Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Klinikdirektor: Univ.-Prof. Dr. med. Carl Neuerburg

Die Bedeutung der Transforming Growth Factor-β1 Aktivierung für die Pathogenese des Morbus Dupuytren

Dissertation

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

vorgelegt von
Nele Dauer
2026

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

gez.:
Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter: PD Dr. rer. nat. Vera Grotheer
Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Lorenz Sellin

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Oezel L, Wohltmann M, Gondorf N, Wille J, Güven I, Windolf J, Thelen S, Jaekel C, Grotheer V.
Dupuytren's Disease Is Mediated by Insufficient TGF-β1 Release and Degradation.
Int J Mol Sci. 2023;24(20):15097. doi:10.3390/ijms242015097 [1]

Zusammenfassung (deutsch)

Morbus Dupuytren ist eine fibroproliferative Erkrankung der Palmaraponeurose, die zu einer fortschreitenden Beugekontraktur der Finger führt und damit händische Tätigkeiten im Alltag von Betroffenen deutlich einschränkt. Die Pathogenese des Morbus Dupuytren (MD) wird maßgeblich durch eine übermäßige Myofibroblastengenese geprägt, wofür Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) verantwortlich gemacht wird. TGF-β1 ist ein Zytokin mit vielfältigen Funktionen, das unter anderem an der Regulation von Wundheilung und der Myofibroblastengenese beteiligt ist. TGF-β1 führt zur gesteigerten α-smooth muscle actin (α-sma) Expression, einem Surrogatparameter für die vermehrte Myofibroblastengenese. Es wurde nachgewiesen, dass TGF-β1 im Gewebe des MD überexprimiert wird. TGF-β1 wird zunächst als inaktives Protein synthetisiert und in einem Komplex aus TGF-β, latency associated peptide (LAP) und latent TGF binding protein (LTBP) an die extrazelluläre Matrix (EZM) gebunden und in dieser inaktiven Form, gespeichert. Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung oder mechanische Zugkräfte, die TGF-β1 aus dem Komplex freisetzen. Für den Abbau des TGF-β1 ist Caveolin-1 (Cav-1) ein entscheidender Faktor. Nach Bindung von TGF-β1 an die Rezeptoren werden diese durch Cav-1 internalisiert, wodurch die Signalübertragung beendet wird. Inwiefern die Freisetzung von TGF-β1 aus diesem Komplex oder der Abbau dieses Signals beim MD inhibiert ist, ist bisher nicht im Detail untersucht. Daher wurden in dieser Arbeit die an der TGF-β1-Aktivierung und Signaldegradation beteiligten Proteine in MD-Fibroblasten untersucht. Die Analyse der Genexpression erfolgte mittels Western-Blot und Immunfluoreszenz.

In dem vorliegenden Promotionsvorhaben konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Cav-1- und Plasminexpression , die an der Aktivierung und dem Abbau des TGF-β1 beteiligt sind, in den MD-Fibroblasten signifikant reduziert war.

Somit kann diese Arbeit einen wesentlichen Beitrag dazu leisten die Pathomechanismen die für die gestörte Myofibroblastengenese im Dupuytren verantwortlich sind aufzuklären. Deswegen können die Ergebnisse daher in Zukunft Gegenstand von vertiefenden Forschungen sein, um möglicherweise neue Therapieoptionen den MD zu entwickeln.

Zusammenfassung (Englisch)

Morbus Dupuytren (MD) is a fibroproliferative disorder of the palmar aponeurosis that leads to progressive flexion contractures of the fingers, significantly limiting the daily activities of those affected. The pathogenesis of MD is primarily caused by excessive myofibroblast generation, which is attributed to transforming growth factor-β1 (TGF-β1). TGF-β1 is a cytokine with a variety of functions, including involvement in wound healing and fibrosis formation. TGF-β1 promotes increased expression of α-sma, a surrogate marker for disrupted myofibroblastogenesis. It has been demonstrated that TGF-β1 is overexpressed in MD tissue. TGF-β1 is initially synthesized as an inactive precursor molecule and stored in the extracellular matrix (EZM) in a complex with latency-associated peptide (LAP) and latent TGF-binding protein (LTBP), where it is inactive. Activation occurs through proteolytic cleavage or mechanical forces that release TGF-β1 from this complex. Caveolin-1 (Cav-1) plays a crucial role in the subsequent signal transduction of TGF-β1. After TGF-β1 binds to its receptors, these are internalized by Cav-1, thus terminating the signal transmission. Whether the release of TGF-β1 or its signal transduction is disrupted in MD remains unclear. Therefore, this study investigated the proteins involved in TGF-β1 activation and signal degradation in MD fibroblasts. Gene expression analysis was performed using Western-blotting an immunofluorescence.

First, the concentration of TGF-β1 was determined at which α-sma expression was maximal in MD fibroblasts. After that, the gene expression of proteins involved in TGF-β1 activation and signal degradation was detected in DD fibroblasts after stimulation with the previously determined TGF-β1 concentration. It was shown, among other findings, that Cav-1 and plasmin expression were significantly reduced in MD fibroblasts.

This study demonstrates that both disrupted release and impaired degradation of TGF-β1 play significant roles in pathogenesis of MD. These mechanisms should therefore be the subject of further research in the future to potentially develop new therapeutic options for individuals affected by Morbus Dupuytren.

