligt sind. Darüber hinaus lässt sich postulieren, dass ein solcher Mangel durch exogene Zufuhr von Antioxidantien nachweislich kompensiert werden kann, was sich hier in einer verringerten Myofibroblastengnese des MD äußerte.

Das Protein p53 ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus, der DNA-Reparatur sowie der Apoptose und nimmt somit auch eine zentrale Funktion als Tumorsuppressor ein [81, 82]. Wu et al. stellten bereits eine positive Korrelation zwischen der vermehrten Expression von p53 und oxidativen Stress in pulmonalen Fibroblasten dar [88]. Da MD eine benigne proliferative Erkrankung darstellt [129] und auch erhöhte Konzentration an ROS nachgewiesen wurden [32, 98], wurde in dieser Dissertation die Expression von p53 in MD untersucht. Es konnte hier eine signifikante Erhöhung der p53-Expression in MD-Fibroblasten vergleichend mit CTS-Fibroblasten festgestellt werden (Abb. 5). Nach Hussain et al. kann p53 die Expression der MnSOD bewirken und nachfolgend die Apoptose der Zellen induzieren [130]. Interessanterweise lässt sich dieser Zusammenhang hier nicht aufzeigen: Trotz erhöhten p53-Spiegeln in MD-Fibroblasten (Abb. 5), stellte sich eine verminderte Expression der MnSOD dar (Abb. 6). Zudem kann p53 in der Prozessierung des TGF- β eine zentrale Rolle einnehmen [131]. Hierbei führt eine erhöhte p53-Expression, über Interaktion mit Smad-Proteinen

und der daraus folgenden Aktivierung der PAI-Aktivität zu einer weiteren Aktivierung des TGF- β .

In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass p53 durch die Regulierung von ROS-modifizierenden Proteinen zum einen zur Produktion von ROS und zum anderen auch durch die Aktivierung von TGF- β zur Entstehung und Fortschreitung des MD beitragen könnte. Zum weiteren Verständnis, welche Bedeutung p53 in der Pathogenese des MD beigemessen werden könnte, bedarf es jedoch noch weiterführenden Untersuchungen, wodurch p53 ein interessanter Ansatzpunkt für künftige Forschungsarbeiten sein könnte.

4.2 Modulation der TGF- β -Prozessierung in MD-Fibroblasten

TGF- β bildet als Homodimer mit LAP den inaktiven *small latent complex*, welcher an das LTBP gebunden ist. In der Gesamtheit wird diese Formation als *large latent complex* bezeichnet und anschließend in die EZM sekretiert. Dort kann TGF- β über oben erwähnte Mechanismen, wie proteolytische Spaltung oder ionisierende Strahlung, freigesetzt werden und so in seine aktive Form übergehen [47-49]. Ebenso kann auch ROS eine Freisetzung des TGF- β s aus dem LAP-TGF- β -Komplex bewirken und somit zu einer vermehrten Aktivität führen [49, 54, 100].

In MD-Gewebe konnte bereits sowohl erhöhte Konzentrationen von TGF- β [43], welches für die stark vermehrte Myofibroblastengenesse verantwortlich gemacht wird [36], als auch erhöhte Konzentrationen an ROS nachgewiesen werden [98].

In dieser Arbeit zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von LAP-TGF- β in MD-Fibroblasten im Vergleich zu CTS-Fibroblasten (Abb. 15). Diese könnte einerseits Folge bzw. Ursache der ohnehin erhöhten TGF- β -Konzentration im MD sein [43], andererseits könnte ein möglicher Erklärungsansatz in der fehlerhaften Prozessierung des TGF- β liegen. Dafür spricht, dass in dieser Arbeit demonstriert werden konnte, dass die mRNA-Expression des LTBP-1 keinen Unterschied in MD- oder CTS-Fibroblasten aufzeigte (Abb. 14), wohingegen sich die LAP-TGF- β -Proteinexpression wie bereits erwähnt signifikant unterschied (Abb. 15). Bekannt ist, dass Thrombospondin eine proteolytische Freisetzung des inaktiven TGF- β s aus seinem LLC bewirken kann und es auf diesem Wege in die aktive Form überführt [132]. So nimmt Thrombospondin eine zentrale Funktion bei der Entstehung und Regulation von fibrotischen Erkrankungen ein, wie es z. B. bei der renalen Fibrose der Fall ist [133].

Trotz Verwendung verschiedenster Konzentrationen Thrombospondin, welche in der Literatur bereits nachweislich Effekte erzielt hatten [134, 135], ließen sich in der Behandlung von MD-Fibroblasten keine Veränderungen sowohl in der Expression von LAP-TGF- β und α -SMA als auch der PAI-Aktivität darstellen (Abb. 17 – Abb. 20). Dies untermauert die Untersuchungen von Grainger et al., die ebenfalls keine Thrombospondin-abhängige Aktivierung des TGF- β darstellen konnten [136]. Somit lässt sich postulieren, dass Thrombospondin alleine nicht an der Prozessierung des TGF- β im MD beteiligt ist.

Wie bereits erwähnt, kann TGF- β auch durch Plasmin mittels proteolytischer Freisetzung aus dem inaktiven Komplex in der EZM gelöst werden und so die volle biologische Aktivität entfalten [51, 52]. Plasmin ist eine Serin-Protease, die am Abbau von Fibrin und auch an der Modulation immunologischer Prozesse beteiligt ist [137, 138]. Eine übermäßige Aktivierung von Plasmin wirkt jedoch proinflammatorisch und kann auch die Produktion von ROS stimulieren [139]. Es wurde bereits beschrieben, dass Plasmin die Proliferation von Fibroblasten fördert [140] und z. B. so durch Regulierung proliferativer Proteine in stellatischen Leberzellen Einfluss auf die Entstehung der Leberfibrose ausüben kann [141]. Darüber hinaus wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Plasmin und der Ausbildung der renalen sowie pulmonalen Fibrose dargestellt [140, 142].

