

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Kommissarischer Klinikdirektor: Univ.-Prof. Dr. med. Uwe Maus

**Rolle von NADPH-Oxidase in der Myofibroblasten-Differenzierung  
bei Morbus Dupuytren Patienten unter Nachweis der Extrazellulären-  
Domäne A-Fibronektin und des  $\alpha$ -smooth muscle actin – Proteins**

Dissertation

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

vorgelegt von

Kathrin Eder

2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

# Widmung

Für meine Eltern, meine Schwester Lena und meinen Freund Nik.

## Zusammenfassung

Morbus Dupuytren (MD) ist eine fibroproliferative Erkrankung, die insbesondere in nordeuropäischen Ländern verbreitet ist und häufig familiär gehäuft auftritt. Sie führt zu einer Verdickung und Schrumpfung der Palmaraponeurose, was schließlich eine schmerzlose Flexion der Finger verursacht. Diese Erkrankung wird durch differenzierte Fibroblasten verursacht, die eine abnormale Kollagenproduktion fördern. Besonders die Myofibrogenese, also die Entstehung von myofibroblastenähnlichen Zellen, spielt dabei eine zentrale Rolle. Der Prozess wird maßgeblich durch den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) induziert, der die Aktivierung von SMAD-Proteinen und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) anregt. Diese ROS werden durch die NADPH-Oxidase 4 (NOX-4) produziert, die in diesem Zusammenhang eine bedeutende Rolle spielt. Trotz intensiver Forschung konnte bislang keine kurative Therapie für diese Erkrankung gefunden werden, die häufig einen rezidivierenden und chronischen Verlauf nimmt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere Einblicke in die Rolle der NADPH-Oxidase 4 (NOX-4) und der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Differenzierung von Fibroblasten der Palmaraponeurose bei Patienten mit Morbus Dupuytren (MD) zu gewinnen. Hierbei wurden primäre Fibroblasten sowohl von MD-Patienten als auch von gesunden Kontrollen untersucht. Die Differenzierung der Fibroblasten wurde durch den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  induziert, der als ein bedeutender Trigger der Fibroseentwicklung in Morbus-Dupuytren-Patienten bekannt ist. Zur Untersuchung der Rolle von NOX-4 in diesem Prozess wurde der NOX-4-spezifische Inhibitor GKT173831 sowie der flavinproteinspezifische Inhibitor DPI verwendet, um die Aktivität der NOX-4 gezielt zu blockieren. Diese Inhibitoren ermöglichen eine präzise Kontrolle über die NOX-4-Aktivität, um deren Einfluss auf die Fibroblasten-Differenzierung zu verstehen. In Bezug auf die ROS wurde der Effekt von zwei Antioxidantien, Glutathion (GSH) und N-Acetylcystein (NAC), untersucht. Diese Substanzen dienen der neutralisierenden Wirkung der ROS und tragen dazu bei, den Zusammenhang zwischen ROS-Produktion und der Fibroblastendifferenzierung zu analysieren. Die Analyse der Proteinexpression von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) und EDA-Fibronektin (EDA-Fn), die als Marker für die myofibroblastische Differenzierung und die extrazelluläre Matrixbildung dienen, wurde durch Western Blot-Technologie durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigten eine signifikante Erhöhung der Expression beider Marker als Folge der TGF- $\beta$ -induzierten Differenzierung, was auf eine aktive Myofibrogenese und die Entwicklung von fibrotischem Gewebe hinweist. Die Untersuchung der zellulären Mechanismen zeigte, dass die Inhibition der zellulären Flavinproteine durch den Einsatz von Diphenyleniodoniumchlorid (DPI) sowie die spezifische Hemmung der NADPH-Oxidase 4 (NOX-4) durch GKT173831 zu einer signifikanten Reduktion der TGF- $\beta$ -abhängigen Myofibrogenese führten. Diese Ergebnisse unterstreichen die wichtige Rolle der ROS-Produktion, die über NOX-4 vermittelt wird, bei der Regulation der Fibroblastendifferenzierung und der Entstehung von myofibroblastenähnlichen Zellen. Zusätzlich wurde der Einfluss von Antioxidantien, wie N-Acetylcystein (NAC) und Glutathion (GSH), untersucht, um deren potenzielle Rolle in der Modulation der ROS-Spiegel und der Myofibrogenese zu erfassen. Die antioxidative Intervention führte zwar zu einer starken Reduktion der Fibroblastendifferenzierung, jedoch war aufgrund der begrenzten Fallzahl in den durchgeführten Teilversuchen keine statistische Signifikanz zu erreichen. Dies weist auf die Notwendigkeit einer größeren Stichprobengröße hin, um die Effekte von NAC und GSH in diesem Kontext weiter zu validieren. Ein interessanter Aspekt der Studie war die Untersuchung der Differenzen zwischen den beiden untersuchten Gruppen, den gesunden Kontrollen (CTS) und den MD-Patienten. Es konnte jedoch keine signifikante Differenz im Verhalten der Fibroblasten gegenüber den untersuchten Modulatoren festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass die Fibroblastendifferenzierung und ihre Reaktion auf die modulierenden Substanzen in beiden Gruppen ähnlich verlaufen. Diese Ergebnisse liefern wichtige Hinweise auf die universelle Bedeutung der ROS- und NOX-4-vermittelten Signalwege in der Entwicklung von Morbus Dupuytren und anderen fibroproliferativen Erkrankungen.

## Summary

Morbus Dupuytren (MD) is a fibroproliferative disease that is particularly common in Northern European countries and often runs in families. It leads to thickening and shrinking of the palmar aponeurosis, ultimately causing painless flexion of the fingers. This disease is caused by differentiated fibroblasts that promote abnormal collagen production. A key process in MD is myofibrogenesis, which refers to the development of myofibroblast-like cells. This process is primarily induced by the growth factor TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor beta), which activates SMAD proteins and stimulates the production of reactive oxygen species (ROS). These ROS are produced by NADPH oxidase 4 (NOX-4), which plays a significant role in this context. Despite intensive research, no curative therapy has been found for this disease yet, which often has a recurrent and chronic course. The aim of this study was to gain further insights into the role of NADPH oxidase 4 (NOX-4) and reactive oxygen species (ROS) in the differentiation of fibroblasts from the palmar aponeurosis in patients with Morbus Dupuytren (MD). Primary fibroblasts from both MD patients and healthy controls were studied. The differentiation of fibroblasts was induced by the growth factor TGF- $\beta$ , which is known as a major trigger of fibrosis development in Morbus Dupuytren patients. To investigate the role of NOX-4 in this process, the NOX-4-specific inhibitor GKT173831 and the flavin protein-specific inhibitor DPI were used to specifically block NOX-4 activity. These inhibitors allow for precise control of NOX-4 activity to better understand its influence on fibroblast differentiation. Regarding ROS, the effects of two antioxidants, glutathione (GSH) and N-acetylcysteine (NAC), were examined. These substances neutralize ROS and help analyze the relationship between ROS production and fibroblast differentiation. The analysis of protein expression of  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) and EDA-Fibronectin (EDA-Fn), which serve as markers for myofibroblast differentiation and extracellular matrix formation, was performed using Western blot technology. The results confirmed a significant increase in the expression of both markers as a result of TGF- $\beta$ -induced differentiation, indicating active myofibrogenesis and the development of fibrotic tissue. The study of cellular mechanisms showed that inhibition of cellular flavin proteins using Diphenyliodonium chloride (DPI) and specific inhibition of NADPH oxidase 4 (NOX-4) using GKT173831 led to a significant reduction in TGF- $\beta$ -dependent myofibrogenesis. These results underscore the important role of ROS production mediated by NOX-4 in the regulation of fibroblast differentiation and the formation of myofibroblast-like cells. Additionally, the influence of antioxidants, such as N-acetylcysteine (NAC) and glutathione (GSH), was investigated to assess their potential role in modulating ROS levels and myofibrogenesis. The antioxidant intervention led to a significant reduction in fibroblast differentiation, but due to the limited sample size of the conducted sub-studies, no statistical significance was reached. This highlights the need for a larger sample size to further validate the effects of NAC and GSH in this context. An interesting aspect of the study was the investigation of differences between the two examined groups, the healthy controls (CTS) and MD patients. No significant differences in the behavior of fibroblasts toward the studied modulators were observed, suggesting that fibroblast differentiation and their response to the modulating substances proceed similarly in both groups. These findings provide important insights into the universal significance of ROS- and NOX-4-mediated signaling pathways in the development of Morbus Dupuytren and other fibroproliferative diseases.

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
$\alpha$ -SMA	Alpha-smooth muscle protein
°C	Grad Celsius
A	Ampere
ACVR2A/2B	Activin-Rezeptor Typ 2A/2B
ALK 1-7	Anaplastische Lymphomkinase 1-7
AMHR2	Anti-Mullerian hormone rezeptor Typ 2
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BMP(R2)	Bone morphogenetic protein (rezeptor2)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTS	Karpaltunnelsyndrom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenyleneiodonium
DUOX1/2	Duale Oxidase ½
EDA-Fn	Extra-domain A Fibronektin
EGF	Ephithelial growth factor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF	Fibroblast growth factor
GAG	Glukoasaminglykane
Gln	Glutamin
GSH	Reduziertes Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HCl	Wasserstoffchlorid
IGF-1	Insulin-like growth factor
IL-1	Interleukin-1
JNK	Janus-Kinase
kDA	Kilo-Dalton
KGF	Keratinocyte growth factor
LAP	Latency-associated protein
LEMD3	LEM-domain-containing protein3
LF	Limitierte Fasziektomie

<b>LTBP-1</b>	latentes TGF- $\beta$ -binding-Protein-1
<b>M</b>	Molare Masse
<b>m<sup>2</sup></b>	Quadratmeter
<b>MAP</b>	Mitogen-activated protein
<b>MD</b>	Morbus Dupuytren
<b>MEK</b>	Kombination aus MAPK/ERK-Kinase
<b>mg</b>	Milligramm
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>MMP</b>	Matrix-Metalloproteasen
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>N</b>	Number / Anzahl
<b>NAC / Nac</b>	N-Acetyl-Cystein
<b>NADPH</b>	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
<b>Nd:YAG-Laser</b>	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>NOX</b>	NADPH-Oxidase
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>PAP-Methode</b>	Peroxidase anti-Peroxidase Methode
<b>PDGF</b>	Platelet derived growth factor
<b>PNF</b>	Perukutane Nadelfasziotomie
<b>PRP</b>	Plättchenreiches Plasma
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>Rpm</b>	Rounds per minute
<b>Ski</b>	Sloan-kettering Institute
<b>SMAD</b>	S= Small body size MAD= mother against decapentaplegic
<b>SMURF1-</b>	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1
<b>SnoN</b>	Ski novel
<b>TAK1</b>	TGF- $\beta$ -aktivierte Kinase 1
<b>TGF-<math>\beta</math> 1/2</b>	Transkriptionsfaktor beta 1/2
<b>TGF<math>\beta</math>R2</b>	Transkriptionsfaktor beta 1/2 Rezeptor
<b>TIMPs</b>	Tissue inhibitors of metalloproteinases
<b>TKF</b>	Transkriptionsfaktor
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor alpha
<b>TRAF6</b>	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor

<b>UV</b>	Ultraviolettes Licht
<b>V</b>	Volt
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>µM</b>	Mikromol

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten .....	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung des TGF- $\beta$ -Signalwegs über Smad-Proteine.....	14
Abbildung 3: ROS-abhängige Myofibroblastendifferenzierung .....	19
Abbildung 4: Darstellung des klinischen Erscheinungsbildes vor und nach chirurgischer Intervention .....	22
Abbildung 5: Mögliche Angriffspunkte von NAC (N-Acetyl-L-Cystein) .....	32
Abbildung 6: Verteilungsmuster der Inhibitoren auf die six-well Platten eines Probanden .....	40
Abbildung 7: Lichtmikroskopische Darstellung der behandelten MD-Zellen .....	42
Abbildung 8: schematischer Aufbau einer Blotkassette.....	46
Abbildung 9: Vergleich der absoluten Proteinexpression (EDA-Fn, $\alpha$ SMA) +/- TGF- $\beta$ Zugabe bei Morbus Dupuytren und Carpal-Tunnel-Syndrom .....	50
Abbildung 10: Western Blot-Analyse des $\alpha$ SMA-Proteins nach Behandlung mit dem Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ +/- NOX-Inhibitoren-Zugabe (DPI, GKT137831) .....	51
Abbildung 11: Vergleich der absoluten Proteinexpression ( $\alpha$ SMA) vor und nach DPI-Zugabe bei MD-Probanden nach Aktivierung durch TGF- $\beta$ .....	52
Abbildung 12: Vergleich der absoluten Proteinexpression ( $\alpha$ SMA) vor und nach GKT- Zugabe bei MD-Probanden + TGF- $\beta$ .....	53
Abbildung 13: Vergleich der NOX-Inhibitoren-Wirkung (GKT137831, DPI) in Bezug auf die absolute Proteinexpression ( $\alpha$ SMA) bei MD-Probanden +TGF- $\beta$ .....	54
Abbildung 14: Western Blot-Analyse des $\alpha$ -SMA-Proteins nach Behandlung mit dem Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ +/- Antioxidantien-Zugabe (N-Acetylcystein, Glutathion) .....	55
Abbildung 15: Lichtmikroskopischer Vergleich der Morbus-Dupuytren-Zellen +/- TGF- $\beta$ und +/- Nac.....	56
Abbildung 16: Vergleich der absoluten Proteinexpression ( $\alpha$ SMA) nach Zugabe des Antioxidans NAC bei MD-Probanden +TGF- $\beta$ .....	57
Abbildung 17: Vergleich der absoluten Proteinexpression ( $\alpha$ SMA) nach Zugabe des Antioxidans GSH (red. Glutathion) bei MD-Probanden +TGF- $\beta$ .....	58
Abbildung 18: Western-Blot-Analyse des EDA-Fn Proteins nach Behandlung mit dem Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ +/- NOX-Inhibitoren-Zugabe (DPI, GKT137831).....	59
Abbildung 19: Vergleich der absoluten Proteinexpression (EDA-Fn) vor und nach DPI-Zugabe bei MD-Probanden +TGF- $\beta$ .....	60

Abbildung 20: Vergleich der absoluten Proteinexpression (EDA-Fn) vor und nach GKT-Zugabe bei MD-Probanden +TGF- $\beta$ .....	61
Abbildung 21: Vergleich der NOX-Inhibitoren-Wirkung (GKT137831, DPI) in Bezug auf die absolute Proteinexpression (EDA-Fn) bei MD-Probanden +TGF- $\beta$ .....	61
Abbildung 22: Western Blot-Analyse des EDA-Fn-Proteins nach Behandlung mit dem Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ +/- Antioxidantien-Zugabe (N-Acetylcystein, Glutathion) .....	62
Abbildung 23: Vergleich der absoluten Proteinexpression (EDA-Fn) nach Zugabe des Antioxidans GSH bei MD-Probanden + TGF- $\beta$ .....	63
Abbildung 24: Vergleich der absoluten Proteinexpression (EDA-Fn) nach Zugabe des Antioxidans NAC bei MD-Probanden +TGF- $\beta$ .....	64
Abbildung 25: Immunhistochemische Darstellung der NOX-Inhibitoren DPI und GKT137831 bei Morbus Dupuytren, aufgezeigt an beiden Proteinmarkern ( $\alpha$ -SMA, EDA-Fn).....	68
Abbildung 26: Immunhistochemische Darstellung der Antioxidantien Nac und GSH im Morbus Dupuytren, aufgezeigt an beiden Proteinmarkern ( $\alpha$ -SMA, EDA-Fn) .....	72

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Morbus Dupuytren .....	9
Tabelle 2: Probandenübersicht Karpaltunnelsyndrom.....	25
Tabelle 3: Probandenübersicht Morbus Dupuytren.....	26
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien .....	26
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Chemikalien .....	28
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Inhibitoren.....	29
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Inhibitorkonzentrationen.....	30
Tabelle 8 Auflistung der verwendeten Medien, Lösungen und Puffer.....	32
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Antikörper in der Western-Blot-Analyse.....	33
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Antikörper bei Immunhistochemie .....	33
Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Geräte.....	34
Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Software .....	36
Tabelle 13: Aufteilung der Behandlungsgruppen und Behandlungsfrequenz.....	41
Tabelle 14: Pipettierschema des BSA-Standards .....	44
Tabelle 15: Durchgeführte statistische Testungen nach Prüfung der Normalverteilung.....	49

# Inhaltsverzeichnis

<b>WIDMUNG .....</b>	<b>.....</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Aufbau der Haut.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die drei Phasen der Wundheilung .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Narben und Keloide als Komplikationen der Wundheilung.....	5
<b>1.3 Morbus Dupuytren .....</b>	<b>8</b>
1.3.1 Ätiologie und Verlauf des Morbus Dupuytren .....	8
1.3.2 Die Rolle der Fibroblasten und ihre Differenzierung zu Myofibroblasten.....	9
1.3.3 Der TGF- $\beta$ Signalweg.....	12
1.3.4 Die Bedeutung der NADPH-Oxidase 4 und ROS .....	16
<b>1.4 Aktuelle Therapieoptionen gegen Narben, Keloide und andere sklerotische Ereignisse ....</b>	<b>19</b>
<b>1.5 Ziele der Arbeit .....</b>	<b>23</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Patienten und Probenmaterial.....</b>	<b>23</b>
2.1.1 Verbrauchsmaterial .....	26
2.1.2 Chemikalien .....	28
2.1.2.1 Inhibitoren .....	29
2.1.2.1.1 DPI.....	30
2.1.2.1.2 Glutathion .....	30
2.1.2.1.3 GKT137831 .....	31
2.1.2.1.4 N-Acetyl-L-Cystein.....	31
2.1.2.2 Lösungen und Puffer .....	32
2.1.2.3 Antikörper .....	33
2.1.3 Technik .....	34
2.1.3.1 Geräte .....	34
2.1.3.2 Software.....	36

<b>3</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellkultur</b> .....	<b>37</b>
3.1.1	Kultivierung und Versuchsaufbau .....	37
3.1.1.1	Kryokonservierung .....	37
3.1.1.2	Auftauen .....	38
3.1.1.3	Ernten der Proben .....	38
3.1.1.4	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer) .....	38
3.1.2	Versuchsaufbau .....	39
3.1.2.1	Versuchsablauf .....	40
3.1.2.2	Mikroskopische Ergebnisse .....	42
<b>3.2</b>	<b>Analyse der Proteinexpression durch Western-Blot Analyse</b> .....	<b>43</b>
3.2.1	BCA-Proteinassay .....	43
3.2.2	Prinzip des Western Blots .....	44
3.2.3	Probenvorbereitung und verwendete Gele .....	44
3.2.4	Durchführung der SDS-PAGE .....	45
3.2.5	Das Blotting .....	45
3.2.6	Die Ponceau-S-Färbung .....	46
3.2.7	Antikörpermarkierung und Detektion .....	46
3.2.8	Auswertung der Proteinexpression .....	47
<b>3.3</b>	<b>Immunhistochemie</b> .....	<b>47</b>
<b>3.4</b>	<b>Ethikvotum</b> .....	<b>48</b>
<b>3.5</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Normalverteilung testen</b> .....	<b>49</b>
<b>4.2</b>	<b>Voraktivität der Myofibroblasten</b> .....	<b>49</b>
4.2.1	Nach TGF- $\beta$ Stimulation .....	49
<b>4.3</b>	<b>Expression des Myofibroblastenmarker <math>\alpha</math>-SMA</b> .....	<b>50</b>
4.3.1	NOX-Inhibitoren .....	50
4.3.1.1	DPI .....	51
4.3.1.2	GKT137831 .....	52
4.3.1.3	Vergleich der NOX-Inhibitoren GKT137831 vs. DPI .....	53
4.3.2	Antioxidantien .....	54
4.3.2.1	N-Acetyl-L-Cystein .....	55
4.3.2.2	Glutathion .....	57

4.3.2.3	Vergleich der Antioxidantien N-Acetylcystein vs. Glutathion .....	58
<b>4.4</b>	<b>Expression des Myofibroblastenmarker EDA-Fibronektin .....</b>	<b>58</b>
4.4.1	NOX-Inhibitoren.....	59
4.4.1.1	DPI.....	60
4.4.1.2	GKT137831 .....	60
4.4.1.3	Vergleich der NOX-Inhibitoren GKT137831 vs. DPI.....	61
4.4.2	Antioxidantien.....	62
4.4.2.1	Glutathion.....	63
4.4.2.2	N-Acetyl-L-Cystein.....	63
4.4.2.3	Vergleich der Antioxidantien N-Acetyl-L-Cystein vs. Glutathion .....	64
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>65</b>
5.1	Bewertung der Proteinmarker $\alpha$ -SMA und EDA-Fn in der Myofibrogenese .....	65
5.2	Wirkungsweise der NOX-Inhibitoren.....	67
5.3	Wirkungsweise der Antioxidantien.....	69
5.4	Aktuelle Datenlage und Aussicht im Hinblick auf weitere mögliche Inhibitoren der Myofibrogenese sowie klinische Relevanz .....	72
5.5	Die Rolle von NADPH-Oxidase 4 und ROS bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten .....	74
5.6	Kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse und Fazit.....	75
<b>6</b>	<b>LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>87</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau der Haut

Das größte Organ unseres Körpers ist die Haut. Mit einer Gesamtfläche von ca. 1,5-2 m<sup>2</sup> ist sie nicht nur ein Schutzschild gegenüber äußeren Einflüssen, wie Schmutz, UV-Strahlung oder Krankheitserregern, sondern erfüllt auch eine wichtige Funktion, wenn es um die Regulation unserer Körpertemperatur oder um die Empfindung von Schmerz und Berührungen geht. Sie ist aufgebaut aus drei Schichten. Mikroskopisch kann man die Haut in die äußere Epidermis, die aus verhorntem Plattenepithel besteht, die aus Bindegewebe bestehende Dermis und die darunter liegende Subcutis einteilen. (Moll, 2005, Schiebler and Korf, 2007)

Die Oberhaut bzw. Epidermis, die mit unserer Umwelt in direktem Kontakt steht, ist ca. 50 µm dick und besteht aus vier Schichten. An Regionen mit erhöhter Beanspruchung, wie zum Beispiel an Handfläche oder Fußsohle, kann sie zwischen 0,2 mm und 1 mm dick sein. An der Oberfläche befindet sich die äußere Zellschicht (Stratum corneum), die hauptsächlich aus Hornzellen besteht. Darunter befindet sich das Stratum granulosum, die aufgrund ihrer Körnerzellen auch als Körnerschicht bezeichnet wird. Die dritte Schicht wird als Stratum spinosum bezeichnet, in der die Keratinozyten aufgrund ihres Phänotyps als Stachelzellen bekannt sind. Aufliegend auf die Dermis befindet sich das Stratum basale mit den sog. Basalzellen - die ursprüngliche Form der Keratinozyten. (Moll, 2005)

Die Zell-Hauptpopulation der Oberhaut bilden die Keratinozyten (90 %), die ein großes Regenerationsvermögen besitzen und fortlaufend von der Basalzellschicht (Stratum basale) neu gebildet werden. Diese neuen vitalen Keratinozyten wandern entlang ihrer Differenzierung nach oben an die Oberfläche und werden dort zu avitalen Hornzellen, wo sie durch Abschilferung oder Beanspruchung abfallen. Dieses Prinzip wird auch Orthokeratose genannt und beschreibt die Differenzierung der Keratinozyten von Basal-, Stachel-, Körnerzelle bis hin zur kernlosen Hornzelle. Die Entwicklung von Basalzelle zur Körnerzelle, sowie zur Hornzelle dauert jeweils zwei Wochen. (Moll, 2005, Schiebler and Korf, 2007)

Neben den Keratinozyten befinden sich noch die Melanozyten, die Langerhans- und Merkel-Zellen in der Epidermis.

Die Melanozyten liegen im Stratum basale und kommen zusätzlich im Haarfollikel vor. Diese stark verzweigten Zellen enthalten Melanosomen und sind für die Pigmentierung der Haut bzw. des Haares zuständig. In ihnen wird das schwarz-braune Pigment Melanin hergestellt, das sie an benachbarte Keratinozyten durch Endozytose weitergeben können, wodurch auch die Hautfarbe definiert wird.

Die Langerhans-Zellen stammen aus unreifen Zellen aus dem Knochenmark und bilden sich erst in der Epidermis vollständig aus. Sie werden als immunkompetente Zellen angesehen, da sie durch

ihre antigenpräsentierende Funktion in lokale Lymphknoten einwandern und eine Aktivierung des Immunsystems auslösen können.

Die selteneren Merkel-Zellen zählen zum Nervensystem und entsprechen funktionsgemäß Mechanorezeptoren. Sie befinden sich vor allem an den Fingerkuppen, sowie an den Fußsohlen. (Moll, 2005, Kirsch, 2011, Hamm, 2017)

Die zweite Schicht unserer Haut ist die Dermis, auch Lederhaut genannt. Sie steht -über die Basalmembran- in direktem Kontakt zur darüberliegenden Epidermis. Oft werden beide Schichten auch zur Cutis zusammengefasst.

Sie gliedert sich in zwei Schichten: Stratum papillare (außen) und Stratum reticulare (innen). Das schmale Stratum papillare besteht hauptsächlich aus Matrixgewebe, dermalen Zellen und Blutgefäßen. Die Kollagenfasern und elastischen Fasern befinden sich überwiegend im dickeren Stratum reticulare, die die hohe Widerstandsfähigkeit der Haut gewährleisten. Zusätzlich befinden sich dort die Haarbulbi, sowie die Schweißdrüsen. (Moll, 2005, Kirsch, 2011)

Die dominierenden Zellen in der Dermis sind die Fibroblasten. Ihre Zellkörper sind spindelförmig und haben lange Zellfortsätze, mit denen sie sich untereinander verbinden und ein Netz bilden können. In inaktiver Form werden sie als Fibrozyten bezeichnet. Aufgrund ihrer Zellorganelle können sie Fasern und extrazelluläre Matrix synthetisieren. (Moll, 2005)

Zusätzlich befinden sich Phagozytose-betreibende Makrophagen in der Dermis, sowie andere Immunzellen (z.B. Mastzellen, Granulozyten). (Schiebler and Korf, 2007)

Die dreidimensionale EZM kann in drei Bestandteile gegliedert werden:

1. Kollagenfasern

Die Kollagenfasern verlaufen ungerichtet und in unterschiedliche Richtungen. Generell sind sie für die Struktur, mechanische Stabilität und Elastizität der Haut wichtig. Die dicken und festen Kollagen Typ I-Fasern kommen am häufigsten in der Dermis vor und machen dort 70-75% aus. Sie sind für die Festigkeit und Dehnbarkeit der Haut verantwortlich. Das durch die Fibroblasten produzierte Prokollagen wird intrazellulär hergestellt. Extrazellulär entsteht nach enzymatischer Abspaltung das Kollagen, das sich schließlich zu Fibrillen und wiederum zu Kollagenfasern verknüpft. Die Prokollagene bestehen aus Polypeptidketten, wobei diese abhängig vom Manifestationsort unterschiedlich sind. (Moll, 2005) Bei Kollagen Typ III (retikuläre Fasern) handelt es sich um dünneres, lockereres Kollagen. Sie umgeben die Hautanhangsgebilde und die Basalmembran. Typ IV Kollagen ist nicht nur ein wichtiger Bestandteil der Basalmembran und verbindet Epidermis und Dermis, sondern filtert auch den Austausch von Substanzen zwischen ihnen. Typ V und VI sind u.a. für die Regeneration von beschädigtem Gewebe zuständig. Kollagen Typ VII bildet die Verankerungsfasern („anchoring fibrils“ (Moll, 2005)) der Epidermis in der darunterliegenden Dermis, ähnlich zu Typ IV. (Hamm, 2017, Ricard-Blum, 2011, Schiebler and Korf, 2007)

## 2. Elastische Fasern

Die elastischen Fasern, die unserer Haut ihre Elastizität verleihen, bestehen aus dem Protein Elastin und dem Fibrillin. Diese Fibrillinen bilden ein wellenartiges Gerüst für die Elastinmoleküle, an dem sie sich festsetzen können. Verlieren die Fibrilline ihre Struktur, wirkt die Haut schlaff. (Hamm, 2017, Schiebler and Korf, 2007, Moll, 2005)

## 3. Extrazelluläre Matrix

Die Struktur um die Fasern herum bezeichnet man als Grundsubstanz. Diese besteht vor allem aus Proteoglykanen (Hyaluronsäure, Heparinsulfat, Chondroitinsulfat) und Glykosaminoglykanen. Aufgrund ihrer starken negativen Ladung können sie Wasser binden und spielen somit für den Hautturgor eine wichtige Rolle (Hamm, 2017).

Die tiefste und letzte der drei Hautschichten ist die Subkutis, bzw. Unterhaut. Sie besteht hauptsächlich aus lockerem Bindegewebe und polsternden Fettzellen, welche durch Septen getrennt sind. Sie verbindet die darüberliegenden Schichten der Haut mit den unter ihr liegenden Schichten und dient als „Verschiebeschicht“ (Schiebler and Korf, 2007). In den Septen verlaufen neben den Blutgefäßen auch die Nervenfasern. Die Aufgabe der Unterhaut sind zum einen die Isolation des Körpers vor Kälte, sowie Schutz und Speicherfunktion. Das Speichere Fett, z.B. in der Bauchhaut, dient als Energiereserve für den Körper. Das Baufett hingegen ist ein wichtiger Baustein an Körperstellen, die hohem mechanischen Druck ausgesetzt sind (z.B. Fußsohle, bzw. Ferse). (Schiebler and Korf, 2007)

## 1.2 Die drei Phasen der Wundheilung

In der Literatur werden drei Phasen während des Wundheilungsprozesses beschrieben: Exsudative Phase, Proliferative Phase, Reparative Phase. (Lange and Wessel, 2021)

Die erste Phase beschreibt die exsudative Phase, die wiederum in Hämostase und Entzündungsreaktion unterteilt wird. Sie beginnt innerhalb 4-6 Tagen nach der Verletzung. Kurz nach dem Ereignis erfolgt eine durch Thromboxan A<sub>2</sub> und PG<sub>2</sub>- $\alpha$  vermittelte Vasokonstriktion im Wundgebiet. Die Thrombozyten binden an die Gefäßwand; dadurch erfolgt die Aktivierung der Blutgerinnungskaskade. Am Ende entsteht ein Blutgerinnsel mit provisorischer Matrix aus Thrombozyten, Kollagenfasern, Thrombin und Fibronectin, welches einen Anker und zeitgleich eine Schiene für Zellen bildet, die am Reparationsprozess beteiligt sind und zusätzlich als Reservoir von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF, IGF-1) wirken. Die beteiligten Thrombozyten sezernieren Entzündungsmediatoren (PDGF, IGF-1, TGF- $\beta$ 1, EGF) woraufhin Makrophagen, Fibroblasten und Gefäßzellen aktiviert werden.

Während der Entzündungsphase infiltrieren Leukozyten in das Wundgebiet, danach Monozyten und Lymphozyten. Neutrophile synthetisieren TNF- $\alpha$  (Entzündungsmediator) und IL-1, diese aktivieren Fibroblasten und Keratinozyten. Weiterhin werden Proteasen und freie O<sub>2</sub>-Radikale produziert, um phagozytiertes Material abzubauen.

Die aus Monozyten differenzierten Makrophagen verfügen im Wundheilungsprozess über eine Schlüsselfunktion. Sie produzieren Zytokine und Wachstumsfaktoren (z.B. FGF, TGF- $\beta$ ). Dadurch kommt es zur Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen.

Direkt nach der Entstehung des Gewebedefektes kommt es durch die Vasokonstriktion zur Hypoxie im Wundareal. Durch das Sauerstoffdefizit erfolgt der Reiz zur Ausbildung von neuen Blutgefäßen, sowie zur Fibroblasten-Proliferation und zur Migration der Keratinozyten in das Wundgebiet. (Broughton et al., 2006, Piatek and Tautenhahn, 2012, Wild and Auböck, 2007, Fritsch and Schwarz, 2018)

Die zweite Phase wird als Proliferationsphase bezeichnet. Diese startet zwischen dem 2. und 16. Tag. Die Hauptaufgabe in dieser Phase ist die Auffüllung der Wunde mit neuem Bindegewebe. Im zytologischen Bild lassen sich vor allem Fibroblasten, Makrophagen, Angioblasten und Keratinozyten nachweisen, die zusammen das Granulationsgewebe synthetisieren. Dafür steuern die Faktoren PDGF, TGF- $\beta$ , b-FGF die Migration der Fibroblasten in die Wunde. Diese binden an den Integrinrezeptoren der provisorisch produzierten Matrix aus Phase 1.

Die Aufgabe der Fibroblasten ist in der Granulationsphase die Produktion von Matrixproteinen, v.a. Kollagenfasern vom Typ III, Fibronectin und Bestandteile der EZM wie Glykosaminoglykane (GAG) und Glykoproteine, um nach und nach die alte provisorische Matrix zu ersetzen. Die Kofaktoren Vitamin C, Sauerstoff und Eisen verhindern eine Störung im Ablauf des Wundheilungsprozesses.

Die Reepithelisierung, die einige Stunden nach der Verletzung einsetzt, geht von den Epidermalzellen (basale und suprabasale Zellen) am Wundrand aus, die ähnlich einer vorwachsenden Epithelzunge gleicht (Fritsch and Schwarz, 2018). Diese bedecken anfangs die Wundoberfläche mit Epithel. Ihr Reiz ist der fehlende Kontakt zueinander („free edge effect“) sowie der Anreiz durch Wachstumsfaktoren (v.a. TGF- $\alpha/\beta$ , EGF). Um das Vorwachsen der Keratinozyten zu ermöglichen, werden zusätzlich Enzyme zur Fibrinolyse exprimiert, sowie Matrix-Metalloproteasen (MMPs). Die Migration und die hohe Zellteilungsrate wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren aus Thrombozyten (EGF, TGF- $\alpha/\beta$ ), Makrophagen (TGF $\alpha/\beta$ ), aktivierte Fibroblasten (KGF, FGF, IGF-1) und durch die Keratinozyten selbst (TGF- $\alpha$ ) gefördert. (Fritsch and Schwarz, 2018) Ihre Migration endet, sobald die Zell-Zellverbindung wiederhergestellt ist. Im Anschluss erfolgt ihre physiologische Differenzierung wie bereits in 1.1 beschrieben. (Wild and Auböck, 2007)

In dieser Phase kommen erstmals die sogenannten MMPs zum Einsatz. Sie bestehen aus unterschiedlichen Gruppen und sind wichtig für die Zellwanderung, den Ab- und Umbau der Extrazellulären Matrix (EZM) während der Remodellierungsphase. Sie werden reguliert durch deren Inhibitoren (TIMPS). Ein Ungleichgewicht führt zum übermäßigen Abbau der Matrixproteine und kann somit eine chronische Wundheilungsstörung verursachen.

Der bereits durch die Makrophagen gebildete Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  stimuliert in der Granulationsphase die Angiogenese durch die Angioblasten, sowie die Proliferation von Fibroblasten und Differenzierung zu Myofibroblasten, ebenso die EZM-Produktion.

Die Myofibroblasten haben durch aktinhaltige kontraktile Elemente ( $\alpha$ -SMA, Desmin) eine ähnliche Funktion wie die glatte Muskulatur. (Wolfram et al., 2009) Sie durchziehen das komplette Wundgebiet. Sobald ihre kontraktile Elemente schrumpfen, verkürzen sich die Zell-Zellbindungen zwischen Myofibroblasten und somit kommt es zur Verkleinerung der Wundregion und letztendlich zum Verschluss der Wunde. Sobald sie verschlossen ist, erfolgt die Herabregulierung der Wachstumsfaktorrezeptoren der Fibroblasten und ein Teil der (Myo-)Fibroblasten betreibt Apoptose. Während der Rest lediglich seine Arbeit einstellt und in den Ruhezustand zurückkehrt. (Wild and Auböck, 2007, Piatek and Tautenhahn, 2012)

Die letzte Phase wird als reparative Phase bezeichnet. Sie wird aufgeteilt in Remodelling und Phase der Epithelisierung. Sie beginnt zwischen dem 5.-25. Tag und kann bis zu zwei Jahren andauern. Ziel der Phase ist die Umwandlung des Granulationsgewebes zur Narbe. (Wild and Auböck, 2007) Die Narbe erhält hier ihre endgültige Beschaffenheit (Stärke, Funktion, Aussehen). Dafür erfolgt die gleichzeitige Synthese von stabilen Kollagen Typ-I und Abbau von Typ-III Kollagenfasern. Der Abbau erfolgt durch MMPs.

Das neue Gewebe wird nie wieder die Reißfestigkeit des ursprünglichen Gewebes erzielen. Nach Mauro erhält eine Narbe ca. 14 Tage nach der Verletzung 5 % ihrer ursprünglichen Belastbarkeit, nach 21 Tagen ca. 20 % und einen Monat später sind es ca. 40 % (Mauro, 2005).

In Bezug auf die Hautanhangsgebilde ist es ausschlaggebend, ob diese komplett zerstört wurden, oder ob Reste vorhanden sind, die im Verlauf regenerieren können. Nach komplettem Verlust werden keine Hautanhangsgebilde neu gebildet, da die neugebildete Dermis nicht die Fähigkeit zur Induktion besitzt. Typischerweise erscheint eine alte Narbe -im Gegensatz zu einer frischen- relativ blass und weißlich. Die Ursache dafür liegt im Untergang der Melanozyten im Rahmen der Verletzung, sowie dem Sistieren des Kapillarwachstums am Ende des Wundheilungsprozesses. (Fritsch and Schwarz, 2018, Wild and Auböck, 2007)

### **1.2.1 Narben und Keloide als Komplikationen der Wundheilung**

Neben den drei Wundheilungsphasen kann man noch in primäre und sekundäre Wundheilung unterscheiden. Dabei versteht man unter primärer Wundheilung eine komplikationslose Abheilung der Wunde durch Auffüllen mit unspezifischem Bindegewebe bei glatt adaptierbaren Wundrändern ohne oder mit nur einem schmalen Narbenrest. Unter der sekundären Wundheilung wird im Gegensatz zur ersten eine Wunde verstanden, deren Wundränder ursprünglich nicht glatt adaptierbar, sondern mit großen Gewebsdefekt, sind. Dabei wird vor der Reepithelisierung die Wunde mit Granulationsgewebe, bestehend aus Fibroblasten, neuen Kapillaren und Extrazellulärer Matrix, aufgefüllt. Im Heilungsprozess erfolgt die Verdichtung und die Ansiedlung von

Kollagenfasern, wodurch sich ein zug- und druckfestes Narbengewebe ausbilden kann. (Henne-Bruns et al., 2007, Piatek and Tautenhahn, 2012)

Wie bereits beschrieben entstehen Narben im Zuge einer sekundären Wundheilung. Unter anderem ist auch die Tiefe des Defekts abhängig davon, ob eine Wunde restitio ad integrum -also vollständig- regeneriert, oder ob eine Narbe zurückbleibt. Ist lediglich die oberste Epidermis betroffen, besteht die große Chance nach der Abheilung keine Rückstände erkennen zu können. Ragt die Wunde jedoch in die tieferen Hautschichten und es ist bereits die Dermis betroffen, bleibt eine unvollständige Regeneration nicht aus und eine Narbe als Defektabdeckung bleibt zurück. Hautanhangsgebilde, wie Haare oder Nägel werden nicht mehr gebildet. (Henne-Bruns et al., 2007, Heinzeller and Büsing, 2001, Wild and Auböck, 2007)

Dennoch können durch gestörte Wundheilungsprozesse, Komplikationen entstehen. Hypertrophe Narben oder Keloide sind häufig das Ergebnis einer überschießenden Reorganisation des Gewebes in Verbindung mit EZM-Bildung nach einem Trauma, einer Entzündung oder einer Verbrennung. Als Folge können Schmerzen, Juckreiz, Unbehagen auftreten, sowie ästhetische und funktionelle Einschränkungen resultieren. (Gabriel, 2011, Wolfram et al., 2009)

Ein Keloid entsteht bei übermäßigem Wachstum des Granulationsgewebes. Für die Entstehung eines Keloids wird eine genetische Komponente, sowie die Form des Hauttraumas beschrieben. So treten Keloide an melanozytenreichen Bereichen häufiger auf; v.a. auch generell bei dunkelhäutigen Personen (15-mal häufiger) (Alhady and Sivanantharajah, 1969, Cohen and Peacock, 1990). Charakteristisch für das Keloid ist eine Erhebung über dem ursprünglichen Hautniveau, eine rote oder pinke Erscheinung, wächst über die ursprüngliche Grenze der Wunde hinaus und kann möglicherweise Juckreiz hervorrufen. Das Wachstum der hypertrophen Narbe sistiert im Gegensatz zum Keloid und sie kann sich im Laufe der Zeit sogar zurückbilden (Wolfram et al., 2009). Histologisch zeichnet sich die hypertrophe Narbe durch eine knotige Struktur aus, die neben kleinen Gefäßen und Kollagenfasern auch  $\alpha$ -SMA-exprimierende Myofibroblasten beinhaltet (Wolfram et al., 2009).

Die Hauptzellen in Keloiden sind die Fibroblasten. Diese haben dort eine 4-fach höhere Fibronektinsyntheserate als in normalen Narben (Babu et al., 1989, Oliver et al., 1992).

In Studien, die sich mit der Rolle der Wachstumsfaktoren beschäftigten, wurde gezeigt, dass vor allem TGF- $\beta$  eine essenzielle Rolle bei der Entstehung von Keloiden oder hypertrophen Narben spielt (Chen and Davidson, 2005). Wie bereits beschrieben, sezernieren viele Reparationszellen den genannten Wachstumsfaktor in inaktiver Form. Durch die dadurch verstärkt ausgelöste Chemotaxis der Fibroblasten zum Ort des Gewebedefektes, resultiert logischerweise eine verstärkt ausgelöste Proliferation der kollagenproduzierenden Fibroblasten. (Su et al., 1998)

Am Ende der abgeschlossenen Wundheilung wird TGF- $\beta$  vermindert sezerniert und es kommt zur Beendigung der Wundheilung.

Bei Keloiden oder hypertrophierenden Narben ist dieser Prozess gestört. Bei Keloiden erfolgt eine Überproduktion des Wachstumsfaktors und zugleich eine autokrine Aktivierung, wodurch eine überschießende Wundheilungsreaktion entsteht und eine Herunterregulierung nicht möglich ist. Durch die größere Anzahl der zugehörigen Rezeptoren auf den Fibroblasten erfolgt verständlicherweise eine verstärkte Reaktion auf TGF- $\beta$ . (Wolfram et al., 2009)

Eine weitere Hypothese, warum Keloide stetig wachsen, könnte dadurch erklärt werden, dass MMPs, die eigentlich für den Matrixabbau zuständig sind, nur vermindert synthetisiert werden. Zudem steht auch ein verminderter Apoptosemechanismus in Diskussion (Luo et al., 2001).

Laut Rockwell und Cohen haben Keloide eine 20-fach höhere Kollagensyntheserate als in gesundem Gewebe und eine 3-fach höhere als bei hypertrophierenden Narben (Rockwell et al., 1989, Cohen and Peacock, 1990). Die in der hypertrophen Narbe oberflächlich und wellenförmig verlaufenden Kollagenfasern vom Typ-III sind überwiegend parallel zur Epitheloberfläche angeordnet. In Keloiden sind hauptsächlich Typ I und Typ II-Fasern enthalten, die zufällig und lose angeordnet sind und dementsprechend nicht parallel zur Epitheloberfläche verlaufen (Wolfram et al., 2009). Friedman entdeckte in seiner Arbeit, dass in Keloiden die Herabregulation der Kollagen Typ-I Produktion ineffizient ist und somit die übermäßige Ausprägung der Typ-I Fasern für die charakteristisch feste Keloidstruktur verantwortlich ist (Friedman et al., 1993).

Interessanterweise konnte ein Unterschied in der Wundheilung von fetalem und adultem Gewebe festgestellt werden. Fetales Narbengewebe ist nachgiebiger, was auf eine höhere Ausprägung von Kollagen Typ-III zurückzuführen ist (im Gegensatz bei Erwachsenen wird Typ-III nur in der Anfangsphase gebildet und dann in Typ-I umgewandelt). Fetale Fibroblasten weisen nur eine mäßige Expression von TGF- $\beta$  und  $\alpha$ -SMA auf, sowie eine niedrige Gefäßneubildungsrate. (Moretti et al., 2022)

Die Epithelneubildung erfolgt durch eine radiäre Anordnung der Aktinfilamente, die sich am Wundrand entlang ausbreiten und sich anschließend aufgrund ihrer kontraktilen Filamente zusammenziehen und somit die Wunde verschließen (Fritsch and Schwarz, 2018). Hauptfaktor, wieso fetale Narben im Gegensatz zu adulten Narben komplett ausheilen, ist die unterschiedliche Ausprägung des Glykosaminoglykans Hyaluronsäure (Moretti et al., 2022).

Nach der Wundheilung liegt bei fetalen Narben wieder die ursprüngliche Organisation des Gewebes vor. Dadurch können fetale Narben ihre ursprüngliche mechanische Festigkeit wieder erreichen. Die Ursache könnte sein, dass die Zusammensetzung der EZM unterschiedlich ist und somit durch das produzierte Kollagen (Typ-III vs. Typ-I) auch unterschiedliche Integrine gebildet werden und unterschiedliche Signalkaskaden nachgeschaltet werden. (Moretti et al., 2022)

## 1.3 Morbus Dupuytren

### 1.3.1 Ätiologie und Verlauf des Morbus Dupuytren

Im Jahre 1777 beschrieb Sir Henry Cline erstmalig den pathologischen Prozess, der mit einer Kontraktur der Handfläche und Finger einherging. Nach intensiver Forschung hat Guillaume Dupuytren im Jahre 1831 der fibroproliferativen Erkrankung seinen Namen verliehen – „Dupuytren'sche Krankheit“ (Hutchison et al., 2011). Die pathologischen Umstände konnten bis heute noch nicht eindeutig geklärt werden. Es ist jedoch bekannt, dass aufgrund mechanischer Kräfte verschiedene Entzündungsmediatoren im Körper ausgeschüttet werden und dadurch Signalwege aktiviert werden, die zur veränderten Fibroblasten-Expression führen (Eaton, 2014, Krause et al., 2011, Mella et al., 2018).

Bei Morbus Dupuytren (MD) handelt es sich um eine weltweit verbreitete, familiär fibroproliferative Erkrankung, die autosomal-dominant mit unvollständiger Penetranz vererbt wird. Global beträgt die Prävalenz ca. 8 %, wobei in Afrika ca. 17 % der Bevölkerung betroffen sind und in Europa ca. 10 % an Morbus Dupuytren erkrankt sind. Generell herrscht in Europa ein Nord-Süd-Gefälle. Die Verteilung männlich zu weiblich liegt bei 3-4:1. (Salari et al., 2020, Hueston, 1963) Die unheilbare Erkrankung ist vor allem assoziiert mit weiteren Komorbiditäten. Dazu zählen neben dem chronischen Alkoholkonsum und einer fortschreitenden Lebererkrankung, der schlecht therapierte Diabetes mellitus, sowie ein hohes Maß an Vibrationsexposition im Rahmen einer beruflichen Belastung. (Palmer et al., 2014) Nicht-beeinflussbare Risikofaktoren stellen das Alter und die genetische Komponente dar. Mit zunehmendem Alter steigt die Inzidenz. Liegt die Prävalenz in der Altersgruppe der 55-jährigen noch bei 12 %, so steigt sie bei den 65-jährigen auf 21 % und auf 29 % bei den 75-jährigen Personen (Lanting et al., 2014). In einer dänischen Studie mit Zwillingsgeschwistern konnte die Vererblichkeit von 80 % festgestellt werden. (Larsen et al., 2015)

Die vorherrschenden Zellen im Morbus Dupuytren sind Myofibroblasten (Meister et al., 1978). Zu Beginn der Erkrankung entstehen kleine Knötchen als Folge der Myofibroblastenmigration, die sich bei Fortschreiten der Erkrankung zu einem straffen Strang entwickeln aufgrund vermehrter Kollagen Typ-III-Ablagerung (Tubiana, 1986). Hierbei verdickt und verkürzt sich die Palmaraponeurose und resultiert in einer schmerzlosen Flexion der Finger mit Streckdefizit (Mella et al., 2018). Am häufigsten sind der Klein- und Ringfinger betroffen (Layton and Nanchahal, 2019). Der Schweregrad der fibrotischen Stränge lässt sich klinisch klassifizieren (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Morbus Dupuytren; angelehnt an (Ruettermann et al., 2021)

Stadium	Nach Tubiana		Nach Meyerding	Nach Iselin
	Fibrose	Streckdefizit		
0	-	-		
N	X	-		
N/1	X	Bis 10°		
1	X	Bis 45°	Fibrose ohne funktionelle Einschränkung	Fibrose in der Hohlhand, kein Streckdefizit
2	X	45°-90°	Fibrose mit geringer Kontraktur im MCP	Fibrose mit Kontraktur im MCP
3	X	90°-135°	Fibrose im PIP, Kontraktur MCP+PIP	Fibrose mit Kontraktur im MCP + PIP
4	X	> 135°	Überstreckkontraktur im DIP	Fibrose mit fortgeschrittener Kontraktur im MCP + PIP Überstreckung im DIP
P = palmar, D = digital, H = Hyperextension, N = Nodus (keine Kontraktur, aber aponeurotische Läsion)			MCP = Metacarpalgelenk PIP = Proximals Interphalangealgelenk DIP = Distales Interphalangealgelenk	

Die Myofibrogenese wird begünstigt durch TGF- $\beta$  als Induktor, was durch eine verminderte profibrotische Genexpression, bei seiner Inhibition bewiesen werden kann (Krause et al., 2011, Desmoulière et al., 1993). Aufgrund verschiedener Arbeiten, die in den Fibroblasten erhöhte reaktive Sauerstoffspezieswerte messen konnten, geht man davon aus, dass ROS in der Pathogenese des MD beteiligt ist (Murrell et al., 1987). In den fibrotischen Strängen sind viele Mitochondrien enthalten, die über ihre NADPH-Oxidase für die ROS-Generierung verantwortlich sind. Die Zugabe von TGF- $\beta$  hat zur erhöhten mitochondrialen ROS-Produktion geführt, was schließlich zur vermehrten Expression von profibrotischen Genen führt, bzw. die Myofibroblastendifferenzierung reguliert (Seyhan et al., 2018, Desmoulière et al., 1993). Die Marker der Myofibroblastendifferenzierung ( $\alpha$ -SMA, EDA-Fn) können auch als Marker für Morbus Dupuytren verwendet werden.

### 1.3.2 Die Rolle der Fibroblasten und ihre Differenzierung zu Myofibroblasten

Die Fibroblasten sind mesenchymalen Ursprungs und bilden wichtige Zellen in der Dermis sowie im Bindegewebe; zu finden sind sie jedoch im ganzen Körper. Ihre inaktive Form wird als Fibrozyt bezeichnet. Sie sind neben der Synthese und dem Umbau der extrazellulären Matrix auch für die Regulierung der Entzündungsreaktion sowie der Zellproliferation während des Wundheilungsprozesses verantwortlich. Sie können dabei aus dem umliegenden Gewebe Signale aufnehmen und mit den anderen Reparationszellen kommunizieren. Sie können den Marker Vimentin exprimieren; Desmin und  $\alpha$ -SMA jedoch nicht (Li and Wang, 2011). Es handelt sich bei ihnen um eine sehr heterogene Gruppe, die organspezifisch in unterschiedlicher Form und Gestalt. (Stunova and Vistejnova, 2018, Welsch, 2006) Sie können neben nicht-kontraktilen Fibroblasten, auch als Myofibroblast oder als Proto-Myofibroblast auftreten (Hinz et al., 2007).

Morphologisch handelt es sich bei den Fibroblasten um spindelförmige Zellen mit langen Zellfortsätzen, die Zell-Zellverbindungen miteinander eingehen können. Durch ihren gut entwickelten Golgi-Apparat können sie eine hohe Syntheseleistung erbringen. Neben der bereits erwähnten EZM stellen sie auch Kollagenfasern und Grundsubstanz her, genauso wie Fibronectin und MMPs, die den Matrixabbau regulieren. (Moll, 2005, McAnulty, 2007) Über membranständige Integrine sind sie mit Matrixkomponenten (z.B. Fibronectin) verbunden (Welsch, 2006). Sobald Fibroblasten ein Signal zur Differenzierung erhalten, können sie sich in Myofibroblasten transformieren. Sie können sich jedoch auch aus Fibrozyten oder Endothel-/ Epithelzellen differenzieren (McAnulty, 2007). Es hat sich gezeigt, dass Myofibroblasten durch eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) entstehen können (Hinz et al., 2007). Das auslösende Signal kann im Rahmen der Wundheilung durch den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  oder auch durch Sauerstoffmangel erfolgen.

Die Myofibroblasten enthalten neben kontraktilen Fibrillen, weshalb ihnen zusätzlich die Eigenschaften der glatten Muskulatur zugeschrieben werden, auch viel raues endoplasmatisches Reticulum und viele Mitochondrien. (Welsch, 2006, Gabbiani et al., 1971) Die kontraktionsfähigen Fasern bestehen aus Aktin-Myosin-Bündeln. Sie stehen mit anderen Myofibroblasten über Gap junctions in direktem Austausch. Als spezifischen Marker exprimieren die Myofibroblasten das Protein  $\alpha$ -SMA, welches der  $\alpha$ -Isoform des Aktins der glatten Muskulatur entspricht. (Wild and Auböck, 2007, Hinz et al., 2007, Hinz, 2016) Neben der Kontraktionsfähigkeit, die für den Verschluss der Wunde notwendig ist, können Myofibroblasten auch Syntheseleistung erfüllen. Sie produzieren Kollagenfasern Typ-I / II / III / IV / XVIII, Grundsubstanz (Proteoglykane, Glykoproteine) und noch weitere Bestandteile der Extrazellulären Matrix, ebenso wie die regulatorischen Proteasen MMP und TIMP. (Li and Wang, 2011) Ihre genaue Rolle im Rahmen des Wundheilungsprozesses wurde bereits unter 1.2. beschrieben. Am Ende des Wundheilungsprozesses werden die Myofibroblasten abgebaut bzw. inaktiviert (Tomasek et al., 2002). Funktioniert dieser Mechanismus jedoch nicht, kommt es zur Überaktivität der kontraktilen Fibroblasten und es kann zu hypertropher Narbenbildung oder Fibrose führen, was zu einer positiven Rückkopplungsschleife von EZM-Sekretion führt und folglich in der  $\alpha$ -SMA Expression sichtbar wird. (Moretti et al., 2022)

In verschiedenen fibroproliferativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Dupuytren können vermehrt Myofibroblasten nachgewiesen werden. Der Stimulus für den phänotypischen Übergang ist hier der mechanische Stress, der auf die Fibroblasten ausgeübt wird. Es ist wichtig, die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten als Reifungsprozess zu verstehen. (Hinz et al., 2019) Die sequenzielle Entwicklung von charakteristischen Eigenschaften kann somit die Erklärung für rätselhafte Befunde sein, wie z.B. die verminderte  $\alpha$ -SMA Expression während der Kollagensynthese (Pakshir et al., 2020, Tsukui et al., 2020). Im Hinblick auf die variable Expression von  $\alpha$ -SMA geht man davon aus, dass es sich bei den Myofibroblasten um eine

heterogene Gruppe handelt, die abhängig von ihrer Herkunft und Umgebung, in unterschiedlichen Aktivitätszuständen vorliegen (Pakshir et al., 2020).

Unter dem Protein  $\alpha$ -SMA versteht man eine Aktin-Isoform, die zur mechanischen Spannung im Gewebe und zum Matrixumbau beiträgt und dadurch als mechanosensitiver Marker bezeichnet werden kann. Durch verschiedene Mechanismen kann sich die Expression des Markers erhöhen.

(Wang et al., 2006) In anderen Arbeiten wurde bereits festgestellt, dass der Einbau von  $\alpha$ -SMA in die Aktinstressfasern die Kontraktilität der Myofibroblasten verstärkt (Verjee et al., 2010).

In Ruhe produzieren Fibroblasten nur wenig EZM und bilden eine geringe Anzahl von Aktin-assoziierten Zell-Zellverbindungen aus. Sie werden erst durch Gewebeverletzung oder durch Zytokine aktiviert (Hinz et al., 2007). Tomasek et al. beschreiben ein zusätzliches Schutzschild der Fibroblasten, das durch den Matrixumbau verloren geht und sie somit nicht mehr von ihrer Umgebung geschützt sind (Tomasek et al., 2002). Als Reaktion auf die Gewebeschädigung werden die Fibroblasten durch hohe mechanische Belastung oder Versteifung der EZM aktiviert und bilden kontraktile Stressfasern aus, die aus zytoplasmatischen Aktinen bestehen und dadurch Zugkräfte ausüben können (Hinz et al., 2001, Pakshir et al., 2020). Diese Sonderform wird als Proto-Myofibroblast bezeichnet, die sich schließlich durch TGF- $\beta$ -Stimulation zum Myofibroblast weiterdifferenzieren kann. (Hinz et al., 2007) Diese Zwischenstufe ist aufgrund der Neugewinnung der Kontraktionsfähigkeit, geprägt durch die *de-novo*-Expression des  $\alpha$ -SMA-Proteins. Unter dem Mikroskop konnten sogenannte *stress fibres* und *supermature fokale Adhäsionen* nachgewiesen werden. Die Zell-Zellverbindungen erfolgen über Cadherin-Moleküle. (Hinz, 2006)

Zusammenfassend, damit die  $\alpha$ -SMA exprimierenden Myofibroblasten entstehen können, müssen neben einem hohen persistierenden extrazellulären Stress (mechanischer Zug, Umbau der EZM), der profibrotische Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  in hohem Maß, sowie spezielle EZM-Proteine (z.B. ED-A-Splicevariante von Fibronectin), die vermehrt im Rahmen der Wundheilung exprimiert werden, vorhanden sein. (Hinz et al., 2007) Fibronectin ist vor allem mit Zellen verbunden, die eine hohe Migrations-, Proliferations- und Differenzierungsrate aufweisen (Barnes and Gorin, 2011). Diese Splicevariante des Fibronectin kann durch den Marker EDA-Fn (Extra-domain A Fibronectin) nachgewiesen werden. Dieses wird für die TGF- $\beta$ -induzierte  $\alpha$ -SMA-Expression bzw. Myofibroblastendifferenzierung benötigt und kann eigenständig die  $\alpha$ -SMA-Expression induzieren, wodurch sich EDA-Fn als zuverlässiger Myofibroblastenmarker eignet (Tomasek et al., 2002, Hinz et al., 2007). Die Domäne EDA erleichtert die Bindung zwischen Fibronectin und dem latenten TGF- $\beta$ -binding-Protein-1 (LTBP-1) und ist somit unerlässlich für die Aktivierung des Wachstumsfaktors und folglich die Myofibroblastendifferenzierung. (Klingberg et al., 2018)

Experimentelle Untersuchungen haben ergeben, dass die Zellen am Ende ihrer Wirkungsphase ihre kontraktile Eigenschaften verlieren. Bislang wurde davon ausgegangen, dass sie sich in Apoptose begeben (Tomasek et al., 2002). Aktuell ist jedoch immer noch ungeklärt, ob es eine

Dedifferenzierung zur Vorläuferzelle gibt oder sie lediglich in einen Ruhezustand übergehen. (Demaria et al., 2014, Horowitz and Thannickal, 2019, Hinz et al., 2019)

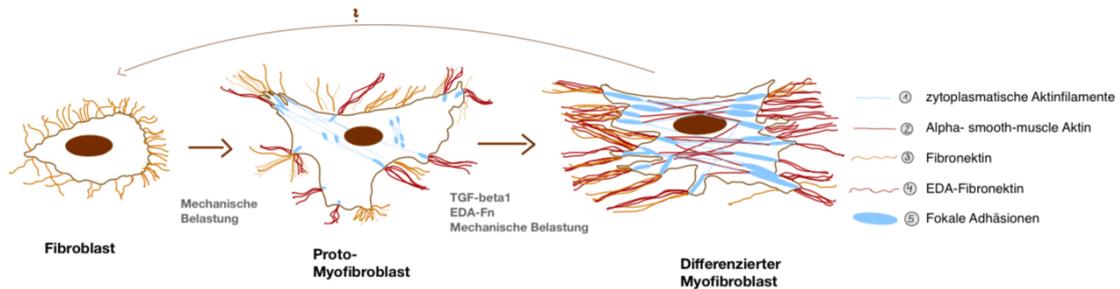


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, in Anlehnung an Tomasek et al. (2002)

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

Wie bereits beschrieben, spielt der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  in der überschießenden Myofibroblastenaktivität und in der Entstehung einer fibroproliferativen Erkrankung, wie z.B. Morbus Dupuytren, eine entscheidende Rolle. Die Zugabe von TGF- $\beta$  fördert nachweislich die Wundheilung durch die Bildung von Granulationsgewebe, welches zahlreiche Myofibroblasten enthält und auch zur vermehrten Expression von  $\alpha$ -SMA beiträgt, wodurch die typischen kontraktilen Elemente gebildet werden. (Vaughan et al., 2000, Desmoulière et al., 1993) Im Gegensatz zeigte bereits Bonniaud et al. im Tierversuch, dass die Ausschaltung von TGF- $\beta$  als fibroproliferativer Wachstumsfaktor die Signalkaskade hemmt und eine Fibrose verhindert werden kann (Bonniaud et al., 2004).

Die TGF- $\beta$  Superfamilie besteht aus 40 Mitgliedern, darunter drei TGF- $\beta$ -Isoformen (TGF- $\beta$ 1,2,3) sowie 21 BMPs (bone morphogenetic protein). Die beiden Signalwege verlaufen ähnlich, indem sie an den Typ-II-Rezeptor binden, der daraufhin deren Typ-I-Rezeptor phosphoryliert und somit die zytoplasmatische Signalkaskade startet (Sturrock et al., 2006).

Das Zytokin TGF- $\beta$  wird als latentes Pro-Peptid synthetisiert und kann auf diese Weise nicht direkt an den Rezeptor andocken (Annes et al., 2003). Wie bereits mehrfach erwähnt, kann TGF- $\beta$  im Rahmen der Wundheilung die Fibroblastenproliferation, sowie die Myofibroblastendifferenzierung und folglich die EZM-Produktion regulieren (Kubiczkova et al., 2012). Bei überschießender Reaktion können Keloide oder hypertrophe Narben resultieren oder andere fibrotische Erkrankungen (Vaughan et al., 2000).

TGF- $\beta$  wird von Fibroblasten und seinen Derivaten als Teil eines latenten Komplexes gebildet. Der Komplex besteht aus LAP (latency-associated protein) und dem LTBP-1 (latent TGF- $\beta$ 1-binding protein), wobei TGF- $\beta$  in der Matrix lokalisiert ist und die amino-terminale Region von LTBP-1 kovalent an Proteine der EZM gebunden ist. (Annes et al., 2003) Die Freisetzung von TGF- $\beta$

erfolgt über Proteine im Golgi-Apparat, die bei der Wundheilung mitwirken, wie z.B. MMPs. (Lodyga and Hinz, 2020) TGF- $\beta$  wird als Homodimer zusammen mit LAP sezerniert. Die Verbindung verhindert die Bindung von TGF- $\beta$  an Zellrezeptoren, wodurch sich Zeitpunkt der Sekretion und Zeitpunkt der Wirkung als Wachstumsfaktor unterscheiden. (Hinz, 2015) Mechanische Kräfte verstärken die TGF- $\beta$ -Aktivierung durch das LAP. Meistens können Zellen auf TGF- $\beta$  zugreifen, indem sie es über  $\alpha$ -Klasse-Integrin-vermittelte Kräfte aus dem LAP/LTBP-1 Komplex freisetzen, die nur bei bestimmten Steifigkeitsgraden der EZM übertragen werden. (Moretti et al., 2022)

Nach der Aktivierung bindet der Wachstumsfaktor an einen heteromeren Rezeptorkomplex, welcher aus einem TGF- $\beta$  Typ-I- und einem TGF- $\beta$  Typ-II-Rezeptor zusammengesetzt ist. Beide besitzen eine Tyrosinkinase-Aktivität. Die Rezeptor Typ-I Familie beinhaltet sieben Mitglieder (ALK 1-7). Zur Typ-II Familie zählen TGF $\beta$ R2, BMPR2, ACVR2A/2B und AMHR2. (Kubiczkova et al., 2012) Die Bindung des aktiven Liganden an den Rezeptor Typ-II führt zur Autophosphorylierung seiner zytoplasmatischen Domäne, sowie zur Rekrutierung und Phosphorylierung des Typ-I Rezeptors.

Durch ihre Kinaseaktivität erfolgt die intrazelluläre Fortleitung über Proteine der Smad-Familie (S= small body size; MAD = mother against decapentaplegic) (Kubiczkova et al., 2012). Sie bestehen aus drei Untergruppen: die rezeptorregulierten R-Smads (Smad1/ 2 / 3/ 5/ 8), die Co-Smads (Smad4) und die inhibitorischen Smad-Proteine (Smad6 / 7). Die R-Smads werden durch die Kinaseaktivität des Typ-I-Rezeptors phosphoryliert und dadurch aktiviert. Dadurch erfolgt der Beginn der Smad-abhängigen Signalkaskade.

Im Smad-abhängigen Signalweg (siehe Abbildung 2) bindet der aktivierte TGF- $\beta$  Rezeptorkomplex den aktivierten Smad2/Smad3-Komplex, während BMP Smad1,5,8 rekrutiert und anschließend phosphoryliert. Die Endstrecke über Smad4 ist ihnen gleich (Rider and Mulloy, 2017).

Im Zellkern erfolgt durch Bindung an die Gensequenz die Expression von fibrogenen Proteinen. Dazu zählt zum einen die  $\alpha$ -SMA-Expression und zum anderen die Regulation von weiteren biologischen Prozessen (Tzavlaki and Moustakas, 2020). Smad3 vermittelt die TGF- $\beta$  induzierte fibroproliferative Wirkung und ist maßgeblich an der Produktion von extrazellulärer Matrix beteiligt. Um die Wirkung zu bestätigen, erfolgte die Untersuchung von Smad3-Knockout-Mäusen. Dadurch konnte die Annahme gestützt werden, da diese von einer Progression der Lungenfibrose geschützt waren und keine fibroproliferativen Proteine gebildet wurden. (Bonniaud et al. 2004)

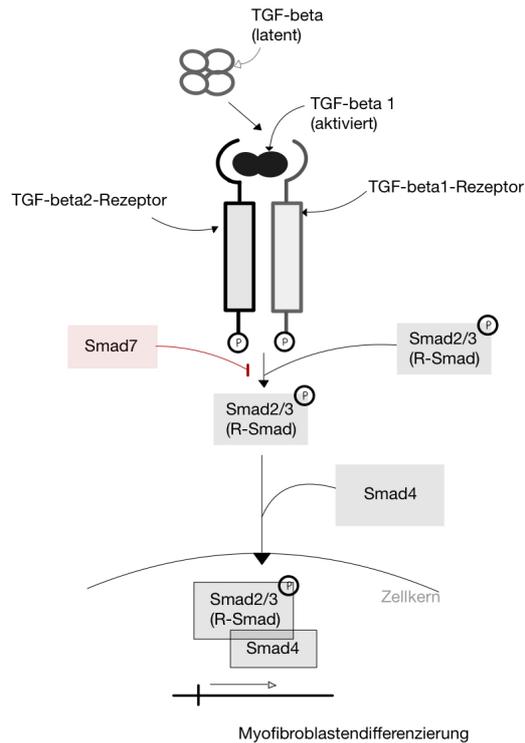


Abbildung 2: Schematische Darstellung des TGF- $\beta$ -Signalwegs über Smad-Proteine

Bei Smad6 und Smad7 handelt es sich um inhibitorische Smad-Proteine. Sie dienen zur Feinadjustierung der Signale durch TGF- $\beta$ . Durch ihren negativen Rückkopplungsmechanismus, der sich hauptsächlich auf den aktiven Typ-I Rezeptor oder auf die aktivierten Smad-Komplexe konzentriert, erfolgt eine Downregulation des TGF- $\beta$ -Signalwegs (Yan et al., 2016, Moretti et al., 2022). Während Smad6 vor allem die BMPRI1A/1B-Rezeptoren hemmt, kann Smad 7 die Signalübertragung von allen sieben TGF- $\beta$  Typ-I Rezeptoren hemmen (Murayama et al., 2020). Smad7 kann entweder den Rezeptor blockieren und dadurch seine Aktivität einschränken bzw. den Rezeptorabbau induzieren oder die Bindung des Smad-Komplexes an die DNA verhindern (Yan et al., 2016).

Als weitere Inhibitoren des Smad-abhängigen Signalwegs sind das Proto-Onkogen Sloan-Kettering Institute (Ski) und Ski novel (SnoN) bekannt. Sie können durch die Interaktion mit Smad4 und der Rekrutierung von Histondeacetylasen, die als Repressoren dienen, die Genexpression unterdrücken und somit zur verminderten Myofibroblastendifferenzierung beitragen. (Pakshir et al., 2020) Das LEM domain-containing protein 3 (LEMD3) wirkt dem Smad-abhängigen TGF- $\beta$ -Signalweg entgegen. Es bindet den Smad2/Smad3-Komplex und verhindert damit die Translokation in den Zellkern und folglich die Genexpression (Moretti et al., 2022).

Neben dem Smad-abhängigen Signalweg gibt auch noch andere Wege, die durch TGF- $\beta$  ausgelöst werden.

(1) Der ERK-MAP-Kinase-Weg aktiviert durch die Phosphorylierung des Typ-I Rezeptors Ras/Raf und schließlich MEK1/2 und ERK 1/2. Die aktivierten ERK1/2 können aufgrund ihrer Kinaseaktivität Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und somit zur Genexpression beitragen. Gleichzeitig können auch Smad-Proteine phosphoryliert werden und wiederum aktiviert werden. (Lee et al., 2007, Mulder and Morris, 1992)

(2) Über die Aktivierung von MKKs (MAP-Kinase-Kinasen) kann TGF- $\beta$  den p38/JNK-Weg schnell aktivieren. Nach der Ligandbindung kann der TGF- $\beta$ -Rezeptorkomplex an die E3-Ubiquitin-Ligase des TRAF6 (TNF-Rezeptor assoziierter Faktor) binden und zu seiner Aktivierung, sowie zur Bindung an TAK1 (TGF- $\beta$ -aktivierte Kinase 1) führen. Das inhibitorische Smad6 kann diesen Schritt hemmen. Die nachgeschalteten MAP-Kinasen können durch aktiviertes TAK1 phosphoryliert werden und dadurch JNK und p38 aktivieren, die auf die Genexpression Einfluss nehmen. Smad7 kann den p38-Weg verstärken. Genauso wie der ERK-MAP-Kinase-Weg können auch p38 und JNK die R-Smads regulieren und den Signalweg einleiten. (Sorrentino et al., 2008, Zhang et al., 2013, Yamaguchi et al., 1995)

(3) Im PI3K/AKT/mTOR-Signalweg kann TGF- $\beta$  durch Bindung an den TGF- $\beta$ -Rezeptor der PI3K-Untereinheit zur Ubiquitinierung von TRAF6 und zur Phosphorylierung von AKT beitragen. Über die Bindung an PI3K kann zusätzlich mTOR aktiviert werden, was wiederum AKT phosphorylieren kann und das Zellüberleben verlängert. In Bezug auf den Smad-Signalweg kann das aktivierte AKT die Smad3-Phosphorylierung verhindern und dadurch den Signalweg hemmen. (Yi et al., 2005, Yang et al., 2009)

(4) Der MAP-Kinase-Signalweg kann auch über die Aktivierung des Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierten Faktors 4 (TRAF4) erfolgen. Die weitere Signalkaskade läuft ähnlich zum p38-Weg ab. TRAF4 kann zusätzlich zur Stabilisierung des TGF- $\beta$ -Rezeptor Typ-I beitragen. (Lee et al., 2007)

(5) Im JAK/STAT-Weg ist die JAK-Einheit als Signalgeber mit dem Typ-I-Rezeptor des TGF- $\beta$ -Rezeptorkomplexes verbunden. Durch die TGF- $\beta$ -Bindung erfolgt die Phosphorylierung von STAT durch JAK. Bei STAT3 handelt es sich um einen Aktivator der Signalübertragung für profibrotische Proteine. Tang et al. hat herausgefunden, dass STAT3 in Verbindung mit Smad3 zu verstärkt fibrogenen Reaktionen in Leberzellen beitragen kann (Tang et al., 2017, Tzavlaki and Moustakas, 2020).

(6) Die Aktivierung des Rho-(like) GTPase-Signalwegs durch TGF- $\beta$  führt neben der EMT (epithelial-mesenchymal Transition) zur Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und zur Ausbildung der *stress fibres*. Dafür sind Smad-abhängige, sowie unabhängige Signalkaskaden notwendig. Die Signalübertragung erfolgt über Par6, ein Regulator der Zellpolarität, der mit dem Typ-I-Rezeptor interagiert und durch den Typ-II-Rezeptor phosphoryliert wird. Daraufhin wird die

SMURF1-Ubiquitin-Ligase aktiviert, die zur Ubiquitinierung der RhoA-GTPase führt und für den Abbau markiert. Die *tight-junctions* in den Epithelzellen gehen daraufhin verloren. In Fibroblasten führt die Bindung durch TGF- $\beta$  zur PAK2-Aktivierung über Rho-like GTPasen, was schließlich zu ihrer morphologischen Transformation beiträgt. (Bhowmick N.A. et al., 2001, Shen et al., 2001, Wilkes et al., 2003, Tzavlaki and Moustakas, 2020)

(7) Neben all den bisher genannten Smad-unabhängigen Signalwegen kann die Signalübertragung auch über die intrazelluläre Domäne des TGF- $\beta$  Typ-I-Rezeptors erfolgen. Die in das Zytoplasma abgespaltene Domäne (TGF $\beta$ RI-ICD) kann in den Zellkern eintreten und die Genexpression induzieren. (Gudey et al., 2014)

(8) Ein weiterer Signalweg, der die Differenzierung der Myofibroblasten steuert, jedoch TGF- $\beta$ -unabhängig ist, ist die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Kaskade. Durch die Anheftung des wnt-Liganden erfolgt der Abbau des inhibitorischen Komplexes aus APC, Axin und GSK-3 $\beta$  und  $\beta$ -Catenin kann in den Zellkern migrieren und als pluripotenter TKF an die DNA binden. (Distler et al., 2019, Guo et al., 2012, Moretti et al., 2022)

#### **1.3.4 Die Bedeutung der NADPH-Oxidase 4 und ROS**

Die NADPH-Oxidasen der NOX-Familie sind Eiweiße, die für die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zuständig sind. Die Familie der NADPH-Oxidasen können in sieben verschiedene Cytochrom-Untereinheiten unterteilt werden: NOX1 / 2 / 3 / 4 / 5, sowie DUOX1 und DUOX2. Alle Mitglieder der NOX-Familie sind Transmembranproteine. Ihre Aufgabe besteht darin, Elektronen durch die Plasmamembran zu transportieren, um O<sub>2</sub> zu O<sub>2</sub><sup>-</sup> zu reduzieren. Ihr Vorkommen und ihre Aktivierungsmechanismen sind unterschiedlich. Zu ihrer physiologischen Funktion zählt neben der Immunabwehr auch die Regulierung der Genexpression und Zelldifferenzierung. (Bedard and Krause, 2007) Im Folgenden wird der Fokus auf die NADPH-Oxidase 4 der NOX-Familie gelegt, da bereits Murrell et.al. 1987 die Hypothese annahm, dass die durch NOX4 synthetisierten ROS-Moleküle mit der Myofibroblastengnese bei fibrotischen Erkrankungen und vor allem bei Morbus Dupuytren, in Verbindung stehen und der Enzymfamilie eine entscheidende Rolle bei der Zellsignalisierung zuweist. (Barnes and Gorin, 2011, Murrell et al., 1987, Bondi et al., 2010)

NOX4 war ursprünglich vor allem im Nierengewebe stark ausgeprägt. Im Rahmen der fortschreitenden Forschung wurde sie auch in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten vermehrt vorgefunden (Sturrock et al., 2006, Cucoranu et al., 2005) und ist jeweils mit den intrazellulären Aktinfilamenten verknüpft (Vukelic et al., 2018). NOX4 weist – im Gegensatz zu NOX1-3 - nur eine Ähnlichkeit von 39 % zu dem phagozytären NOX2 auf (Bedard and Krause, 2007).

Die NOX4 ist an vielen physiologischen Zellvorgängen beteiligt. Dazu zählen neben der Regulierung der DNA-Schäden auch die ROS-Synthese durch die Mitochondrien und die Anordnung der Extrazellulären Matrix (Szanto, 2022). Die Aktivierung erfolgt beispielsweise aufgrund von Stress, Hypoxie oder ischämischen Zuständen (Pedruzzi et al., 2004), jedoch auch aufgrund einer TGF- $\beta$ -Stimulation in glatten Muskelzellen (Sturrock et al., 2006). Wiederum kann ROS die Wirkung von TGF- $\beta$  verstärken, vermutlich aufgrund einer Konformationsänderung des LAP, wodurch TGF- $\beta$  nicht mehr gebunden wird und frei liegt. So entsteht eine gegenseitige Wechselbeziehung. (Jobling et al., 2006)

Um seine Funktion aufnehmen zu können, benötigt NOX4 p22phox als Interaktionspartner. Die Komponente p22phox, die auch in NOX1/3 enthalten ist, bringt dem Enzym nicht nur Stabilität, sondern ist auch für die ROS-Synthese essenziell (Martyn et al., 2006, Ambasta et al., 2004). NOX4 wird überwiegend auf der Ebene der Transkription, bzw. Translation reguliert und wird deshalb als konstitutiv aktives Enzym bezeichnet, da es weder eine Rekrutierung von zytosolischen Untereinheiten noch Rac benötigt (Martyn et al., 2006, Serrander et al., 2007, Sturrock et al., 2006).

Sobald der NOX-Komplex aktiviert wurde, erfolgt die Elektronenübertragung von NADPH auf eine prosthetische Gruppe (Flavingruppe), anschließend auf Häm-Gruppen und schließlich auf ein Sauerstoffmolekül (Bedard and Krause, 2007, Pecchillo Cimmino et al., 2023). Die Aktivierung der Oxidase erfolgt gewebespezifisch und wird – bis auf das konstitutiv aktive NOX4 – reguliert, um eine ROS-Überproduktion zu vermeiden (Pecchillo Cimmino et al., 2023).

Oxidativer Stress führt im Körper zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und spielt somit eine essenzielle Rolle bei der Entstehung oder dem Fortschreiten von Krankheiten. Dieser kann zum Beispiel durch UV-Licht, Röntgen-Strahlung oder durch Autoxidation reduzierter Stoffwechselprodukte ausgelöst werden (Brandt, 2007).

Die reaktiven Sauerstoffspezies – kurz ROS genannt – werden, durch die Reduktion von einwertigem Sauerstoff gebildet.

Zu den ROS-Molekülen zählen Sauerstoffradikale, wie Superoxide ( $O_2^-$ ), Hydroxyle ( $HO\bullet$ ), Peroxyle ( $ROO\bullet$ ) und Alkoxyle ( $RO\bullet$ ) oder auch Ozon ( $O_3$ ), Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), die hingegen oxidativ wirken können oder in Radikale umgewandelt werden können (Brandt, 2007).

Indem die NADPH-Oxidasen oder die mitochondriale Elektronentransportkette Superoxidationen bilden, kann ROS – konzentrationsabhängig – entweder durch geringe Mengen auf die Zellphysiologie Einfluss nehmen und proliferativ wirken (z.B. bei Fibroblasten), oder durch eine erhöhte Produktion direkt zu makromolekularen Schäden führen bzw. Zellschäden oder fibrotische Reaktionen erzeugen (Pecchillo Cimmino et al., 2023, Barnes and Gorin, 2011). So können hohe ROS-Konzentrationen zum Beispiel im Zitronensäurezyklus bzw. Krebszyklus Einfluss nehmen und bei einem Ungleichgewicht zum Fortschreiten des Tumorwachstums beitragen (Panieri and

Santoro, 2016). Oder – in Bezug auf fibrotische Erkrankungen – kann ROS verschiedene Reaktionen, wie z.B. Hypertrophie, Proliferation oder die EZM-Produktion regulieren (Bondi et al., 2010, Pecchillo Cimmino et al., 2023).

In vielen Studien wurde der Zelltod als natürliche Reaktion auf Redoxstress beschrieben. Durch DNA-Strangbrüche, Schädigung der Lipid- oder Proteinstruktur oder durch direkte ROS-vermittelte Schädigung, kann die Apoptose ausgelöst werden (Irani, 2000). Unter bestimmten Umständen kann die NOX-Aktivierung jedoch auch antiapoptotisch wirken. Darauf haben vor allem die Dauer und die Stärke des ROS-Signals Einfluss (Lambeth, 2004). Um die Zellen vor ROS zu beschützen, werden Schutzmechanismen benötigt. Man unterscheidet in enzymatische Systeme und nicht-enzymatische Systeme. Zu den enzymatischen zählen antioxidative Redoxsysteme (Katalase, Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase - SOD1, SOD2, SOD3), die zur Entfernung der Sauerstoffradikale beitragen. Bei nicht-enzymatischem Abbau werden die Radikale durch Antioxidantien (Vitamin C, E) abgefangen oder die bereits geschädigten Moleküle werden repariert bzw. entfernt und ersetzt (Brandt, 2007).

Einen Beweis, dass Antioxidantien Einfluss auf die TGF- $\beta$  Signalisierung und weiterhin auch auf die Myofibroblastendifferenzierung haben, erhält man, bei Zugabe des Antioxidans Nac (N-Acetylcystein) zu den von Morbus Dupuytren stammenden Fibroblasten, was zu einer erniedrigten  $\alpha$ -SMA-Expression führt (Murphy-Marshman et al., 2017).

Bereits seit Jahren ist bekannt, dass es eine Verknüpfung zwischen ROS und der Entstehung von fibrotischen Erkrankungen gibt. In experimentellen Beobachtungen konnte festgestellt werden, dass sowohl TGF- $\beta$ 1 als auch ROS, die Umwandlung von Fibroblasten in  $\alpha$ -SMA synthetisierende Myofibroblasten aktivieren und zu einer verstärkten Matrixsynthese führen (Bondi et al., 2010). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass beide miteinander in Verbindung stehen und gemeinsame Signalwege nutzen (Barnes and Gorin, 2011). Die Einbindung von NOX4 in den verschiedenen Signalwegen ist noch nicht hinreichend geklärt, sie ist aber gewebeabhängig. Dass NOX4 die einzige Quelle für die ROS-Synthese ist, ist noch nicht bewiesen (Sturrock et al., 2006). Im Smad-abhängigen Signalweg der glatten Muskulatur, der Lunge oder den Nierenfibroblasten, ist die NOX4 nach dem Smad2/3-Komplex, aber noch vor dem ERK-Signalweg, geschaltet (siehe Abb. 3). (Bondi et al., 2010) Zudem kann TGF- $\beta$ 1 aus seinem Komplex, durch den Redoxstress und ohne mechanischen Stress, ausgelöst werden, was durch die Hydroxyl-induzierte Modifikation von Methionin möglich ist (Jobling et al., 2006). Der Einsatz chemischer Inhibitoren der NADPH-Oxidase haben keine Auswirkungen auf Smad3, sondern blockieren die nachgeschaltete ERK-Phosphorylierung, wodurch keine Expression der Marker  $\alpha$ -SMA und EDA-Fn erfolgt (Sturrock et al., 2006).