Eine additive Zugabe von Plasmin induzierte in den MD-Fibroblasten eine Reduktion des LAP-TGF- β -Proteins (Abb. 24), welches somit auf eine mangelnde Prozessierung des TGF- β s durch Plasmin schließen ließ. Dazu passt, dass Plasmin in den als Kontrolle genutzten CTS-Fibroblasten keinen Effekt bewirkte und es dort weder zu einer Steigerung noch einer Reduzierung des LAP-TGF- β s kam (Abb. 25). Entsprechend der bereits genannten Erkenntnisse könnte man in Zusammenschau hypothetisch durch eine vermehrte Freisetzung des TGF- β s auch eine α -SMA-Erhöhung erwarten, welche für ein Fortschreiten der Myofibroblastengnese durch das freigewordene TGF- β sprechen würde [46]. Dies ist interessanterweise nicht der Fall. Durch Behandlung der MD-Fibroblasten mit Plasmin über einen Zeitraum von 6 h wurde eine äußerst eindruckliche Reduzierung der TGF- β -Aktivität erreicht (Abb. 28). Konkordant ließ sich eine reduzierte α -SMA-Expression, welche somit einer verminderten Myofibroblastengnese in MD-Fibroblasten entspricht, darstellen (Abb. 26). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Plasmin *in vitro* einen Fibroblasten-induzierten Kollagenabbau induzieren und somit Einfluss auf die Wundheilung

nehmen kann [143]. Die hier erhobene Schlussfolgerung wird dadurch unterstrichen, dass Plasmin bei den CTS-Fibroblasten kaum Einfluss auf die α -SMA-Expression zu nehmen schien (Abb. 27).

In der Pathogenese des MD scheint Plasmin eine Schlüsselfunktion einzunehmen. Zum einen konnte durch Plasmin eine Reduktion der LAP-TGF- β -Expression erreicht werden, zum anderen wurde ebenfalls eine verminderte α -SMA-Expression und somit Myofibroblastengnese induziert. Somit könnte eine additive Applikation von Plasmin zu einer Reduzierung der pathologisch erhöhten Konzentration von TGF- β in MD führen und somit ein Fortschreiten dieser Erkrankung verzögern.

4.3 Methodendiskussion

Bei der vergleichenden Untersuchung von CTS- und MD-Fibroblasten ist das Geschlecht als möglicher *Confounder* zu benennen. MD ist eine Erkrankung die v. a. ältere Männer betrifft. Dementsprechend waren bei 26 Spendern lediglich 6 Spender weiblich. Die übrigen 20 Spender waren männlichen Geschlechts. Demgegenüber waren die wegen eines CTS operierten Patienten überwiegend weiblichen Geschlechts, da diese Erkrankung sich häufiger bei Frauen manifestiert. Von 23 verwendeten Gewebespenden waren 17 weiblichen Geschlechts und nur 6 Spender waren männlich.

4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Antioxidative Schutzmechanismen übernehmen eine tragende Funktion in der Detoxifikation von ROS, welche an der Entstehung diverser Krankheitsbilder, wie u. a. Fibrosen, maßgeblich beteiligt sind. Es wurden bereits erhöhte Konzentrationen von ROS in MD nachgewiesen, wofür bisher allerdings der Abbau von Hypoxanthin verantwortlich gemacht wurde. Im Rahmen dieser Dissertation wurde nachgewiesen, dass die antioxidativ wirkende MnSOD in MD-Fibroblasten signifikant reduziert exprimiert wurde. Es lässt sich mutmaßen, dass es in MD-Fibroblasten dadurch zu einer Akkumulation von reaktionsfreudigen ROS kommt, welche somit die Myofibroblastengnese beeinflussen. Dies bedeutet, dass ROS im MD nicht nur durch die Hypoxanthinoxidase induziert werden, sondern auch durch die verminderte Expression der MnSOD zu Stande kommen, welche somit ein ROS-modulierendes

Enzym in der Pathogenese des MD darstellt. Es wird hiermit also ein weiterer Mechanismus identifiziert, der zu der erhöhten ROS-Konzentration im MD beitragen könnte. Durch exogene Zugabe von Antioxidantien wie SOD, MnTBAP und Katalase konnte eine deutliche Reduktion der α -SMA-Expression und folglich auch der Myofibroblastengnese in MD-Fibroblasten erzielt werden. Dies weist auf einen weiteren potenziellen therapeutischen Ansatzpunkt zur Reduktion von ROS und somit zur Behandlung des MD durch Antioxidantien hin.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ebenfalls herausgefunden, dass die Expression des TGF- β -bindenden Proteins LAP-TGF- β in MD-Fibroblasten signifikant erhöht ist. Dies könnte sowohl an der ohnehin schon erhöhten Konzentration des TGF- β s in MD liegen oder sich als Resultat einer vermehrten Aktivierung des TGF- β durch ROS aus dem inaktiven Komplex ergeben. Detailliertere Untersuchungen könnten Gegenstand weiterer laborexperimenteller Arbeiten sein. Nichtsdestotrotz lassen die Ergebnisse die Schlussfolgerung einer fehlerhaften Prozessierung des TGF- β s in der Pathogenese des MD zu. Bemerkenswerterweise wurde durch Zugabe von Plasmin ein Abbau des LAP-TGF- β erzielt, was auf die proteolytische Spaltung von TGF- β aus dem inaktiven Komplex durch Plasmin in MD hindeutet. Zudem wurde dadurch auch eine signifikante Reduzierung der TGF- β -Aktivität in MD-Fibroblasten bewirkt, die sich in einer verminderten α -SMA-Expression widerspiegelte. Vermutlich induziert Plasmin eine verminderte Myofibroblastengnese im MD und stellt somit einen äußerst interessanten Therapieansatz für die Behandlung des MD dar.

In Zusammenschau der Ergebnisse scheinen v. a. die stark erhöhte ROS-Produktion und die fehlerhafte Prozessierung des TGF- β in der Pathogenese des MD eine wesentliche Relevanz zu haben. In dieser Dissertation werden verschiedene Möglichkeiten zur Reduktion von ROS genannt, wodurch Antioxidantien nicht nur vor ROS-schützende, sondern auch antifibrotische Effekte in MD vermitteln. Auch die Behandlung mit Plasmin, welche nur im MD durch proteolytische Spaltung zu einer verminderten LAP-TGF- β -Expression und einer signifikanten Reduktion der Myofibroblastengnese führt, trägt maßgeblich zu einer Prozessierung des TGF- β in MD bei. Hier stellt sich ein vielversprechender Forschungsansatz für die zukünftige Behandlung des MD dar. Bevor die erhobenen Ergebnisse jedoch Anwendung in dem klinischen Alltag finden könnten, sind weitere Studien erforderlich.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Lanting, R., et al., *A Systematic Review and Meta-Analysis on the Prevalence of Dupuytren Disease in the General Population of Western Countries*. Plastic and Reconstructive Surgery, 2014. **133**(3): p. 593-603.
2. Hindocha, S., D.A. McGrouther, and A. Bayat, *Epidemiological evaluation of Dupuytren's disease incidence and prevalence rates in relation to etiology*. Hand (N Y), 2009. **4**(3): p. 256-69.
3. Ross, D.C., *Epidemiology of Dupuytren's disease*. Hand Clin, 1999. **15**(1): p. 53-62, vi.
4. Brenner, P., A. Krause-Bergmann, and V.H. Van, *[Dupuytren contracture in North Germany. Epidemiological study of 500 cases]*. Unfallchirurg, 2001. **104**(4): p. 303-11.
5. Hahn, P., *[Epidemiology of Dupuytren's disease]*. Orthopade, 2017. **46**(4): p. 298-302.
6. Burge, P., *Genetics of Dupuytren's disease*. Hand Clin, 1999. **15**(1): p. 63-71.
7. Larsen, S., et al., *Genetic and environmental influences in Dupuytren's disease: a study of 30,330 Danish twin pairs*. J Hand Surg Eur Vol, 2015. **40**(2): p. 171-6.
8. Dolmans, G.H., et al., *Wnt signaling and Dupuytren's disease*. N Engl J Med, 2011. **365**(4): p. 307-17.
9. Becker, K., et al., *Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies and Network Analysis-Based Integration with Gene Expression Data Identify New Suggestive Loci and Unravel a Wnt-Centric Network Associated with Dupuytren's Disease*. PLoS One, 2016. **11**(7): p. e0158101.
10. Steinhart, Z. and S. Angers, *Wnt signaling in development and tissue homeostasis*. Development, 2018. **145**(11).
11. Mitsui, Y., et al., *Molecular Mechanisms and Risk Factors Related to the Pathogenesis of Peyronie's Disease*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(12).
12. Schoenfeld, J.D., et al., *Sorafenib in Dupuytren and Ledderhose Disease*. Oncologist, 2022. **27**(3): p. e294-e296.
13. Liss, G.M. and S.R. Stock, *Can Dupuytren's contracture be work-related?: review of the evidence*. Am J Ind Med, 1996. **29**(5): p. 521-32.
14. Descatha, A., et al., *Association among work exposure, alcohol intake, smoking and Dupuytren's disease in a large cohort study (GAZEL)*. BMJ Open, 2014. **4**(1): p. e004214.
15. Burge, P., et al., *Smoking, alcohol and the risk of Dupuytren's contracture*. J Bone Joint Surg Br, 1997. **79**(2): p. 206-10.
16. Eckerdal, D., A. Nivestam, and L.B. Dahlin, *Surgical treatment of Dupuytren's disease - outcome and health economy in relation to smoking and diabetes*. BMC Musculoskelet Disord, 2014. **15**: p. 117.
17. Arkkila, P.E., I.M. Kantola, and J.S. Viikari, *Dupuytren's disease: association with chronic diabetic complications*. J Rheumatol, 1997. **24**(1): p. 153-9.
18. Noble, J., J.G. Heathcote, and H. Cohen, *Diabetes mellitus in the aetiology of Dupuytren's disease*. J Bone Joint Surg Br, 1984. **66**(3): p. 322-5.
19. Del Frari, B., D. Estermann, and H. Piza-Katzer, *[Dupuytren's contracture -- surgery of recurrences]*. Handchir Mikrochir Plast Chir, 2005. **37**(5): p. 309-15.
20. Tubiana, R., J. Michon, and J.M. Thomine, *Scheme for the assessment of deformities in Dupuytren's disease*. Surg Clin North Am, 1968. **48**(5): p. 979-84.
21. Tubiana, R., *Evaluation of deformities in Dupuytren's disease*. Ann Chir Main, 1986. **5**(1): p. 5-11.
22. Cooper, D.W. and B. Burns, *Anatomy, Shoulder and Upper Limb, Hand Palmaris Tendon*, in *StatPearls*. 2022, StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
23. Leibovic, S.J., *Normal and Pathologic Anatomy of Dupuytren Disease*. Hand Clin, 2018. **34**(3): p. 315-329.
24. Bojsen-Moller, F. and L. Schmidt, *The palmar aponeurosis and the central spaces of the hand*. J Anat, 1974. **117**(Pt 1): p. 55-68.
25. Luck, J.V., *Dupuytren's contracture; a new concept of the pathogenesis correlated with surgical management*. J Bone Joint Surg Am, 1959. **41-a**(4): p. 635-64.