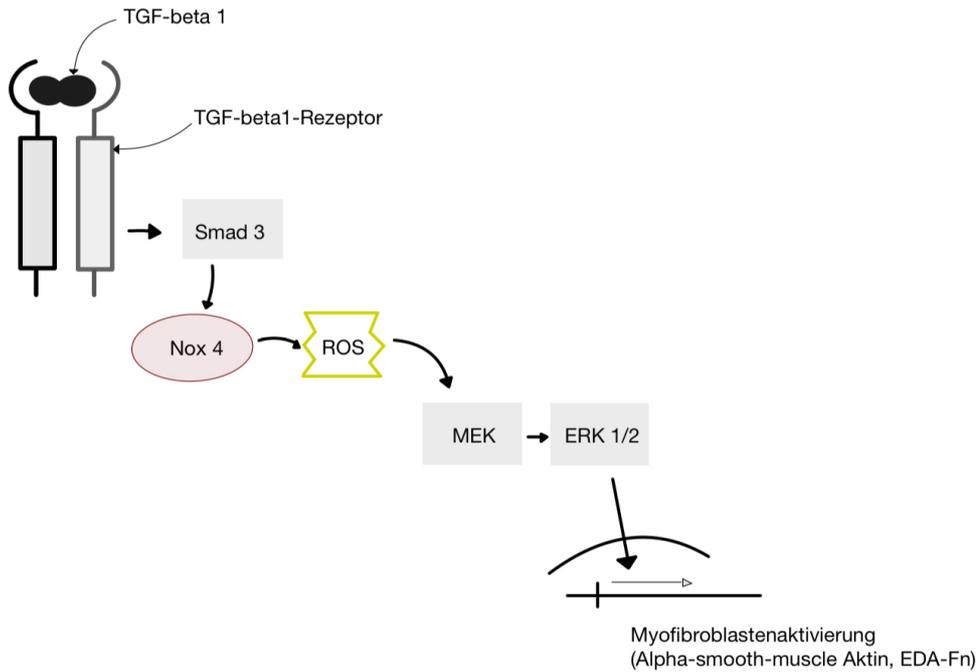


Abbildung 3: ROS-abhängige Myofibroblastendifferenzierung (Smad3, NOX4, ROS, MEK/ERK)

## 1.4 Aktuelle Therapieoptionen gegen Narben, Keloide und andere sklerotische Ereignisse

Falls es die Möglichkeit gäbe, wäre die Prävention von Keloiden oder hypertrophen Narben die beste Option. Da jeder Gewebsdefekt einen Risikofaktor darstellt, sollten alle unnötigen Wunden weitestgehend vermieden werden. Da dies nicht immer möglich ist, sollte bei chirurgischen Eröffnungen eine Schnitttrichtung entlang der Hautfalten erfolgen, sowie ein spannungsfreier Verschluss mit minimaler Spannung angestrebt werden (Wolfram et al., 2009, Murray, 1993). Generell sollte anamnestisch eruiert werden, ob es bereits in der Vergangenheit zu Problemen bei der Wundheilung gekommen ist.

Da präventive Maßnahmen manchmal nicht ausreichen, oder nicht möglich sind, muss die überaktive Wundheilung in Form von überschießendem Gewebe auf andere Weise therapiert werden. Die chirurgische Exzision stellt bei Narben und Keloiden eine gute Therapieoption dar, wobei beachtet werden muss, dass v.a. bei Keloiden die Kollagensynthese erneut stimuliert wird und es häufig zu Rezidiven führt. Deshalb wird eine intramarginale Exzision in Kombination mit Druck, Strahlentherapie oder Glucocorticoiden empfohlen, um die Kollagen Typ-I-Produktion zu unterdrücken. Die Wundheilung wird dabei nicht beeinträchtigt. (Engrav et al., 1988, Cosman et al., 1961, Rockwell et al., 1989)

Die Arbeit mit Kompression wurde erstmals 1835 beschrieben, jedoch erst in den 1970er Jahren vermehrt eingesetzt. Dabei wurde in Studien herausgefunden, dass Druck auf Narben an den Extremitäten zu schnellerer Abheilung führt. (Urioste et al., 1999) Histologisch ist erkennbar, dass

sich durch die Druckausübung extrazelluläre Matrix bildet, wie sie in normalem Gewebe vorkommt und auch verhältnismäßig wenig Myofibroblasten nachweisbar sind, da diese wahrscheinlich durch Apoptose abgebaut werden. In hypertrophen Narben wird normalerweise eine erhöhte Freisetzung von TNF- $\alpha$  erwartet. Jedoch konnte auch hier in Studien eine Verminderung festgestellt werden. Eine genaue Erklärung gibt es bisher nicht, jedoch gibt es verschiedene Hypothesen, wie z.B., dass ein verminderter Blutfluss, bzw. eine sauerstoffarme Umgebung eine verminderte Ansammlung von Fibroblasten bedingt und zudem das Granulationsgewebe generell mit weniger Reparationszellen versorgt wird und weniger Matrix produziert werden kann. (Wolfram et al., 2009)

Eine weitere Therapiemöglichkeit ist die Anwendung von Silikongelfolien auf verschlossenen Wunden. Diese bewirken bei regelmäßigem und frühzeitigem Einsatz eine reduzierte Fibroblastenaktivität und eine Herabregulation von TGF- $\beta$  (Kuhn et al., 2000). Es wird vermutet, dass unter der Bedeckung mit der dichten Silikonelastomerfolie eine Erhöhung der Temperatur und Luftfeuchtigkeit erreicht wird (Juckett and Hartman-Adams, 2009). In einer aktuellen RCT von Tian et al. konnte jedoch aufgrund von fehlenden Beweisen keine eindeutige klinische Wirksamkeit bei Anwendung auf Keloidnarben belegt werden (Tian et al., 2023).

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wurde Röntgenstrahlung zur Keloidbehandlung eingesetzt. Cosman und seine Kollegen konnten einen wirkungsvollen Effekt der Strahlentherapie in Kombination mit einer Exzision feststellen. (Cosman et al., 1961) Bei alleinigem Einsatz war die Rezidivwahrscheinlichkeit sehr hoch. Man nimmt an, dass die Bestrahlung einen Effekt auf die Fibroblastenproliferation hat und deren Apoptose auslöst (Wolfram et al., 2009).

In vielen Forschungsgruppen wurde bereits der Einsatz von verschiedenen Laserarten in Bezug auf Keloid oder hypertrophe Narben getestet. Darunter zählen neben dem Nd:YAG-Laser, der CO<sub>2</sub>-Laser sowie der Argon- und farbpulsierte Laser. Bereits in den frühen 1980er Jahren wurde erstmals die verminderte Mitoserate der Fibroblasten beschrieben (Castro et al., 1983). Jahre später konnte durch den Einsatz eines gepulsten Farblasers (PDL, 585nm) in bis zu 83 % der Fälle eine Reduktion der Narbenhöhe und -größe erzielt werden. Die Patienten berichteten auch über einen Rückgang des unangenehmen Juckreizes sowie über eine Verblässung des behandelten Gebiets. Der Nachteil daran ist der hohe Kostenaufwand und die niedrige Verfügbarkeit (Alster, 1994). Kuo et al. gehen davon aus, dass durch die Bestrahlung der Kollagenabbau und die Fibroblastenapoptose gefördert wird (Kuo et al., 2005). Dennoch gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Der Einsatz des Lasers kann in der Keloidtherapie keinen eindeutigen Vorteil gegenüber der chirurgischen Exzision erreichen (Apfelberg et al., 1989, Leszczynski et al., 2022). Unter dem Einsatz des Kohlendioxidlasers (CO<sub>2</sub>-Laser) konnte eine Verkleinerung der Läsion erreicht werden. Am wirksamsten konnten alle Laser arbeiten, sobald sie in Kombination mit einer Kortikosteroidinjektion eingesetzt wurden (Alexander et al., 2019, Alster, 1994). Diese stellen einen weiteren wichtigen Baustein dar. Sie können alleine oder in Kombination mit anderen

Verfahren eingesetzt werden. Die Steroide können zur Abflachung der Narbe bzw. des Gewebes führen, jedoch können sie diese nicht auflösen bzw. beseitigen. (English and Shenefeld, 1999) Die Rezidivrate bewegt sich zwischen 9-50 % (Niessen et al., 1999). Das in die obere Dermis injizierte Triamcinolonacetonid (TA) hat neben der antientzündlichen Wirkung auch eine hemmende Funktion auf die Mitoserate der Fibroblasten, was sich schließlich auf die Kollagensynthese und EZM-Produktion auswirkt (Urioste et al., 1999). Generell sollte man mit den Injektionen bereits im frühen Krankheitsverlauf beginnen, damit sich das hypertrophe Gewebe nicht vollständig ausprägt und man einen frühzeitigen Wachstumsstopp erreicht (Wolfram et al., 2009). Bei der Verabreichung von Steroiden besteht immer die Gefahr von Nebenwirkungen. Diese reichen von Gewebsatrophie bis hin zur Hypopigmentierung (Juckett and Hartman-Adams, 2009). Neben den Kortikoid-Injektionen gibt es noch weitere Substanzen, die bereits in Studien erforscht wurden. Das Pyrimidinanalogon 5-FU (5-Fluoruracil) hat als Ziel die Fibroblastenproliferation. Durch deren Hemmung kommt es zur verminderten Kollagensynthese. Der Effekt wurde bei hypertrophen Narben stärker nachgewiesen als bei Keloiden. (Wolfram et al., 2009) Da dessen Injektion Schmerzen verursachen kann, wird eine kombinierte Injektion mit Kortikosteroiden empfohlen (Fitzpatrick, 1999). Zusätzlich entstehen hierbei weniger Nebenwirkungen, als durch die alleinige Steroidgabe (Apikian and Goodman, 2004).

Die Therapie bei MD-Patienten erfolgt abhängig von der Klinik und selbstverständlich auch abhängig von deren Einschränkungen und Belastungen im Alltag. Das Ziel ist die Erlangung einer guten Funktionalität der Hand. (Poelstra et al., 2020) Generell empfiehlt sich eine stadienabhängige Therapie. Wohingegen man bei Stadium 0 oder N nach Tubiana – jeweils ohne Streckdefizit – noch keine invasive Therapie empfiehlt, sondern den Patienten über die nächstmöglichen Schritte und über den Progress aufklärt, sollte man ab Stadium I bereits über eine perkutane Nadelfasziotomie nachdenken (PNF; Lösung der palmaren Fibrosen durch Nadelstiche) und bei starker Beeinträchtigung eine partielle bzw. limitierte Fasziektomie (LF; Teilresektion der fibrotischen Palmaraponeurose) empfehlen (Karabeg et al., 2012, Kitridis et al., 2019, Bundesvereinigung, 2012). Das Hauptproblem der operativen Eingriffe ist die hohe Rate an Rezidiven innerhalb der ersten fünf Jahre. Die Rezidivrate beläuft sich bei einer LF auf 12-73 % nach fünf Jahren (23,8 % nach 3,7 Jahren (MW)) (van Rijssen et al., 2012) und kann für den Patienten sehr frustrierend sein, da sie sich schließlich einer erneuten Operation unterziehen müssen, was letztendlich mit einem deutlich höheren Komplikationsrisiko einhergeht. (Werker et al., 2012) Bei einer PNF handelt es sich – im Vergleich zur LF – um einen komplikationsloseren Eingriff, der jedoch mit einer noch früher eintretenden Rezidivwahrscheinlichkeit einhergeht (van Rijssen et al., 2012, Zhou et al., 2016). Hierbei berichten 85 % der Patienten bereits nach 2,5 Jahren über einen Progress der Erkrankung (van Rijssen et al., 2012). Der Vorteil nach einer primär durchgeführten PNF ist die freiere Wahl der zweiten OP-Technik. Aufgrund der schmaleren Stränge kann entweder eine erneute PNF erfolgen, oder der Operateur eskaliert auf die limitierte

Fasziektomie, wodurch postoperativ verbreiterte Fibrosestränge entstehen können (van Rijssen and Werker, 2012, Eaton, 2011). Als ultimo ratio - bei aggressiven Verläufen oder häufigen Rezidiven- steht die Dermatofasziektomie mit Hautersatz. Dabei erfolgt eine radikale Ausräumung des fibrotisch veränderten Gewebes, wodurch dem Patienten das Sensibilitätsgefühl im Gebiet des Hautersatzes verloren geht (Rodrigues et al., 2015, Armstrong et al., 2000).

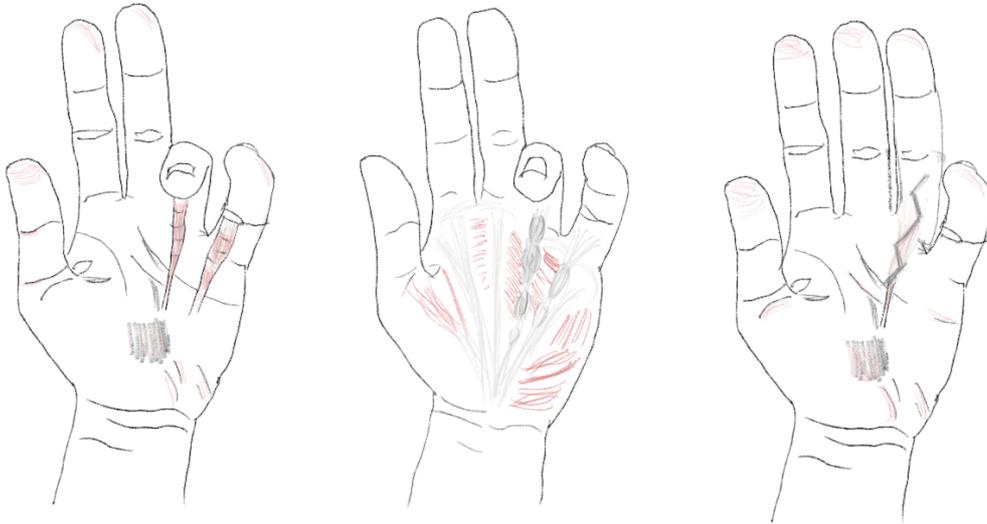


Abbildung 4: Darstellung des klinischen Erscheinungsbildes vor und nach chirurgischer Intervention

Heutzutage können neben der chirurgischen Intervention auch andere Möglichkeiten angeboten werden. Die CCH-Behandlung (Zulassung 2010), wobei die aus dem Bakterium *Clostridium histolyticum* gewonnene Kollagenase in das betroffene Gebiet injiziert wird, findet heute kaum noch Anwendung, aufgrund von hohen Kosten und vergleichbarer Wirksamkeit zur LF. (Warwick, 2017, Hurst et al., 2009)

Der Einsatz von Strahlentherapie hat gezeigt, dass es bei noch frühen MD-Stadien zu verzögerter Progression führen kann. Im Stadium N bzw. 1 (Streckdefizit  $< 10^\circ$ ) konnte in 80 % ein Progressionsstopp und sogar in 25 % eine Remission der Erkrankung erzielt werden (Betz et al., 2010). Bei Einsatz von ionisierender Strahlung dürfen die kanzerogenen Effekte nicht außer Acht gelassen werden. Der Einsatz von Bestrahlung mit blauem Licht steht aktuell noch in der Forschung, wobei sich bereits jetzt eindruckliche Hinweise ergeben für eine positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs (Krassovka et al., 2020, Gaßmann, 2024).

Wichtig ist, dass Patienten bereits bei Erstvorstellung über den progredienten Verlauf aufgeklärt werden und, dass gemäß den aktuellen Forschungsergebnissen, nur eine symptomorientierte Behandlung möglich ist und noch keine wirksame antifibrotische Behandlung der Erkrankung erforscht ist.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Auf Grundlage der Arbeit von Hava Uzunmehmet, die sich mit der Rolle der NADPH-Oxidasen während der Inhibition der durch TGF- $\beta$ -induzierten Myofibrogenese beschäftigte, untersuchte sie anhand verschiedener Inhibitoren, die Wirkung auf die Genexpression bei Fibroblasten aus der Bauchhaut. In dieser Arbeit wird dieser Ansatz auf Dupuytren-Zellen übertragen und es soll erarbeitet werden, inwiefern spezifische Inhibitoren einen grundlegenden Einfluss auf die Entstehung des MD hat.

Zielsetzung in dieser Arbeit war die Auswirkung von verschiedenen Inhibitoren auf die Myofibrogenese bzw. NADPH-Oxidase des Morbus Dupuytren zu untersuchen, unter Nachweis der spezifischen Proteinmarker EDA-Fn und  $\alpha$ -SMA.

Unter Zugabe des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ , sowie verschiedener NOX-Inhibitoren bzw. Antioxidantien, wurden die Surrogatparameter mittels Western Blot gemessen.

Wir beschäftigten uns mit folgenden Hypothesen:

1. Der Einfluss von Antioxidantien (N-Acetyl-Cystein, im Verlauf Glutathion) auf die Myofibroblastendifferenzierung anhand der quantitativen Bestimmung der Myofibroblastenmarker  $\alpha$ -SMA und EDA-Fn
2. Der Einfluss von NOX(4)-Inhibitoren (GKT137831, DPI) auf die Myofibroblastendifferenzierung anhand der quantitativen Bestimmung der Myofibroblastenmarker  $\alpha$ -SMA und EDA-Fn
3. Spielt die NOX-4 in der Pathogenese des Morbus Dupuytren eine bedeutende Rolle?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten und Probenmaterial

In dieser experimentellen Arbeit wurde für unsere Versuchsgruppe das Bindegewebe aus Patienten mit Morbus Dupuytren (MD), sowie für die Kontrollgruppe mit Karpaltunnel-Syndrom (CTS) gewonnen. Das Resektionsmaterial stammt aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie in Köln und wurde im Rahmen eines medizinisch notwendigen Eingriffs entnommen.

Die in dieser Versuchsreihe verwendeten CTS-Fibroblasten stammen aus dem chirurgisch eröffneten Retinaculum flexorum der Hand, welches die Ursache für die klinische Symptomatik bei Karpaltunnelsyndrom darstellt. Bei dem chronisch verlaufenden Prozess klagt der Patient über Parästhesien und Schmerzen, die aufgrund einer Kompression des Nervus medianus entstehen, der durch diesen Kanal verläuft. Betroffen sind häufiger Frauen als Männer und meist treten die Symptome erstmals zwischen dem 40.-50. Lebensjahr auf. Ursächlich reicht das Spektrum von Überlastung bei vor allem körperlicher anstrengender Arbeit bis zu Traumafolge oder bei Vorhandensein von gewissen Risikofaktoren, wie z.B. familiärer Disposition, Adipositas oder dem

Vorhandensein von endokrinen Erkrankungen. Gehäuft tritt das CTS physiologisch bei Schwangeren auf, die aufgrund einer Ödemneigung auch über die typische Klinik aufgrund der Einengung des canalis carpi klagen. Diese bildet sich meistens innerhalb der ersten Zeit nach der Geburt zurück (DGH, 2012).

Ob das resezierte Gewebematerial im Nachhinein zu Forschungszwecken verwendet werden darf, wurde präoperativ mit den Patienten bzw. den gesetzlichen Betreuern genauestens erläutert. Die Ethikkommission der HHU Düsseldorf bewilligte unter der Studiennummer 5882R am 13.07.2017 die „Erstellung einer Biobank zur Erforschung des Morbus Dupuytren“.

Im Forschungslabor des Instituts für Unfall- und Handchirurgie der Uniklinik Düsseldorf wurde aus dem Gewebe der Probanden Fibroblasten isoliert und kultiviert. Durch zweimaliges Waschen mit sterilem PBS konnte das zum Transport verwendete Kulturmedium ausgewaschen werden. Im Anschluss erfolgte die Präparation des Spendergewebes in kleine Fragmente, die schließlich über Nacht in ca. 10 ml Dispase-II-Lösung bei ca. 4 °C auf dem Rollenmischer inkubiert wurden. Am nächsten Tag erfolgte für ca. 20 Minuten die Inkubation bei 37 °C (Wasserbad) und schließlich die Zentrifugation (1200 rpm, 5 Minuten) um den Überstand von den Zellpellets zu trennen. Zur weiteren Verarbeitung erfolgte die Zugabe eines Collagenase-Puffers (ca. 5-7 ml, 0,2 % Collagenase I, 1,5 % BSA) bevor die nächste Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten erfolgte. Nachdem beide enzymatischen Vorgänge abgeschlossen sind, kann das Pellet in einen Zellsieb gegeben werden und schließlich mittels eines Glasstempels durch Druck die Fibroblasten freisetzen. Um ein besseres Ergebnis mit möglichst vielen Fibroblasten zu erzielen, kann der Vorgang wiederholt werden. Nach erneuter Zentrifugation wird nach Entfernung des Überstands das Zellpellet in frisches Kulturmedium gegeben und schließlich auf sterile Petrischalen verteilt. In diesem Stadium wird von Passage „0“ gesprochen. Diese Fibroblastenkultur wird für einen Tag bei 37 °C und 5 %CO<sub>2</sub> im Wärmeschrank kultiviert. Der erste Mediumwechsel erfolgt nach 24 Stunden, um die nicht angewachsenen Zellen bzw. restliche Gewebebestandteile restlos zu entfernen. Die folgenden Mediumwechsel sollen alle 2-3 Tage erfolgen. Falls in der mikroskopischen Untersuchung eine Vermehrung der Fibroblasten beobachtet wird, kann das *splitting* der Zellen und ggf. eine Verteilung auf six-well-Platten erfolgen für nachfolgende Experimente.

Die Probennummer ergibt sich aus folgendem Schema:

1	Probe	MD bzw. CTS
2	Zahl	OP-Datum (yymmdd)
3	ggf. 2. Zahl	Jede weitere Probe des gleichen OP-Datums
4	Passage „p“	<i>splitting</i> -Anzahl
Zusätzliche Informationen: Geschlecht, Alter		

In diese Forschungsarbeit wurden insgesamt 30 Probanden (CTS N= 15 CTS, MD N= 15) aufgenommen. Wobei nur bei 12 CTS-Proben und bei 11 MD-Proben ein Proteinnachweis erfolgen konnte, da die restlichen Proben aufgrund verschiedener Gründe (siehe Tab. 2) nicht geeignet waren.

*Tabelle 2: Probandenübersicht Karpaltunnelsyndrom: Es erfolgte die Probenbeschriftung wie oben beschrieben. „x“ = ist erfolgt; „-“ ist nicht erfolgt*

Nummer	Proband	Passage	Geschlecht	Alter	Einfrieren zur weiteren Proteinbestimmung	Proteinbestimmung	Western Blot-Analyse
1	CTS170307-2	P4	M	74	x	x	zu wenig Proteine nachgewiesen
2	CTS170317-2	?	M	65	x	x	x
3	CTS170411	P5	W	64	x	x	x
4	CTS180508	p7	M	73	x	x	x
5	CTS180926	P3	W	89	x	x	x
6	CTS181030	P3	W	55	nein / Kontamination	-	-
7	CTS181126	P4	M	60	nein / Kontamination	-	-
8	CTS190121	P3	M	62	x	x	x
9	CTS190122	P3	W	49	x	x	x
10	CTS190205	P1	W	38	x	x	x
11	CTS190326-1	P3	W	36	x	x	x
12	CTS190326-2	p3	W	72	x	x	x
13	CTS190402-1	P2	M	81	nein - direkte Verwendung	x	x
14	CTS190507	P1	W	60	nein - direkte Verwendung	x	x
15	CTS190514-1	?	M	68	nein - direkte Verwendung	x	x

Tabelle 3: Probandenübersicht Morbus Dupuytren: Es erfolgte die Probenbeschriftung wie oben beschrieben. „x“ = ist erfolgt; „-“ ist nicht erfolgt

Nummer	Probe	Passage	Geschlecht	Alter	Einfrieren zur weiteren Proteinbestimmung	Proteinbestimmung	Western Blot-Analyse
1	MD170711	P4	M	66	x	x	x
2	MD170817	P1	M	62	x	x	x
3	MD170917	P8	M	74	x	x	x
4	MD180220	P1 und P3	M	61	P1 nein, Kontamination	-	-
					P3: x	x	x
5	MD180319	P4	M	69	x	x	x
6	MD181113	P5	M	57	nein, Kontamination	-	-
7	MD190108	P7	W	73	x	x	x
8	MD190115-1	P5	M	91	Keine Anzucht möglich	-	-
9	MD190115-2	P2	M	51	x	x	x
10	MD190122	P2	W	76	x	x	x
11	MD190219-1	P4	M	46	x	x	x
12	MD190319	P1	W	68	x	-	x
13	MD190326-2	?	W	36	Keine Anzucht möglich	-	-
14	MD190423	P4	M	72	x	x	x
15	MD191122	P3	M	76	Keine Anzucht möglich	-	-

## 2.1.1 Verbrauchsmaterial

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Produkt	Handelsname	Hersteller
0,5 ml Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes™ 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
1,5 ml Reaktionsgefäße	SARSTEDT Reagiergefäß 1,5 ml EASY CAP	SARSTEDT AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
1,5 ml Reaktionsgefäße (safety lock)	Safe-Lock Tubes™ 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
6-Well-Platte	CytoOne 6-Well Plate with Lid	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
96-Well-Platte	GREINER 96-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Abwurfbeutel	Vernichtungsbeutel 200 x 300 mm, PP, transparent, Stärke: 50 µm, autoklavierbar, ohne Druck	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Bechergläser	DURAN Becher niedrige Form und Ausguss	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/ Mainz, Deutschland
Blotting Membran	Nitrocellulose Blotting- Membran (Porengröße 0,2µm)	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland
Blotting Papier	Blotting Filter Paper 2,5mm thick	Life Technologies Ltd., Paisley, England
Deckgläschen	Assistent® Deckgläser, rund, Stärke 1, CE, #41001115	Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim vor der Rhöhn, Deutschland
Einweg-Wägeschalen	Diamond weighing boates, weiß, antistatisch	vwr International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fertig Gel	Mini-PROTEAN TGX Stain- Free 4-20%	BioRad Laboratories Inc. Made in United States
Folie	Microtiter Sealing Tape	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Glaspipetten	Pasteurpipetten aus Glas	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Handschuhe S	Micro-Touch Nitrile, Powder free	Ansell GmbH, München, Deutschland
Kryogefäße	Cryo.s Einfrierröhrchen 2ml™	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Laborflasche	DURAN Original Laborflasche	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
Messbecherglas	Pyrex Beakers, low form, Griffin	SciLabware Ltd., Stoke-on- Trent, England
Messzylinder	Borosilikatglas 3.3, niedrige Form, Klasse B	vwr International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Messzylinder	PP, durchscheinend, hohe Form, Klasse B	Vwr International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Multipipetten-Spitzen (0,5ml; 5ml; 10ml)	Combitips Plus steril/unsteril Neubauer improved	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Objektträger	Objektträger 76x26mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH
Papiertücher	Präzisionstücher weiß/klein	Kimberly-Clak Global Sales Inc., Roswell, USA
Papiertücher	Tapira Plus Kosmetiktücher	GVS Großverbraucherspezialisten eG, Heidenheim, Deutschland
Parafilm	Parafilm "M"	Bemis Company, Inc., Neenah, WI, USA
Petrischale	TC-Schale 100, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze 10µl / 20µl/ 100µl / 1000µl	XL graduated filter tip	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze 5ml /10ml / 25ml	Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Spritzen 0,5ml / 5ml / 10ml	Combitips advanced steril/unsteril	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Spritzen 2ml / 5ml / 10ml / 25ml	Costar stripette serological piper	Corning Inc., Corning, USA
Spritze 20ml	Injekt 20ml, Luer Solo	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Sterilfilter	Millex-GS, Sterile Filter Unit with MF-Millipore MCE Membrane, 0,22µm	Merck Millipore Ltd., Cork, Irland
Zellschaber	Cell lifter, Polyethylene, sterile	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen (15ml/50ml)	Cellstar Tubes, sterile, graduation and writing area	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15ml / 50ml)	50ml Tubes, sterile, graduation and writing area	SARSTEDT AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland

## 2.1.2 Chemikalien

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Produkt	Handelsname	Hersteller
Aqua ad iniectionabilia	Ampuwa Spüllösung Plastipur	Fresenius Kabi France, Sèvres, Frankreich
Aqua dest. (steril)	Demi-Wasser	Otto Fischer GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland
Bromphenolblau	Bromphenolblau Natriumsalz für die Elektrophorese, Farbstoff zur Laufmarkierung in der Gelelektrophorese. Indikator pH 3,0-4,6	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Bovine Serum Albumin Fraktion V, >98%, pulv., für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dispase Typ II	Dispase II (neutral protease, grade II); from Bacillus polymyxa, lyophilizate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (IX), liquid (high glucose)	Life Technologies Ltd., Paisley, England
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline, without CaCl, MgCl, sterile filtered, suitable for cell culture	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Entwicklerlösung für Western Blot Membranen	Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Ethanol (70%)	Wet Task	Kimberly-Clark Corporation, Neenah, WI, USA
Ethanol (90%)	Ensure; Ethanol for analysis	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FCS	Sera Plus special processed FBS; sterile filtered	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Glycerol	Rotipuran ≥ 99,9%, p.a., ACS ISO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Glycin Pufferan ≥ 99,9%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hepes	HEPES Buffer 1M, pH 7,0-7,6, sterile filtered, BioReagent, suitable for cell culture	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	Methanol Rotipuran ≥ 99,9%, p.a., ACS ISO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol M7154, for electrophoresis	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA

NaCl-Lösung	NaCl 0,9 % Ecotainer	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin; 10,000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, sterile filtered, for cell culture	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Ponceau S	Ponceau S, BioReagent, suitable for electrophoresis	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Protein Assay Kit	Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
SDS	SDS ≥99,5%, Blotting-Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TGF-β1	Rh TGF-beta 1	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland
TRIS-HCL	TRIS-HCl 1M Stock Solution	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
TRIS-Base	AnalaR NORMAPUR Tris(hydrosymethyl)aminomethane (TRIS, Trometamol)	Vwr International GmbH, Darmstadt, Deutschland
TRIS	TRIS PUFFERAN, ≥99,3%, Buffer Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Trypan Blue Solution 0,4%	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Trypsin	Trypsin/EDTA Solution 10X; sterile filtered	Biowest, Nuaille, Frankreich
Tween	Tween 20 for molecular biology, viscous liquid	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Western Blot Gel Kit	TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 12%	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Western Blot Substrat	Immobilon Forte Western HRP Substrate	Millipore Corporation, Billerica, USA
Western Marker Antikörper/ Proteinmarker	Roti-Mark WESTERN HRP-Konjugat, anti-WESTERN Marker Antikörper (Kaninchen)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Western Marker Proteinleiter	Roti-Mark PLUS WESTERN Marker	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.2.1 Inhibitoren

In dieser Arbeit wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt, die einen Einfluss auf die Myofibroblastendifferenzierung haben. In der Literatur gibt es bereits viele verschiedene chemische Ansätze, jedoch haben wir uns auf Antioxidantien (NAC, Glu bzw. GSH), sowie NOX(4)-Inhibitoren (GKT137831, DPI) konzentriert. Die Konzentration der Inhibitoren wurde bereits in einer vorgeschalteten Arbeit titriert und wurde hier übernommen. (Uzunmehmet, 2019) Die Messung der Myofibrogenese erfolgte über die Expression der Proteine  $\alpha$ -SMA und EDA-Fn.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Inhibitoren

Inhibitor	Handelsname	Hersteller
Diphenylenoidonium (DPI)	Diphenyleniodonium chloride Lot #096M4110V	Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA

Glutathion (Glu/GSH)	L-Glutathione reduces G6013-5G Lot #SLBV2396	Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA
N-Acetylcystein (NAC / Nac)	N-Acetyl-L-cysteine A7250-10G	Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA
NOX Inhibitor GKT 13	GKT 137831 Item No. 17764	Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Inhibitorkonzentrationen

Inhibitor	Konzentration	Absolute Dosis	Zeitpunkt der Zugabe	Mediumwechsel + erneute Zugabe jeweils am 2.– 5. Tag
GKT	30 µM	3,6 µl	Unmittelbar nach der Verteilung der Zellen auf die six-well Platten	X
DPI	10 µM	1,9 µl		-*
NAC	10 µM	15 µl		X
Glu / GSH	153,66 mg	30 µl		x

\* keine erneute Zugabe bei starker Zellzahlreduktion unter dem Mikroskop an Tag 2

### 2.1.2.1.1 DPI

Das Präparat Diphenyliodoniumchlorid (DPI) zählt als unspezifischer Inhibitor von Flavingruppen-tragenden Enzymen (O'Donnell et al., 1994, Bondi et al., 2010). Dabei hemmt DPI die p47phox-Untereinheit der NADPH-Oxidase (Cifuentes-Pagano et al., 2015). Der Wirkmechanismus wurde durch Murphy-Mashman, et al. erforscht: Durch die Hemmung der NOX-Enzyme, u.a. auch NOX4, folgt ein vermindertes Ansprechen auf den Wachstumsfaktor TGF-β, was zu einer verminderten ROS-Erzeugung und erniedrigten Expression von α-SMA und EDA-Fn führt. (Bondi et al. 2010) Bei DPI handelt es sich um einen unspezifischen Hemmstoff für viele verschiedene Elektronentransporter, der – im Gegensatz zum selektiven NOX1/4 Inhibitor GKT- vollständig apoptotisch wirkt. Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Zugabe von DPI zum Wachstumsfaktor TGF-β, eine Reduktion um 60 % von α-SMA und EDA-Fn erzielt werden kann. (Bondi et al., 2010) Es hemmt nicht nur alle NOX-Isoformen, sondern auch die Stickstoffmonoxid-Synthase, die Xanthinoxidase, den mitochondrialen Komplex I und die Cytochrom-P-450-Reduktase. Durch eine kovalente Bindung von Phenylradikalen an den Co-Faktor von Flavin, erfolgt eine erfolgreiche Inhibierung der Gruppe und die Bildung eines Radikals. Durch die Hemmung der Flavingruppe ist die Übertragung der Elektronen in der NADPH-Oxidase nicht möglich (Bedard and Krause, 2007, O'Donnell et al., 1994).

### 2.1.2.1.2 Glutathion

Bei dem reduzierten Glutathion (GSH), handelt es sich um ein Tripeptid aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin. Es ist im ganzen Körper vorhanden und zählt zu den wichtigsten nicht-enzymatischen Antioxidantien im Körper. Es kann – so wie das NAC – direkt als Radikalfänger wirken und die Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) schützen oder als Co-

Faktor für antioxidative und entgiftende Enzyme wie Glutathionperoxidasen, Glutathion-S-Transferasen und Glyoxalasen arbeiten. Die Entgiftungsreaktion erfolgt durch die Oxidation von GSH zu Glutathiondisulfid (GSSG). Die Regeneration der oxidierten Form (GSSG) erfolgt über die Glutathionreduktase. Die dafür notwendigen Elektronen stammen von NADPH/H<sup>+</sup>. (Averill-Bates, 2023)

#### **2.1.2.1.3 GKT137831**

Bei GKT137831 handelt es sich um einen spezifischer NOX1- und NOX4-Inhibitor (Teixeira et al., 2017). Es zählt zur Familie der Pyrazolopyridindion, welches nur über eine schwache NOX2 Hemmung verfügt (Cifuentes-Pagano et al., 2015). GKT wird aufgrund seiner Ähnlichkeit zu dem Substrat (NADPH) der NOX1/4 als kompetitiver Inhibitor eingesetzt und führt zu einer signifikanten Verringerung der ROS-Freisetzung ( $p < 0.01$ ) in Stellatzellen der Leber (Jiang et al., 2012, Cifuentes-Pagano et al., 2015). Das Präparat verfügt über alle notwendigen Eigenschaften, die für eine klinische Studie von Vorteil sind: Hohe orale Bioverfügbarkeit, niedriges toxisches Potenzial, spezifische Wirkung auf NOX. (Laleu et al., 2010)

Aktuell wird der Effekt von GKT auf die diabetische Nephropathie bereits in einer klinischen Studie getestet (Cifuentes-Pagano et al., 2015, De Livera et al., 2020).

Für unsere Versuche musste GKT in DMSO-Lösung verdünnt werden. Der Lieferumfang beträgt 10 mg/ml bzw. 25 mg/ml. Abhängig von der Konzentration musste die Lösung mit 1000  $\mu$ l bzw. mit 2500  $\mu$ l DMSO verdünnt werden und anschließend gekühlt gelagert werden.

#### **2.1.2.1.4 N-Acetyl-L-Cystein**

Bei N-Acetyl-L-Cystein handelt es sich um ein synthetisches Thiol mit antioxidativer Wirkung. Es dient als Schutzschild für die Zelle. Einerseits als Cysteinquelle für die Synthese des körpereigenen Antioxidans Glutathion (GSH-Synthese) und andererseits kann NAC die gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle direkt abfangen und gilt als Radikalfänger. (Morley et al., 2003, Murrell et al., 1987, Sadowska, 2012) Ihr Wirkmechanismus beruht auf einer antiinflammatorischen und antiproliferativen Wirkung (Murphy-Marshman et al., 2017). Durch die Veränderung des Redoxstatus kann NAC die Aktivierung des  $\kappa$ B aus NF $\kappa$ B beeinflussen und dadurch die Entzündungsreaktion modulieren (Sadowska, 2012). Meurer et al. haben den Einfluss von NAC auf die TGF- $\beta$ -Signalübertragung in hepatischen Stellatzellen untersucht. Dabei ergab sich, dass NAC – in Abhängigkeit seiner Dosis - die Induktion des TGF- $\beta$ -Signalwegs, die Phosphorylierung von Smad2/3 und die inhibitorische Wirkung von Smad7 aufheben kann (Meurer et al., 2005). Kopp et al. haben diese Hypothese auf Morbus Dupuytren-Fibroblasten übertragen. Dabei kamen sie zum Ergebnis, dass NAC die TGF- $\beta$ /Smad-vermittelte Signalisierung aufhebt und somit die Wirkung ähnlich zur inhibitorischen Wirkung von Smad7 ist. Den dosisabhängigen Effekt konnten sie anhand der verminderten Expression von Fibrogenese-assoziierten Proteinen ( $\alpha$ -SMA, PAI-1, Col1A1) messen. (Kopp et al., 2006) Sadowska hat 2012 im Rahmen ihrer

Untersuchung bei chronisch obstruktiver Lungenerkrankung die verschiedenen Angriffspunkte der NAC näher beschrieben. Neben seiner direkten Funktion als Radikalfänger von reaktiven Sauerstoffspezies, wirkt es indirekt über die Synthese von Cystein und schließlich zu intrazellulärem Glutathion. Durch die Veränderung des Redoxstatus wird darüber die der Kernfaktor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) beeinflusst und die daraus resultierende Entzündungsreaktion gehemmt. (Sadowska, 2012)

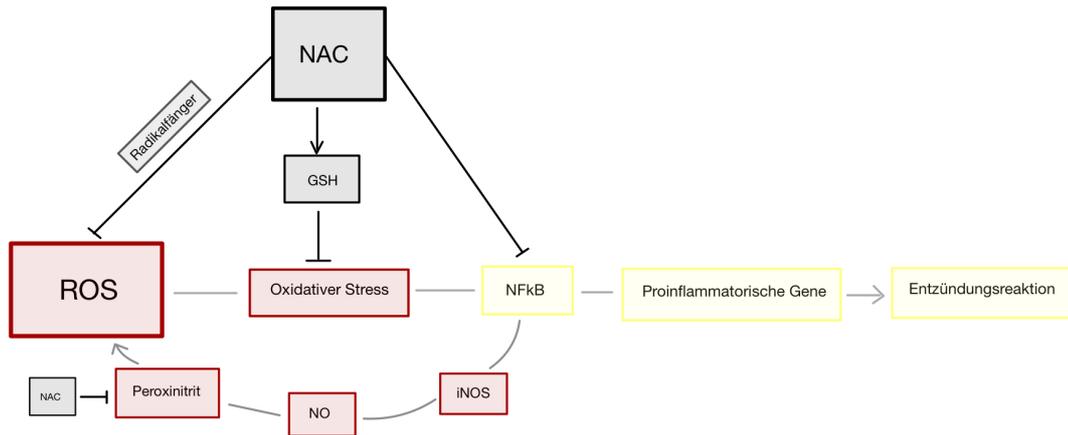


Abbildung 5: Mögliche Angriffspunkte von NAC (N-Acetyl-Cystein) und Hemmung der NF $\kappa$ B -Aktivität, moduliert in Anlehnung an (Sadowska, 2012)

### 2.1.2.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Medien, Lösungen und Puffer

Name der Lösung/ des Puffers	Zusammensetzung
Nährmedium	500ml DMEM 50 ml 10% FCS 5ml 1% Pen/Strep 5ml 1% Hepes
Blotting-Puffer Gelöst in Aqua dest.	60ml Tris-Glycin Transferpuffer 10x 70ml Methanol ad 750ml H <sub>2</sub> O
Dispase-II-Lösung Gelöst in Aqua dest.	PBS 0,1% Dispase Typ II 5% Hepes
Kollagenase Puffer	0,001M CaCl 0,005M Glucose 0,1M HEPES 0,12M NaCl <sub>2</sub> 0,05M KCl 0,2% Kollagenase Typ I 1,5% BSA
Laemmli-Puffer	250 mM Tris-HCl (pH=6,8)

Gelöst in Aqua dest.	40% Glycerol 8% SDS 0,1% Bromphenolblau Vor Gebrauch 20% Mercaptoethanol zusetzen
Ponceau S	0,1% Ponceau 3% Trichloressigsäure
RIPA-Puffer für Proteinanalyse nach abcam Gelöst in Aqua dest.	50 mM TRIS (pH=8) 150 mM NaCl 1 % NP-40 0,5 % Na-Deoxycholat 0,1 % SDS Dem Puffer werden vor dem Gebrauch noch Phosphataseinhibitor und Proteininhibitor zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.
TBS/(T) Gelöst in Aqua dest.	7,7mM Tris (pH 7,5) 150mM NaCl +0,1% Tween (bei TBS-T)
Transferpuffer Gelöst in Aqua dest.	25 mM Tris-Base (pH 8,0 – 10,5) 192 mM Glycin

### 2.1.2.3 Antikörper

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Antikörper in der Western-Blot-Analyse

Antikörper	Bezeichnung	Host / Target
Primärantikörper gegen $\alpha$ -sma	Anti-alpha smooth muscle actin antibody [1A4] (ab7817) – 42kDA	rabbit
Primärantikörper gegen Fn-EDA		mouse
Primärantikörper gegen GAPDH	Anti-GAPDH hFAB Rhodamine Antibody	
Sekundärantikörper anti-mouse	Polyclonal Goat Anti Mouse Immunglobulins/HRP P0447	goat / mouse
Sekundärantikörper anti-rabbit		goat / rabbit

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Antikörper bei Immunhistochemie

Name	Bezeichnung	Verwendete Verdünnung (PBS bzw. FCS)
Monoclonal Normalhorse	Common Vector S 2000	1: 100
Polyclonal Normalwine	Vector S 400	1:100
Biotinyliertes Anti Mouse	IgG (H+L) Vector BA 2001	1:100
Swine Anti Rabbit	Dako Z 0196	1:50
Monoclonal ABC-Kit	Vectastatin, Vector PK 4000	1:50
Polyclonal PAP-Rabbit	Dako Z 113	1:200
DAB	Sigma D-5637	1:2

## 2.1.3 Technik

### 2.1.3.1 Geräte

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Handelsname	Hersteller
Absauganlage	Vacuboy	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Absaugpumpe	LABOPORT	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Abzug		Waldner
Aluminiumständer zur kühlen Probenlagerung	Rotilabo-Alu.Rack 1.5	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Autoklav	Laboklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, BRD
Autoklav	Systec DX-90	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Blotter	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Brutschrank (37°C)	HERACELL 150	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Eismaschine	RF 0244 A	Manitowoc Ice, Manitowoc, USA
Eiswanne zur Probenkühlung	neoLab Eisbad klein aus PS	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Elektrophorse Spannungsquelle	PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Gasflamme	Fuego SCS basic	WLD-Tec, Göttingen, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Premium NoFrost	LIEBHERR-International AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C	Hera Freeze	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Geldokumentationsanlage (Western)	BioRad GelDoc	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Gelkammer	Mini-Protean TetraCell PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Hämozytometer/ Neubauer-Kammer	Neubauer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen, Deutschland
Heizbad	Lauda AL12	LAUDA GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Heizblock	dry bath	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Kryo-Einfriergerät		Schmidt Laborgeräte und Umweltsimulationen, Deutschland
Kühlschrank 4°C	KUw 1740	LIEBHERR-International AG, Bulle, Schweiz
Magnetrührer	620 Standard	vwr International GmbH, Darmstadt, Deutschland

Mikroskop	Axiovert. 40/ Axiskop40	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Multipipette	Multipipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten (100-1000µl, 20-200µl, 10-100µl, 2-20µl, 1-10µl)	Eppendorf research plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten (20-200µl, 5-50µl, 0,5-10µl)	Finnipipette	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Pipetten (200-1000/µl, 50-200/µl, 2-20/µl)	Pipetman classic	Gilson S.A.S., Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipetten (25ml, 10ml, 5ml)		STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	accu-jet® pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Pipettierhilfe	Omega Pipettor	Argos Technologies Inc., Vernon Hills, USA
Power Supplier	Mini-Protean TetraCell PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Pumpe	Laboport	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Schwarze Tonne	Kontaminationsabfall	MAUSER Corporate GmbH, Brühl, Deutschland
Sicherheitsbrenner	Fuego SCS basic RF	WLD-Tec, Göttingen, Deutschland
Sicherheitswerkbank mit Abzug	TA 1500 x 900 – 900 (Laborsystem mc6)	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, Deutschland
Sonifizierer	DU 50 H (Cycle 0,5; Amplitude 80%)	Dr. Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Deutschland
Sterile Werkbank	HERAsafe	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Sterile Werkbank	Euroflow EFA5	Clean Air Techniek bv, Woerden, Niederlande
Taumelrollenmischer	RM5-V 1750	CAT Ingenieurbüro M. Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland
Taumelrollenmischer	RM5-V80-1752	CAT Ingenieurbüro M. Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland
Thermostat für Wasserbad	Thermomix BU	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Transferkammer	Trans-Blot Turbo™	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Vortexer	IKA MS3 basic (3000 U/min)	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen, BRD
Vortexer	Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Vortexer	Vortex mixer	Vwr International GmbH, Darmstadt, Deutschland

Waage (d=0,1mg)	Kern ABJ Log NoA01 Electronic Balance Typ ABJ2204	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Waage (d=10mg)	Adventurer Pro AV412	Ohaus Corporation, Pine Brook, USA
Wärme-Bad 37°C	Aqualine AL 12	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG, Lauda- Königshofen, Deutschland
Western Blot Imaging Instrument	ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Zentrifuge groß	HERAEUS Megafuge 16R zentrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge klein	HERAEUS Pico 17 zentrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

### 2.1.3.2 Software

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Software

Software	Produktbezeichnung	Hersteller
Office Paket	Microsoft Office 2010 (Office Professional) / 2016 (Office 365)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Photometer Software	WorkOut 2.0	DAZDAQ LTD., Brighton, England
Statistik Software GraphPad Prism	GraphPad Prism Version 9.5.1 2023 für macOS	GraphPad Software, San Diego California, USA
Statistik Software SPSS Statistics 26 / 29	SPSS Statistics Version 26 /29	IBM Company, USA
EndNote X9/ 20		Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
Western Blot Software Image Lab	Image Lab Version 6.0.1 build 34, 2017, Standard Edition	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultur

In dieser Arbeit wurde an Fibroblasten von MD oder CTS-Erkrankten geforscht. Alle Proben wurden auf Petrischalen ausgesät und mit Medium versehen. Als Medium wurde DMEM mit 4,5 g Glucose und FBS (10 % fetales Rinderserum), 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % HEPES vermischt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung. Wie bereits unter 2.1 beschrieben, befinden sich die Zellen nach dem Aussähen in Passage 0 und können über Nacht anwachsen. Alle anderen Zellen bzw. Gewebebestandteile, die am nächsten Tag im Mikroskop noch freischwimmen, werden durch einen Mediumwechsel abgetragen.