26. Murrell, G.A., M.J. Francis, and L. Bromley, *The collagen changes of Dupuytren's contracture*. J Hand Surg Br, 1991. **16**(3): p. 263-6.
27. Plikus, M.V., et al., *Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease*. Cell, 2021. **184**(15): p. 3852-3872.
28. Darby, I.A. and T.D. Hewitson, *Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis*. Int Rev Cytol, 2007. **257**: p. 143-79.
29. Hinz, B., *Formation and function of the myofibroblast during tissue repair*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(3): p. 526-37.
30. Hinz, B., *Myofibroblasts*. Exp Eye Res, 2016. **142**: p. 56-70.
31. Hinz, B., et al., *Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(9): p. 2730-41.
32. Andrew, J.G., et al., *An investigation into the role of inflammatory cells in Dupuytren's disease*. J Hand Surg Br, 1991. **16**(3): p. 267-71.
33. Desmoulière, A., et al., *Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 56-66.
34. Desmoulière, A., et al., *Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(1): p. 19-30.
35. Sayadi, L.R., et al., *The Molecular Pathogenesis of Dupuytren Disease: Review of the Literature and Suggested New Approaches to Treatment*. Ann Plast Surg, 2019. **83**(5): p. 594-600.
36. Badalamente, M.A., et al., *The role of transforming growth factor beta in Dupuytren's disease*. J Hand Surg Am, 1996. **21**(2): p. 210-5.
37. Morikawa, M., R. Derynck, and K. Miyazono, *TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(5).
38. Roberts, A.B. and L.M. Wakefield, *The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(15): p. 8621-3.
39. Hu, H.H., et al., *New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis*. Chem Biol Interact, 2018. **292**: p. 76-83.
40. Prud'homme, G.J., *Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations*. Lab Invest, 2007. **87**(11): p. 1077-91.
41. Blobel, G.A., W.P. Schiemann, and H.F. Lodish, *Role of transforming growth factor beta in human disease*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1350-8.
42. Taipale, J., J. Saharinen, and J. Keski-Oja, *Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion*. Adv Cancer Res, 1998. **75**: p. 87-134.
43. Baird, K.S., J.F. Crossan, and S.H. Ralston, *Abnormal growth factor and cytokine expression in Dupuytren's contracture*. J Clin Pathol, 1993. **46**(5): p. 425-8.
44. Berndt, A., et al., *Appearance of the myofibroblastic phenotype in Dupuytren's disease is associated with a fibronectin, laminin, collagen type IV and tenascin extracellular matrix*. Pathobiology, 1994. **62**(2): p. 55-8.
45. Zhang, A.Y., et al., *Gene expression analysis of Dupuytren's disease: the role of TGF-beta2*. J Hand Surg Eur Vol, 2008. **33**(6): p. 783-90.
46. Desmoulière, A., et al., *Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts*. J Cell Biol, 1993. **122**(1): p. 103-11.
47. Barcellos-Hoff, M.H., et al., *Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland*. J Clin Invest, 1994. **93**(2): p. 892-9.
48. Miyazono, K., et al., *A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1*. Embo j, 1991. **10**(5): p. 1091-101.
49. Annes, J.P., J.S. Munger, and D.B. Rifkin, *Making sense of latent TGFbeta activation*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 2): p. 217-24.
50. Wohltmann, M.H., *Einfluss der Bestrahlung ($\lambda = 453$ nm) auf modulierende Proteine der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Pathogenese des Morbus Dupuytren*. 2022.

51. Lyons, R.M., et al., *Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin*. J Cell Biol, 1990. **110**(4): p. 1361-7.
52. Lyons, R.M., J. Keski-Oja, and H.L. Moses, *Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium*. J Cell Biol, 1988. **106**(5): p. 1659-65.
53. Barcellos-Hoff, M.H. and T.A. Dix, *Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1*. Mol Endocrinol, 1996. **10**(9): p. 1077-83.
54. Jobling, M.F., et al., *Isoform-specific activation of latent transforming growth factor beta (LTGF-beta) by reactive oxygen species*. Radiat Res, 2006. **166**(6): p. 839-48.
55. Annes, J., et al., *A genetic screen to identify latent transforming growth factor beta activators*. Anal Biochem, 2004. **327**(1): p. 45-54.
56. Munger, J.S., et al., *The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis*. Cell, 1999. **96**(3): p. 319-28.
57. Annes, J.P., et al., *Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1*. J Cell Biol, 2004. **165**(5): p. 723-34.
58. Lu, M., et al., *Integrin alpha8beta1 mediates adhesion to LAP-TGFbeta1*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 23): p. 4641-8.
59. Ludbrook, S.B., et al., *The integrin alphavbeta3 is a receptor for the latency-associated peptides of transforming growth factors beta1 and beta3*. Biochem J, 2003. **369**(Pt 2): p. 311-8.
60. Mu, D., et al., *The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1*. J Cell Biol, 2002. **157**(3): p. 493-507.
61. Campbell, M.G., et al., *Cryo-EM Reveals Integrin-Mediated TGF-β Activation without Release from Latent TGF-β*. Cell, 2020. **180**(3): p. 490-501.e16.
62. Asano, Y., et al., *Increased expression of integrin alpha(v)beta3 contributes to the establishment of autocrine TGF-beta signaling in scleroderma fibroblasts*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7708-18.
63. Bouzeghrane, F., et al., *Alpha8beta1 integrin is upregulated in myofibroblasts of fibrotic and scarring myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **36**(3): p. 343-53.
64. Heldin, C.H., K. Miyazono, and P. ten Dijke, *TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins*. Nature, 1997. **390**(6659): p. 465-71.
65. Itoh, S., et al., *Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins*. Eur J Biochem, 2000. **267**(24): p. 6954-67.
66. Shi, Y. and J. Massagué, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell, 2003. **113**(6): p. 685-700.
67. Feng, X.H. and R. Derynck, *Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 659-93.
68. Massagué, J., J. Seoane, and D. Wotton, *Smad transcription factors*. Genes Dev, 2005. **19**(23): p. 2783-810.
69. Derynck, R. and Y.E. Zhang, *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. Nature, 2003. **425**(6958): p. 577-84.
70. Cogan, J.G., et al., *Vascular smooth muscle alpha-actin gene transcription during myofibroblast differentiation requires Sp1/3 protein binding proximal to the MCAT enhancer*. J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36433-42.
71. Tomasek, J.J., et al., *Regulation of alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts is dependent on the intronic CArG element and the transforming growth factor-beta1 control element*. Am J Pathol, 2005. **166**(5): p. 1343-51.
72. Samarakoon, R., et al., *TGF-β1 → SMAD/p53/USF2 → PAI-1 transcriptional axis in ureteral obstruction-induced renal fibrosis*. Cell Tissue Res, 2012. **347**(1): p. 117-28.
73. Higgins, C.E., et al., *The Genomic Response to TGF-β1 Dictates Failed Repair and Progression of Fibrotic Disease in the Obstructed Kidney*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 678524.
74. Samarakoon, R., et al., *The TGF-β1/p53/PAI-1 Signaling Axis in Vascular Senescence: Role of Caveolin-1*. Biomolecules, 2019. **9**(8).

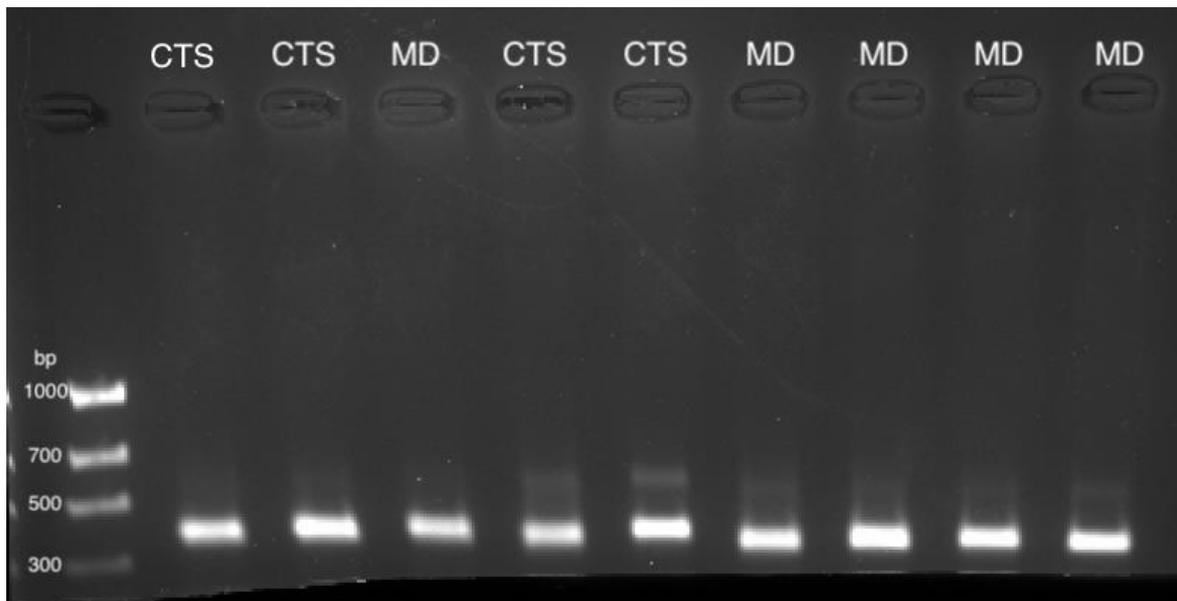
75. Samarakoon, R. and P.J. Higgins, *Integration of non-SMAD and SMAD signaling in TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression in vascular smooth muscle cells*. *Thromb Haemost*, 2008. **100**(6): p. 976-83.
76. Eddy, A.A. and A.B. Fogo, *Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(11): p. 2999-3012.
77. Boehm, J.R., et al., *Growth state-dependent regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression during epithelial cell stimulation by serum and transforming growth factor-beta1*. *J Cell Physiol*, 1999. **181**(1): p. 96-106.
78. Baum, P., et al., *Phenocopy--a strategy to qualify chemical compounds during hit-to-lead and/or lead optimization*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e14272.
79. Rabieian, R., et al., *Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 as a Regulator of Fibrosis*. *J Cell Biochem*, 2018. **119**(1): p. 17-27.
80. Kortlever, R.M., P.J. Higgins, and R. Bernards, *Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(8): p. 877-84.
81. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. *Nature*, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
82. Menendez, D., M. Shatz, and M.A. Resnick, *Interactions between the tumor suppressor p53 and immune responses*. *Curr Opin Oncol*, 2013. **25**(1): p. 85-92.
83. White, E., *Autophagy and p53*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016. **6**(4): p. a026120.
84. Kang, H.J. and Z. Rosenwaks, *p53 and reproduction*. *Fertil Steril*, 2018. **109**(1): p. 39-43.
85. Liu, J., et al., *Tumor suppressor p53 and metabolism*. *J Mol Cell Biol*, 2019. **11**(4): p. 284-292.
86. Kawarada, Y., et al., *TGF-β induces p53/Smads complex formation in the PAI-1 promoter to activate transcription*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 35483.
87. Overstreet, J.M., et al., *Redox control of p53 in the transcriptional regulation of TGF-β1 target genes through SMAD cooperativity*. *Cell Signal*, 2014. **26**(7): p. 1427-36.
88. Wu, Q., et al., *p53: A Key Protein That Regulates Pulmonary Fibrosis*. *Oxid Med Cell Longev*, 2020. **2020**: p. 6635794.
89. Liu, B., Y. Chen, and D.K. St Clair, *ROS and p53: a versatile partnership*. *Free Radic Biol Med*, 2008. **44**(8): p. 1529-35.
90. Brieger, K., et al., *Reactive oxygen species: from health to disease*. *Swiss Med Wkly*, 2012. **142**: p. w13659.
91. Venditti, P. and S. Di Meo, *The Role of Reactive Oxygen Species in the Life Cycle of the Mitochondrion*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(6).
92. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(1): p. 245-313.
93. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. *Nature*, 2000. **408**(6809): p. 239-47.
94. Ray, P.D., B.W. Huang, and Y. Tsuji, *Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling*. *Cell Signal*, 2012. **24**(5): p. 981-90.
95. Kishida, K.T. and E. Klann, *Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory*. *Antioxid Redox Signal*, 2007. **9**(2): p. 233-44.
96. Dekhuijzen, P.N., et al., *Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. **154**(3 Pt 1): p. 813-6.
97. Praticò, D., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F2alpha-III, an index of oxidant stress*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **158**(6): p. 1709-14.
98. Murrell, G.A., M.J. Francis, and L. Bromley, *Free radicals and Dupuytren's contracture*. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1987. **295**(6610): p. 1373-5.
99. Krstić, J., et al., *Transforming Growth Factor-Beta and Oxidative Stress Interplay: Implications in Tumorigenesis and Cancer Progression*. *Oxid Med Cell Longev*, 2015. **2015**: p. 654594.
100. Liu, R.M. and K.A. Gaston Pravia, *Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis*. *Free Radic Biol Med*, 2010. **48**(1): p. 1-15.