Ein Mediumwechsel erfolgte 2-3x pro Woche. Dabei wurde unter sterilen Bedingungen zuerst das alte Medium abgesaugt und neues Medium hinzugegeben. Nach ausreichend starkem Wachstum, konnte ein Zell-Splitting 1:2 oder 1:3 erfolgen. Um die Zellen zu mobilisieren, wurde 10 %iges Trypsin-EDTA (+PBS) hinzugegeben. Bei Trypsin handelt es sich um eine Serinprotease, die ihr Wirkmaximum bei 37 °C entfaltet, weshalb die Zellen für circa 5-10 Minuten in den Brutschrank gelegt wurden. Ein wichtiger Zwischenschritt ist die Zugabe des FCS-haltigem Mediums nach der Inkubation, damit die Reaktion verlangsamt wird, um eine vollständige Zerstörung der Zellen zu verhindern. Nach der Wartezeit, erfolgte durch das „shake-off-Verfahren“, sowie der vorsichtigen mechanischen Mobilisierung mittels eines Zellschabers, die Ablösung der Zellen und im Anschluss konnte das Zell-Medium-Gemisch in einem Falcon bei 270 G (1200 U/min) für 5 Minuten zentrifugiert werden. Nach dem Absaugen des Überstands, konnte entweder die Zellzählung mittels Hämozytometer erfolgen, oder die Zellen wurden auf die neuen Petrischalen verteilt und mit Medium (12 ml) aufgefüllt.

#### 3.1.1 Kultivierung und Versuchsaufbau

##### 3.1.1.1 Kryokonservierung

Beim Verfahren der Kryokonservierung von Fibroblasten wird aufgrund der zellschädigenden Wirkung des Einfriermediums bei Raumtemperatur schnell und unter Kühlung (ggf. Lagerung auf Eis) gearbeitet. Das frisch angesetzte Einfriermedium besteht aus 90 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO). Wie bereits unter 3.1 beschrieben erfolgte die Mobilisierung der Zellen vom Boden der Platte durch eine Trypsin/EDTA-Lösung. Der Vorgang, der bei verlängerter Exposition zur Zelledestruktion führen kann, konnte durch die Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt bzw. verlangsamt werden. Dieser Schritt musste ständig unter dem Mikroskop überwacht werden. Die neue Zellsuspension wurde folglich durch eine Pipette in ein Falkongefäß überführt und im Anschluss bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Im Vorfeld erfolgte jedoch die Bestimmung der Zellzahl mittels Zählkammer aus 10 µm Zellsuspension. Die Zielzellzahl pro Milliliter eingefrorenem Medium beläuft sich auf  $1 \times 10^6$  Zellen. Nach Verwerfen des Überstands

konnte das Zellpellet im gekühlten Einfriermedium resuspendiert werden und jeweils 1 ml in Kryoröhrchen gegeben werden. Die Lagerung erfolgte im Anschluss für 24 h bei -80 °C im Kryoeinfriergerät mit 100 % Isopropanolol. Dabei wird die kontrollierte Kühlung um 1 °C/Min gewährleistet. Bei Langzeitlagerung kann nach frühestens 24 h die weitere Kühlung bei -80 °C kaltem Stickstoff erfolgen.

#### **3.1.1.2 Auftauen**

Beim Auftauen der Zellkulturen muss ebenso wie beim Einfrieren auf das zytotoxisch wirksame DMSO bei Raumtemperatur geachtet werden. Deshalb müssen die Schritte auf Eis durchgeführt werden. Nachdem die Zellen aus der Kühlung entnommen wurden, müssen die Kryoröhrchen kurz bei 37 °C im Wasserbad angetaut werden. Erst dann dürfen die Zellen mit einer bestimmten Menge an Medium resuspendiert und in ein größeres Falcon übertragen werden. Bevor die Zellen in einer Petrischale ausgesät werden können, muss der toxische Überstand abzentrifugiert werden. Schließlich beginnt ein neuer Zyklus und die Kultivierung der Zellen beginnt.

#### **3.1.1.3 Ernten der Proben**

Um festwachsende Fibroblasten vom Boden der Petrischale zu lösen, bedarf es zuerst einem Waschschrift mit PBS, um die Mediumreste zu entfernen. Zur Ablösung der Zellen wird eine Mischung aus Trypsin und EDTA (1:10, 5 ml Trypsin, 45 ml PBS) auf die Platte gegeben. Die enzymatische Reaktion wird bei 37 °C im Wärmeschrank beschleunigt. Nach fünf Minuten und unter wiederholter mikroskopischer Kontrolle können die adhären Zellen durch sanfte Schläge gegen die Seite des Gefäßes gelöst werden. Um die enzymatische Reaktion der Serinprotease Trypsin zu stoppen, bedarf es der Zugabe von 13 ml FCS-haltigem Kulturmedium. Falls die chemische Lösung der Zellen nicht vollständig ausreichte, kann zusätzlich die mechanische Lösung durch einen Zellschaber erfolgen. Sobald (fast) alle Zellen lose im Gefäß schwimmen, konnte nach wiederholter Resuspension die Überführung in ein Falcon erfolgen. Um die Zellen vom Medium zu trennen, erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 1200 rpm. Der entstandene Überstand wurde verworfen. Das am Boden befindliche Zellpellet wurde mit 5-10 ml (Menge abhängig von vorher definierter Zellzahl mittels Zählkammer) Kulturmedium versehen.

#### **3.1.1.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer)**

Für die durchgeführten Experimente wurde eine festdefinierte Zellzahl benötigt. Um diese bestimmen zu können, erfolgte die Gabe einer Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer, die schließlich mit einem angefeuchteten Deckglas bedeckt wurde und sich fest mit der Zählkammer verbunden hat. Nun wurden 10 µl der Zellsuspension an den Rand der Deckplatte pipettiert. Durch kapilläre Sogkräfte gelangt die Zellsuspension zwischen Deckglas und Zählkammerboden. Unter 10-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop kann schließlich die Zellzahl pro ml bestimmt werden. Nachdem man alle vier Kammern ausgezählt hat, muss daraus der Durchschnitt errechnet und mit dem Kammerfaktor  $10^4$  (1 Kammer = 0,1 µl Volumen) multipliziert werden. Zum Schluss muss

noch eine Multiplikation mit dem Suspensionsvolumen erfolgen, um die absolute Zellzahl zu ermitteln.

$$\begin{aligned} & \text{gezählte Zahl} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Kammerfaktor} \\ & = 20 * 5 * 10^4 \end{aligned}$$

$$\frac{\text{haben}}{\text{soll}} = \frac{9 * 10^4}{10^4} = 9$$

$$\frac{5}{20} = 0,25 * 8 = 2\text{ml (Zellsuspension)}$$

Zielvolumen: 8ml

$$8\text{ml} - 2\text{ml} = 6\text{ml Medium zugeben}$$

### 3.1.2 Versuchsaufbau

Diese Forschungsarbeit beschäftigte sich mit der Pathogenese des Morbus Dupuytren und inwiefern die Aktivität der NOX4 und die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine Rolle spielen. Als Korrelat zur Myofibroblasten-Differenzierung wurden die Marker EDA-Fn und  $\alpha$ -SMA untersucht. Die Fibroblasten stammen aus Morbus Dupuytren und Karpaltunnel-Syndrom Patienten. Diese wurden auf *six-well*-Platten mit verschiedenen Antioxidantien (N-Acetylcystein, Glutathion), sowie NOX(4)-Inhibitoren (DPI, GKT137831) beimpft. Die Proteinexpression wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die quantitative Untersuchung der exprimierten Proteine erfolgte über die angeschlossene immunhistochemische Untersuchung.

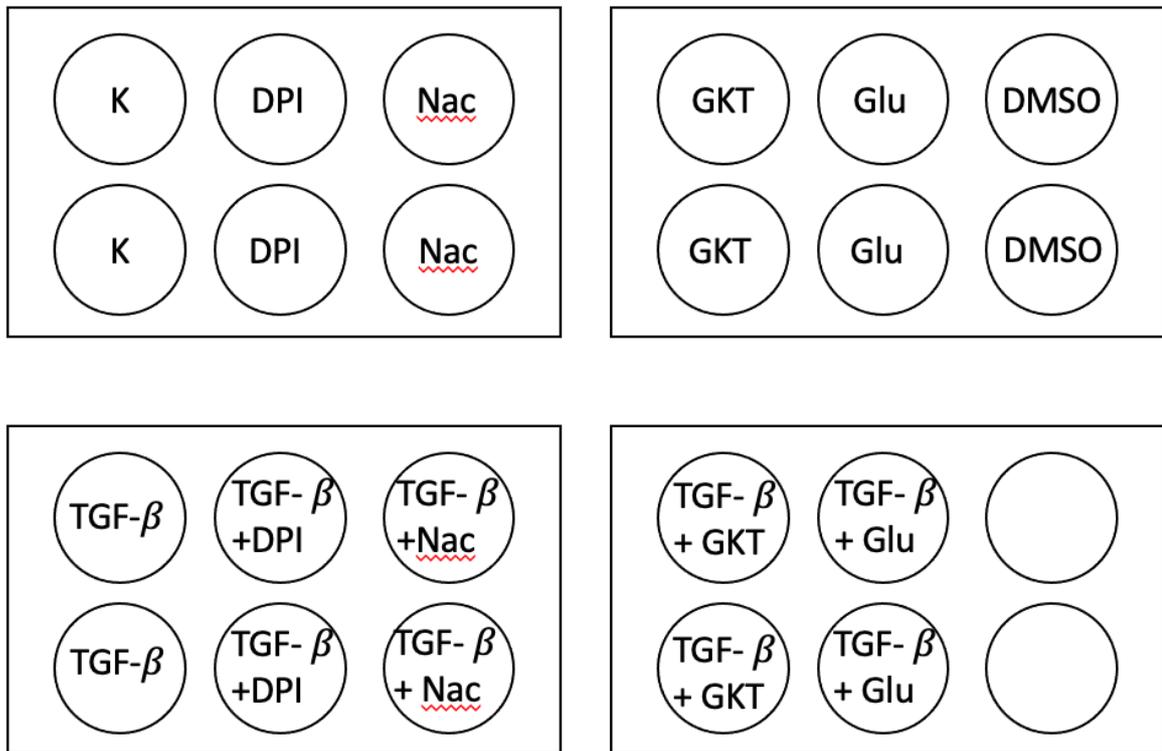


Abbildung 6: Verteilung der verschiedenen Inhibitoren auf die six-well-Platten eines Probanden mit doppelter Well-Anzahl, um maximale Proteinexpression zu generieren; Glu = GSH

### 3.1.2.1 Versuchsablauf

Zu Beginn der Versuchsreihe erfolgte die Kultivierung eines Probanden (CTS, MD). Nachdem eine ausreichende Zellzahl erreicht war, konnte eine Verteilung auf 22 six-well-Platten erfolgen. Für die Ermittlung der ausreichenden Zellzahl wurde die unter 3.1.1.4 genannte Formel verwendet. Um eine ausreichende Proteinexpression zu generieren, erfolgte die doppelte Kultivierung vitaler Zellen.

Nachdem die Fibroblasten verteilt wurden, erfolgte die Zugabe von weiteren Substanzen (siehe Abbildung 6). Bei jeder Versuchsreihe wurden zwei Wells als Kontrolle (K) angelegt, die während der ganzen Versuchsreihe keine Inhibitoren zugesetzt bekommen, sondern lediglich Mediumwechsel erhalten. Die restlichen Wells wurden mit Fibroblasten und den jeweiligen Inhibitoren (absolute Dosis siehe unter Tab. 7) versetzt. Um den Effekt von TGF-β als Wachstumsfaktor zu untersuchen, wurden die Zellen der Versuchsreihe mit TGF-β versehen, um seinen fibroproliferativen Effekt zu untersuchen (untere Reihe in Abbildung 6). Auch hier erfolgte zusätzlich zur TGF-β Gabe die Inhibitoren-Zugabe. Erst dadurch kann der Effekt auf die Myofibrogenese quantifiziert werden. Die Testkonzentration wurde im Verhältnis 1:200 von der Stammkonzentration (1000 ng/ml) verdünnt. So wurden 5 ng/ml TGF-β pro Well hinzugegeben. Beispielrechnung bei 30 benötigten Wells:

1 Well à 1,5ml TGF-β Lösung

$$30 * 1,5ml = 45ml$$

$$x = \frac{45000\mu l}{200}$$

$$x = 225\mu l TGF\beta$$

Eine Well mit DMSO wurde zusätzlich angelegt, da der Inhibitor GKT137831 darin aufgelöst ist und dadurch die Neutralität der Lösung gezeigt werden konnte, da DMSO bei Raumtemperatur als zytotoxisch wirksam ist. So ergaben sich insgesamt 10 Gruppen (DMSO ausgenommen):

*Tabelle 13: Aufteilung der Behandlungsgruppen und Behandlungsfrequenz; Nac (N=5), GSH (N= 8), da aufgrund avitaler Zellen das Antioxidans im Verlauf der Studie gewechselt wurde, Tag 0: Aussaat + TGFβ + Wachstumsfaktorengabe, ab Tag 1: Mediumwechsel + TGF-β + ggf. Inhibitorzugabe*

1	Keine Behandlung	Täglicher Mediumwechsel
2	DPI	Tag 0
3	GKT	Tag 0 -1- 2- 3- 4- 5
4	Nac	Tag 0 -1- 2- 3- 4- 5
5	GSH	Tag 0 -1- 2- 3- 4- 5
6	TGF-β	Tag 0 -1- 2- 3- 4- 5
7	TGF-β + DPI	Tag 0
8	TGF-β + GKT	Tag 0 -1- 2- 3- 4- 5
9	TGF-β + Nac	Tag 0 -1- 2- 3- 4- 5
10	TGF-β + GSH*	Tag 0 -1- 2- 3- 4- 5

Nachdem der Versuchsansatz an Tag 0 ausgesät wurde, wurden die Platten anschließend für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag (Tag 1) erfolgte der erste Mediumwechsel (inkl. TGF-β und Inhibitoren-Wechsel), um abgestorbene Zellen abzutragen. Dieser Ablauf wurde für insgesamt 5 Tage fortgeführt.

Nach den ersten beiden Versuchsreihen zeigte sich bereits in den vorgeschalteten Western Blot Bestimmungen, dass Zellen, die mit DPI als Inhibitor versetzt waren, eine sehr niedrige Proteinexpression lieferten. Dies konnte auch unter dem Mikroskop festgestellt werden. Als Resultat erfolgte ab Versuchsreihe 3 nur eine einmalige Zugabe von DPI an Tag 0.

Im Verlauf des Experiments konnte ein weiterer Effekt unter dem Mikroskop beobachtet werden.

Die Zellen, die mit N-Acetylcystein behandelt wurden (N=6; CTS N=5, MD N=5), zeigten im Verlauf stark verminderte Vitalität, sodass Glutathion (N=16 (CTS N=9, MD N=8) als Ersatz in die restlichen Versuchsreihen inkludiert wurde. Bereits in der vorgeschalteten Arbeit von Frau

Uzunmehmet konnte gezeigt werden, dass NAC eine ROS-Reduktion herbeiführt und zusätzlich zu einer verminderten Protein-Expression ( $\alpha$ SMA, EDA-FN) um 55% führt. (Uzunmehmet, 2019)

### 3.1.2.2 Mikroskopische Ergebnisse

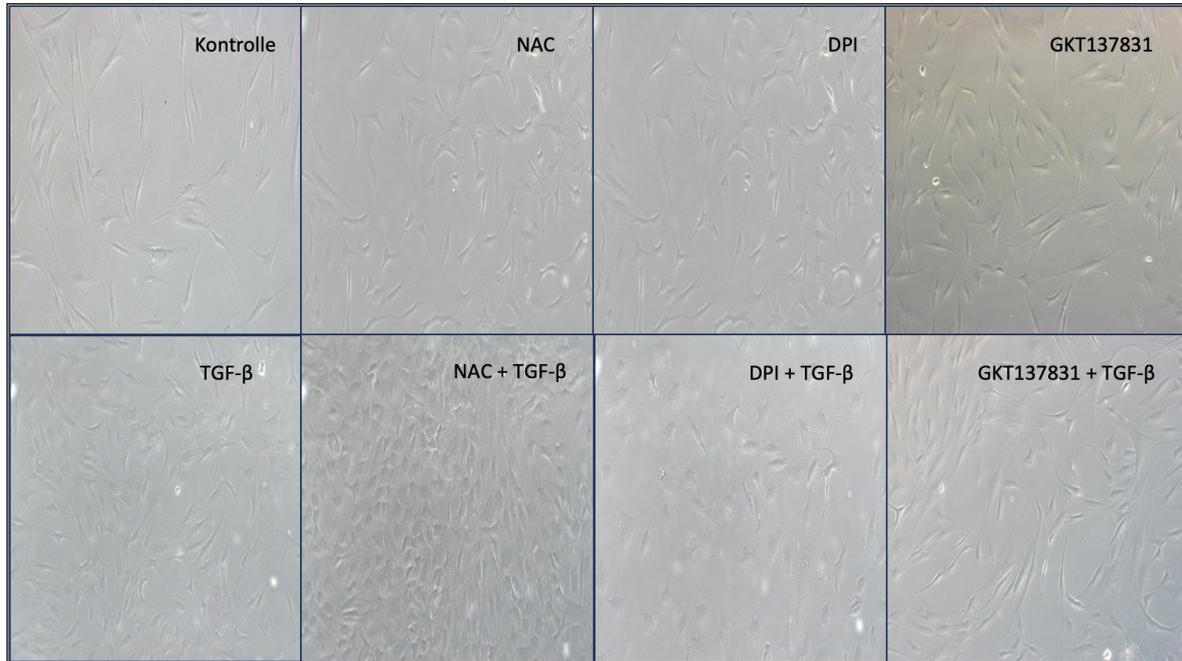


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Darstellung der behandelten MD-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten; Kontrolle: d2, TGF- $\beta$ : d2, NAC d3, NAC+TGF- $\beta$ : d3, DPI d2, DPI+TGF- $\beta$ : d2, GKT137831: d3, GKT137831+TGF- $\beta$ : d3

Im Verlauf der Versuchsreihe wurden die Zellen mehrfach lichtmikroskopisch betrachtet, um die Zellveränderungen besser nachvollziehen zu können. Die Bilder wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgenommen; vorallem ab dem Tag, an dem sich ihre Struktur maßgeblich veränderte (siehe Abb. 7). So zeigen sich im Kontrollbild die normalen schmalen Fibroblasten mit ihren schmalen Zellkörpern und spitzen Fortsätzen. Sieht man sich die obere Zeile genauer an, so zeigen sich auch nach den unterschiedlichen Inhibitoren nur minimale Veränderungen am Phänotyp. Im Gegensatz zur 2. Reihe. Hier kann das Wachstum, sowie die Transformation der Zellen durch TGF- $\beta$  beobachtet werden. Bereits an Tag 2 kann bereits eine Veränderung der Struktur der Fibroblasten gezeigt werden. Typischerweise findet man eine Verkürzung der Ausläufer sowie einen dickeren Zellkörper. Auffällig ist der plumpe Zellkörper nach NAC-Behandlung, der zum einen an d3 noch ein starkes Wachstum bzw. eine dichte Besiedelung zeigt, so lichtet sich das Bild ab Tag4 und unter dem Mikroskop schwimmen vielen Zellen frei herum, was u.a. auf avitale Zellen schließen lässt. Bedauerlicherweise wurde nach dem Wechsel des Antioxidans N-Acetyl-Cystein auf Glutathion keine lichtmikroskopische Aufnahme getätigt.

Durch die Inhibition aller flavinhaltigen Enzymen in den Fibroblasten war das Redox-System der Zellen gestört, woraufhin sie nach DPI-Zugabe eine untypische Struktur aufwiesen. Dies zeigt sich auch in unseren Bildern. Nach DPI-Zugabe verändern sich die Zellkörper in große dickere

Zellkörper mit sehr kurzen Fortsätzen. Bei GKT137831 sieht man mikroskopisch kaum Veränderung, auch nicht nach Stimulation durch den Wachstumsfaktor.

## 3.2 Analyse der Proteinexpression durch Western-Blot Analyse

Die Western-Blot-Analyse dient zur Analyse der Proteinexpression. In der Gelelektrophorese werden die Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt und können schließlich durch Antikörper nachgewiesen werden. Durch die quantitative und qualitative Bestimmung der Schlüsselproteine konnten Vergleiche durchgeführt werden. Diese Zahlen stellen die Grundlage für die statistische Auswertung dar.

### 3.2.1 BCA-Proteinassay

Als Vorstufe der Western Blot-Analyse zur Bestimmung der Proteinmenge ist eine vorherige Proteinbestimmung zwingend notwendig. Die Bestimmung erfolgte nach dem Prinzip des *Pierce BCA Protein Assay Kit* von Thermo Fisher.

Da die Fibroblasten in der Kultivierung bereits zu einem maßgeblichen Teil konfluieren, muss in jeder Probe die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgen.

Zur Vorbereitung der Zellen müssen die in RIPA gelösten und gefrorenen Zellen (-80°C) durch eine Sonicatorsonde eines Ultraschallprozessors lysiert werden. Im Anschluss werden die Zellen zusammen mit PBS im Verhältnis 1:6 verdünnt, d.h. 4 µl Probe, 16 µl PBS<sup>2-</sup>. In eine 96-well-Platte wurden in Doppelbestimmung je 10 µl des Proteinstandards und der Probe pipettiert. Zu der Probe bzw. dem Standard wurden noch zusätzlich 200 µl *working Reagenz* gegeben. Dieses Reagenz aus Lösung A (Biocinsäure) und Lösung B (4 % Kupfersulfat) wurde im Verhältnis 50:1 vermischt. Die Formel dazu lautet:

$$(Proben + Standard) * Anzahl Replikate * 200 \mu l WR pro Probe = Volumen WR$$

Im Anschluss wird die Mikrotiterplatte mit Vlies-Folie verklebt und kurz auf dem Schüttler vermischt, bevor die Proben für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert werden. Nach der Inkubation kann die photometrische Absorption bei 562 nm erfolgen.

Das in unserem Versuch verwendete Proteinkit, dient zur photometrischen Messung (*Victor multilabel plate readers*) der Proteinkonzentration. Das Photometer kann den Farbumschlag messen, der durch die Reaktion von BCA (bichinchoninic acid) mit dem reduzierten Kupfer (Cu<sup>1+</sup>) entsteht. In alkalischer Lösung kommt es zur Bindung der Peptidbindungen an Cu<sup>2+</sup>, wodurch eine Reduktionsreaktion stattfindet. Der entstandene Farbumschlag bzw. die Blaufärbung kann durch photometrische Messung im Absorptionsbereich 540-590 nm ermittelt werden.

Tabelle 14: Pipettierschema des BSA-Standards

Konzentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Probenname	BSA-Standard ( $\mu\text{l}$ )	PBS / RIPA ( $\mu\text{l}$ )
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

### 3.2.2 Prinzip des Western Blots

Das Ziel der Western-Blot-Analyse ist die quantitative und qualitative Darstellung der Schlüsselproteine der Myofibrogenese –EDA-Fn und  $\alpha$ -SMA. Dazu bedarf es dem Transfer der extrahierten Proteine auf eine Membran (= Protein Blotting). In unserem Versuch erfolgte die Gel-Blot-Variante. Dabei wurden die Proteine aus der zuvor durchgeführten Proteinbestimmung durch Gelelektrophorese nach Größe bzw. Molmasse getrennt. Die Laufrichtung erfolgt von der Kathode in Richtung Anode, also anhand der Stromladung. Um das Blotting zu visualisieren und vor der Antikörpermarkierung zu überprüfen, erfolgt die Ponceau-Färbung.

### 3.2.3 Probenvorbereitung und verwendete Gele

In unserem Versuch wurden Fertiggele von Bio-Rad eingesetzt. Die Vorteile zeigen sich dabei in der schnellen Verfügbarkeit, sowie der fleckenfreien und schnellen Proteinübertragung (ca. 15 Minuten). Zudem können die Gele als standardisiert angesehen werden, sodass die Ergebnisse vergleichbar miteinander sind. Es bestand auch die Möglichkeit der eigenen Gelanfertigung. Die Gele wurden anhand der Gebrauchsanweisung in die Gelkammern eingespannt und mit Laufpuffer befüllt. Die Proben selbst wurden mit 5  $\mu\text{l}$  Laemmli-Puffer (80 % Laemmli, 20 %  $\beta$ -Mercaptoethanol) gemischt und anschließend für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und bis zur Gelbeladung auf Eis gelagert. Zusätzlich enthält der Puffer Bromphenolblau, das zur Visualisierung der Proteinbanden dient. Unter Mercaptoethanol versteht man ein Reagens, welches zur Denaturierung von Proteinen eingesetzt wird und hier zur Aufspaltung der Disulfidbrücken führt (Spektrum, 1999). Das Gemisch wurde im Anschluss bei 13.300 rpm für zwei Minuten

zentrifugiert und schließlich in die 14 Probentaschen (15 µl) pipettiert. Die Proteinleiter wurde mit einem vorgefertigten Roti-Western-Marker (7 µl) in die erste Tasche gegeben. Schließlich wurde der Deckel verschlossen und für ca. 15 Minuten eine Spannung von 80 V angelegt, bis die Proteine durch das Sammelgel gewandert sind. Für die restliche benötigte Durchlaufzeit durch das Trenngel wird die Spannung auf 100-120 V erhöht. (Orthopädie und Unfallchirurgie, 2020)

### 3.2.4 Durchführung der SDS-PAGE

In unserer Versuchsreihe wurde das diskontinuierliche System nach Laemmli - eine eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) - verwendet, die es ermöglicht die Proteine anhand ihrer Molmasse aufzutrennen. Die Diskontinuität bezieht sich hierbei auf die unterschiedliche Gelstruktur (Sammelgel vs. Trenngel), den pH-Wert, sowie die Art und Konzentration der Pufferionen (HCl vs. Glycin). Das in den Gelen enthaltene SDS-Detergens (Natriumdodecylsulfat) denaturiert die Proteine und gibt jedem eine negative Ladung, sodass eine Auftrennung nach Größe in Richtung der basalen Anode möglich ist. Sobald die elektrische Spannung an der Apparatur angeschlossen wird, beginnen die in den Puffern befindlichen Ionen zu wandern. Am schnellsten wandern die Chloridionen (= Leitton) und am langsamsten die Glycine (= Folgeion). Die HCl-Ionen befinden sich in den beiden Gelen und Glycin wird mit dem Laufpuffergemisch hinzugegeben. Glycine liegen in niedrigem pH-Milieu (HCl-Puffer) eher in ungeladener Form vor.

Zwischen beiden Gelen bildet sich eine Bande mit geringer Ionendichte und niedriger Leitfähigkeit sowie hohem elektrischen Widerstand; dadurch entsteht der Feldstärkegradient. Hier sammeln sich die SDS-Proteinkomplexe an und gelangen nur in schmaler Zone auf das Trenngel.

Im Folgenden steigt der pH-Wert, sodass Glycin eine negative Ladung erhält und die Laufgeschwindigkeit erhöht und die Proteine überholt. Diese werden schließlich im engporigen Trenngel anhand des „Molekularsiebeffekts“ aufgetrennt. (Ecker and Kartenbeck, 1997) Im Anschluss wurde das Gel im *ChemiDoc-Imager* für ca. 45-50 Sekunden aktiviert (Einstellung: *stain-free gel, rapid auto exposure*) und ein Bild für die Normierung des Totalproteins erstellt.

### 3.2.5 Das Blotting

Das Blotting beschreibt den Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran im Trans-Blot Turbo Transfer System. Unter Abb. 8 ist der Aufbau der Blotkassette abgebildet. Die Laufrichtung entspricht von der Kathode (-) in Richtung Anode (+). Der Pfeil entspricht dem Druckaufbau auf das Blotssystem. Die abgebildete Membran und das Filterpapier werden vor dem Blotting in Transferpuffer (10 % Methanol, 8 % Transferpuffer, 82 % aqua dest) eingelegt, bevor das System anhand Abb. 8 zusammengesetzt wird. Im Anschluss wird das verschlossene Gehäuse in das Transfer System geschoben. Der Blottingprozess erfolgt für 20 min bei 2,5 A und 25 V. Anschließend erfolgt die Kontrolle des Transfers mit BioRad ChemiDoc Imaging System.

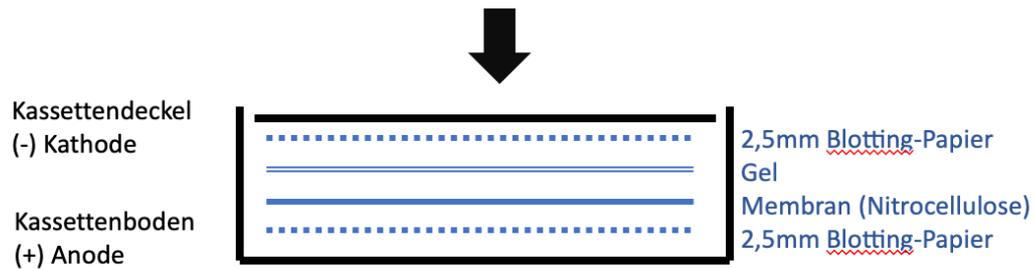


Abbildung 8: schematischer Aufbau einer Blotkassette

### 3.2.6 Die Ponceau-S-Färbung

Nach Ablauf der 20 Minuten wird die Membran in ein Gefäß mit Ponceau-S-Lösung gelegt und für ca. 1-2 Minuten gefärbt. Dadurch werden die Ergebnisse des Blotting-Transfers sichtbar. Die spezielle Lösung bindet reversibel an positiv geladene Aminosäureenden. Im Anschluss erfolgt das Abspülen mit destilliertem Wasser, bis der Hintergrund der Membran aufklart. Dadurch, dass es sich bei Ponceau-S-Färbung um eine reversible Färbung handelt, verschwindet diese wieder vollständig nach längerer Durchführung des Waschvorgangs. Vor dem Trocknen muss die Membran mit TBS-Tween ca. 1 Stunde gewaschen werden, um die Bindungsstellen für die nachfolgende Antikörpermarkierung freizulegen. (Bio-Rad Laboratories)

### 3.2.7 Antikörpermarkierung und Detektion

Zu Beginn werden die unspezifischen Bindungen mit TBS-Tween Lösung für ca. eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Im Anschluss erfolgt die erste spezifische Antikörperbindung ( $\alpha$ -SMA, EDA-Fn) für 24 h, dabei werden zu der Membran 3 ml der vorgefertigten Antikörpermischung (1:2000 in BSA gelöst) in ein Falcon gegeben und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wird die Membran dreimal für jeweils 5 Minuten auf dem Schüttler mit dem Waschpuffer (TBS-T) bei Raumtemperatur im Dunklen gewaschen. Dadurch werden ungebundene Antikörper ausgewaschen. Als nächsten Schritt erfolgt die Sekundärantikörperbindung. Dafür wurden der anti-Western-Marker sowie der *Goat-anti-mouse*-Marker (1:4) in TBS-Tween (1:1000) gelöst. Dieser ist an eine Peroxidase (HPR = Merrettichperoxidase) gebunden und katalysiert die Chemilumineszenzreaktion, wodurch Luminol aus der im weiteren Verlauf zugefügten Entwicklerlösung oxidiert wird. Im letzten Schritt erfolgte schließlich die Inkubation mit dem Anti-GAPDH, der in 3 % BSA-Lösung (1:5000) aufgelöst wurde. Die Inkubationszeit sowie die Waschvorgänge bleiben gleich. Nach der Antikörpermarkierung wurden die Blots auf dem Fenster des ChemiDoc Imaging Systems positioniert (Anwendung: „Rhodamine Blot“, optimale Belichtungszeit) und unter UV-Licht erfolgte die Bestimmung der Ladekontrolle (GAPDH). Zur Detektion der gesuchten Antikörper muss die Membran mit Entwicklerlösung benetzt werden. Unter UV-Licht wurden die Banden -durch die Chemiluminescence-Blot Aufnahme- sichtbar. Die

digitale Speicherung der entstanden Bilder erfolgte über die Software *Quantity One*, worüber die Bilder bei ImageLab Software am PC abgerufen und ausgewertet werden konnten. Um die Blots für weitere Detektionen aufzubewahren, wurden diese bei 4 °C in TBS gelagert.

### 3.2.8 Auswertung der Proteinexpression

Die Auswertung der erzeugten Antikörperbindungen erfolgte mit dem Programm Image Lab Version 6.0.1 build 34, 2017, Standard Edition von BioRad Laboratories. Die Normierung erfolgte auf das jeweilige Totalprotein der Kontrolle.

## 3.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, um Proteine oder andere Strukturen durch markierte Antikörper sichtbar zu machen- aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung. Neben der Quantifizierung und Klassifizierung der Signale kann auch die Lokalisation bestimmt werden. Das Prinzip beruht auf dem Schlüssel-Schloss-Prinzip - einer Antigen-Antikörper-Reaktion. In unserem Versuch erfolgte die indirekte Antikörpermarkierung mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern, die die Lokalisation der Antigene aufzeigen kann. In unserem Fall handelt es sich um das Fluorochrom.

Zu Beginn des Versuchs wurden die Schnitte bei -20 °C in Aceton fixiert und getrocknet. Um folglich die endogene Peroxidase des Gewebes zu inhibieren, werden die Schnitte in PBS und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gebadet (ca. 10 Minuten). Ohne diesen Schritt, kann eine unspezifische Hintergrundfärbung entstehen. Anschließend erfolgt die Zugabe von Antikörpern, die unspezifische Rezeptorbindungen blockieren sollen. Diese werden ca. 30 Minuten eingewaschen. Benutzt wurden hierzu *Monoklonale Normalhorse* (Common Vector S 2000, 1:100) oder *Polyklonale Normalwine* (Vector S 400, 1:100) Antikörper. Die Spülung erfolgt mit PBS.

Im Verlauf werden universelle Brückenantikörper verwendet, die für alle Färbungen verwendet werden können. In unserem Versuchsaufbau wurden zwei Brückenantikörper verwendet. Bei dem ersten Brückenantikörper wurde Anti-Mouse bzw. Anti-Rabbit den Zellen zugesetzt. Für jeweils 40 Minuten wurden diese damit gespült. Als zweiter Antikörper wurde das *Monoklonale ABC-Kit* bzw. das *polyklonale PAP-Rabbit-Set* verwendet. Bei der ABC-Methode handelt es sich um die generell am häufigsten benutzte Methode. Hierbei bindet ein Biotin-gekoppelter Zweitantikörper an den primären Antikörper. Schließlich erfolgt die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Bei der PAP-Methode (Peroxidase anti-Peroxidase Methode) wird zusätzlich ein „dritter“ Antikörper aus einem Komplex aus dem Peroxidaseenzym und dem dazugehörigen Antikörper gebildet.

Um eine farbliche Abgrenzung zu erhalten, wurden die Zellen mit DAB-Chromogen gefärbt. Um einen Kontrast der Zellkernfärbung bzw. Antikörper-Färbung zu erlangen, erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin, sodass eine visuelle Kontrastierung im Fluoreszenzmikroskop erzielt werden konnte.

### **3.4 Ethikvotum**

Die Ethikkommission der HHU Düsseldorf bewilligte unter der Studiennummer 5882R am 13.07.20217 die „Erstellung einer Biobank zur Erforschung des Morbus Dupuytren“.

### **3.5 Statistische Auswertung**

Die statistische und graphische Auswertung der in unserer Versuchsreihe erarbeiteten Ergebnisse erfolgte über die Software GraphPad Prism 9.0 bzw. 10 und SPSS Version 26 und 29. Die Erstellung des Datensatzes wurde in Zusammenarbeit mit der Firma punkt05-Statistikberatung (Suitbertusstraße 90B, 40233 Düsseldorf) über Excel für Office 265 Microsoft Office erstellt. In unserer Versuchsreihe wurden die Rohdaten statistisch ausgewertet.

Die weitere statistische Auswertung wurde eigenständig über GraphPad Prism durchgeführt. Nach der deskriptiven Auswertung erfolgte die Prüfung auf Normalverteilung durch den Kolmogorav-Smirov-Test mit Darstellung der Dallal-Wilkinson-Lillie für den p-Wert. Bei normalverteilten Daten wurde zum Vergleich der Daten innerhalb einer Gruppe (z.B. CTS oder MD) der *One-way* ANOVA durchgeführt, ansonsten der Kruskal-Wallis-Test. Zusätzlich erfolgte mit dem t-Test für abhängige Variablen bzw. dem Wilcoxon-Test die Prüfung der abhängigen Variablen auf Unterschiede in jeweils zwei Gruppen (z.B. MD:EDAFn GKT+TGF- $\beta$  vs. Alleinige Stimulierung mit TGF- $\beta$ ). Eine zweifaktorielle Analyse (two-way ANOVA) wurde zur Analyse der Unterschiede in zwei unabhängigen Gruppen (CTS vs. MD) durchgeführt. Bei Normalverteilung wurde mit dem Bonferroni-Posthoc, ansonsten mit dem Dunn's Test gearbeitet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Normalverteilung testen

Die Normalverteilung wurde getestet durch den Kolmogorov-Smirnov Test mit Darstellung der Dallal-Wilkinson-Lillie ( $\alpha=0.05$ ). Dies bedeutet, wenn der p-Wert  $<0.05$  ist, ist der Test signifikant und die H<sub>0</sub>-Hypothese (Daten sind normalverteilt) muss verworfen werden und die Alternativhypothese (Daten sind nicht normalverteilt) wird angenommen. Die Daten befinden sich im Anhang.