101. Richter, K. and T. Kietzmann, *Reactive oxygen species and fibrosis: further evidence of a significant liaison*. Cell Tissue Res, 2016. **365**(3): p. 591-605.
102. Miao, L. and D.K. St Clair, *Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(4): p. 344-56.
103. Lefaix, J.L., et al., *Successful treatment of radiation-induced fibrosis using Cu/Zn-SOD and Mn-SOD: an experimental study*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996. **35**(2): p. 305-12.
104. Vozenin-Brotans, M.C., et al., *Antifibrotic action of Cu/Zn SOD is mediated by TGF-beta1 repression and phenotypic reversion of myofibroblasts*. Free Radic Biol Med, 2001. **30**(1): p. 30-42.
105. Ishikawa, F., et al., *A mitochondrial thioredoxin-sensitive mechanism regulates TGF-beta-mediated gene expression associated with epithelial-mesenchymal transition*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **443**(3): p. 821-7.
106. Michaeloudes, C., et al., *TGF-beta regulates Nox4, MnSOD and catalase expression, and IL-6 release in airway smooth muscle cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **300**(2): p. L295-304.
107. Oberley, L.W. and G.R. Buettner, *Role of superoxide dismutase in cancer: a review*. Cancer Res, 1979. **39**(4): p. 1141-9.
108. Gauuan, P.J., et al., *Superoxide dismutase mimetics: synthesis and structure-activity relationship study of MnTBAP analogues*. Bioorg Med Chem, 2002. **10**(9): p. 3013-21.
109. Yu, J., et al., *MnTBAP Therapy Attenuates Renal Fibrosis in Mice with 5/6 Nephrectomy*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 7496930.
110. Venkatadri, R., et al., *MnTBAP Inhibits Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis by Regulating VEGF and Wnt Signaling*. J Cell Physiol, 2017. **232**(3): p. 506-516.
111. Glorieux, C. and P.B. Calderon, *Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach*. Biol Chem, 2017. **398**(10): p. 1095-1108.
112. Alfonso-Prieto, M., et al., *The molecular mechanism of the catalase reaction*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(33): p. 11751-61.
113. Goyal, M.M. and A. Basak, *Human catalase: looking for complete identity*. Protein Cell, 2010. **1**(10): p. 888-97.
114. Dong, Y., et al., *Catalase ameliorates hepatic fibrosis by inhibition of hepatic stellate cells activation*. Front Biosci (Landmark Ed), 2014. **19**(3): p. 535-41.
115. McMillan, C., C. Yeung, and P. Binhammer, *Variation in Treatment Recommendations for Dupuytren Disease*. J Hand Surg Am, 2017. **42**(12): p. 963-970.e6.
116. Rodrigues, J.N., et al., *Surgery for Dupuytren's contracture of the fingers*. Cochrane Database Syst Rev, 2015. **2015**(12): p. Cd010143.
117. Ball, C., et al., *Systematic review of non-surgical treatments for early dupuytren's disease*. BMC Musculoskelet Disord, 2016. **17**(1): p. 345.
118. Keilholz, L., M.H. Seegenschmiedt, and R. Sauer, *Radiotherapy for prevention of disease progression in early-stage Dupuytren's contracture: initial and long-term results*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996. **36**(4): p. 891-7.
119. Hurst, L.C., et al., *Injectable collagenase clostridium histolyticum for Dupuytren's contracture*. N Engl J Med, 2009. **361**(10): p. 968-79.
120. van Rijssen, A.L. and P.M. Werker, *Percutaneous needle fasciotomy in dupuytren's disease*. J Hand Surg Br, 2006. **31**(5): p. 498-501.
121. Rodrigo, J.J., et al., *Treatment of Dupuytren's contracture. Long-term results after fasciotomy and fascial excision*. J Bone Joint Surg Am, 1976. **58**(3): p. 380-7.
122. Denkler, K., *Surgical complications associated with fasciectomy for dupuytren's disease: a 20-year review of the English literature*. Eplasty, 2010. **10**: p. e15.
123. Vesper, U.S., et al., *[Primary intervention in Dupuytren's disease]*. Orthopade, 2017. **46**(4): p. 336-341.
124. Dutta, A., et al., *Dupuytren's Contracture - Current Concepts*. J Clin Orthop Trauma, 2020. **11**(4): p. 590-596.
125. Forgon, M. and G. Farkas, *[Results of surgical treatment of Dupuytren's contracture]*. Handchir Mikrochir Plast Chir, 1988. **20**(5): p. 279-84.

126. Ruettermann, M., et al., *Dupuytren's Disease-Etiology and Treatment*. Dtsch Arztebl Int, 2021. **118**(46): p. 781-788.
127. Grosche, J., J. Meißner, and J.A. Eble, *More than a syllable in fib-ROS-is: The role of ROS on the fibrotic extracellular matrix and on cellular contacts*. Mol Aspects Med, 2018. **63**: p. 30-46.
128. Jaekel, C., et al., *Illuminating the effect of beneficial blue light and ROS-modulating enzymes in Dupuytren's disease*. PLoS One, 2021. **16**(7): p. e0253777.
129. Hindocha, S., *Risk Factors, Disease Associations, and Dupuytren Diathesis*. Hand Clin, 2018. **34**(3): p. 307-314.
130. Hussain, S.P., et al., *p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis*. Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2350-6.
131. Elston, R. and G.J. Inman, *Crosstalk between p53 and TGF- β Signalling*. J Signal Transduct, 2012. **2012**: p. 294097.
132. Murphy-Ullrich, J.E. and M.J. Suto, *Thrombospondin-1 regulation of latent TGF- β activation: A therapeutic target for fibrotic disease*. Matrix Biol, 2018. **68-69**: p. 28-43.
133. Murphy-Ullrich, J.E., *Thrombospondin 1 and Its Diverse Roles as a Regulator of Extracellular Matrix in Fibrotic Disease*. J Histochem Cytochem, 2019. **67**(9): p. 683-699.
134. Patel, M.K., et al., *Thrombospondin-1 is a potent mitogen and chemoattractant for human vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(10): p. 2107-14.
135. Koch, M., *Die Bedeutung von Thrombospondin-1 für den chondrozytären Phänotyp*. 2012.
136. Grainger, D.J. and E.K. Frow, *Thrombospondin 1 does not activate transforming growth factor beta1 in a chemically defined system or in smooth-muscle-cell cultures*. Biochem J, 2000. **350 Pt 1**(Pt 1): p. 291-8.
137. Wu, G., et al., *Structural studies of plasmin inhibition*. Biochem Soc Trans, 2019. **47**(2): p. 541-557.
138. Draxler, D.F., M. Sashindranath, and R.L. Medcalf, *Plasmin: A Modulator of Immune Function*. Semin Thromb Hemost, 2017. **43**(2): p. 143-153.
139. Syrovets, T., O. Lunov, and T. Simmet, *Plasmin as a proinflammatory cell activator*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(3): p. 509-19.
140. Mandal, S.K., et al., *A novel mechanism of plasmin-induced mitogenesis in fibroblasts*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(1): p. 163-9.
141. Martínez-Rizo, A., et al., *Plasmin plays a key role in the regulation of profibrogenic molecules in hepatic stellate cells*. Liver Int, 2010. **30**(2): p. 298-310.
142. Zhang, G., et al., *Plasmin(ogen) promotes renal interstitial fibrosis by promoting epithelial-to-mesenchymal transition: role of plasmin-activated signals*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(3): p. 846-59.
143. Pins, G.D., et al., *Plasmin triggers rapid contraction and degradation of fibroblast-populated collagen lattices*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(4): p. 647-53.

6 Anhang

6.1 Anhang 1: Analyse des LAP-TGF- β -Amplifikons



LAP-TGF- β -Amplifikat in CTS und MD (491 bp) Die LAP-TGF- β -Amplifikate lassen sich sowohl in den CTS- als auch den MD-Fibroblasten bei einer Größe von 491 bp darstellen.

6.2 Anhang 2: Einverständniserklärung

Einverständniserklärung

Hiermit erteile ich


Name, Vorname


geboren am

die Einwilligung, alle angefertigten Fotoaufnahmen bzw. von mir selbst eingereichten Bilder ohne Einschränkung zu verwenden.
Für die Genehmigung verzichte ich auf Zahlungsansprüche.

Ich bin über Paragraph 22 des Gesetzes betreffend des Urheberrechts an Werken der bildenden Künste und in der Fotografie (KunstUrhG) ausdrücklich aufgeklärt worden.