Tabelle 15: Durchgeführte statistische Testungen nach Prüfung der Normalverteilung durch Kolmogorov-Smirnov-Test ( $\alpha = 0,05$ ) (siehe Anhang)

CTS	EDA-Fn	Normalverteilung: paired t-Test
	$\alpha$ SMA	Nicht normalverteilt: Wilcoxon-Test
MD	EDA-Fn	Nicht normalverteilt: Wilcoxon-Test
	$\alpha$ SMA	Normalverteilung: paired t-Test

### 4.2 Voraktivität der Myofibroblasten

Zu Beginn der Auswertung erfolgt die Veranschaulichung der Voraktivität der eingesetzten Zellen. Es zeigt sich die absolute Expression der Myofibroblastenmarker in den unbehandelten Zellen der Morbus Dupuytren Patienten, sowie zum Vergleich der Karpaltunnelsyndrom-Patienten. In beiden Gruppen kann eine Voraktivität beschrieben werden.

#### 4.2.1 Nach TGF- $\beta$ Stimulation

Nach TGF- $\beta$  Zugabe, wodurch die Signalkaskaden zur Myofibroblastendifferenzierung aktiviert werden, zeigen sich signifikante Unterschiede in der Proteinexpression der einzelnen Marker. Somit zeigt sich eine hoch signifikante Zunahme der Expression von EDA-Fn und eine sehr signifikante Zunahme der  $\alpha$ SMA-Expression.

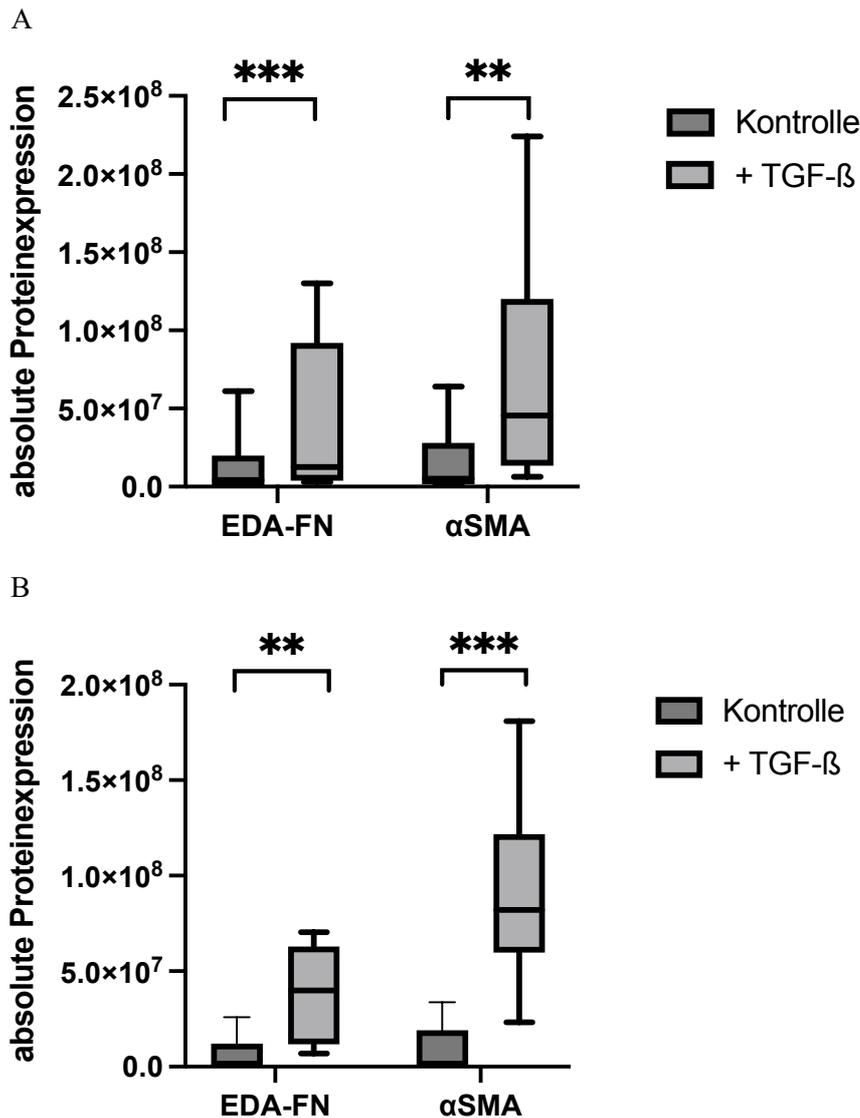


Abbildung 9: Vergleich der absoluten Proteinexpression (EDA-FN,  $\alpha$ SMA) +/- TGF- $\beta$  Zugabe bei MD-Probanden (A) (Signifikanz [\*\*]  $p=0.0066$ , [\*\*\*]  $p=0.001$ ),  $N=11$  und bei CTS-Probanden (B) (Signifikanz [\*\*]  $p=0.0043$ , [\*\*\*]  $p=0.0005$ ),  $N=12$

### 4.3 Expression des Myofibroblastenmarker $\alpha$ -SMA

Wie bereits erwähnt, spielt das das alpha-smooth-muscle actin, insbesondere im Zusammenhang mit der Aktivierung und Funktion von Myofibroblasten, eine Schlüsselrolle. Durch den Einfluss von TGF- $\beta$  produzieren die Myofibroblasten extrazelluläre Matrix, die zu Spannung und Zellkontraktion führt. Nachfolgend wird die Auswirkung der NOX-Inhibitoren und der Antioxidantien in Bezug auf die  $\alpha$ -SMA Expression beschrieben.

#### 4.3.1 NOX-Inhibitoren

Zur Veranschaulichung wurden in Abbildung 10 die beiden NOX-Inhibitoren GKT137831 und Diphenyliodonium im direkten Vergleich bzw. gruppiert dargestellt. Dabei zeigt sich sehr deutlich bei beiden Probanden der gleiche Trend. Bei den naiven Zellen (jeweils ohne Wachstumsfaktor) ist die Expression des Markers ähnlich hoch. Im gruppierten Vergleich kann

eine geringe Mehr-Expression bei CTS-Zellen beobachtet werden; dies bezieht sich dabei auch auf die aktivierten Zellen durch TGF- $\beta$ .

Bei Zugabe des Wachstumsfaktors zeigt sich jeweils eine starke Zunahme der Markerexpression. In absteigender Reihenfolge wird  $\alpha$ -SMA am stärksten bei der Kontrollgruppe mit TGF- $\beta$ -Zugabe exprimiert, folglich von der GKT-Gruppe und am niedrigsten von der DPI-Gruppe.

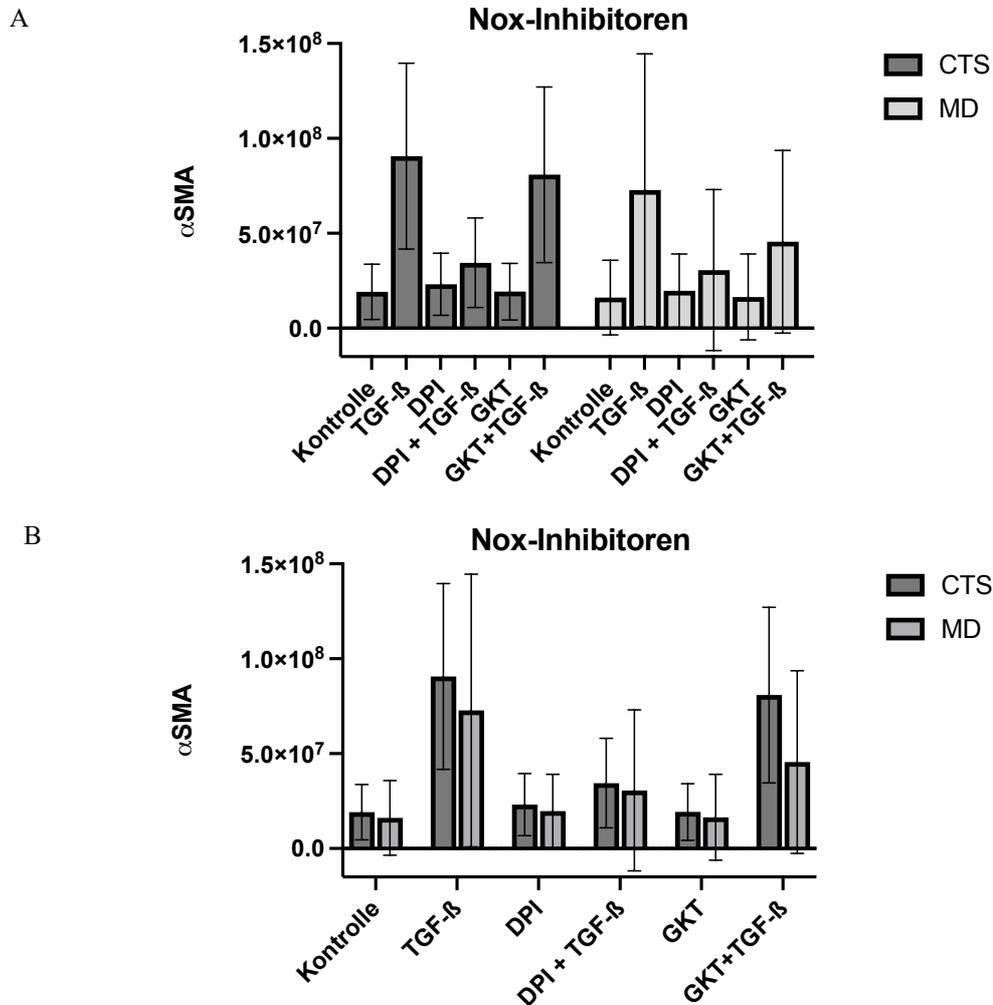


Abbildung 10: Western Blot-Analyse des  $\alpha$ SMA-Proteins nach Behandlung mit dem Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  +/- NOX-Inhibitoren-Zugabe (DPI, GKT137831) Die Behandlung erstreckte sich über fünf Tage +/- Aktivierung der Myofibrogenese durch TGF- $\beta$  (5ng/ml). [A] Darstellung der beiden Gruppen (CTS, MD) im direkten Vergleich [B] gruppierte Darstellung der Behandlungsgruppen

#### 4.3.1.1 DPI

Betrachtet man nun die verschiedenen Inhibitoren gesondert, zeigt sich bei diesem Inhibitor ein sehr ähnliches Expressionsmuster in beiden Versuchsgruppen. Durch die Zugabe des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  wird in beiden Gruppen (MD, CTS) ein signifikanter Anstieg der Markerexpression beobachtet. Nach Zugabe des NOX-Inhibitor DPI zeigt sich bei beiden

Patientenkollektiven ein hoch signifikanter Unterschied im folgenden  $\alpha$ -SMA Nachweis. Bezogen auf die absoluten Zahlen wird bei aktivierten (+ TGF- $\beta$ ) Dupuytren-Zellen mehr Protein sezerniert.

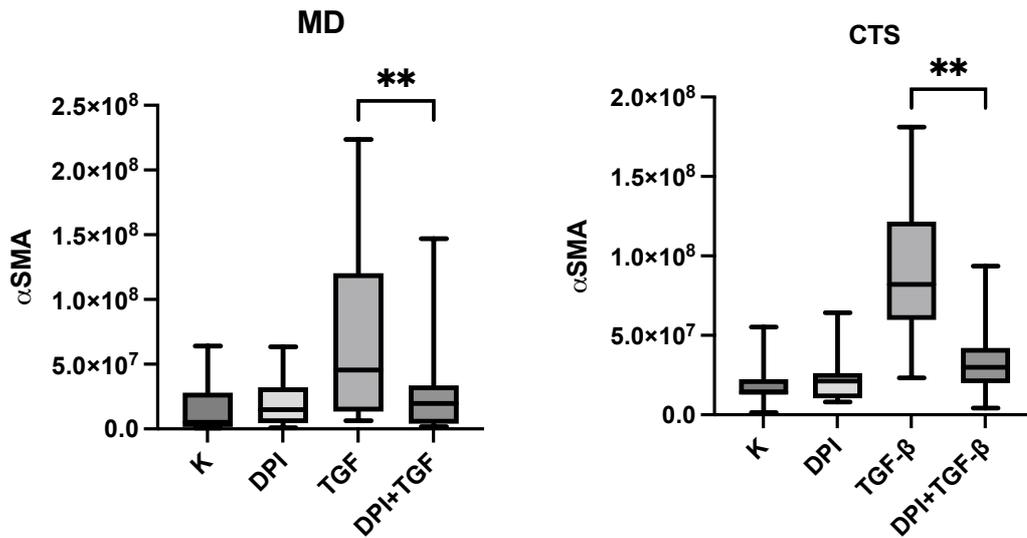


Abbildung 11: Vergleich der absoluten Proteinexpression ( $\alpha$ SMA) vor und nach DPI-Zugabe bei MD-Probanden +TGF- $\beta$  (Signifikanz [ $**$ ]  $p=0.0047$ ),  $N=11$ , sowie bei CTS-Probanden (Signifikanz [ $**$ ]  $p=0.0016$ ),  $N=12$ )

#### 4.3.1.2 GKT137831

Bei diesem Inhibitor, der spezifisch zwei der wichtigsten NOX-Isoformen (NOX1, NOX4) in der Pathogenese fibrotischer Erkrankungen hemmt, ist in beiden Kollektiven ein unterschiedliches Bild zu beobachten. Durch die Hemmung von NOX4 und schließlich auch der ROS-Produktion, verhindert somit die für Dupuytren-Zellen bekannte überaktive TGF- $\beta$ -Signalwegaktivierung. Bei Dupuytren-Probanden zeigt sich neben der üblichen Mehrexpression durch Aktivierung auch ein signifikanter Unterschied durch Inhibierung mit GKT. Im Gegensatz zu den CTS-Probanden kann hier kein signifikanter Unterschied verzeichnet werden.

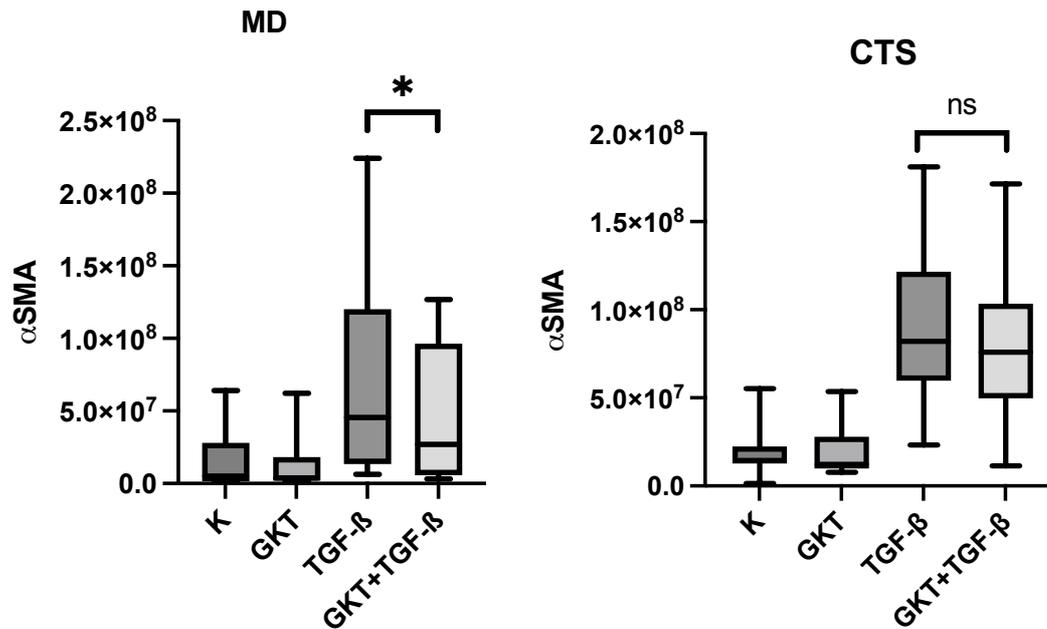


Abbildung 12: Vergleich der absoluten Proteinexpression ( $\alpha$ SMA) vor und nach GKT- Zugabe bei MD-Probanden +TGF- $\beta$  (Signifikanz [\*]  $p= 0.0429$ ),  $N=11$  sowie bei CTS Probanden (Signifikanz [ns]  $p= 0.3652$ ),  $N=12$

#### 4.3.1.3 Vergleich der NOX-Inhibitoren GKT137831 vs. DPI

Vergleicht man nun die Auswirkung der beiden NOX-Inhibitoren untereinander, zeigt sich bei den aktivierten Dupuytren-Zellen kein signifikanter Unterschied in der Wirkung der beiden Inhibitoren GKT und DPI. Im Gegensatz zu den Karpaltunnel-Zellen. Der hoch signifikante Unterschied in der Proteinexpression zugunsten der Wirkung von DPI beschreibt in dem Fall eine niedrigere Expression von  $\alpha$ -SMA, also weniger Produktion von EZM und kontraktile Filamenten. Betrachtet man die absoluten Zahlen, so wird deutlich, dass die MD-Probanden nach GKT-Zugabe eine höhere Varianz an Proteinexpression zeigen, als die mit DPI behandelten Zellen (siehe Anhang).

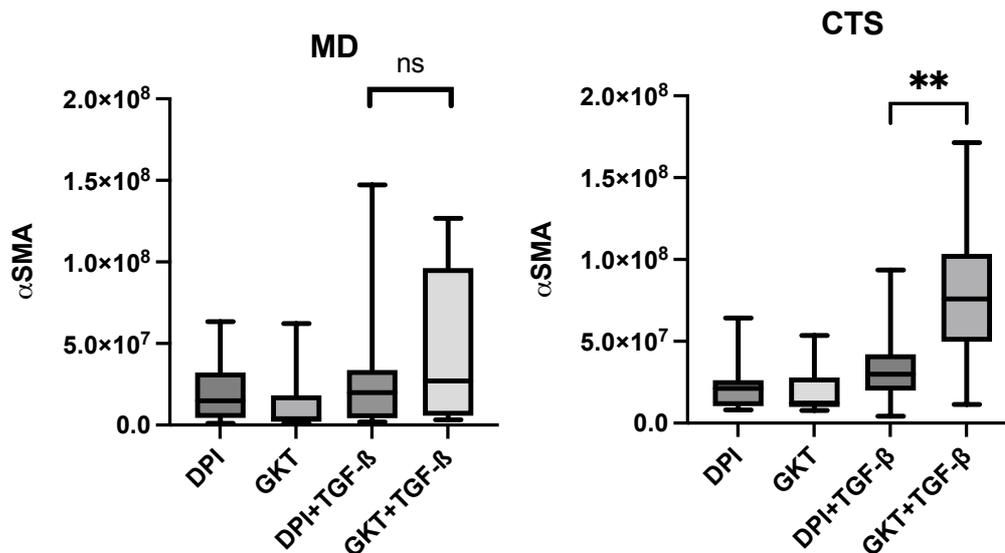
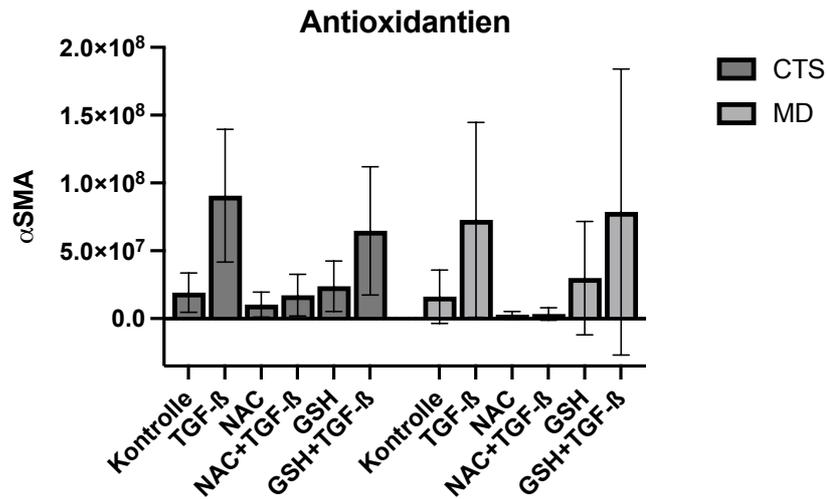


Abbildung 13: Vergleich der NOX-Inhibitoren-Wirkung (GKT137831, DPI) in Bezug auf die absolute Proteinexpression ( $\alpha$ SMA) bei MD-Probanden +TGF- $\beta$  (Signifikanz [ns] $p = 0.1414$ ),  $N=11$  MD sowie bei CTS (Signifikanz [\*\*] $p=0.024$ ),  $N=12$

### 4.3.2 Antioxidantien

Unter 4.3.1 wurden die NOX-Inhibitoren in Bezug auf die  $\alpha$ -SMA-Expression analysiert. Nun werden die beiden Antioxidantien N-Acetylcystein, das als Vorstufe von Glutathion dient und das Glutathion selbst in Bezug auf die Produktion von kontraktile Fasern betrachtet. Die beiden Antioxidantien neutralisieren ROS (reaktive Sauerstoffspezies) und reduzieren dadurch den oxidativen Stress, der bei fibrotischen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Sieht man sich die beiden Patientenkollektive gesondert an (siehe Abb. 14 [A]) zeigt sich ein paralleles Expressionsverhalten in Bezug auf die naiven Zellen sowie die aktivierten Zellen durch den Wachstumsfaktor. Nach Zugabe der Inhibitoren zeigen die Zellen mit dem Antioxidans GSH (red. Gluathion) bei Karpaltunnel- und Dupuytren-Probanden eine ähnlich starke Expression. Unterschiedlich reagieren die Zellen auf das N-Acetylcystein. Zeigt sich bei CTS eine moderate  $\alpha$ -SMA-Expression, so sind die Proteine bei den MD-Probanden kaum mehr nachweisbar. Deutlicher wird diese Beobachtung im gruppierten Vergleich (siehe Abb. 14 [B]).

A



B

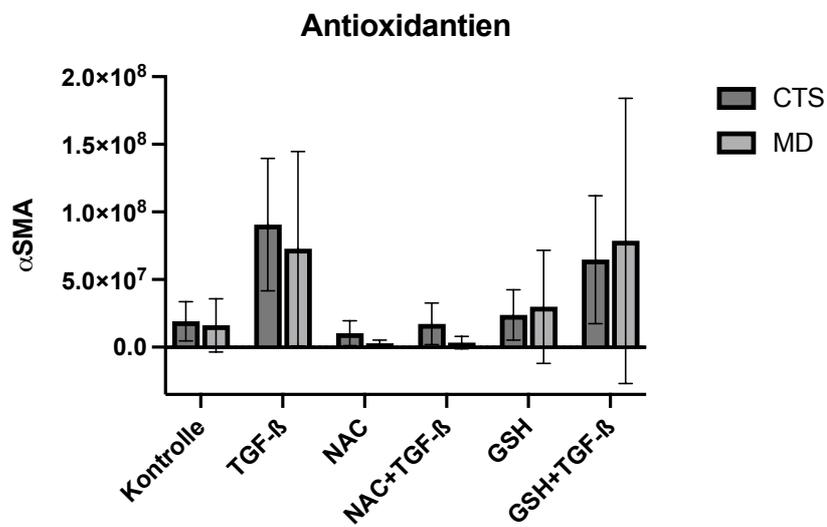


Abbildung 14: Western Blot-Analyse des  $\alpha$ -SMA-Proteins nach Behandlung mit dem Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  +/- Antioxidantien-Zugabe (N-Acetylcystein, Glutathion) Die Behandlung erstreckte sich über fünf Tage +/- Aktivierung der Myofibrogenese durch TGF- $\beta$  (5ng/ml). [A] Darstellung der beiden Gruppen (CTS, MD) im direkten Vergleich [B]gruppierete Darstellung der Behandlungsgruppen)

#### 4.3.2.1 N-Acetyl-L-Cystein

Das N-Acetyl-L-Cystein ist ein starkes endogenes Antioxidans. Die Vorstufe von Glutathion reduziert die ROS-Konzentration den Zellen, indem es die Glutathionproduktion erhöht und als Radikalfänger dient. Speziell in Myofibroblasten führt es durch die Verminderung des oxidativen Stresses, zur Hemmung der TGF- $\beta$  Signalübertragung und dadurch zur Verminderung der EZM-Produktion. In der ersten Versuchsreihe in unserem Experiment zeigte sich bereits sehr rasch, dass die Dupuytren-Zellen lichtmikroskopisch avital sind.

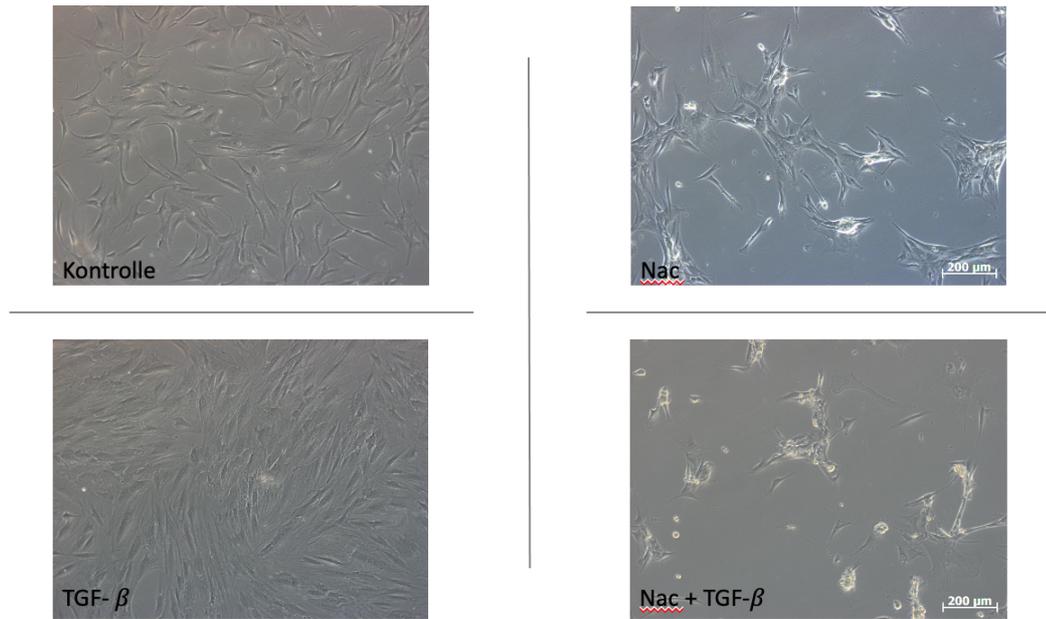


Abbildung 15: Lichtmikroskopischer Vergleich der Morbus-Dupuytren-Zellen +/- TGF- $\beta$  und +/- Nac

Aufgrund dessen wurde ab der zweiten Versuchsreihe das Glutathion anstelle des N-Acetylcysteins eingesetzt.

Bei sehr geringer Probandenzahl (N=5) zeigt sich bei beiden Gruppen jedoch kein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression. Die absoluten Zahlen zeigen hingegen einen Unterschied in der absoluten  $\alpha$ -SMA-Expression. Auch in Bezug auf die Zugabe des Nac zu den naiven Zellen der jeweiligen Gruppe, zeigt sich ein stark verminderter Proteinnachweis.

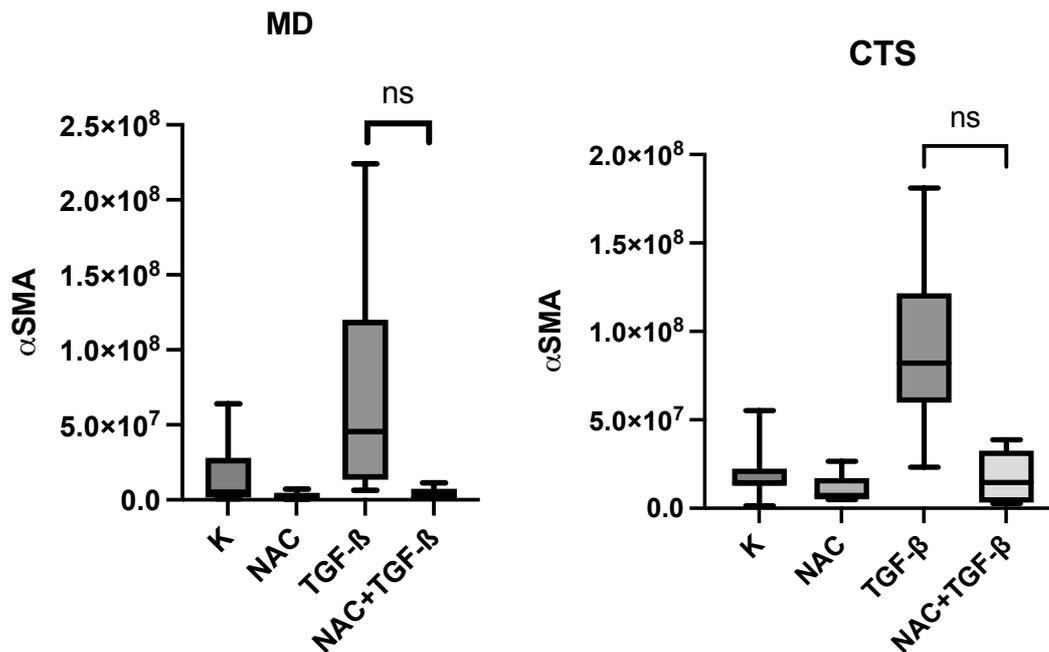


Abbildung 16: Vergleich der absoluten Proteinexpression ( $\alpha$ SMA) nach Zugabe des Antioxidans NAC bei MD-Probanden +TGF- $\beta$  (Signifikanz [ns]  $p=0.1798$ )  $N=5$  sowie bei CTS (Signifikanz [ns]  $p=0.0625$ )  $N=5$

#### 4.3.2.2 Glutathion

Wie unter 4.3.2.1 bereits erwähnt, wurde ab der zweiten Versuchsreihe Glutathion als Antioxidans verwendet. Dabei handelt es sich um ein intrazelluläres Antioxidans, das ebenso eine wichtige Rolle beim Schutz der Zellen vor oxidativem Stress spielt. In Myofibroblasten kann die Erhöhung des Glutathionspiegels durch exogen verabreichtes Glutathion oder durch die Verstärkung seiner Synthese (durch NAC) die ROS-Entstehung reduzieren. Folglich würde dadurch die EZM-Ablagerung verringert werden und die proliferative Wirkung würde abgeschwächt werden. In Abb. 17 zeigt sich [A] kein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression nach Inhibitorzugabe bei aktivierten MD-Zellen. Im Gegensatz fällt bei den CTS-Probanden eine stärkere Expression durch die TGF- $\beta$  Stimulation auf. In den aktivierten Karpaltunnelzellen gibt es hier jedoch einen signifikanten Unterschied nach Zugabe des Antioxidans.

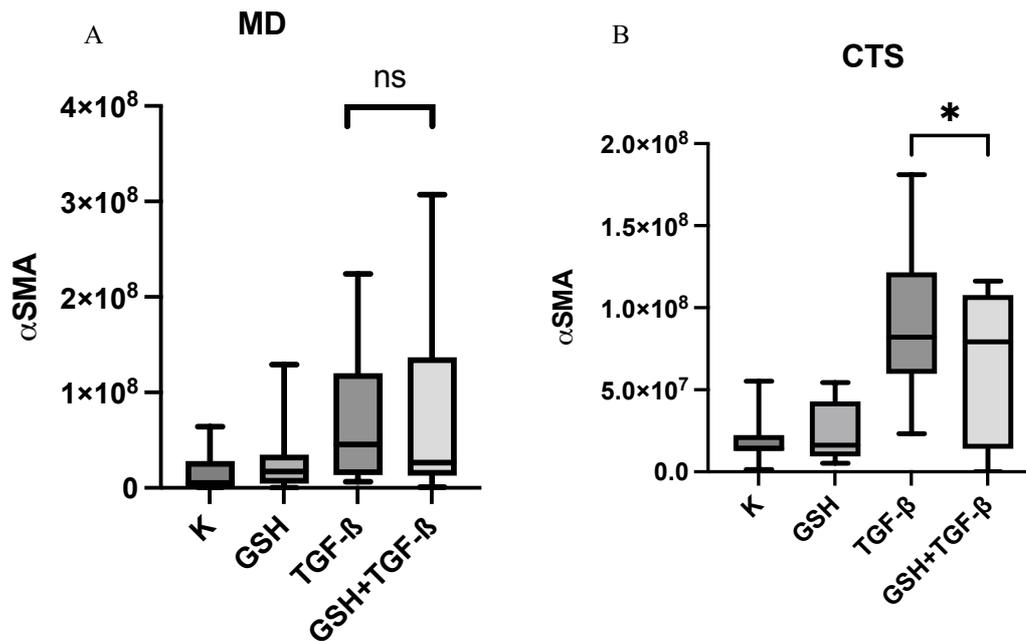


Abbildung 17: Vergleich der absoluten Proteinexpression ( $\alpha$ SMA) nach Zugabe des Antioxidans GSH (red. Glutathion) bei MD-Probanden +TGF- $\beta$  (Signifikanz [ns]  $p=0.4161$ )  $N=8$  sowie bei CTS (Signifikanz [\*]  $p=0.0234$ )  $N=8$

#### 4.3.2.3 Vergleich der Antioxidantien N-Acetylcystein vs. Glutathion

Möchte man die beiden Antioxidantien im Hinblick auf ihre Proteinexpression miteinander vergleichen, so ist das aufgrund niedriger Probandenzahl ( $N=2$ ) nicht möglich.

Aufgrund schwacher Ergebnisse im BCA-Proteinessay wurde bereits ab Proband 6 auf ein anderes Antioxidans – in diesem Fall auf Glutathion- gewechselt. Nur zwei Probanden wurden mit beiden Antioxidantien behandelt. Aufgrund der kleinen Stichprobe kann hierzu keine Aussage bezüglich der Proteinexpression getätigt werden.

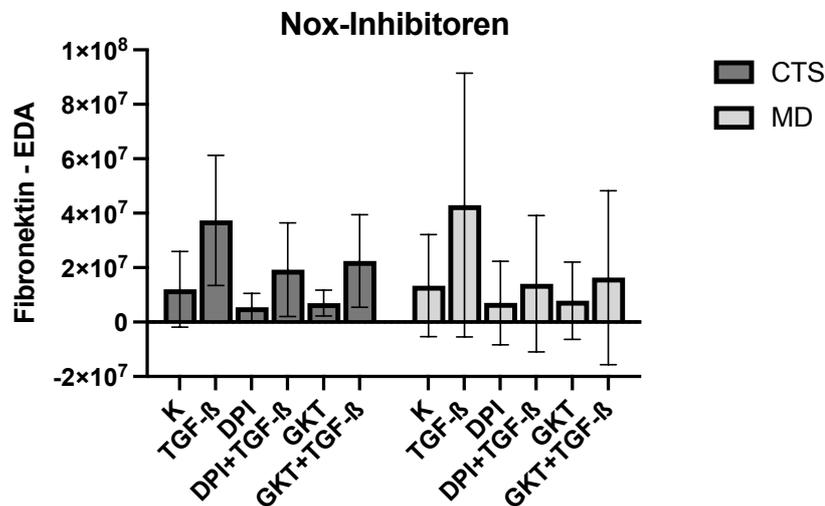
### 4.4 Expression des Myofibroblastenmarker EDA-Fibronectin

Unter 4.3 wurde die Expression des Markers  $\alpha$ -SMA genauer betrachtet. In unserer Versuchsreihe wurde zusätzlich die Expression eines weiteren EZM-Markers, dem sogenannten *extra domain A-containing fibronectin* untersucht. Dabei handelt es sich um ein wichtiges Glykoprotein der extrazellulären Matrix, welches eine wichtige Rolle bei der Gewebereparatur und der Zell-Matrix-Interaktion spielt. Bei Morbus Dupuytren ist EDA-Fibronectin besonders relevant, da es in Verbindung mit der Myofibroblastenaktivierung und der Gewebefibrosierung steht. EDA-Fn bindet an die kontraktilen Fasern -die durch  $\alpha$ -SMA synthetisiert wurden- und führen über einen biomechanischen Prozess zur verstärkten Kollagensynthese und zur Bildung von dichtem, fibrösem Gewebe.

#### 4.4.1 NOX-Inhibitoren

Unter 4.3.1 wurde bereits genauer auf die unterschiedlichen NOX-Inhibitoren eingegangen. In Bezug auf die EDA-Fn-Expression zeigt sich in Abb. 18 [A] ein ähnliches Expressionsmuster bei beiden Patientenkollektiven. Sowohl die Aktivierung durch TGF- $\beta$  zeigt bei beiden eine Zunahme der absoluten Proteinexpression; ebenso kann eine verminderte Expression nach Inhibitorzugabe verzeichnet werden. Im Vergleich zur reinen TGF- $\beta$ -Behandlung zeigt sich bei allen weiteren aktivierten Zellen eine Abnahme der absoluten EDA-Fn-Expression. Ein ähnliches Bild zeigt sich in der gruppierten Ansicht (Abb. 18 [B]). Kleine Unterschiede sind hier jedoch innerhalb der Inhibitoren zu sehen. Zeigt sich noch bei der TGF- $\beta$ -Gruppe eine stärkere Expression bei den MD-Probanden, so nimmt die Expression nach Inhibitorzugabe jedoch stärker ab als bei der Kontrollgruppe.

A



B

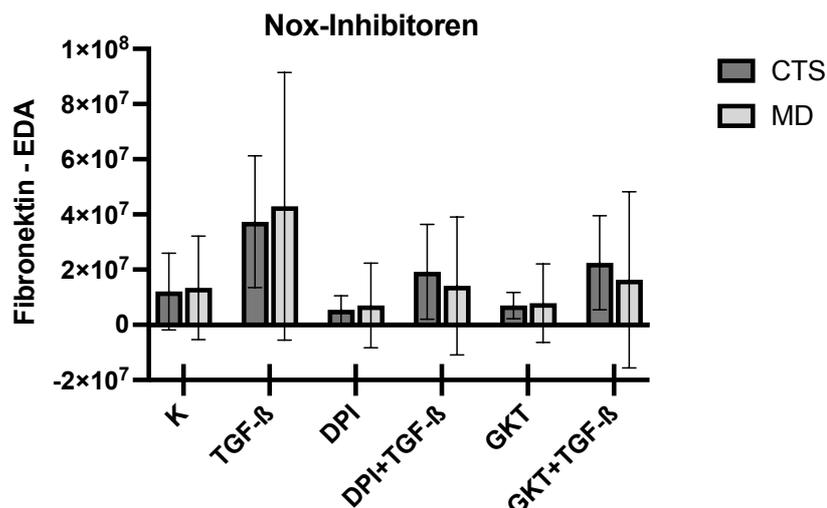


Abbildung 18: Western Blot-Analyse des EDA-Fn Proteins nach Behandlung mit dem Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  +/- NOX-Inhibitoren-Zugabe (DPI, GKT137831) Die Behandlung erstreckte sich über fünf Tage +/- Aktivierung der Myofibrogenese durch TGF- $\beta$  (5ng/ml). [A] Darstellung der beiden Gruppen (CTS, MD) im direkten Vergleich. [B] gruppierte Darstellung der Behandlungsgruppen

#### 4.4.1.1 DPI

In Abbildung 19 wird die absolute Proteinexpression des Markers EDA-Fn bei den MD-Zellen näher beleuchtet. Bereits nach Zugabe des NOX-Inhibitors zu den naiven Fibroblasten, kann bereits ein signifikanter Unterschied in der Expression der Proteine gezeigt werden. Unter Zugabe des Wachstumsfaktors und im Verlauf auch des Inhibitors, wird der Unterschied größer (stark signifikanter Zusammenhang). In der Kontrollgruppe der Karpaltunnel-Zellen zeigt sich nach Inhibitorzugabe im Vergleich zu den aktivierten Zellen ein sehr stark signifikanter Unterschied anhand der absoluten Expression von EDA-Fn.

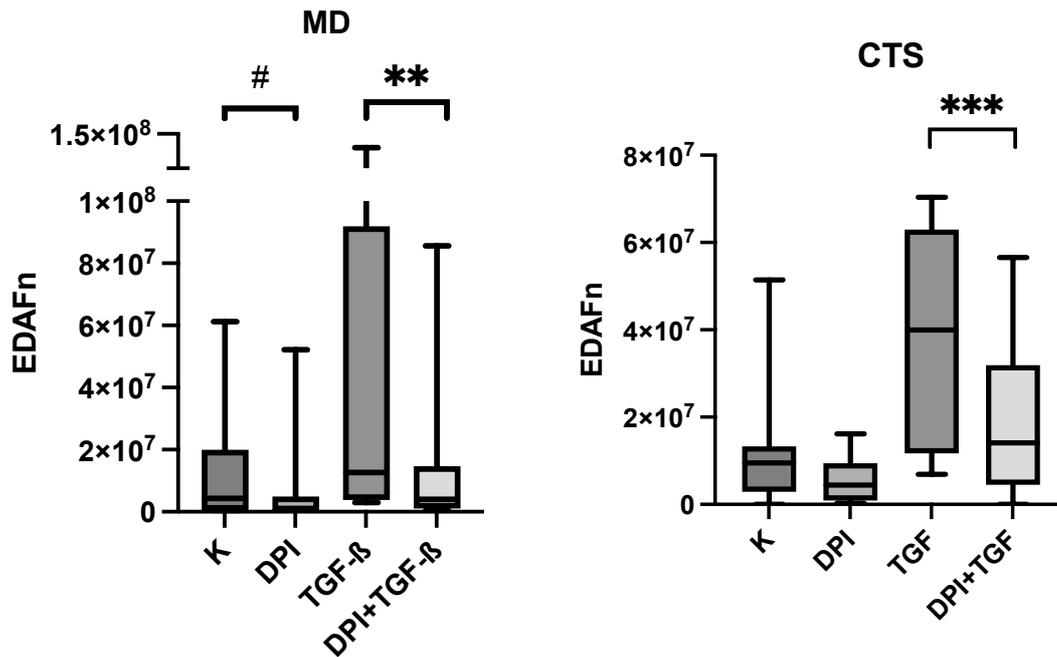


Abbildung 19: Vergleich der absoluten Proteinexpression (EDA-Fn) vor und nach DPI-Zugabe bei MD-Probanden +TGF-β (Signifikanz [#]  $p = 0.0244$ , [\*\*]  $p = 0.0068$   $N=11$ ), sowie bei CTS (Signifikanz [\*\*\*]  $p = 0.0007$ ,  $N=11$ )

#### 4.4.1.2 GKT137831

Bei Zugabe dieses Inhibitors zeigt sich- ebenso wie bei DPI – bereits eine signifikante Abnahme der EDA-Fn Expression bei den naiven MD-Zellen. Bei aktivierten MD-Zellen, also nach TGF-β-Stimulation, beeinflusst die GKT-Zugabe die EDA-Fn Expression sehr stark signifikant.