- § 22: Bildnisse dürfen nur mit Einwilligung des Abgebildeten verbreitet oder öffentlich zur Schau gestellt werden. Die Einwilligung gilt im Zweifel als erteilt, wenn der abgebildete dafür, dass er sich selbst abbilden ließ, eine Entlohnung erhielt. Nach dem Tode des Abgebildeten bedarf es bis zum Ablauf von 10 Jahren der Einwilligung der Angehörigen des Abgebildeten. Angehörige im Sinne dieses Gesetzes sind der überlebende Ehegatte oder Lebenspartner und die Kinder des Abgebildeten und, wenn weder ein Ehegatte oder Lebenspartner noch Kinder vorhanden sind, die Eltern des Abgebildeten.

Hiermit trete ich meine Rechte an meinem Bild zu Zwecken der Forschung an den Autor ab.

Mir ist bekannt, dass ich mein Einverständnis jederzeit mit Wirkung für die Zukunft widerrufen kann.

Es ist mir erlaubt, dieses Bild/diese Bilder auch für private Zwecke zu nutzen.

MOERS, 21.8.2022
Ort, Datum


Unterschrift

Einverständniserklärung

Hiermit erteile ich


Name, Vorname


geboren am

die Einwilligung, alle angefertigten Fotoaufnahmen bzw. von mir selbst eingereichten Bilder ohne Einschränkung zu verwenden.
Für die Genehmigung verzichte ich auf Zahlungsansprüche.

Ich bin über Paragraph 22 des Gesetzes betreffend des Urheberrechts an Werken der bildenden Künste und in der Fotografie (KunstUrhG) ausdrücklich aufgeklärt worden.

- § 22: Bildnisse dürfen nur mit Einwilligung des Abgebildeten verbreitet oder öffentlich zur Schau gestellt werden. Die Einwilligung gilt im Zweifel als erteilt, wenn der abgebildete dafür, dass er sich selbst abbilden ließ, eine Entlohnung erhielt. Nach dem Tode des Abgebildeten bedarf es bis zum Ablauf von 10 Jahren der Einwilligung der Angehörigen des Abgebildeten. Angehörige im Sinne dieses Gesetzes sind der überlebende Ehegatte oder Lebenspartner und die Kinder des Abgebildeten und, wenn weder ein Ehegatte oder Lebenspartner noch Kinder vorhanden sind, die Eltern des Abgebildeten.

Hiermit trete ich meine Rechte an meinem Bild zu Zwecken der Forschung an den Autor ab.

Mir ist bekannt, dass ich mein Einverständnis jederzeit mit Wirkung für die Zukunft widerrufen kann.

Es ist mir erlaubt, dieses Bild/diese Bilder auch für private Zwecke zu nutzen.

MOERS, den 19.08.2022
Ort, Datum


Unterschrift

6.3 Anhang 3: Spenderliste

Nummer	Spender	Alter	Geschlecht	Passage	Gewebe
1	190626	79	weiblich	p3	CTS
2	190716	80	weiblich	p2	CTS
3	190514	65	männlich	p5	CTS
4	190722	72	männlich	p2	MD
5	190904	66	männlich	p1	MD
7	190716	80	weiblich	p1	CTS
9	190626	79	weiblich	p2	CTS
10	190711	69	männlich	p2	MD
11	190529	52	weiblich	p1	MD
12	190529	52	weiblich	p1	MD
13	190711	69	männlich	p2	MD
24	190521	57	männlich	p3	MD
25	190613	49	männlich	p3	MD
26	190909	68	männlich	p1	MD
27	190514-2	51	männlich	p2	CTS
28	190910-1	41	weiblich	p1	CTS
29	190702-2	80	weiblich	p1	CTS
31	190514-2	51	männlich	p3	CTS
32	190702	82	weiblich	p3	CTS
33	190617	49	männlich	p2	MD
34	190521	57	männlich	p3	MD
35	190529	52	weiblich	p2	MD
36	190507	60	weiblich	p2	CTS
39	190917	81	männlich	p2	MD
40	191008	66	männlich	p2	MD
42	190924	59	männlich	p2	MD
43	191015	67	weiblich	p2	CTS
44	191029	58	weiblich	p1	CTS
45	191105	72	weiblich	p1	CTS
46	190910-2	84	männlich	p1	CTS
47	190827	87	männlich	p1	CTS
50	191112	63	männlich	p1	MD
51	191210	45	männlich	p1	MD
52	190909	68	männlich	p1	MD
53	191217	41	männlich	p1	MD

54	190904	66	männlich	p2	MD
59	190910-1	41	weiblich	p1	CTS
64	191114	42	weiblich	p2	CTS
66	191005	72	weiblich	p1	CTS
69	200113	62	männlich	p1	MD
70	200128	76	weiblich	p1	MD
73	190219	46	weiblich	p2	MD
74	181119	56	weiblich	p1	MD
75	190115-1	87	männlich	p1	MD
76	180918	65	männlich	p1	MD
77	190121	62	männlich	p2	CTS
78	190626	79	weiblich	p1	CTS
79	190716	80	weiblich	p2	CTS
80	190702-2	80	weiblich	p2	CTS

Übersicht der Spender

CTS			
	weiblich	männlich	gesamt
- Spenderanzahl	17	6	23
- Durchschnittsalter	68,94 Jahre	66,67 Jahre	68,35 Jahre

MD			
	weiblich	männlich	gesamt
- Spenderanzahl	6	20	26
- Durchschnittsalter	55,67 Jahre	62,95 Jahre	61,27 Jahre

Auswertung Spender