Ebenso kann diese Beobachtung auch bei CTS-Probanden gezeigt werden, hier jedoch nur mit einer geringeren Signifikanz (siehe Abb. 20).

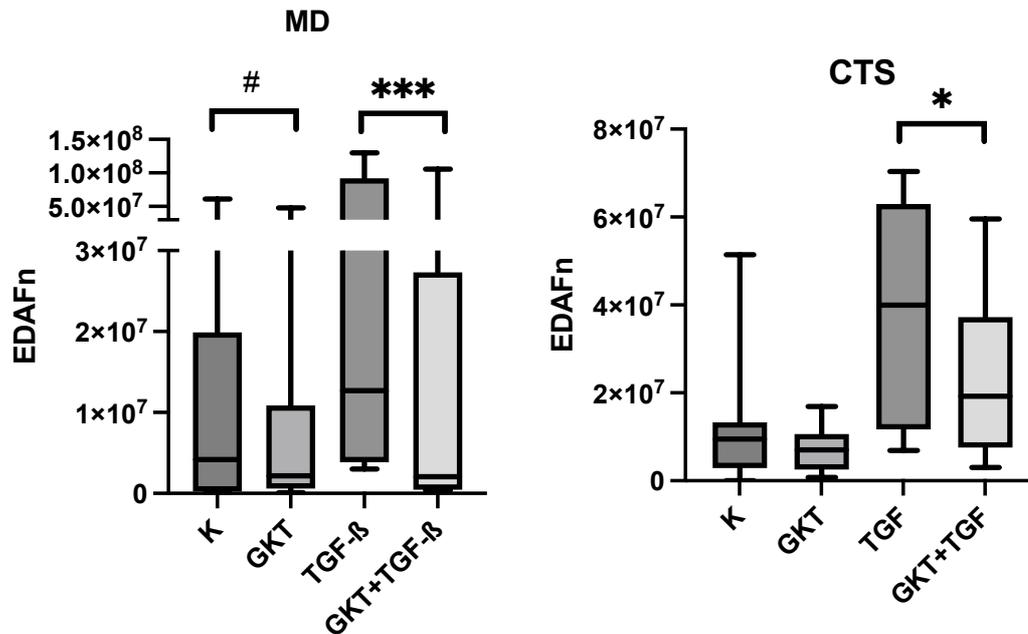


Abbildung 20: Vergleich der absoluten Proteinexpression (EDA-Fn) vor und nach GKT-Zugabe bei MD-Probanden +TGF- $\beta$  (Signifikanz [#]  $p = 0.042$ , [\*\*\*]  $p=0.001$ ),  $N=11$ , sowie bei CTS (Signifikanz [\*]  $p= 0.0329$ ,  $N=11$ )

#### 4.4.1.3 Vergleich der NOX-Inhibitoren GKT137831 vs. DPI

Vergleicht man nun die Wirkung beider NOX-Inhibitoren in Hinblick auf die Expression von EDA-Fibronektin, so kann bei der Dupuytren-Population kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden. Im Gegensatz zum CTS-Kollektiv bildet sich ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den beiden Inhibitoren ab.

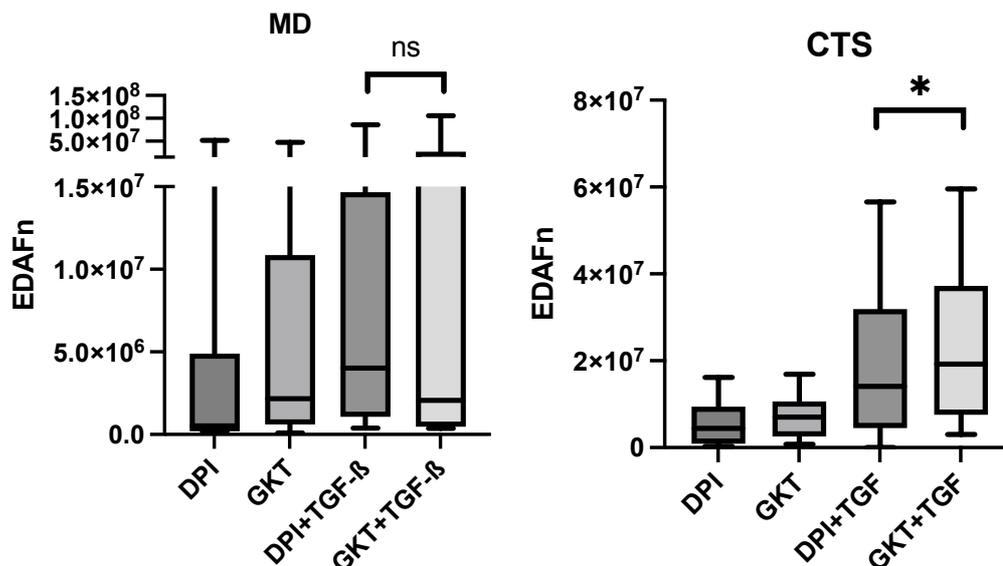
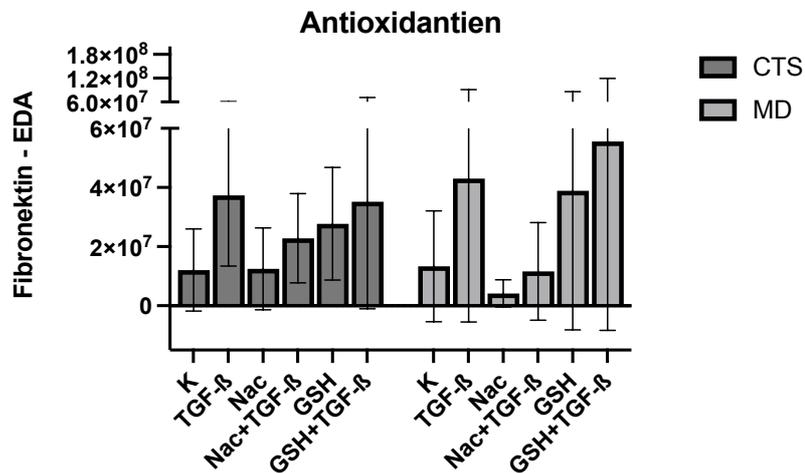


Abbildung 21: Vergleich der NOX-Inhibitoren-Wirkung (GKT137831, DPI) in Bezug auf die absolute Proteinexpression (EDA-Fn) bei MD-Probanden +TGF- $\beta$  (Signifikanz [ns]  $p = 0.8984$ ),  $N=11$ , sowie bei CTS (Signifikanz [\*]  $p= 0.0162$ ,  $N=11$ )

#### 4.4.2 Antioxidantien

Wie bereits unter 4.3.2 näher beschrieben, neutralisieren NAC und Glutathion die reaktiven Sauerstoffspezies und können dadurch den oxidativen Stress in der Zelle reduzieren. In Bezug auf die Expression von EDA-Fibronectin ist festzustellen, dass das Expressionsmuster der absoluten Zahlen prinzipiell ähnlich ausgeprägt ist. Einen Unterschied kann man im Verteilungsverhältnis erkennen. So sind bei NAC-behandelten Dupuytren-Zellen in absolutum weniger Proteine nachzuweisen als bei Karpaltunnel-Zellen. Die Ursache dafür könnte u.a. die geringe Probandenzahl sein (nähere Erklärung siehe 4.3.2). Ebenso fällt die absolute Expression von MD-Zellen nach Zugabe von Glutathion (+/- vorherige Aktivierung) höher aus als bei den CTS-Zellen. Betrachtet man die gruppierte Darstellung (siehe Abb. 22 [B]) wird dieser Umstand deutlicher. Auch hier werden bei den MD-Myofibroblasten deutlich mehr Proteine exprimiert als bei CTS-Zellen.

A



B

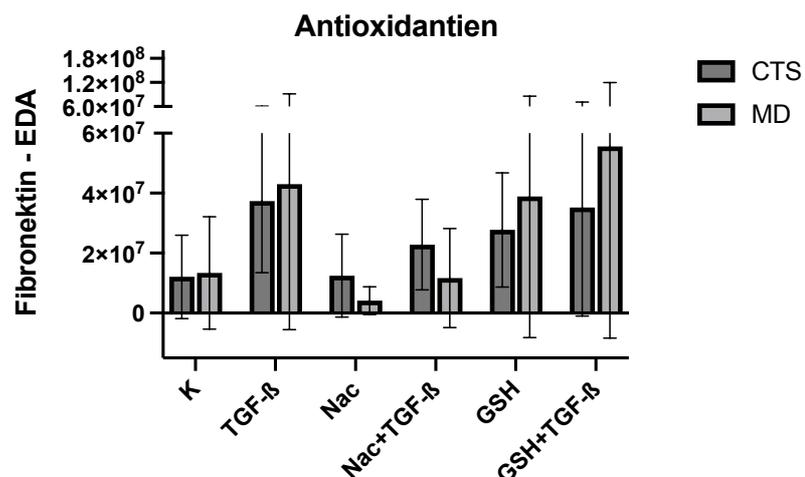


Abbildung 22: Western Blot-Analyse des EDA-Fn-Proteins nach Behandlung mit dem Wachstumsfaktor TGF-β +/- Antioxidantien-Zugabe (N-Acetylcystein, Glutathion) Die Behandlung erstreckte sich über fünf Tage +/- Aktivierung der Myofibrogenese durch TGF-β (5ng/ml). [A] Darstellung der beiden Gruppen (CTS, MD) im direkten Vergleich [B] gruppierte Darstellung der Behandlungsgruppen

#### 4.4.2.1 Glutathion

Bei diesem Antioxidans zeigt sich ebenso nach Zugabe zu naiven MD-Zellen ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Proteinexpression. In diesem Fall jedoch keine Abnahme, sondern eine Zunahme der EDA-Fn Expression. Der gleiche Effekt zeigt sich auch bei aktivierten MD-Zellen, jedoch ohne statistische Signifikanz. In der Kontrollgruppe der Karpaltunnel-Zellen zeigt sich ebenso kein statistischer Zusammenhang, jedoch in Betrachtung der absoluten Zahlen eine milde Abnahme.

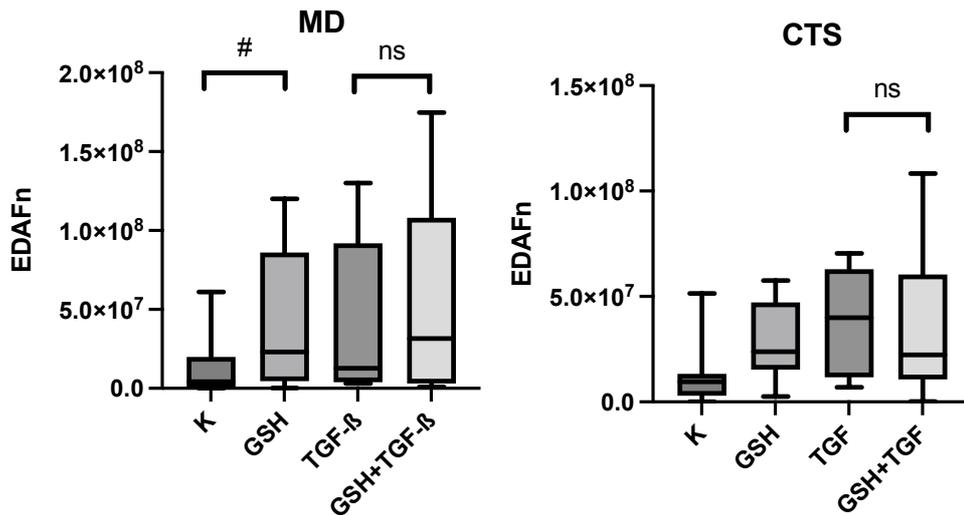


Abbildung 23: Vergleich der absoluten Proteinexpression (EDA-Fn) nach Zugabe des Antioxidans GSH bei MD-Probanden + TGF-β (Signifikanz [#]  $p=0.0391$ , [ns]  $p=0.9453$ )  $N=8$ , sowie CTS-Probanden (Signifikanz [ns]  $p=0.9582$ ),  $N=8$

#### 4.4.2.2 N-Acetyl-L-Cystein

Bei der Vorstufe des Glutathions, also dem NAC, zeigt sich der Effekt aus 4.4.2.1 nicht. Obwohl die Proteinexpression nach TGF-β-Aktivierung absolut mehr EDA-Fn exprimiert, lässt sich nach Inhibitorzugabe keine statistisch signifikante Abnahme der Proteinexpression nachweisen. Wichtig dabei ist wiederum zu beachten, dass die Probandenzahl in den NAC-Versuchen sehr gering ist ( $N=5$ ). Bei den CTS-Probanden konnte ebenso kein signifikanter Zusammenhang beobachtet werden, wobei hier  $N=4$  keine repräsentativen Schlüsse ziehen lässt.

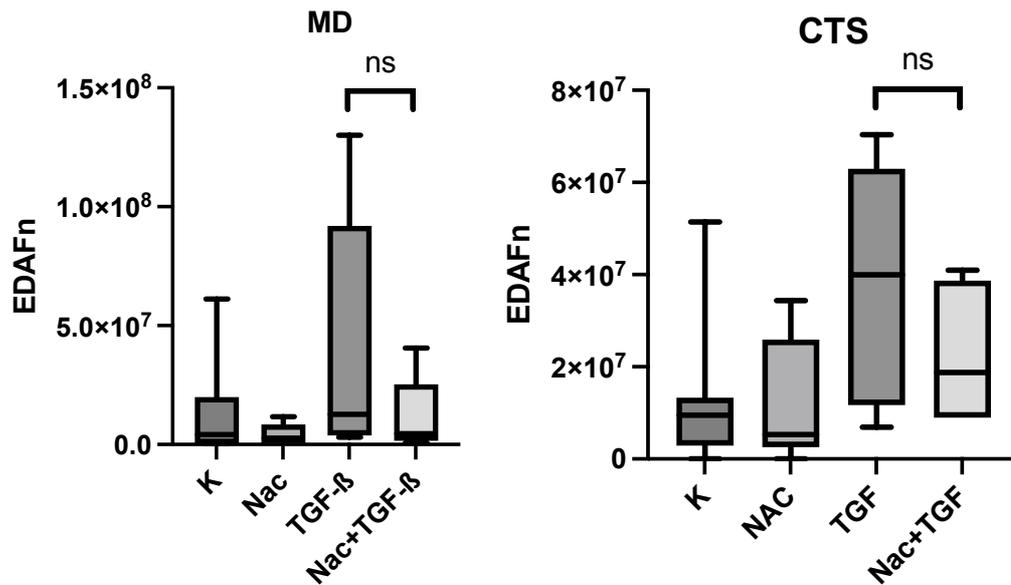


Abbildung 24: Vergleich der absoluten Proteinexpression (EDA-Fn) nach Zugabe des Antioxidans NAC bei MD- Probanden +TGF- $\beta$  (Signifikanz [ns]  $p=0.0625$ )  $N=5$  MD, sowie bei CTS (Signifikanz [ns]  $p=0.4194$ )  $N=4$

#### 4.4.2.3 Vergleich der Antioxidantien N-Acetyl-L-Cystein vs. Glutathion

Möchte man die beiden Antioxidantien im Hinblick auf die Proteinexpression miteinander vergleichen, so ist das aufgrund niedriger Probandenzahl ( $N=2$ ) nicht möglich.

Aufgrund schwacher Ergebnisse im BCA-Proteinessay wurde bereits ab Proband 6 auf ein anderes Antioxidans – in diesem Fall auf GSH- gewechselt. Nur zwei Probanden wurden mit beiden Antioxidantien behandelt. Aufgrund der kleinen Stichprobe kann hierzu keine Aussage bezüglich der Proteinexpression getätigt werden.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Myofibrogenese anhand Dupuytren-Myofibroblasten mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Zum Nachweis der erfolgreichen Aktivierung des Prozesses erfolgte die Erfassung des smooth-muscle-actin Proteins ( $\alpha$ -SMA), sowie des speziell gespleißtem Fibronectin (EDA-Fn). Als Kontrollgruppe wurden Karpaltunnelsyndrom-Probanden verwendet. Wir haben in unserer Forschungsarbeit besonders die molekulare Hemmung der durch TGF- $\beta$  stimulierten Myofibroblasten näher betrachtet und mit verschiedenen Inhibitoren behandelt. Nach Stimulation der MD-Zellen erfolgte täglich für insgesamt fünf Tage eine Beimpfung der in vitro aktivierten Myofibroblasten. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und die Markerproteine der Myofibroblasten durch Western-Blot-Analyse bestimmt.

Wie bereits unter 4.3. bzw. 4.4. zu sehen, reagieren die beiden Gruppen in Abhängigkeit des jeweiligen Proteinmarker mit einem ähnlichen Expressionsmuster auf die verschiedenen Inhibitoren, die in dieser Versuchsreihe verwendet wurden. So zeigt sich in beiden Gruppen nach Stimulierung der Myofibrogenese mit TGF- $\beta$  eine starke Zunahme der absoluten Proteinexpression. Nach Zugabe der Inhibitoren ist bei beiden Gruppen eine verminderte Expression der jeweiligen Proteinmarker zu beobachten. Betrachtet man nun die Inhibitoren untereinander, so zeigen sich interessante Ergebnisse, die als Grundlage zur weiteren Forschung genutzt werden können. Bereits in der vorgeschalteten Arbeit von Uzunmehmet wurden die gleichen Inhibitoren untersucht und an Fibroblasten getestet. In ihrer Arbeit titrierte sie die jeweilige Dosis des Inhibitors, um die maximale konzentrationsabhängige Wirkung zu erreichen (Uzunmehmet, 2019).

### 5.1 Bewertung der Proteinmarker $\alpha$ -SMA und EDA-Fn in der Myofibrogenese

In unserer Versuchsreihe war das Ziel, nach Zugabe der Inhibitoren die Myofibroblasten nachzuweisen. Dafür bedarf es zuverlässige Markerproteine, weshalb  $\alpha$ -SMA und EDA-Fn dafür verwendet wurden. In Bezug auf diese Arbeit kann anhand der alpha-smooth-muscle Proteinexpression ein ähnliches Expressionsmuster in beiden Zielgruppen beobachtet werden. Der Nachweis dieses Oberflächenmarkers zeigt das Vorhandensein von kontraktilen Fasern im Gewebe und ist ein Marker für die Myofibroblasten und indirekt auch für deren Differenzierung (Hindman et al., 2003).

In normalem Gewebe tritt  $\alpha$ -SMA (alpha-smooth-muscle actin-2) z.B. in glatten Muskelzellen auf, wo es maßgeblich an der Vasomotorik oder Peristaltik beteiligt ist; wird aber im krankhaften Gewebe, v.a. im Granulationsgewebe vermehrt in Fibroblasten exprimiert, was schließlich die Kontraktionsfähigkeit mit sich bringt und somit die Gewebespannung verändert. In gesundem Wundgewebe ist das Vorkommen zeitlich beschränkt und die Differenzierung zu Myofibroblasten endet nach der erfolgreich abgeschlossenen Wundheilung. Bei geschädigtem Gewebe, im Rahmen

einer fibrotischen Erkrankung, wird die Differenzierung fälschlicherweise nicht herabreguliert, sondern bleibt bestehen. Der Unterschied zu normalen Gewebefibroblasten ist das Vorhandensein von Stressfasern, die aus Mikrofilamentbündeln bestehen. Dies stellt eine Art Mechano-Transduktionssystem dar, wodurch die entstandene Kraft auf die extrazelluläre Matrix übertragen wird. Zudem kann nun darüber eine intrazelluläre Signalübertragung erfolgen. (Geiger and Bershadsky, 2001)

Eine mechanische Zellverletzung ist nicht ausreichend, um eine  $\alpha$ -SMA-Produktion zu provozieren. Erst durch die TGF- $\beta$ -Exposition als Wachstumsfaktor, wird das Protein exprimiert. In der Untersuchung von Masszi et al., wurde die Rolle der Zell-Zell-Kontakte in Bezug auf den epithelial-mesenchymalen Übergang durch TGF- $\beta$  näher beleuchtet. Dort wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor allein nicht in der Lage war, EMT zu fördern. Erst durch unterschiedliche Störungen konnte diese Transition erfolgen. Durch mechanischen Stress oder durch Cadherin-Verlust bei Calcium-Mangel wurde eine erhöhte Fibronectin und SMA-Expression registriert. Der Wachstumsfaktor potenzierte dies. Zudem zeigte sich  $\beta$ -Catenin als zusätzlicher Transkriptionsfaktor bei Kontaktverlust, der auf TGF- $\beta$  stimulierend wirkt (Masszi et al., 2004).

Unter 1.3.3 wurde der TGF- $\beta$  Signalweg näher beleuchtet. Zusammenfassend lässt sich aber sagen, dass TGF- $\beta$  an Smad-Proteine bindet, einen Komplex bildet und schließlich im Zellkern als Transkriptionsfaktor die Genexpression fördert. (Hinz et al., 2007) Zudem kann er auch ohne Smad-Proteine die weitere Myofibroblastendifferenzierung induzieren.

Wie bereits bekannt, hängt die  $\alpha$ SMA-Expression von der EDA-Fn-Interaktion zusammen mit der Zelloberfläche und dem Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  ab. In Studien wurde herausgefunden, dass die Zunahme der Gewebespannung zu einer erneuten TGF- $\beta$ -Stimulation führt und schließlich die  $\alpha$ SMA-Expression erleichtert. Somit herrscht eine direkte Proportionalität zwischen der  $\alpha$ SMA-Expression und der Kraftgenerierung durch Myofibroblasten. (Tomasek et al., 2002) Neben  $\alpha$ SMA ist TGF- $\beta$  auch an der Synthese einer alternativ gespleißten zellulären Fibronectin-Form (EDA-Fn) beteiligt. Nicht nur der bereits mehrfach erwähnte Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  fördert die Myofibroblastendifferenzierung, sondern auch das reaktive Sauerstoffspezies Superoxid, bei dem es sich um das Produkt der NAD(P)H-Oxidase handelt. Auch hier wirkt der Wachstumsfaktor mit. *In vitro* stimulierte dieser die Bildung von *stressfibres*, sowie die – bereits bekannte – Expression von  $\alpha$ SMA und EDA-Fn. Zusätzlich erhöhte sich auch die NOX2 und NOX4-Aktivität, was wiederum die Entstehung von ROS durch TGF- $\beta$  bestätigte. Bereits in der Vergangenheit wurden verschiedene Inhibitoren (DPI, interferierende RNA, SIS3) untersucht, die eine Reduktion der  $\alpha$ SMA und EDA-Fn Konzentration bewirken, jedoch auf unterschiedliche Weise. In der wissenschaftlichen Arbeit von Bondi et al (2010) wurden zudem die beteiligten Schritte der Signalkaskade genauer beleuchtet. Ausführlich wurde die Signalisierung unter 1.3.3 und die Bedeutung der NADPH-Oxidase4 unter 4.3.1 besprochen.

Ein weiterer Oberflächenmarker, anhand dem in dieser Arbeit die Wirkungsweise der Inhibitoren untersucht wurde, war die Spleißvariante EDA (Extra-Domain-A) des Fibronectins, die während des fibrotischen Prozesses prominent exprimiert wird und zur Myofibroblastendifferenzierung beiträgt. (Klingberg et al., 2018) Diese Domäne wurde durch einen speziellen Spleißvorgang an das Fibronectin-Molekül gebunden. Wie bereits besprochen, setzt eine  $\alpha$ SMA-Expression, die EDA-Fn Produktion voraus. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Bindung einer speziellen Sequenz der extra-Domäne A an den  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-Integrinrezeptor gefördert wird und somit zur Fibroblastendifferenzierung führt. Dadurch werden verschiedene Kinasen aktiviert, unter anderem die MAP-ERK1/2-Kinase, die zum typischen Phänotyp der Myofibroblasten führen. (Kohan et al., 2010) Schließlich lässt sich sagen, dass ein positiver Zusammenhang zwischen der Stimulation durch den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ , der Zellproliferation, der Bildung von EDA-Fn und schließlich zur Ausbildung der typischen Myofibroblasten-Konfiguration besteht.

## 5.2 Wirkungsweise der NOX-Inhibitoren

In dieser Forschungsarbeit wurden DPI (= Diphenyleniodoniumchlorid) und GKT137831 als interessante NOX-Inhibitoren in Bezug auf die Myofibroblastengnese der Morbus Dupuytren Probanden verwendet. Bei dem eingesetzten Chlorid handelt es sich um einen flavinspezifischen Wirkstoff, der schließlich zu einer Radikalbindung führt und dadurch die Elektronentransportkette bzw. die Differenzierung nicht mehr stattfinden kann (O'Donnell et al., 1994).

Im Vergleich zu den Vorarbeiten wurden in unserer Versuchsreihe ähnliche Ergebnisse in Hinblick auf die Myofibroblastendifferenzierung erzielt. In beiden Gruppen (Morbus Dupuytren, Karpal-Tunnelsyndrom) war eine reduzierte  $\alpha$ SMA-Expression zu beobachten. Nach Zugabe von 10  $\mu$ M DPI zu den TGF- $\beta$  behandelten Zellen, zeigt sich eine hoch signifikante Abnahme ( $p = 0.0047$ ) der Proteinexpression. Diese Behandlung führte zu einer irreversiblen Reaktion und zeigt sich schließlich in einer erniedrigten  $\alpha$ SMA-Expression und folglich einer verminderten Myofibroblastengnese.

Zeitgleich zeigt sich in Abbildung 10 bzw. 11, dass DPI keine Auswirkung auf Zellen ohne TGF- $\beta$ -Aktivierung hat. Beide Boxplots (Kontrolle und DPI-Zugabe) zeigen eine ähnliche Struktur auf. In unserer Versuchsgruppe der Morbus Dupuytren Zellen zeigt sich interessanterweise der Graph (DPI+TGF- $\beta$ ) und somit die Proteinexpression ähnlich niedrig zur Kontrollgruppe. Demnach kann mit dem Inhibitor DPI die TGF- $\beta$  Aktivierung fast vollständig rückgängig gemacht werden.

Ähnlich präsentieren sich die Beobachtungen bei Expression des Markers EDA-Fibronectin (EDA-Fn). Auch hier kann ein hoch signifikanter Rückgang ( $p = 0.0068$ ) des Markers nach Behandlung der durch TGF- $\beta$  stimulierten Zellen beobachtet werden (Abb. 19). Ohne Stimulation kann auch bei naiven Zellen bereits eine signifikante Hemmwirkung ( $p = 0.0244$ ) nachgewiesen werden. So präsentiert sich durch die irreversible Hemmung der Myofibrogenese eine Abnahme der Zellkörper

(visualisiert anhand der blauen Zellkerne). Durch die Hemmung der flavinhaltigen Enzyme verändert sich ebenso ihre Struktur.

In der Vorarbeit von Uzunmehmet konnte die irreversible Wirkung von DPI an Fibroblasten bestätigt werden. Auch hier zeigte sich eine stark verringerte  $\alpha$ -SMA-Expression. Die konnte durch die Kombination mit Blaulicht weiter gesteigert werden. Im Gegensatz zu EDA-Fn konnte eine noch stärkere Wirkung gezeigt werden. Somit wurde festgestellt, dass DPI eine unterschiedliche Hemmstärke auf die einzelnen Myofibroblastenmarker hat.

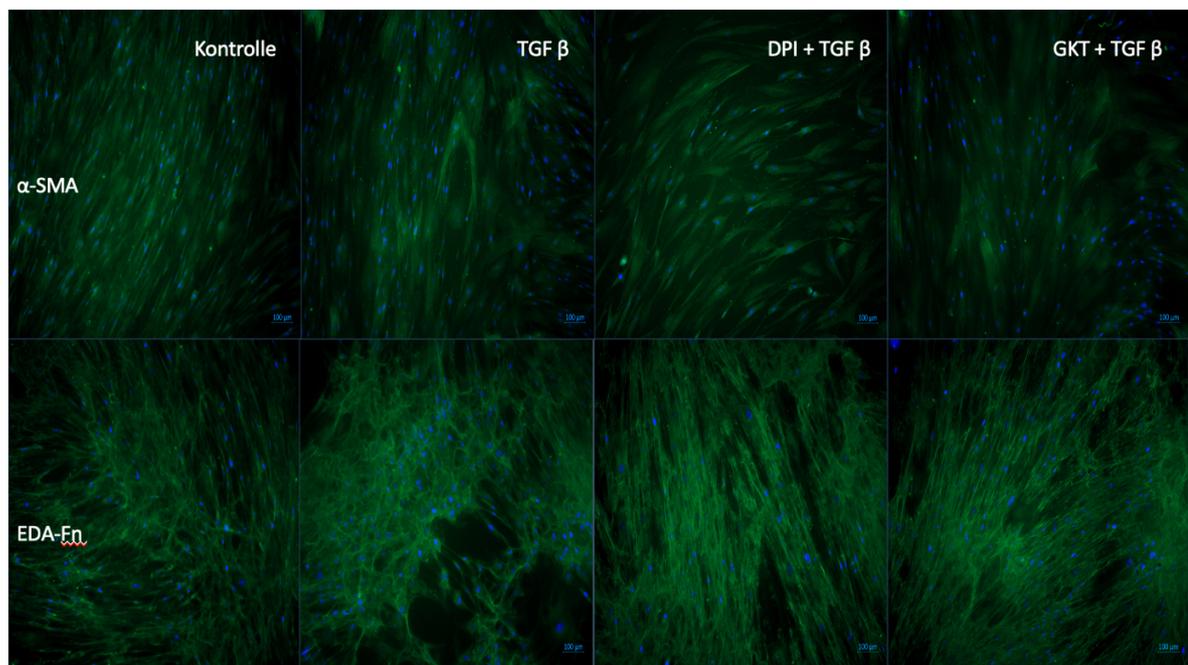


Abbildung 25: Immunhistochemische Darstellung der NOX-Inhibitoren DPI und GKT137831 bei Morbus Dupuytren, aufgezeigt an beiden Proteinmarkern ( $\alpha$ -SMA, EDA-Fn). Im Bild ersichtlich sind blau die Zellkerne zur Veranschaulichung der relativen Zellzahl und grün die  $\alpha$ -SMA-Fibrillen bzw. die EDA-Fibrillen.

In Abbildung 25 wurden durch immunhistologische Anfärbung die Ergebnisse der Behandlung der Morbus Dupuytren – Myofibroblasten durch Zugabe von NOX-Inhibitoren besser ersichtlich. Neben einer Zunahme der Proteinkonzentration nach Zugabe des Wachstumsfaktors konnte zudem die Reduktion der Fibrillen bzw. Zellkerne nach Zugabe der etwaigen Inhibitoren gezeigt werden. Diese immunhistologische Aufarbeitung diente dazu, die bereits in der Western Blot-Analyse gezeigten Ergebnisse zu visualisieren und zu bestätigen.

Im Vergleich zu DPI, das vor allem den Elektronentransfer innerhalb der Flavoproteine aller NOX-Komplexe hemmt, hemmt GKT137831 spezifisch die an der Myofibroblastengnese beteiligte NOX4 (und NOX1). Letzterer wurde bereits bei der Therapie der Leberfibrose experimentell untersucht und in klinischen Studien für diabetische Nephropathie getestet (Sampson et al., 2014, De Livera et al., 2020). In unseren Untersuchungen konnte der Einfluss auf die  $\alpha$ -SMA Aktivierung in dermalen Myofibroblasten in Bezug auf unsere Versuchsgruppe bestätigt werden. Anders als in der Vorarbeit von Uzunmehmet beobachtetem fehlenden Einfluss auf die  $\alpha$ -SMA - Expression (a.e. aufgrund niedriger Probandenzahl), zeigte sich bei uns ein signifikanter Unterschied ( $p=0.0429$ ). Im Gegensatz dazu konnte in der Vergleichsgruppe der Karpaltunnel-

Zellen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden bzw. bei der Betrachtung der EDA-Fn-Gruppe zeigte sich eine Signifikanz ( $p=0.0329$ ). In der Vorarbeit von Uzunmehmet wurde die Wirkung von GKT in Verbindung mit Bestrahlung mit blauem Licht und zusätzliche Verabreichung von Antioxidantien untersucht. Durch die alleinige Gabe von GKT137831 wurde eine verminderte  $\alpha$ -SMA-Expression in stimulierten Fibroblasten registriert. Durch die zusätzliche Behandlung mit blauem Licht betrieben die Zellen Apoptose. Um die antioxidative Wirkung bzw. die Abwehr der ROS-Bildung zu bestätigen, wurden im nächsten Schritt Antioxidantien (Glutathion, NAC) eingesetzt. Als Ergebnis konnte eine verminderte Apoptoserate unter GSH als NAC nachgewiesen werden, sodass ein Hinweis auf eine verstärkte Wirkung zugunsten des Glutathions beschrieben wurde. (Uzunmehmet, 2019) In unserer Versuchsreihe zeigte sich passend zu unserer immunhistochemischen Darstellung kein signifikanter Unterschied zwischen dem Einsatz von DPI ( $p=0.1414$ ) oder GKT137831 ( $p=0.8984$ ). In Bezug auf unsere Hypothese, welche Rolle die NADPH-Oxidase4 in der Pathogenese des Morbus Dupuytren spielt, kann aufgrund vorliegender Ergebnisse eine bedeutende Rolle des Enzyms postuliert werden. Aufgrund verminderter Ausprägung der Surrogatmarker zeigt sich ein wirksamer Einfluss der beiden NOX-Inhibitoren auf die Myofibrogenese der Dupuytren-Erkrankung.

### **5.3 Wirkungsweise der Antioxidantien**

Die Wirkung durch N-Acetylcystein auf die TGF- $\beta$ -vermittelte Expression von  $\alpha$ -SMA wurde bereits 2017 beschrieben. Damals wurden Zahnfleisch- und Hautfibroblasten mit NOX-Hemmern bzw. Antioxidantien behandelt und bereits damals konnte ein Effekt auf die Synthese der EZM beschrieben werden. (Murphy-Marshman et al., 2017).

N-Acetyl-Cystein hemmt effektiv die TGF- $\beta$  – Signalübertragung und verhindert dabei die fibrogenen Eigenschaften der Dupuytren-Zellen und die Produktion von EZM und kontraktilen Filamenten (Kopp et al., 2006). Trotzdem handelt es sich bei diesem Antioxidans um ein biphasisch wirksames Element. Es wurde bereits eine konzentrationsabhängige Wirkung nachgewiesen, wobei eine niedrige Konzentration die Migrationsgeschwindigkeit der Myofibroblasten erhöht und eine hohe Konzentration diese wiederum erniedrigt bzw. hemmt (Nichols and Vaughan, 2016).

In unserer Arbeit zeigte sich ein regelrechtes Sterben der Myofibroblasten, die mit NAC behandelt wurden. Lichtmikroskopisch war nach einmaliger Dosis von  $10\mu\text{M}$  am Folgetag nur noch ein Bruchteil lebender Zellen zu beobachten. Der Rest zeigte sich in geschrumpfter und für Myofibroblasten untypischer Form. In diesen Proben konnte keine Proteinexpression mehr erfolgen. Als Schlussfolgerung betrieben die Dupuytren-Zellen entweder Apoptose oder wurden vorübergehend inaktiviert, so wie es bereits bei Kisseleva et al. 2012 beschrieben wurde. Da diese Beobachtung erst im Laufe der Versuchsreihen beobachtet wurde, wurde als Schlussfolgerung die Behandlungsfrequenz von 1x/Tag in 5 Tagen auf 1x in 5 Tagen erweitert,

sowie die weiteren Versuchsreihen anstelle von N-Acetylcystein mit dem Glutathion (GSH) behandelt. Bei N-Acetylcystein handelt es sich um eine indirekte Cysteinquelle für die GSH-Synthese in der Zelle. Durch die Glutathionperoxidase kann GSH Wasserstoffperoxid und weitere reaktiven Sauerstoffspezies reduzieren und die Zelle vor oxidativem Stress schützen und sogar ROS-Moleküle abfangen (Krassovka, 2017, Morley et al., 2003).

Die Auswertung der Proteinexpression zeigte schließlich bei niedriger N-Zahl keine Signifikanzen, die jedoch eine Richtung symbolisierten. So zeigt sich nach Zugabe des N-Acetylcysteins eine stark verminderte Expression von  $\alpha$ -SMA sowie von EDA-Fn und schließlich eine deutliche Reduktion der Myofibrogenese. Durch seine leichte Verfügbarkeit wäre ein therapeutischer Ansatz denkbar, sodass man durch lokale Intervention dem Prozess entgegenwirken kann und bestenfalls die Rezidivrate des Morbus Dupuytren zu verringern.

Wie bereits erwähnt, wurde in den Folgeversuchen Glutathion eingesetzt. Dabei handelt es sich ebenso um ein Molekül mit antioxidativer Wirkungsweise, wodurch versucht wird, den oxidativen Stress auszugleichen (Proell et al., 2007). Es handelt sich dabei um einen der wichtigsten Puffer für reaktive Sauerstoffspezies und ist in fast allen Gewebezellen vorhanden. Dieses Thiol besteht aus reduziertem Glutathion (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG). Die relative Verteilung bestimmt den Redoxstatus und wird „durch die Redoxreaktion, die Oxidation der Thiolgruppe und die Reduktion der Disulfidbindung reguliert“ (Ono et al., 2009). Durch seine Wirkung als Reduktionsmittel kann es zur Reduktion von Disulfiden kommen und daher zu Veränderungen der Struktur verschiedener Zielproteine. Deshalb ist es z.B. möglich, in Abhängigkeit der GSH-Konzentration, Smad3-Proteine zu verändern und dadurch den Signalweg reversibel zu unterbrechen (Ono et al., 2009).

Eine genauere Untersuchung zur Wirkung bei proliferativen Erkrankungen wurde durch Bonniaud et al. durchgeführt. Dabei wurde mithilfe von  $\gamma$ -Glutamylcysteinethylester ( $\gamma$ -GCE; Vorläufer der GSH-Biosynthese) die TGF- $\beta$  induzierte fibrogene Wirkung in Lungenfibroblasten sowie in glatter Muskulatur untersucht. Als Ergebnis konnte gezeigt werden, „dass ein erhöhter intrazellulärer GSH-Wert die TGF- $\beta$ 1-induzierte Smad3-Aktivierung abschwächen kann“ (Ono et al., 2009). Diese Abschwächung ist reversibel und Smad3 war nach dem Abflachen des GSH-Spiegels wieder auf Ausgangsniveau. Somit konnte eine schädliche Wirkung ausgeschlossen werden (Ono et al., 2009).

Glutamin kann als Ausgangsstoff für Myofibroblastenmetabolite verstanden werden. Durch die Glutaminase erfolgt eine Umwandlung in das körpereigene Glutamat und durch die Glutamat-Dehydrogenase schließlich zu  $\alpha$ -Ketoglutarat und kann somit in den Zitronensäurezyklus eingeschleust werden. Generell kann TGF- $\beta$  die Glutaminase stimulieren (Ono et al., 2009). Bernard et al untersuchten, inwiefern ein Glutamin-Defizit die Myofibrogenese beeinflusst. Als Resultat konnten sie eine signifikante Reduktion der EDA-Fn Expression feststellen;  $\alpha$ -SMA

wurde durch einen Mangel an Glutamin nicht beeinflusst. Erst durch eine totale Depletion des Moleküls konnte eine Beeinflussung der Expression von beiden Markern registriert werden. Als abschließende Beobachtung konnte Bernard et al. festhalten, dass „die anhaltende Aktivierung von Myofibroblasten von der Verfügbarkeit von Gln abhängt. Die Gln-Depletion fördert jedoch nicht die Dedifferenzierung von Myofibroblasten.“ (Bernard et al., 2017)

In unserer Arbeit zeigte sich bei der Untersuchung der Glutathion-Wirkung auf die Proteinexpression folgendes: Betrachtet man unter Abb. 17 die  $\alpha$ -SMA- und unter Abb. 23 die EDA-Fn-Expression nach GSH-Zugabe, so lässt sich jeweils kein signifikanter Unterschied ( $p=0.4161$  vs.  $p=0.9453$ ) zur reinen Aktivierung durch TGF- $\beta$  darstellen. Die Zellen wurden in unseren Versuchen 1x täglich (ca. alle 24h) mit den Inhibitoren neu versetzt und dies für insgesamt 5 Tage. In den Versuchen von Ono et al. konnte eine zeitabhängige Wirkung von GSH demonstriert werden. So war nach  $\gamma$ -GCE-Zugabe (Vorstufe von GSH) nach ca. 4h die GSH-Konzentration signifikant erhöht und nach ca. 16h kehrte der intrazelluläre Spiegel auf das Ausgangsniveau zurück. Da in unseren Versuchen jedoch GSH verwendet wurde, ist nicht sicher zu sagen, ob auch diese Konzentration (153,66 mg) möglicherweise nicht ausreichend ist für eine 24-stündige Wirkung. So wäre es sinnvoll, in weiteren Studien die zeitabhängige  $\alpha$ -SMA-Konzentration zu betrachten.

Weiterhin zeigt sich in unseren Versuchen (Abb. 23) bereits eine Zunahme der Expression von EDA-Fn bei unbehandelten Dupuytren'schen Zellen, sodass die Vermutung auf eine proliferative Wirkung gestellt wird. Da nur eine geringe Probandenzahl ( $N=8$ ) beprobt wurde, wäre es notwendig in weiteren Untersuchungen diesen Effekt genauer zu untersuchen und ggf. zu widerlegen bzw. zu bestätigen.

Möchte man eine Aussage über die Effektivität der Wirkung der beiden Antioxidantien tätigen, benötigt es eine erneute Untersuchung der beiden Antioxidantien simultan. Da sich nach bereits 5 Probanden eine starke Reduktion der vitalen Zellen unter N-Acetylcystein zeigte, wurde während des Versuches auf Glutathion rotiert und somit gibt es nur wenige Probanden, die mit beiden Antioxidantien behandelt wurden.

Um die These zu unterstützen, wurde erneut eine immunhistochemische Färbung angefertigt (Abb. 26). Wie zu erkennen, hat sich nach der jeweiligen Behandlung mit den beiden Antioxidantien die Fibrillenstruktur stark verändert. So zeigen sich diese bei  $\alpha$ -SMA unter NAC spindelförmig und durchlöchert und nach GSH-Zugabe eher verschwommener Natur. Die Zellkerne sind bei beiden noch deutlich sichtbar und kaum vermindert. Bezogen auf die EDA-Fn Expression zeigt sich die Fibrillenstruktur netzartig verändert mit Abnahme der Zellkerne.

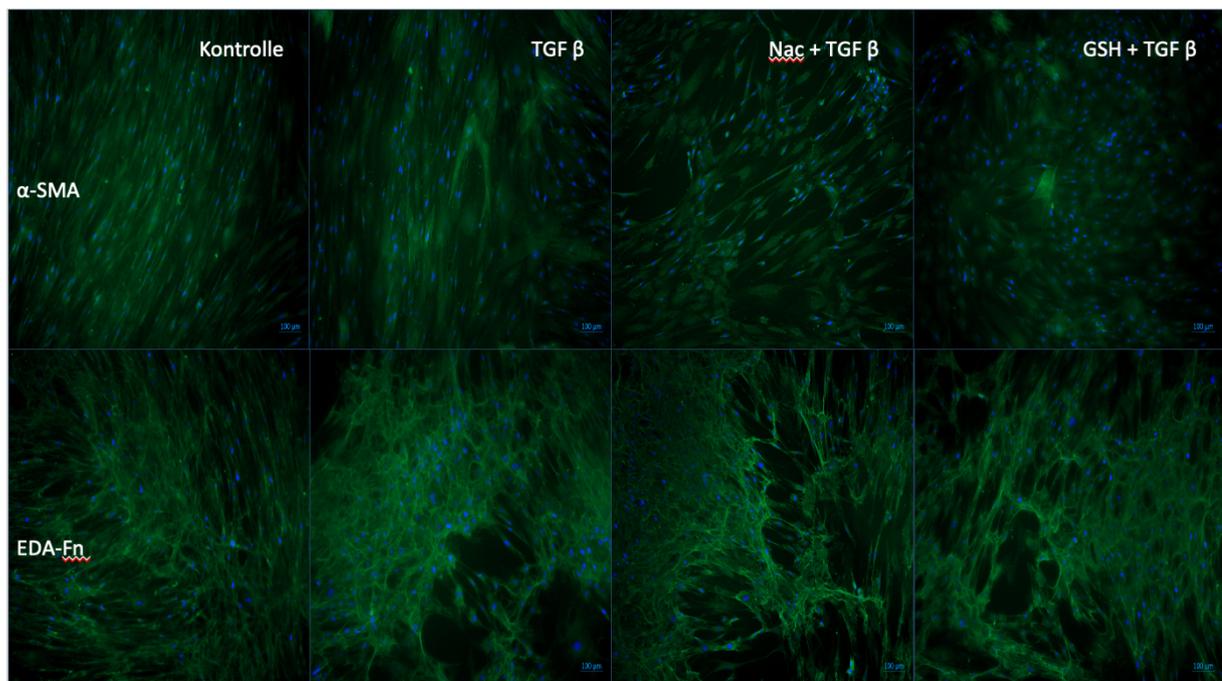


Abbildung 26: Immunhistochemische Darstellung der Antioxidantien Nac und GSH im Morbus Dupuytren, aufgezeigt an beiden Proteinmarkern ( $\alpha$ -SMA, EDA-Fn). Im Bild ersichtlich sind blau die Zellkerne zur Veranschaulichung der relativen Zellzahl und grün die  $\alpha$ -SMA-Fibrillen bzw. die EDA-Fibrillen.

#### 5.4 Aktuelle Datenlage und Aussicht im Hinblick auf weitere mögliche Inhibitoren der Myofibrogenese sowie klinische Relevanz

Neben DPI und GKT137831 gibt es noch weitere NOX-Inhibitoren. Einige wurde ebenso in diversen wissenschaftlichen Arbeiten näher durchleuchtet. Bei Apocynin, einem natürlichen Acetophenon, handelt es sich ebenso um einen NOX-Inhibitor. Er hat in verschiedenen Studien bereits seine antifibrotische Wirkungsweise gezeigt. (Cheng et al., 2016) konnten bereits 2016 die Herabregulation des oxidativen Stresses und der Myofibroblastenakkumulation nachweisen, indem es NOX2 und NOX4 hemmte. Ebenso hat es antioxidative Fähigkeiten und hemmt speziell die Wasserstoffperoxidproduktion. Sogar eine Beeinflussung des für uns wichtigen TGF- $\beta$ /Smad-Signalwegs wurde dem Wirkstoff im Rahmen der Pathogenese der diabetischen Nephropathie nachgewiesen (Savla et al., 2021). Im Gegensatz dazu bezeichnen Bedard und Krause Apocynin als nicht „leistungsfähiges Instrument“ (Bedard and Krause, 2007). Es wurde nicht nur in sehr hohen Konzentrationen zur NOX4-Inhibition eingesetzt, sondern auch bei Zelltypen ohne Peroxidase (Bedard and Krause, 2007). Eine Beeinflussung der Myofibrogenese im Rahmen der Morbus Dupuytren Entstehung wäre somit tendenziell denkbar. Ein Vorteil wäre auf jeden Fall die leichte Verfügbarkeit des pflanzlichen Wirkstoffes.

Ebenso gibt es bereits Studien zu dem natürlichen Chinon-Derivat Plumbagin, welches ebenso die NOX4 – Synthese hemmt und somit die NOX4 – Signalübertragung und ROS-Entstehung unterbricht und dadurch die Myofibroblastendifferenzierung verhindert. Bei der genaueren Untersuchung des Wirkstoffes im Rahmen der diabetischen Nephropathie konnte gezeigt werden,

dass Plumbagin signifikant die durch TGF- $\beta$ -induzierte Expression der Marker Fibronectin und Kollagen-IV hemmt. (Sampson et al., 2014, Yong et al., 2013)

Celastrol, ein weiteres pflanzliches Derivat, hemmt neben NOX2/4 auch NOX1 und wurde bereits in der Metaanalyse von Khairudin et al. (2023) ausführlich aufgearbeitet. In verschiedenen Untersuchungen konnte bereits sein antifibrotisches Potenzial bei Leber-/Lungen- und Nierenfibrose bestätigt werden. Die Studienlage zur möglichen Toxizität ist aktuell noch nicht ausreichend und bedarf noch weiterer Forschung. (Mohd Khairudin et al., 2023)

Bereits vor einigen Jahren wurde der mögliche therapeutische Nutzen der Selen-Supplementierung bei nachweislichem Mangel beschrieben. (Khanna et al., 2013) erkannte, dass fibrotische Störungen auch häufig bei Patienten mit Selen-Mangel auftreten. Bereits 2007 wurde beschrieben, dass die antioxidative Wirkung von Selenoprotein P, in Myofibroblasten hochreguliert ist. Dadurch kann es den reaktiven Sauerstoffspezies entgegenwirken (Kabuyama et al., 2007).

In einer aktuellen Studie von Sinaci et al. wurde Hyaluronsäure zur in vitro Behandlung bei Dupuytren'schen Gewebe eingesetzt. Dabei zeigten sich signifikant niedrigere  $\alpha$ -SMA-Werte und eine Abnahme der Myofibroblastenaktivität. Eine weitere klinische Testung ist noch ausstehend (Sinaci et al., 2022).

In einer weiteren sehr aktuellen Studie von 2023 wurden normale Hautfibroblasten und Dupuytren-Myofibroblasten zusammen mit Fett-Stammzellen und plättchenreichem Plasma (PRP) kultiviert und schließlich in ein Tiermodell implantiert. Es konnte erstaunlicherweise eine Transformation der Myofibroblasten in Adipozyten beobachtet werden und eine erhebliche Verringerung des Glattmuskel-Aktins nach Behandlung mit einer Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* oder der Kombination aus Fett-Stammzellen und PRP gezeigt werden. Letztendlich wurden dadurch die kontraktile Fibrose- bzw. Phänotypmarker im Lebendmodell reduziert. Ziegler et al. postulieren eine klinisch relevante Wirksamkeit durch die Behandlung mit Fettstammzellen und PRP zur Reduktion der Faszektomie-Raten sowie der Rezidive. (Ziegler et al., 2023)

Ein weiteres sehr aktuelles Behandlungsinstrument ist das Curcumin, welches in Bezug auf die Zahnfleischwucherung näher betrachtet wurde. Auch in gingivalem Gewebe bedarf es einer Src- / JNK- und Smad3-Aktivierung über den stimulierenden Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1. Durch diese Signalweiterleitung erfolgt eine Überexpression des CCN2-Wachstumsfaktors. In der Arbeit von Yang et al. wurde die Wirkung von Curcumin näher beleuchtet und zeigte, dass durch die Phosphorylierung der beteiligten Signalmoleküle der CCN2-Faktor nicht mehr nachgewiesen werden konnte und schließlich die TGF- $\beta$  induzierte Migration und folgender  $\alpha$ -SMA-Expression gehemmt wurde. (Yang et al., 2013)

Zusätzlich wurde in vergangenen Studien, u.a. in unserem Forschungslabor, die Wirkung von blauem Licht erforscht. Blaues Licht (453 nm) hat bekannterweise eine hemmende Wirkung auf Fibroblasten, wofür die intrazellulären Flavine, die als Photosensibilisatoren dienen, verantwortlich sind. Es wurde bereits herausgefunden, dass durch blaues Licht flavinhaltige Oxidasen reduziert

werden, aber als Konsequenz zu erhöhter ROS-Bildung führt (Suschek et al., 2018). Das Mitochondrium ist fähig Blaulicht zu absorbieren. Durch die Aufnahme des Lichtes führt es schließlich zur Erschöpfung der Atmungskette (flavinhaltige Komplexe I und II), sodass keine Energie zur weiteren Zelldifferenzierung aufgebracht werden kann (Opländer et al., 2011). Diese Reduktion verläuft ohne Oxidation bzw. Substanzverbrauch; damit ist die Enzymreaktion vollständig entkoppelt. Weiterhin wurde untersucht, inwiefern die Bestrahlung bei der Hemmung der Myofibrogenese nützlich sein kann. (Krassovka et al., 2020) Es wurde in experimenteller Forschung nach Inkubation mit ROS und Bestrahlung mit blauem Licht (453nm) eine verminderte  $\alpha$ -SMA Expression in zuvor mit TGF- $\beta$  aktivierten Zellen beobachtet (Krassovka, 2017). In den letzten Jahren wurde in vielen wissenschaftlichen Studien an einer kurativen Therapiemöglichkeit bei Morbus Dupuytren geforscht. In vitro zeigen sich bereits vielversprechende Ansätze, die sicherlich in Zukunft auch in vivo weiter getestet werden. Trotzdem wird diese proliferative Erkrankung leitliniengerecht neben Strahlentherapie und der in Deutschland nicht zugelassenen Kollagenase-Injektion weiterhin hauptsächlich chirurgisch behandelt.

## **5.5 Die Rolle von NADPH-Oxidase 4 und ROS bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten**

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind instabile Moleküle, die aus Sauerstoff abgeleitet sind und sowohl als hochreaktive Radikale (wie Superoxid-Anionen  $[O_2^-]$ , Hydroxylradikale  $[•OH]$ , Peroxylradikale  $[RO_2•]$  und Alkoxyradikale  $[RO•]$ ) als auch als nicht-radikale Verbindungen (wie Ozon  $[O_3]$ , Singulett-Sauerstoff  $[^1O_2]$  und Wasserstoffperoxid  $[H_2O_2]$ ) auftreten können. Diese Verbindungen sind in der Lage, mit einer Vielzahl biologischer Moleküle wie Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren zu interagieren und spielen eine Schlüsselrolle in zellulären Signalwegen. Obwohl ROS in hohen Konzentrationen zelluläre Schäden verursachen und als oxidativer Stress bezeichnet werden, fungieren sie auch als Signalmoleküle, die metabolische Prozesse regulieren. Ein Beispiel hierfür ist die NADPH-Oxidase 4 (NOX4), ein Enzym, dessen Hauptfunktion die Produktion von ROS ist. NOX4 katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxid-Anionen, die anschließend zu Wasserstoffperoxid dismutieren. Diese ROS-Produktion ist entscheidend für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, insbesondere in Reaktion auf den Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- $\beta$ 1), einem zentralen profibrotischen Faktor. In verschiedenen Zelltypen, darunter glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Hepatozyten und Fibroblasten, führt die Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 zu einer erhöhten Expression von NOX4 und einer verstärkten ROS-Produktion. (Bondi et al., 2010, Bedard and Krause, 2007, Leusen et al., 1996, Barnes and Gorin, 2011) Neben den weiteren NOX-Isoformen, die hauptsächlich vaskulär oder renal agieren, spielt NOX4 eine dominante Rolle in profibrotischen

Erkrankungen der Haut. So führt seine Aktivität zur vermehrten Entstehung von Kelloiden und hypertrophe Narben, da das Enzym an der Umwandlung von Fibro- zu Myofibroblasten maßgeblich beteiligt ist. (Babalola et al., 2014)

Gleichzeitig beschäftigten sich Wissenschaftler in der Vergangenheit mit einer Möglichkeit der Redifferenzierung. Dazu wurden bereits mehrere Ansätze mit verschiedenen Substanzen durchgeführt. Gemeinsam ist Ihnen ihre antioxidative Wirkung. In unserer Forschungsarbeit wurden auch zwei antioxidative Wirkstoffe genauer untersucht: N-Acetylcystein und seine Vorstufe das Glutathion (näheres siehe 5.3). Als Erkenntnis dieser Untersuchungen lässt sich rückschließen, dass ein Rückgang der intrazellulären ROS-Konzentration – oder umgekehrt eine sehr hohe ROS-Exposition – ebenfalls zur Redifferenzierung beitragen kann, indem ROS-abhängige Differenzierungssignale unterbunden werden.

## **5.6 Kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse und Fazit**

In dieser Arbeit wurden insgesamt 23 Probanden in die statistische Auswertung mitaufgenommen. Darunter zwölf Karpaltunnelsyndrom-Patienten und elf Morbus Dupuytren-Patienten. Bereits unter Tabelle 2 und 3 ist zu sehen, dass sich nicht alle Proben, die zu Beginn aus erkranktem Gewebe isoliert und angezchtet wurden, schließlich für Versuchsreihen eignen. Neben Kontamination bei der Anzucht, oder Absterben der Myofibroblasten nach Zugabe verschiedener Inhibitorsätze, verringert sich die Zahl der Proben, die sich schließlich zur Proteinbestimmung eignen. Zudem wurden Proben unterschiedlichen Alters verwendet. Auf den ersten Blick kann kein Qualitätsunterschied der Zellen beobachtet werden. Generell empfiehlt es sich hauptsächlich junge Zellen zur Bestimmung zu verwenden.

Während der Anzucht der Zellen, der Proteinbestimmung und schließlich während der Western-Blot-Analyse ergaben sich unterschiedliche Stolperfallen, die unterschiedliche Effekte auf die Versuche hatten. Waren die Zellen bei der Anzucht kontaminiert, so konnten sie leicht neu angesetzt werden, sofern noch ausreichend Zellen im Gefrierschrank verfügbar waren. In unserem Forschungslabor liegt ein Hauptfokus auf die Erforschung der Morbus Dupuytren-Zellen, sodass jeder mit den gleichen Zellproben seine Versuchsreihen durchgeführt hat. Ein weiteres Problem zeigte sich erst nach der kompletten Durchführung einer Versuchsreihe, als bei der Bestimmung der Proteinkonzentration für die anschließende Western Blot Analyse, keine bzw. nur eine sehr geringe Proteinkonzentration bei den mit DPI-behandelten Zellen zeigte. Als Folge wurden die Zellen nur noch an Tag 0 (Tag des Aussäens) mit dem Inhibitor versetzt. In der Kontrolle konnte schließlich eine ausreichende Konzentration bestätigt werden. Während der Verwendung des Antioxidans N-Acetyl-Cystein zeigten sich bereits unter dem Mikroskop eine verminderte Vitalität der Zellen und auch schließlich eine geringe Proteinexpression. Dieser Effekt einer ROS-Reduktion wurde bereits in einer vorgeschalteten Arbeit beobachtet. So wurde während des Experiments nach N=6 das Antioxidans auf Glutathion gewechselt. Bei diesem Antioxidans zeigte

sich die paradoxe Wirkung der Proliferation der Zellen. Dies bedarf zukünftig noch weiterer Untersuchungen, um den Effekt der ROS-Reduktion durch Antioxidantien genauer zu verstehen. Ein weiterer kritischer Punkt war die Western-Blot-Analyse. Es wurde eine ausreichende Menge an Probenmaterial benötigt, um eine ausreichende Proteinkonzentration in den jeweiligen Taschen zu erreichen. Diese wurde durch die vorgeschaltete Proteinkonzentrationbestimmung ermittelt. Abhängig von der Restmenge in den Reaktionsgefäßen konnte keine erneute zweite Gelelektrophorese erfolgen. Um einen Vergleich der beiden Gruppen (CTS und MD) später zu visualisieren, wurden jeweils Paare gebildet, mit ähnlicher Proteinmenge in der Kontrolle. Diese wurden dann auf fertigen Elektrophoresegelen nacheinander aufgetragen. Da die Taschen nicht ausreichend waren, bei zu großer Versuchsreihe, musste ein zweites Gel verwendet werden. Um später einen Vergleich der beiden Gele zu ermöglichen, wurden auch hier zusätzlich unbehandelte und mit TGF- $\beta$  stimulierte Probe aufgetragen. Dieser Vergleich ergab später bei der Auswertung über ImageLab, auch bei der Beachtung der gleichen Belichtungszeit, nicht die gleichen Werte, sodass hier eine mögliche Fehlerquelle besteht. Bei einer erneuten Versuchsdurchführung könnte man hier vermehrt Wert darauf legen, dass man gegebenenfalls die CTS und MD Proben auf jeweils einem Gel darstellt, um einen quantitativen Vergleich zu ermöglichen.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ALEXANDER, S., GIRISHA, B. S., SRIPATHI, H., NORONHA, T. M. & ALVA, A. C. 2019. Efficacy of fractional CO(2) laser with intralesional steroid compared with intralesional steroid alone in the treatment of keloids and hypertrophic scars. *J Cosmet Dermatol*, 18, 1648-1656.
- ALHADY, S. & SIVANANTHARAJAH, K. 1969. Keloids in various races. A review of 175 cases. *Plastic Reconstructive Surgery*, 44, 564-6.
- ALSTER, T. 1994. Improvement of erythematous and hypertrophic scars by the 585-nm flashlamp-pumped pulsed dye laser. *Annals of plast surgery*, 32(2), 186-190.
- AMBASTA, R. K., KUMAR, P., GRIENGLING, K. K., SCHMIDT, H. H., BUSSE, R. & BRANDES, R. P. 2004. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 279, 45935-41.
- ANNES, J. P., MUNGER, J. S. & RIFKIN, D. B. 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*, 116, 217-24.
- APFELBERG, D., MASER, M., WHITE, D. & LASH, H. 1989. Failure of carbon dioxide laser excision of keloids. *Lasers Surgery Medicine*, 9, 382-8.
- APIKIAN, M. & GOODMAN, G. 2004. Intralesional 5-fluoruracil in the treatment of keloid scars. *Australasian Journal of Dermatology*, 45, 140-3.
- ARMSTRONG, J. R., HURREN, J. S. & LOGAN, A. M. 2000. Dermofasciectomy in the management of Dupuytren's disease. *The Journal of Bone & Joint Surgery British Volume*, 82-B, 90-94.
- AVERILL-BATES, D. A. 2023. The antioxidant glutathione. *Vitam Horm*, 121, 109-141.
- BABALOLA, O., MAMALIS, A., LEV-TOV, H. & JAGDEO, J. 2014. NADPH oxidase enzymes in skin fibrosis: molecular targets and therapeutic agents. *Arch Dermatol Res*, 306, 313-330.
- BABU, M., DIEGELMANN, R. & OLIVER, N. 1989. Fibronectin is overproduced by keloid fibroblasts during abnormal wound healing. *Molecular Cell Biology*, 9, 1642-50.
- BARNES, J. L. & GORIN, Y. 2011. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int*, 79, 944-56.
- BEDARD, K. & KRAUSE, K. H. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87, 245-313.
- BERNARD, K., LOGSDON, N. J., BENAVIDES, G. A., SANDERS, Y. Y., ZHANG, J., DARLEY-USMAR, V. M. & THANNICKAL, V. J. 2017. Glutaminolysis is required for transforming growth factor-β1-induced myofibroblast differentiation and activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 293, 1218 - 1228.
- BETZ, N., OTT, O. J., ADAMIETZ, B., SAUER, R., FIETKAU, R. & KEILHOLZ, L. 2010. Radiotherapy in early-stage Dupuytren's contracture. Long-term results after 13 years. *Strahlenther Onkol*, 186, 82-90.
- BHOWMICK N.A., GHIASSI M., BAKIN A., AAKRE M., LUNDQUIST C.A., ENGEL M.E., ARTEAGA C.L. & H.L., M. 2001. Transforming growth factor-β1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell.*, 12, 27-36.
- BIO-RAD LABORATORIES, I. Total Protein Detection, Bulletin 6217 Rev A. Bio-Rad Laboratories, Inc.
- BONDI, C. D., MANICKAM, N., LEE, D. Y., BLOCK, K., GORIN, Y., ABOUD, H. E. & BARNES, J. L. 2010. NAD(P)H oxidase mediates TGF-beta1-induced activation of kidney myofibroblasts. *J Am Soc Nephrol*, 21, 93-102.
- BONNIAUD, P., KOLB, M., GALT, T., ROBERTSON, J., ROBBINS, C., STAMPFLI, M., LAVERY, C., MARGETTS, P. J., ROBERTS, A. B. & GAULDIE, J. 2004. Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis. *J Immunol*, 173, 2099-108.

- BRANDT, U. 2007. Redoxreaktionen, Sauerstoff und oxidative Phosphorylierung. *In: LÖFFLER, G., PETRIDES, P. E. & HEINRICH, P. C. (eds.) Biochemie und Pathobiochemie.* Heidelberg: Springer.
- BROUGHTON, G., 2ND, JANIS, J. E. & ATTINGER, C. E. 2006. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*, 117, 12S-34S.
- BUNDESVEREINIGUNG, K. 2012. Beschluss des gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Arzneimittel-Richtlinie (AM-RL): Anlage XII- Beschlüsse über die Nutzenbewertung von Arzneimitteln mit neuen Wirkstoffen nach § 35a des Fünften Buches Sozialgesetzbuch (SGB V) - Mikrobielle Collagenase aus *Clostridium histolyticum*. *Dtsch Arztebl International*, 109, A-1842-A-1844.
- CASTRO, D. J., ABERGEL, R. P., MEEKER, C., DWYER, R. M., LESAVOY, M. A. & UITTO, J. 1983. Effects of the Nd:YAG laser on DNA synthesis and collagen production in human skin fibroblast cultures. *Ann Plast Surg*, 11, 214-22.
- CHEN, M. & DAVIDSON, T. 2005. Scar management: prevention and treatment strategies. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 13, 242-7.
- CHENG, X., ZHENG, X., SONG, Y., QU, L., TANG, J., MENG, L. & WANG, Y. 2016. Apocynin attenuates renal fibrosis via inhibition of NOXs-ROS-ERK-myofibroblast accumulation in UUO rats. *Free Radical Research*, 50, 840-852.
- CIFUENTES-PAGANO, M. E., MEIJLES, D. N. & PAGANO, P. J. 2015. Nox Inhibitors & Therapies: Rational Design of Peptidic and Small Molecule Inhibitors. *Curr Pharm Des*, 21, 6023-35.
- COHEN, I. & PEACOCK, E. J. 1990. Plastic surgery Vol. 1. *In: MCCARTHY, J. (ed.).* Philadelphia: Saunders.
- COSMAN, B., CRICKELAIR, G., JU, M. & AL., E. 1961. The surgical treatment of keloids. *Plast Reconstr Surg*, 27, 335-45.
- CUCORANU, I., CLEMPUS, R., DIKALOVA, A., PHELAN, P. J., ARIYAN, S., DIKALOV, S. & SORESCU, D. 2005. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res*, 97, 900-7.
- DE LIVERA, A. M., REUTENS, A., COOPER, M., THOMAS, M., JANDELEIT-DAHM, K., SHAW, J. E. & SALIM, A. 2020. Evaluating the efficacy and safety of GKT137831 in adults with type 1 diabetes and persistently elevated urinary albumin excretion: a statistical analysis plan. *Trials*, 21, 459.
- DEMARIA, M., OHTANI, N., YOUSSEF, S. A., RODIER, F., TOUSSAINT, W., MITCHELL, J. R., LABERGE, R. M., VIJG, J., VAN STEEG, H., DOLLÉ, M. E., HOEIJMAKERS, J. H., DE BRUIN, A., HARA, E. & CAMPISI, J. 2014. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell*, 31, 722-33.
- DESMOULIÈRE, A., GEINOZ, A., GABBIANI, F. & GABBIANI, G. 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*, 122, 103-11.
- DISTLER, J. H. W., GYÖRFI, A.-H., RAMANUJAM, M., WHITFIELD, M. L., KÖNIGSHOFF, M. & LAFYATIS, R. 2019. Shared and distinct mechanisms of fibrosis. *Nature Reviews Rheumatology*, 15, 705-730.
- EATON, C. 2011. Percutaneous fasciotomy for Dupuytren's contracture. *J Hand Surg Am*, 36, 910-5.
- EATON, C. 2014. Evidence-based medicine: Dupuytren contracture. *Plast Reconstr Surg*, 133, 1241-1251.
- ECKER, W. A. & KARTENBECK, J. 1997. Auftrennung von Proteinen durch Elektrophorese in Polyacrylamidgelen. *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie.* Heidelberg: Springer Berlin.
- ENGLISH, R. & SHENEFELT, P. 1999. Keloids and hypertrophic scars. *Dermatol Surg*, 25, 631-8.

- ENGRAV, L., GOTTLIEB, J., MILLARD, S. & AL., E. 1988. A comparison of intramarginal and extramarginal excision of hypertrophic burn scars. *Plast Reconstr Surg*, 81, 40-5.
- FITZPATRICK, R. 1999. Treatment of inflamed hypertrophic scars using intralesional 5-FU. *Dermatol Surg*, 25, 224-32.
- FRIEDMAN, D., BOYD, C., MACKENZIE, J. & ET AL. 1993. Regulation of collagen gene expression in keloids and hypertrophic scars. *Journal of surgical research*, 55, 214-22.
- FRITSCH, P. & SCHWARZ, T. 2018. Aufbau und Funktion der Haut. In: FRITSCH, P. & SCHWARZ, T. (eds.) *Dermatologie Venerologie*. Heidelberg: Springer.
- GABBIANI, G., RYAN, G. B. & MAJNO, G. 1971. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*, 27, 549-550.
- GABRIEL, V. 2011. Hypertrophic scar. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, 22, 301-10.
- GASSMAN, N. 2024. *Die Charakterisierung der antifibrotischen Wirkung von blauem Licht ( $\lambda=453\text{ nm}$ ) und die Rolle des Extrazelluläre- Domäne A-Fibronektins (EDA- FN) und seiner fibroblastulären Rezeptoren in der Pathogenese des Morbus Dupuytren*. Doctor of medicine Dissertation, Heinrich-Heine-Universität.
- GEIGER, B. & BERSHADSKY, A. 2001. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 584-92.
- GUDEY, S. K., SUNDAR, R., MU, Y., WALLENIUS, A., ZANG, G., BERGH, A., HELDIN, C. H. & LANDSTRÖM, M. 2014. TRAF6 stimulates the tumor-promoting effects of TGF $\beta$  type I receptor through polyubiquitination and activation of presenilin 1. *Sci Signal*, 7, ra2.
- GUO, Y., XIAO, L., SUN, L. & LIU, F. 2012. Wnt/beta-catenin signaling: a promising new target for fibrosis diseases. *Physiol Res*, 61, 337-46.
- HAMM, H. 2017. Grundlagen In: GOEBELER, M. & HAMM, H. (eds.) *Basiswissen Dermatologie*. Heidelberg: Springer.
- HEINZELLER, T. & BÜSING, C. M. 2001. *Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg*, Stuttgart, Thieme.
- HENNE-BRUNS, D., KREMER, B. & DÜRIG, M. 2007. *Duale Reihe - Chirurgie Wunde*. Stuttgart: Thieme.
- HINDMAN, H. B., MARTY-ROIX, R., TANG, J. B., JUPITER, J. B., SIMMONS, B. P. & SPECTOR, M. 2003. Regulation of expression of alpha-smooth muscle actin in cells of Dupuytren's contracture. *J Bone Joint Surg Br*, 85, 448-55.
- HINZ, B. 2006. Masters and servants of the force: the role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. *Eur J Cell Biol*, 85, 175-81.
- HINZ, B. 2015. The extracellular matrix and transforming growth factor- $\beta$ 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biology*, 47, 54-65.
- HINZ, B. 2016. Myofibroblasts. *Exp Eye Res*, 142, 56-70.
- HINZ, B., CELETTA, G., TOMASEK, J., GABBIANI, G. & CHAPONNIER, C. 2001. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell*, 12, 2730-2741.
- HINZ, B., MCCULLOCH, C. A. & COELHO, N. M. 2019. Mechanical regulation of myofibroblast phenoconversion and collagen contraction. *Exp Cell Res*, 379, 119-128.
- HINZ, B., PHAN, S. H., THANNICKAL, V. J., GALLI, A., BOCHATON-PIALLAT, M. L. & GABBIANI, G. 2007. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*, 170, 1807-16.
- HOROWITZ, J. C. & THANNICKAL, V. J. 2019. Mechanisms for the Resolution of Organ Fibrosis. *Physiology*, 34, 43-55.
- HUESTON, J. T. 1963. Recurrent Dupuytren's contracture. *Plast Reconstr Surg*, 31, 66-9.
- HURST, L. C., BADALAMENTE, M. A., HENTZ, V. R. & ET AL. 2009. Injectable collagenase clostridium histolyticum for Dupuytren's contracture. *N Engl J Med.*, 361, 968-979.

- HUTCHISON, R., RAYAN, G. M. & ASTLEY, C. 2011. his life and surgical contributions. *J Hand Surg Am.*, 36, 316-320.
- IRANI, K. 2000. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res*, 87, 179-83.
- JIANG, J. X., CHEN, X., SERIZAWA, N., SZYNDRALEWIEZ, C., PAGE, P., SCHRÖDER, K., BRANDES, R. P., DEVARAJ, S. & TÖRÖK, N. J. 2012. Liver fibrosis and hepatocyte apoptosis are attenuated by GKT137831, a novel NOX4/NOX1 inhibitor in vivo. *Free Radic Biol Med*, 53, 289-96.
- JOBLING, M. F., MOTT, J. D., FINNEGAN, M. T., JURUKOVSKI, V., ERICKSON, A. C., WALIAN, P. J., TAYLOR, S. E., LEDBETTER, S., LAWRENCE, C. M., RIFKIN, D. B. & BARCELLOS-HOFF, M. H. 2006. Isoform-specific activation of latent transforming growth factor beta (LTGF-beta) by reactive oxygen species. *Radiat Res*, 166, 839-48.
- JUCKETT, G. & HARTMAN-ADAMS, H. 2009. Management of keloids and hypertrophic scars. *Am Fam Physician*, 80, 253-60.
- KABUYAMA, Y., OSHIMA, K., KITAMURA, T., HOMMA, M., YAMAKI, J., MUNAKATA, M. & HOMMA, Y. 2007. Involvement of selenoprotein P in the regulation of redox balance and myofibroblast viability in idiopathic pulmonary fibrosis. *Genes to Cells*, 12, 1235-1244.
- KARABEG, R., JAKIRLIC, M., ARSLANAGIC, S., DUJSO, V., OBRADOVIC, G. & ZECO, A. 2012. Results of surgery treatment of Dupuytren's contracture in 115 patients. *Med Arch*, 66, 329-31.
- KHANNA, S., UDAS, A. C., KUMAR, G. K., SUVARNA, S. & KARJODKAR, F. R. 2013. Trace elements (copper, zinc, selenium and molybdenum) as markers in oral sub mucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 27, 307-311.
- KIRSCH, J. 2011. Haut und Hautanhangsgebilde. In: KIRSCH, J., MAY, C. A., LORKE, D., WINKELMANN, A., SCHWAB, W., HERRMANN, G. & FUNK, R. (eds.) *Taschenlehrbuch Anatomie*. Stuttgart: Thieme.
- KITRIDIS, D., KARAMITSOU, P., GIANNAROS, I., PAPADAKIS, N., SINOPIDIS, C. & GIVISSIS, P. 2019. Dupuytren's disease: limited fasciectomy, night splinting, and hand exercises-long-term results. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 29, 349-355.
- KLINGBERG, F., CHAU, G., WALRAVEN, M., BOO, S., KOEHLER, A., CHOW, M. L., OLSEN, A. L., IM, M., LODYGA, M., WELLS, R. G., WHITE, E. S. & HINZ, B. 2018. The fibronectin ED-A domain enhances recruitment of latent TGF- $\beta$ -binding protein-1 to the fibroblast matrix. *Journal of Cell Science*, 131.
- KOHAN, M., MURO, A. F., WHITE, E. S. & BERKMAN, N. 2010. EDA-containing cellular fibronectin induces fibroblast differentiation through binding to  $\alpha 4\beta 7$  integrin receptor and MAPK/Erk 1/2-dependent signaling. *The FASEB Journal*, 24, 4503-4512.
- KOPP, J., SEYHAN, H., MÜLLER, B., LANCZAK, J., PAUSCH, E., GRESSNER, A. M., DOOLEY, S. & HORCH, R. E. 2006. N-acetyl-L-cysteine abrogates fibrogenic properties of fibroblasts isolated from Dupuytren's disease by blunting TGF-beta signalling. *J Cell Mol Med*, 10, 157-65.
- KRASSOVKA, J. 2017. *Molekulare Grundlagen der durch blaues Licht induzierten Differenzierungshemmung humaner Fibroblasten zu Myofibroblasten*, Universitäts- und Landesbibliothek der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- KRASSOVKA, J. M., SUSCHEK, C. V., PROST, M., GROTHEER, V., SCHIEFER, J. L., DEMIR, E., FUCHS, P. C., WINDOLF, J., STÜRMER, E. K. & OPLÄNDER, C. 2020. The impact of non-toxic blue light (453 nm) on cellular antioxidative capacity, TGF- $\beta 1$  signaling, and myofibrogenesis of human skin fibroblasts. *J Photochem Photobiol B*, 209, 111952.
- KRAUSE, C., KLOEN, P. & TEN DIJKE, P. 2011. Elevated transforming growth factor  $\beta$  and mitogen-activated protein kinase pathways mediate fibrotic traits of Dupuytren's disease fibroblasts. *Fibrogenesis Tissue repair*, 4, 14.

- KUBICZKOVA, L., SEDLARIKOVA, L., HAJEK, R. & SEVCIKOVA, S. 2012. TGF- $\beta$  - an excellent servant but a bad master. *J Transl Med*, 10, 183.
- KUHN, M. A., MOFFIT, M. R., SMITH, P. D., LYLE, W. G., KO, F., MELTZER, D. D. & ROBSON, M. C. 2000. Silicone Sheeting Decreases Fibroblast Activity und Downregulates TGF- $\beta$ 2 in Hypertrophic Scar Model. *Interantional Journal of surgical Investigation* 2, 6, 467-474.
- KUO, Y., WU, W., JENG, S. & AL., E. 2005. Suppressed TGF-beta1 expression is correlated with up-regulation of matrix metalloproteinase-13 in keloid regression after flashlamp pulsed-dye laser treatment. *Lasers Surgery Medicine*, 36, 38-42.
- LALEU, B., GAGGINI, F., ORCHARD, M., FIORASO-CARTIER, L., CAGNON, L., HOUNGNINOUMOLANGO, S., GRADIA, A., DUBOUX, G., MERLOT, C., HEITZ, F., SZYNDRALEWIEZ, C. & PAGE, P. 2010. First in class, potent, and orally bioavailable NADPH oxidase isoform 4 (Nox4) inhibitors for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *J Med Chem*, 53, 7715-30.
- LAMBETH, J. D. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*, 4, 181-9.
- LANGE, B. & WESSEL, L. 2021. S1-Leitlinie: Wunden und Wundbehandlung im Kindesalter. 3.0 ed.: AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften).
- LANTING, R., BROEKSTRA, D. C., WERKER, P. M. N. & VAN DEN HEUVEL, E. R. 2014. A systematic review and meta-analysis on the prevalence of Dupuytren disease in the general population of Western countries. *Plast Reconstr Surg*, 133, 593-603.
- LARSEN, S., KROGSGAARD, D. G., AAGAARD LARSEN, L., IACHINA, M., SKYTTE, A. & FREDERIKSEN, H. 2015. Genetic and environmental influences in Dupuytren's disease: a study of 30,330 Danish twin pairs. *J Hand Surg Eur Vol*, 40, 171-6.
- LAYTON, T. & NANCHAHAL, J. 2019. Recent advances in the understanding of Dupuytren's disease. *F1000Res*, 8.
- LEE, M. K., PARDOUX, C., HALL, M. C., LEE, P. S., WARBURTON, D., QING, J., SMITH, S. M. & DERYNCK, R. 2007. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *Embo j*, 26, 3957-67.
- LESZCZYNSKI, R., DA SILVA, C. A. P., PINTO, A. N., KUCZYNSKI, U. & DA SILVA, E. M. K. 2022. Laser therapy for treating hypertrophic and keloid scars. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- LEUSEN, J. H., VERHOEVEN, A. J. & ROOS, D. 1996. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: intrigues in the phox family. *J Lab Clin Med*, 128, 461-76.
- LI, B. & WANG, J. H. 2011. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. *J Tissue Viability*, 20, 108-20.
- LODYGA, M. & HINZ, B. 2020. TGF- $\beta$ 1 - A truly transforming growth factor in fibrosis and immunity. *Semin Cell Dev Biol*, 101, 123-139.
- LUO, S., BENATHAN, M., RAFFOUL, W. & ET AL. 2001. Abnormal balance between proliferation apoptotic cell death in fibroblasts derived from keloid lesions. *Plastic and Reconstructive surgery*, 107, 87-96.
- MARTYN, K. D., FREDERICK, L. M., VON LOEHNEISEN, K., DINAUER, M. C. & KNAUS, U. G. 2006. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal*, 18, 69-82.
- MASSZI, A., FAN, L., ROSIVALL, L., MCCULLOCH, C. A., ROTSTEIN, O. D., MUCSI, I. & KAPUS, A. 2004. Integrity of cell-cell contacts is a critical regulator of TGF-beta 1-induced epithelial-to-myofibroblast transition: role for beta-catenin. *Am J Pathol*, 165, 1955-67.
- MAURO, T. 2005. Natural course of wound repair versus impaired healing in chronic cutaneous ulcers. In: BURNS, T., BREATHNACH, S., COX, N., FRIFFITHS, C. & ET AL. (eds.) *Wound healing and ulcers of the skin. Diagnosis and therapy - the practical approach*. Blackwell Science.

- MCANULTY, R. J. 2007. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 666-71.
- MEISTER, P., WILHELM, K. & RÖCKL, C. 1978. [Palmar fibromatosis (morbus Dupuytren). Comparative clinical, pathological and anatomical mass examinations (author's transl)]. *MMW Munch Med Wochenschr*, 120, 93-8.
- MELLA, J. R., GUO, L. & HUNG, V. 2018. Dupuytren's Contracture: An Evidence Based Review. *Ann Plast Surg*, 81, S97-s101.
- MEURER, S. K., LAHME, B., TIHAA, L., WEISKIRCHEN, R. & GRESSNER, A. M. 2005. N-acetyl-L-cysteine suppresses TGF-beta signaling at distinct molecular steps: the biochemical and biological efficacy of a multifunctional, antifibrotic drug. *Biochem Pharmacol*, 70, 1026-34.
- MOHD KHAIRUDIN, N. Y., AZME, N., NASRUDIN, N. & AB KARIM, S. A. 2023. The Promising Therapeutic Potential of Celastrol for Fibrotic Diseases: A Systematic Literature Review on Its Mechanism. *Cureus*, 15, e44269.
- MOLL, I. 2005. Unsere dynamische Haut. In: MOLL, I. (ed.) *Duale Reihe: Dermatologie*. 6 ed. Stuttgart: Thieme.
- MORETTI, L., STALFORT, J., BARKER, T. H. & ABEBAYEHU, D. 2022. The interplay of fibroblasts, the extracellular matrix, and inflammation in scar formation. *J Biol Chem*, 298, 101530.
- MORLEY, N., CURNOW, A., SALTER, L., CAMPBELL, S. & GOULD, D. 2003. N-acetyl-L-cysteine prevents DNA damage induced by UVA, UVB and visible radiation in human fibroblasts. *J Photochem Photobiol B*, 72, 55-60.
- MULDER, K. M. & MORRIS, S. L. 1992. Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells. *J Biol Chem*, 267, 5029-31.
- MURAYAMA, K., KATO-MURAYAMA, M., ITOH, Y., MIYAZONO, K., MIYAZAWA, K. & SHIROUZU, M. 2020. Structural basis for inhibitory effects of Smad7 on TGF- $\beta$  family signaling. *J Struct Biol*, 212, 107661.
- MURPHY-MARSHMAN, H., QUENSEL, K., SHI-WEN, X., BARNFIELD, R., KELLY, J., PEIDL, A., STRATTON, R. J. & LEASK, A. 2017. Antioxidants and NOX1/NOX4 inhibition blocks TGF $\beta$ 1-induced CCN2 and  $\alpha$ -SMA expression in dermal and gingival fibroblasts. *PLoS One*, 12, e0186740.
- MURRAY, J. C. 1993. Scars and keloids. *Dermatol Clin*, 11, 697-708.
- MURRELL, G. A., FRANCIS, M. J. & BROMLEY, L. 1987. Free radicals and Dupuytren's contracture. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 295, 1373-5.
- NICHOLS, M. D. & VAUGHAN, M. B. 2016. The Effect of n - Acetylcysteine on the Migration of Myofibroblasts. *The FASEB Journal*, 30.
- NIESSEN, F., SPAUWEN, P., SCHALKWIJK, J. & KON, M. 1999. On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review. *Plast Reconstr Surg*, 104 (5), 1435-1458.
- O'DONNELL, V. B., SMITH, G. C. & JONES, O. T. 1994. Involvement of phenyl radicals in iodonium inhibition of flavoenzymes. *Mol Pharmacol*, 46, 778-85.
- OLIVER, N., BABU, M. & DIEGELMANN, R. 1992. Fibronectin gene transcription is enhanced in abnormal wound healing. *Journal of investigative Dermatology*, 99, 579-86.
- ONO, A., UTSUGI, M., MASUBUCHI, K., ISHIZUKA, T., KAWATA, T., SHIMIZU, Y., HISADA, T., HAMURO, J., MORI, M. & DOBASHI, K. 2009. Glutathione redox regulates TGF- $\beta$ -induced fibrogenic effects through Smad3 activation. *FEBS Letters*, 583, 357-362.
- OPLÄNDER, C., HIDDING, S., WERNERS, F. B., BORN, M., PALLUA, N. & SUSCHEK, C. V. 2011. Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts. *J Photochem Photobiol B*, 103, 118-25.
- ORTHOPÄDIE UND UNFALLCHIRURGIE 2020. Western Blot Semi-Dry Blotting. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- PAKSHIR, P., NOSKOVICOVA, N., LODYGA, M., SON, D. O., SCHUSTER, R., GOODWIN, A., KARVONEN, H. & HINZ, B. 2020. The myofibroblast at a glance. *J Cell Sci*, 133.

- PALMER, K., D'ANGELO, S., SYDDALL, H. & ET AL. 2014. Dupuytren's contracture and occupational exposure to hand-transmitted vibration. *Occup Environ Med.*, 71, 241-245.
- PANIERI, E. & SANTORO, M. M. 2016. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis*, 7, e2253.
- PECCHILLO CIMMINO, T., AMMENDOLA, R., CATTANEO, F. & ESPOSITO, G. 2023. NOX Dependent ROS Generation and Cell Metabolism. *Int J Mol Sci*, 24.
- PEDRUZZI, E., GUICHARD, C., OLLIVIER, V., DRISS, F., FAY, M., PRUNET, C., MARIE, J. C., POUZET, C., SAMADI, M., ELBIM, C., O'DOWD, Y., BENS, M., VANDEWALLE, A., GOUGEROT-POCIDALO, M. A., LIZARD, G. & OGIER-DENIS, E. 2004. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol*, 24, 10703-17.
- PIATEK, S. & TAUTENHAHN, J. 2012. Physiologie der Wundheilung. In: LIPPERT, H. (ed.) *Wundatlas- Kompendium der komplexen Wundbehandlung*. Stuttgart: Thieme.
- POELSTRA, R., VAN KOOIJ, Y., VAN DER OEST, M. J. W. & ET AL. 2020. Patient's satisfaction beyond hand function in Dupuytren's disease: analysis of 1 106 patients. *J Hand Surg Eur*, 45, 280-5.
- PROELL, V., CARMONA-CUENCA, I., MURILLO, M. M., HUBER, H., FABREGAT, I. & MIKULITS, W. 2007. TGF- $\beta$  dependent regulation of oxygen radicals during transdifferentiation of activated hepatic stellate cells to myofibroblastoid cells. *Comparative Hepatology*, 6, 1.
- RICARD-BLUM, S. 2011. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- RIDER, C. C. & MULLOY, B. 2017. Heparin, Heparan Sulphate and the TGF- $\beta$  Cytokine Superfamily. *Molecules*, 22.
- ROCKWELL, W., COHEN, I. & EHRlich, H. 1989. Keloids and hypertrophic scars. A comprehensive review. *Plastic and Reconstructive surgery*, 84.
- RODRIGUES, J. N., BECKER, G. W., BALL, C., ZHANG, W., GIELE, H., HOBBY, J., PRATT, A. L. & DAVIS, T. 2015. Surgery for Dupuytren's contracture of the fingers. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015, Cd010143.
- RUETTERMANN, M., HERMANN, R. M., KHATIB-CHAHIDI, K. & WERKER, P. M. N. 2021. Morbus Dupuytren - Ätiologie und Behandlung. *Deutsches Ärzteblatt*, 118, 781-8.
- SADOWSKA, A. 2012. N-Acetylcysteine mucolysis in the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Therapeutic advances in respiratory disease*, 6, 127-35.
- SALARI, N., HEYDARI, M., HASSANABADI, M., KAZEMINIA, M., FARSHCHIAN, N., NIAPARAST, M., SOLAYMANINASAB, Y., MOHAMMADI, M., SHOHAIMI, S. & DANESHKHAH, A. 2020. The worldwide prevalence of the Dupuytren disease: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res*, 15, 495.
- SAMPSON, N., BERGER, P. & ZENZMAIER, C. 2014. Redox Signaling as a Therapeutic Target to Inhibit Myofibroblast Activation in Degenerative Fibrotic Disease. *BioMed Research International*, 2014, 131737.
- SAVLA, S. R., LADDHA, A. P. & KULKARNI, Y. A. 2021. Pharmacology of apocynin: a natural acetophenone. *Drug Metabolism Reviews*, 53, 542-562.
- SCHIEBLER, T. H. & KORF, H.-W. 2007. *Anatomie Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*, Heidelberg, Steinkopff.
- SERRANDER, L., CARTIER, L., BEDARD, K., BANFI, B., LARDY, B., PLASTRE, O., SIENKIEWICZ, A., FÓRRÓ, L., SCHLEGEL, W. & KRAUSE, K. H. 2007. NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem J*, 406, 105-14.
- SEYHAN, H., STROMPS, J. P., DEMIR, E., FUCHS, P. C. & KOPP, J. 2018. Vitamin D deficiency may stimulate fibroblasts in Dupuytren's disease via mitochondrial

- increased reactive oxygen species through upregulating transforming growth factor- $\beta$ 1. *Med Hypotheses*, 116, 40-41.
- SHEN, X., LI, J., HU, P. P., WADDELL, D., ZHANG, J. & WANG, X. F. 2001. The activity of guanine exchange factor NET1 is essential for transforming growth factor-beta-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem*, 276, 15362-8.
- SINACI, C. B., ÇIÇEK, Ç., FILINTE, G. & GÜVEN, Ü. 2022. The Effect of Ex-Vivo Hyaluronic Acid on Myofibroblast and Collagen in Dupuytren Disease. *J Hand Surg Asian Pac Vol*, 27, 975-981.
- SORRENTINO, A., THAKUR, N., GRIMSBY, S., MARCUSSON, A., VON BULOW, V., SCHUSTER, N., ZHANG, S., HELDIN, C. H. & LANDSTRÖM, M. 2008. The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat Cell Biol*, 10, 1199-207.
- SPEKTRUM, A. V. 1999. *beta-Mercaptoethanol* [Online]. Available: <https://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/beta-mercaptoethanol/3881>
- STUNOVA, A. & VISTEJNOVA, L. 2018. Dermal fibroblasts-A heterogeneous population with regulatory function in wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev*, 39, 137-150.
- STURROCK, A., CAHILL, B., NORMAN, K., HUECKSTEADT, T. P., HILL, K., SANDERS, K., KARWANDE, S. V., STRINGHAM, J. C., BULL, D. A., GLEICH, M., KENNEDY, T. P. & HOIDAL, J. R. 2006. Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290, L661-L673.
- SU, C., ALIZADEH, K., BODDIE, A. & LEE, R. 1998. The problem scar. *Clinical plastic surgery*, 25, 451-65.
- SUSCHEK, C. V., KRASSOVKA, J., STEENTJES, P. & WINDOLF, J. 2018. Untersuchungen zum Einfluss der flavinhaltigen Proteine NADPH-Oxidase 4 (NOX4) sowie NADH: Ubichinon-Oxidoreduktase auf die Differenzierung humaner Fibroblasten und deren Relevanz in der Pathogenese sklerotischer Erkrankungen. *Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2018)*. Berlin.
- SZANTO, I. 2022. NADPH Oxidase 4 (NOX4) in Cancer: Linking Redox Signals to Oncogenic Metabolic Adaptation. *Int J Mol Sci*, 23.
- TANG, L. Y., HELLER, M., MENG, Z., YU, L. R., TANG, Y., ZHOU, M. & ZHANG, Y. E. 2017. Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Directly Activates the JAK1-STAT3 Axis to Induce Hepatic Fibrosis in Coordination with the SMAD Pathway. *J Biol Chem*, 292, 4302-4312.
- TEIXEIRA, G., SZYNDRALEWIEZ, C., MOLANGO, S., CARNESECCHI, S., HEITZ, F., WIESEL, P. & WOOD, J. M. 2017. Therapeutic potential of NADPH oxidase 1/4 inhibitors. *Br J Pharmacol*, 174, 1647-1669.
- TIAN, F., JIANG, Q., CHEN, J. & LIU, Z. 2023. Silicone gel sheeting for treating keloid scars. *Cochrane Database Syst Rev*, 1, Cd013878.
- TOMASEK, J., GABBIANI, G., HINZ, B., CHAPONNIER, C. & BROWN, R. 2002. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biology*, 3, 349-363.
- TSUKUI, T., SUN, K. H., WETTER, J. B., WILSON-KANAMORI, J. R., HAZELWOOD, L. A., HENDERSON, N. C., ADAMAS, T. S., SCHUPP, J. C., POLI, S. D., ROSAS, I. O. & AL., E. 2020. Collagen-producing lung cell atlas identifies multiple subsets with distinct localization and relevance to fibrosis. *Nat. Commun.*, 11, 1920.
- TUBIANA, R. 1986. Evaluation of deformities in Dupuytren's disease. *Ann Chir Main*, 5, 5-11.
- TZAVLAKI, K. & MOUSTAKAS, A. 2020. TGF- $\beta$  Signaling. *Biomolecules*, 10.
- URIOSTE, S., ARNDT, K. & DOVER, J. 1999. Keloids and hypertrophic scars: review and treatment strategies. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 18, 159-71.
- UZUNMEHMET, H. 2019. *Die Rolle von NADPH Oxidasen und weiteren flavinhaltigen Enzymen in der durch blaues Licht (453 nm)-induzierten Inhibition der TGF $\beta$ -*

- vermittelten Myofibrogenese. Bachelor Thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- VAN RIJSSSEN, A., TER LINDEN, H. & WERKER, P. M. N. 2012. Five-year results of a random trial on treatment in Dupuytren's disease: percutaneous needle fascioto limited fasciectomy. *Plast Reconstr Surg*, 129, 469-77.
- VAN RIJSSSEN, A. L. & WERKER, P. M. 2012. Percutaneous needle fasciotomy for recurrent Dupuytren disease. *J Hand Surg Am*, 37, 1820-3.
- VAUGHAN, M. B., HOWARD, E. W. & TOMASEK, J. J. 2000. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res*, 257, 180-9.
- VERJEE, L. S., MIDWOOD, K., DAVIDSON, D., EASTWOOD, M. & NANCHAHAL, J. 2010. Post-transcriptional regulation of  $\alpha$ -smooth muscle actin determines the contractile phenotype of Dupuytren's nodular cells. *Journal of Cellular Physiology*, 224, 681-690.
- VUKELIC, S., XU, Q., SEIDEL-ROGOL, B., FAIDLEY, E. A., DIKALOVA, A. E., HILENSKI, L. L., JORDE, U., POOLE, L. B., LASSÈGUE, B., ZHANG, G. & GRIENDLING, K. K. 2018. NOX4 (NADPH Oxidase 4) and Poldip2 (Polymerase  $\delta$ -Interacting Protein 2) Induce Filamentous Actin Oxidation and Promote Its Interaction With Vinculin During Integrin-Mediated Cell Adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 38, 2423-2434.
- WANG, J., ZOHAR, R. & MCCULLOCH, C. A. 2006. Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res*, 312, 205-14.
- WARWICK, D. 2017. Dupuytren's disease: my personal view. *J Hand Surg Eur Vol*, 42, 665-672.
- WELSCH, U. 2006. *Sobott Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie*, München, Urban & Fischer.
- WERKER, P. M., PESS, G. M., VAN RIJSSSEN, A. L. & DENKLER, K. 2012. Correction of contracture and recurrence rates of Dupuytren contracture following invasive treatment: the importance of clear definitions. *J Hand Surg Am*, 37, 2095-2105.e7.
- WILD, T. & AUBÖCK, J. 2007. *Manual der Wundheilung. Chirurgisch-dermatologischer Leitfaden der modernen Wundbehandlung*, Wien, Springer.
- WILKES, M. C., MURPHY, S. J., GARAMSZEGI, N. & LEOF, E. B. 2003. Cell-type-specific activation of PAK2 by transforming growth factor beta independent of Smad2 and Smad3. *Mol Cell Biol*, 23, 8878-89.
- WOLFRAM, D., TZANKOV, A., PÜLZL, P. & PIZA-KATZER, H. 2009. Hypertrophic Scars and Keloids—A Review of Their Pathophysiology, Risk Factors, and Therapeutic Management. *Dermatologic Surgery*, 35, 171-181.
- YAMAGUCHI, K., SHIRAKABE, K., SHIBUYA, H., IRIE, K., OISHI, I., UENO, N., TANIGUCHI, T., NISHIDA, E. & MATSUMOTO, K. 1995. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science*, 270, 2008-11.
- YAN, X., LIAO, H., CHENG, M., SHI, X., LIN, X., FENG, X. H. & CHEN, Y. G. 2016. Smad7 Protein Interacts with Receptor-regulated Smads (R-Smads) to Inhibit Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )/Smad Signaling. *J Biol Chem*, 291, 382-92.
- YANG, W. H., KUO, M. Y., LIU, C. M., DENG, Y. T., CHANG, H. H. & CHANG, J. Z. 2013. Curcumin inhibits TGF $\beta$ 1-induced CCN2 via Src, JNK, and Smad3 in gingiva. *J Dent Res*, 92, 629-34.
- YANG, W. L., WANG, J., CHAN, C. H., LEE, S. W., CAMPOS, A. D., LAMOTHE, B., HUR, L., GRABINER, B. C., LIN, X., DARNAY, B. G. & LIN, H. K. 2009. The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation. *Science*, 325, 1134-8.
- YI, J. Y., SHIN, I. & ARTEAGA, C. L. 2005. Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 280, 10870-6.

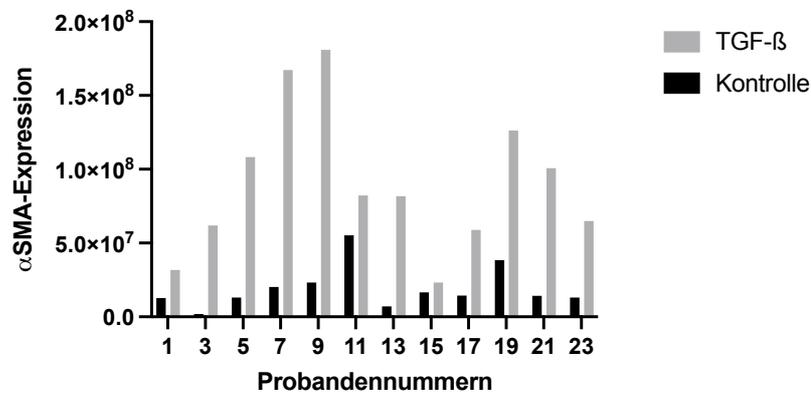
- YONG, R., CHEN, X.-M., SHEN, S., VIJAYARAJ, S., MA, Q., POLLOCK, C. A. & SAAD, S. 2013. Plumbagin Ameliorates Diabetic Nephropathy via Interruption of Pathways that Include NOX4 Signalling. *PLOS ONE*, 8, e73428.
- ZHANG, L., ZHOU, F., GARCÍA DE VINUESA, A., DE KRUIJF, E. M., MESKER, W. E., HUI, L., DRABSCH, Y., LI, Y., BAUER, A., ROUSSEAU, A., SHEPPARD, K. A., MICKANIN, C., KUPPEN, P. J., LU, C. X. & TEN DIJKE, P. 2013. TRAF4 promotes TGF- $\beta$  receptor signaling and drives breast cancer metastasis. *Mol Cell*, 51, 559-72.
- ZHOU, C., SELLES, R. W., SLIJPER, H. P., FEITZ, R., VAN KOOIJ, Y., MOOJEN, T. M. & HOVIUS, S. E. R. 2016. Comparative Effectiveness of Percutaneous Needle Aponeurotomy and Limited Fasciectomy for Dupuytren's Contracture: A Multicenter Observational Study. *Plast Reconstr Surg*, 138, 837-846.
- ZIEGLER, M. E., STABEN, A., LEM, M., PHAM, J., ALANIZ, L., HALASEH, F. F., OBAGI, S., LEIS, A. & WIDGEROW, A. D. 2023. Targeting Myofibroblasts as a Treatment Modality for Dupuytren Disease. *J Hand Surg Am*, 48, 914-922.

# 7 Anhang

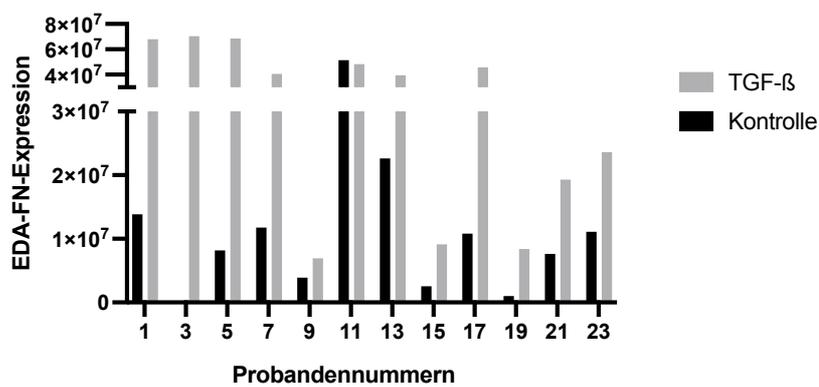
## Datensätze

- Voraktivität

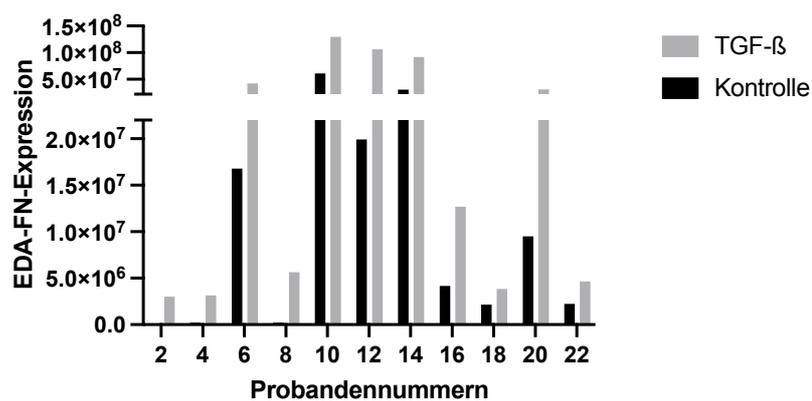
### Aktivierung der Zellen durch TGF- $\beta$ bei CTS-Probanden



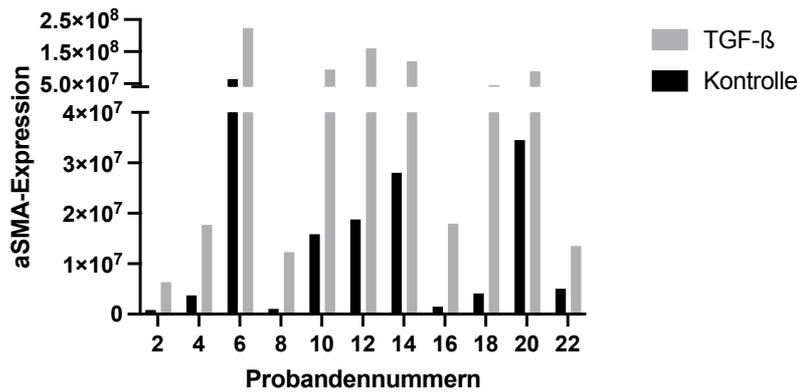
### Aktivierung der Zellen durch TGF- $\beta$ bei CTS-Probanden



### Aktivierung der Zellen durch TGF- $\beta$ bei MD-Probanden



## Aktivierung der Zellen durch TGF- $\beta$ bei MD-Probanden



## Normalverteilung testen

- MD-Probanden

### $\alpha$ SMA

	K	DPI	GKT	NAC	GSH	TGF	DPI+TGF	GKT+TGF	NAC+TGF	GSH+TGF
<b>Kolmogorov-Smirnov test</b>										
<b>KS distance</b>	0,2584	0,2084	0,2852	0,3486	0,3329	0,2313	0,3067	0,2784	0,3098	0,3047
<b>P value</b>	0,0386	>0.1000	0,0127	0,0466	0,0094	>0.1000	0,0047	0,0171	>0.1000	0,0276
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	No	Yes	No	No	No	Yes	No	No	Yes	No
<b>P value summary</b>	*	ns	*	*	**	ns	**	*	ns	*
<b>Number of values</b>	11	11	11	5	8	11	11	11	5	8

### EDA-F<sub>n</sub>

	K	DPI	GKT	NAC	GSH	TGF	DPI+TGF	GKT+TGF	NAC+TGF	GSH+TGF
<b>Kolmogorov-Smirnov test</b>										
<b>KS distance</b>	0,2382	0,3732	0,3370	0,2251	0,3788	0,2595	0,3090	0,3908	0,3367	0,2532
<b>P value</b>	0,0812	0,0001	0,0010	>0.1000	0,0012	0,0371	0,0042	<0.0001	0,0657	>0.1000
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	Yes	No	No	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes
<b>P value summary</b>	ns	***	**	ns	**	*	**	****	ns	ns
<b>Number of values</b>	11	11	11	5	8	11	11	11	5	8

- CTS-Probanden

### $\alpha$ SMA

	K	DPI	GKT	NAC	GSH	TGF	DPI+TGF	GKT+TGF	NAC+TGF	GSH+TGF
<b>Kolmogorov-Smirnov test</b>										
<b>KS distance</b>	0,2373	0,2370	0,3276	0,4139	0,2212	0,1508	0,2000	0,1489	0,2094	0,2109
<b>P value</b>	0,0607	0,0612	0,0009	0,0053	>0.1000	>0.1000	>0.1000	>0.1000	>0.1000	>0.1000
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>P value summary</b>	ns	ns	***	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Number of values</b>	12	12	12	5	8	12	12	12	5	8

EDA-Fn

	K	DPI	GKT	NAC	GSH	TGF	DPI+TGF	GKT+TGF	NAC+TGF	GSH+TGF
<b>Kolmogorov-Smirnov test</b>										
<b>KS distance</b>	0,2829	0,1535	0,1222	0,2975	0,1882	0,1494	0,1669	0,1703	0,2201	0,2854
<b>P value</b>	0,0088	>0.1000	>0.1000	>0.1000	>0.1000	>0.1000	>0.1000	>0.1000	>0.1000	0,0541
<b>Passed normality test (alpha=0.05)?</b>	No	Yes								
<b>P value summary</b>	**	ns								
<b>Number of values</b>	12	12	12	5	8	12	12	12	5	8

Rohdaten

αSMA

Nr	Probanden	K	DPI	GKT	NAC	GSH	TGF	DPI+TGF	GKT+TGF	NAC+TGF	GSH+TGF
1	1	CTS	1,2668E+07	2,0584467E+07	1,9029375E+07	2,6601664E+07		3,1723191E+07	4,263286E+07	6,5309832E+07	2,6361043E+07
2	3	CTS	1376400,0000000	2,1893362E+07	3,0840735E+07	7246365,0000000		6,1833337E+07	2,2133219E+07	8,2901225E+07	3,8719036E+07
3	5	CTS	1,3166595E+07	4,3727733E+07	5,3552312E+07		4,6286627E+07	1,08E+08	5,6833411E+07	1,47383704E+08	1,0035918E+08
4	7	CTS	2,0179544E+07	1,3155704E+07	1,3085794E+07	9742010,0000000		1,67E+08	1,9729118E+07	7,3802328E+07	1,16274745E+08
5	9	CTS	2,324484E+07	2,3778893E+07	1,113595E+07		3,3013579E+07	1,81E+08	3,8230678E+07	1,71483316E+08	1,10182549E+08
6	11	CTS	5,5303566E+07	2,713715E+07	7761980,0000000		1,3139312E+07	8,2329995E+07	3,7662469E+07	2,2738043E+07	1,9988276E+07
7	13	CTS	7010221,0000000	9511931,0000000	9632526,0000000	5196594,0000000	5249146,0000000	8,1727689E+07	4,0139561E+07	9,9253469E+07	3835938,0000000
8	15	CTS	1,6551067E+07	1,3805622E+07	1,2842563E+07	4880910,0000000		2,3272238E+07	4220541,0000000	1,1499436E+07	2817485,0000000
9	17	CTS	1,4459066E+07	8834217,0000000	1,1660919E+07		1,9286248E+07	5,8948671E+07	2,0473763E+07	6,827649E+07	6,7611767E+07
10	19	CTS	3,8372374E+07	6,4293087E+07	4,231511E+07		5,4452748E+07	1,26E+08	9,3619381E+07	1,04913787E+08	9,0991039E+07
11	21	CTS	1,4284065E+07	8011493,0000000	1,110158E+07		9326927,0000000	1,01E+08	1,6319376E+07	7,7994534E+07	101920,0000000
12	23	CTS	1,3033152E+07	2,3009638E+07	8425988,0000000	7657719,0000000		6,4915096E+07	2,1744191E+07	4,4592289E+07	1,4548519E+07
1	2	MD	773432,0000000	4397953,0000000	2155679,0000000	1082394,0000000		6351701,0000000	1779712,0000000	5669451,0000000	1515130,0000000
2	4	MD	3713856,0000000	4387917,0000000	1178884,0000000	1088734,0000000		1,770252E+07	5400762,0000000	3288817,0000000	477593,0000000
3	6	MD	6,4052106E+07	6,3478455E+07	6,2227541E+07		1,29E+08	2,24E+08	1,4701274E+08	1,26829596E+08	3,0721767E+08
4	8	MD	1052980,0000000	1002585,0000000	2038290,0000000	3668510,0000000		1,2290749E+07	2180198,0000000	1,2387387E+07	230328,0000000
5	10	MD	1,5872875E+07	3,2247119E+07	1,2842812E+07		1,308416E+07	9,3935945E+07	1,6990258E+07	9,8273317E+07	8,6745952E+07
6	12	MD	1,8794382E+07	2,5893295E+07	5,8239111E+07		3,9318312E+07	1,6E+08	6,2382232E+07	1,26080051E+08	1,53631167E+08
7	14	MD	2,8051513E+07	3,9403275E+07	3892566,0000000	7245818,0000000		2,0290317E+07	1,2E+08	3,3652508E+07	1,1376655E+07
8	16	MD	1498840,0000000	5298907,0000000	1128572,0000000	2019726,0000000		2,99056,0000000	1,7968047E+07	4081062,0000000	5523278,0000000
9	18	MD	4101708,0000000	6505753,0000000	2132710,0000000		1831154,0000000	4,5596704E+07	1,9758441E+07	2,7039034E+07	1,5064188E+07
10	20	MD	3,4530008E+07	1,4987961E+07	1,8329056E+07		2,114213E+07	8,8810625E+07	2,2107732E+07	5,1954709E+07	1,2221816E+07
11	22	MD	5062086,0000000	1,9679873E+07	1,6886803E+07		1,4300734E+07	1,3540479E+07	2,1389387E+07	2,8039881E+07	2,9358179E+07

Nr = fortlaufende Ziffern

Proband = jedem Probanden wurde im Studienverlauf eine Nummer zugeteilt

EDA-Fn

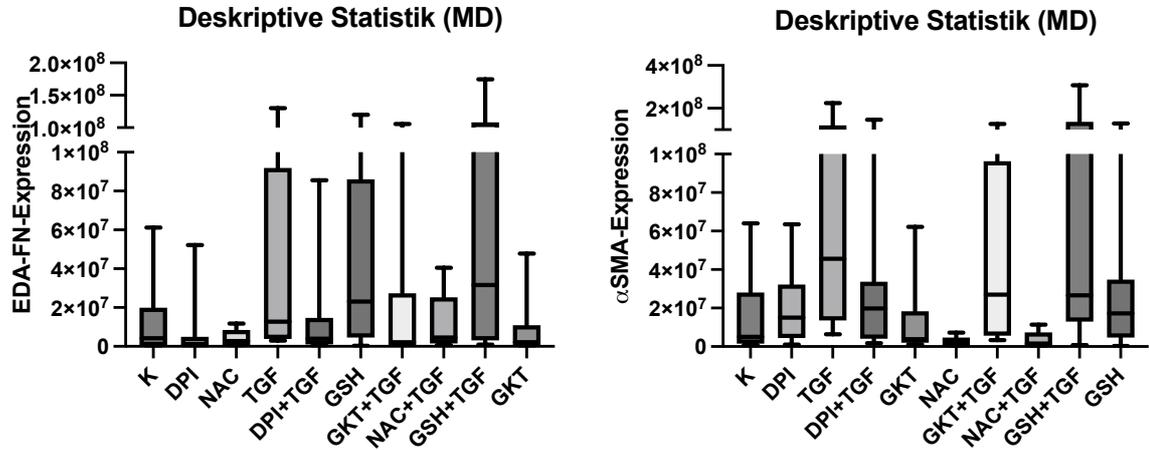
Nr	Probanden	K	DPI	GKT	NAC	GSH	TGF-β	DPI + TGF-β	GKT+TGF-β	NAC+TGF	GSH+TGF-β
1	1	CTS	1,383488E+07	1020002,0000000	1,133346E+07	3,4379284E+07		6,7877762E+07	3,3933226E+07	3,9826332E+07	3,6456204E+07
2	3	CTS	29016,0000000	827989,0000000	1367188,0000000	42069,0000000		7,0384977E+07	5,653578E+07	1,8793245E+07	1,8849837E+07
3	5	CTS	8188479,0000000	1,1127461E+07	1,6896641E+07		5,7577249E+07	6,8581049E+07	3,9278103E+07	5,9593815E+07	1,08371327E+08
4	7	CTS	1,1767315E+07	5312352,0000000	8007940,0000000		1,5160118E+07	4,0479815E+07	1,1811312E+07	1,2964513E+07	3,1973357E+07
5	9	CTS	3879720,0000000	2288087,0000000	6076813,0000000		1,8495852E+07	6930894,0000000	2655430,0000000	6051506,0000000	2,5788034E+07
6	11	CTS	5,1434292E+07	6971571,0000000	5745468,0000000		5,2688744E+07	4,8297768E+07	2,3608477E+07	2,2316785E+07	8067438,0000000
7	13	CTS	2,2620039E+07	1,0086433E+07	7946580,0000000	5297333,0000000		2,9042187E+07	3,3995969E+07	2,5771049E+07	8957053,0000000
8	15	CTS	2557235,0000000	375496,5000000	3167426,0000000	5062552,0000000		9125106,0000000	64543,0000000	3051633,0000000	9005961,0000000
9	17	CTS	1,0825079E+07	1,6185969E+07	2405834,0000000		1,5652893E+07	4,5738145E+07	7449331,0000000	1,2047846E+07	1,8875183E+07
10	19	CTS	1017801,0000000	284142,0000000	794298,5000000		2543532,0000000	8380572,0000000	3537763,0000000	5781898,5000000	1,8359503E+07
11	21	CTS	7622523,0000000	3611343,0000000	8542010,0000000		3,0699999E+07	1,9299774E+07	9693636,5000000	1,9608556E+07	210294,5000000
12	23	CTS	1,1101728E+07	7344463,0000000	1,1559698E+07	1,7481891E+07		2,3602868E+07	1,6415209E+07	4,0198928E+07	4,0934024E+07
1	2	MD	26752,0000000	303063,0000000	631347,0000000	683561,0000000		3019206,0000000	378302,0000000	374729,0000000	2393671,0000000
2	4	MD	169911,0000000	180825,0000000	611241,0000000	550755,0000000		3161281,0000000	1971747,0000000	1706934,0000000	630496,0000000
3	6	MD	1,6792994E+07	520905,0000000	909866,0000000		2,2993569E+07	4,2208056E+07	1,1334417E+07	466720,0000000	5,1439802E+07
4	8	MD	231420,0000000	182800,0000000	341940,0000000	2693887,0000000		5633137,0000000	1297416,0000000	1367412,0000000	4541208,0000000
5	10	MD	6,115525E+07	5,215533E+07	4,7780103E+07		1,07E+08	1,3E+08	8,5599518E+07	1,05615619E+08	1,74722376E+08
6	12	MD	1,9914318E+07	1,1408662E+07	1,6361264E+07		2,3176165E+07	1,07E+08	2,6216438E+07	2,7307353E+07	7,7137937E+07
7	14	MD	3,0727224E+07	4707281,0000000	1,0865857E+07	1,1713533E+07		1,2E+08	9,192513E+07	1,4667801E+07	3,4597823E+07
8	16	MD	4174168,0000000	194671,5000000	2165157,0000000	5196471,0000000	2023035,0000000	1,2695646E+07	671130,5000000	2071504,5000000	1,0117175E+07
9	18	MD	2145707,0000000	2488740,0000000	89469,0000000		276334,0000000	3846510,0000000	1074648,0000000	455601,0000000	988786,0000000
10	20	MD	9504642,0000000	4897009,0000000	3895986,0000000		2,3412726E+07	3,0885906E+07	4012594,5000000	2828094,0000000	1,1819955E+07
11	22	MD	2247199,0000000	206190,0000000	2765369,0000000		1,2236197E+07	4650652,0000000	7809281,5000000	2624195,0000000	9416248,0000000

Nr = fortlaufende Ziffern

Proband = jedem Probanden wurde im Studienverlauf eine Nummer zugeteilt

## Deskriptive Statistik

- Morbus Dupuytren



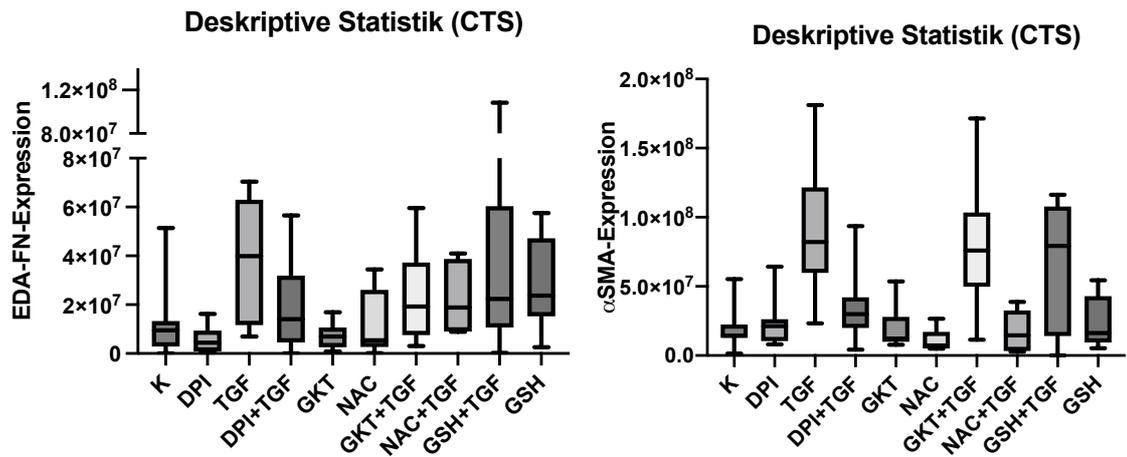
### EDA-Fn

	K	DPI	GKT	NAC	GSH	TGF	DPI+TGF	GKT+TGF	NAC+TGF	GSH+TGF
<b>Number of values</b>	11	11	11	5	8	11	11	11	5	8
<b>Minimum</b>	26752	180825	89469	550755	276334	3019206	378302	374729	630496	954783
<b>Maximum</b>	61155250	52155330	47780103	11713533	120000000	130000000	85599518	105615619	40521367	174722376
<b>Range</b>	61128498	51974505	47690634	11162778	119723666	126980794	85221216	105240890	39890871	173767593
<b>Mean</b>	13371780	7022316	7856145	4167641	38889753	39547775	14093936	16310544	11640783	55611352
<b>Std. Deviation</b>	18743962	15364689	14209242	4620379	47082883	47517199	25015132	31930413	16534426	63958310
<b>Std. Error of Mean</b>	5651517	4632628	4284248	2066296	16646313	14326975	7542346	9627382	7394420	22612678

### alphaSMA

	K	DPI	GKT	NAC	GSH	TGF	DPI+TGF	GKT+TGF	NAC+TGF	GSH+TGF
<b>Number of values</b>	11	11	11	5	8	11	11	11	5	8
<b>Minimum</b>	773432	1002585	1128572	366851	299056	6351701	1779712	3288817	230328	832257
<b>Maximum</b>	64052106	63478455	62227541	7245818	129000000	224000000	147012736	126829596	11376655	307217670
<b>Range</b>	63278674	62475870	61098969	6878967	128700944	217648299	145233024	123540779	11146327	306385413
<b>Mean</b>	16136708	19753008	16459275	2360705	29908233	72745161	30612275	45563867	3371612	78613150
<b>Std. Deviation</b>	19705142	19293568	22586052	2793208	41864997	71949209	42435386	48153146	4630958	105476355
<b>Std. Error of Mean</b>	5941324	5817230	6809951	1249160	14801512	21693503	12794750	14518720	2071027	37291523

- Karpaltunnel-Syndrom



EDA-Fn

	K	DPI	GKT	NAC	GSH	TGF	DPI+TGF	GKT+TGF	NAC+TGF	GSH+TGF
Number of values	12	12	12	5	8	12	12	12	5	8
Minimum	29016	284142	794299	42069	2543532	6930894	64543	3051633	8957053	210295
Maximum	51434292	16185969	16896641	34379284	57577249	70384977	56535780	59593815	40934024	108371327
Range	51405276	15901827	16102343	34337215	55033717	63454083	56471237	56542182	31976971	108161033
Mean	12073176	5452942	6986946	12452626	27732572	37341225	19229488	22472094	22840616	35187930
Std. Deviation	13902585	5060695	4769804	13837496	19078132	23891452	17196069	17024088	15106563	36183646
Std. Error of Mean	4013331	1460897	1376924	6188316	6745138	6896868	4964078	4914431	6755860	12792851

alphaSMA

	K	DPI	GKT	NAC	GSH	TGF	DPI+TGF	GKT+TGF	NAC+TGF	GSH+TGF
Number of values	12	12	12	5	8	12	12	12	5	8
Minimum	1376400	8011493	7761980	4880910	5249146	23272238	4220541	11499436	2817485	101920
Maximum	55303566	64293087	53552312	26601664	54452748	181000000	93619381	171483316	38719036	116274745
Range	53927166	56281594	45790332	21720754	49203602	157727762	89398840	159983880	35901551	116172825
Mean	19137408	23145275	19282069	10316650	23812075	90645851	34478214	80845704	17256404	64715427
Std. Deviation	14539447	16370668	14934829	9185049	18575651	48905134	23536600	46242078	15325330	47248168
Std. Error of Mean	4197177	4725805	4311314	4107679	6567484	14117696	6794431	13348938	6853696	16704750

## Danksagung

Tatsächlich ist der Tag gekommen, an dem diese Arbeit fertiggestellt wurde. Es hat viel Zeit, Mühe und Kraft gekostet. Insgesamt fast 6 Jahre hat es gedauert, davon sieben Monate Laborarbeit -neben dem laufenden Medizinsemester- bis im Verlauf die Literaturrecherche, die statistische Auswertung und schließlich die Fertigstellung der Arbeit erzielt wurde. Neben der Arbeit als Assistenzärztin wurde die Zeit leider nicht mehr, sodass die wenig freie Zeit schließlich dafür genutzt wurde.

Diese Arbeit wäre aber in Alleinleistung niemals möglich gewesen. Für diesen „Dr.med.“ -Titel war große Unterstützung von allen Seiten notwendig.

Deshalb möchte ich mich maßgeblich – ohne den diese Arbeit niemals möglich gewesen wäre – bei Prof. Christoph Suschek, meinem Doktorvater, bedanken. Vielen Dank für die schöne und angenehme Laborzeit, die schönen gemeinsamen Frühstückszeiten im Team und natürlich für die Geduld und große Unterstützung während dieser Zeit. Ebenso möchte ich mich bei PD Mahotka bedanken, dass er dankenswerterweise meine Zweitbetreuung übernahm.

Auch das tolle Team des Orthopädie- und Unfallchirurgie - Forschungslabors (damals noch Unfall- und Handchirurgie, 2019) ist mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden. So haben mich Samira Seghrouchni, Jutta Wilkens und Jutta Schneider stets tatkräftig in meiner Forschungsarbeit unterstützt; auch falls eine Versuchsreihe mal nicht klappte.

Der Support im Labor war natürlich wichtig, jedoch mussten meine Eltern, meine Schwester Lena und vor allem mein Freund Niklas oftmals meine Motivationsstütze sein. So wurde ich immer wieder durch sie angetrieben weiterzumachen und nicht aufzugeben. Auch wenn viele Wochenenden und die freie Zeit dafür aufgewendet wurden.

Danke!

Dann möchte ich mich noch ganz herzlich bei meiner Laborpartnerin und mittlerweile sehr guten Freundin Nathalie Gaßmann bedanken. Danke dir für deine Unterstützung jeglicher Art und danke, dass unsere Freundschaft auch über die Doktorarbeit hinausgewachsen ist.