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
A	Ampère
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ATII	Angiotensin II
AT1-R	Angiotensin-1-Rezeptor
APC	Allophycocyanin
α-sma	α-smooth muscle actin
BCA	bicinchoninic acid
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
°C	Celsius
ca.	circa
Cav-1	Caveolin-1
CD	Cluster of Differentiation
CTS	Karpaltunnelsyndrom
Cu	Kupfer
DNA	desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alia
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence Activated Cell Scanning
FB	Fibroblasten
FBS	Foetal bovine serum (Fetales Rinderserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
x g	Maßeinheit für RCF (relative centrifuge force), RCF = $1.118 * 10^{-5} * r * (rpm)^2$
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HRP	Merettichperoxidase
IPF	Idiopathische Lungenfibrose
kDa	Kilodalton

LAP	latency associated peptide
LLC	large latent complex
LTBP	latent TGF binding protein
M	Molare Masse
MCP	Metacarpophalangealgelenk
MD	Morbus Dupuytren
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloprotease
µ	Mikro
ng	Nanogramm
Nr	Nummer
p	Piko
PCR	polymerase chain reaction
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PAI	plasminogen activator inhibitor
PNF	Perkutane Nadelfasziotomie
PIP	Proximales Interphalangealgelenk
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLC	small latent complex
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TβR-I	TGF-β Rezeptor Typ 1
TβR-II	TGF-β Rezeptor Typ 2
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween 20
TGF-β	Transforming growth factor-β
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

tPA	tissue-type plasminogen activator
TSP	Thrombospondin
TXA	Tranexamsäure
uPA	urokinase-type plasminogen activator
V	Volt
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
w	with
w/o	without

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung....1

1.1 Morbus Dupuytren....1

1.2 Karpaltunnelsyndrom....4

1.3 Erhöhte Myofibroblastengenese und TGF-β....4

1.4 Aktivierung von TGF-β1 / Prozessierung durch Proteasen....6

1.4.1 Aktivierung des TGF-β1 durch Thrombospondin-1....7

1.4.2 Integrin vermittelte Freisetzung des TGF-β1....8

1.4.3 Aktivierung des TGF-β1 durch MMPs....9

1.4.4 Aktivierung des TGF-β1 durch CD44....10

1.4.5 Aktivierung des TGF-β1 durch Plasminogen....10

1.4.6 Die Auswirkungen von Caveolin-1 auf die Signaltransduktion von TGF-β1....11

1.5 Ziele der Arbeit....12

2 Material und Methodik....14

2.1 Material....14

2.1.1 Patientenproben....14

2.1.2 Nicht biologisches Material....14

2.1.3 Substanzen....18

2.1.4 Lösungen....21

2.1.5 Software....23

2.2 Zellkultur Methoden....24

2.2.1 Zellkultur....24

2.2.2 Isolation der Fibroblasten....24

2.2.3 Einfrieren und Auftauen der Fibroblasten....25

2.2.4 Aussaat der Fibroblasten....25

2.3 Stimulation der Fibroblasten mit Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) 26

2.3.1 Konzentrationsreihe....26

2.3.2 Stimulation mit 4 ng/ml TGF-β1....26

2.4 Western-Blot-Analyse....27

2.4.1 Ernte der Fibroblasten zur Proteinbestimmung....27

2.4.2 Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung....27

2.4.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....28
2.4.4 Western-Blotting Analysen von den untersuchten Proteinen TSP-1, Plasminogen, Cav-1, Integrin αvβ6, MMP-2, MMP-9 und MMP-14.....29
2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Analyse der LAP-Sequenzen.....31
2.5.1 RNA-Isolation aus den Fibroblasten.....31
2.5.2 Enzymatische Verdauung der DNA.....32
2.5.3 Reverse Transkription zur Vorbereitung der Real-Time PCR.....32
2.5.4 Real-Time PCR der LAP-TGF Primer.....33
2.5.5 Gelelektrophorese zur Kontrolle der Amplifikatlänge.....34
2.6 Durchflusszytometrische Analyse der Proteinexpression.....35
2.7 Statistische Auswertung.....37
3 Ergebnisse.....38
3.1 Stimulation der Fibroblasten mit TGF-β1.....38
3.2 Analyse der Proteinexpression nach Stimulation mit 4 ng/ml TGF-β1...40
3.2.1 Vergleich der MMP-9 Proteinexpression.....40
3.2.2 Vergleich der MMP-14 Proteinexpression.....41
3.2.3 Vergleich der MMP-2 Proteinexpression.....42
3.2.4 Vergleich der Thrombospondin-1 Proteinexpression.....43
3.2.5 Vergleich der Integrin αvβ6 Proteinexpression.....44
3.2.6 Beeinflussung der Plasminogen Expression.....45
3.2.7 Vergleich der Caveolin-1 Proteinexpression.....46
3.3 Analyse der Integrin αvβ6 -Proteinexpression.....47
3.3.1 Vergleich der CD44 Proteinexpression.....48
4 Diskussion.....50
4.1 Proteinexpression von MMP-2, MMP-9 und MMP-14 im MD.....51
4.2 Proteinexpression von TSP-1 im MD unter Einfluss von TGF-β1.....54
4.3 Veränderung der Integrin αvβ6 Proteinexpression unter Einfluss von TGF-β1 im MD.....56
4.4 Proteinexpression von Plasmin im MD unter Einfluss von TGF-β1.....57
4.5 Verminderte Caveolin-1 Proteinexpression im MD.....58
4.6 Ausblick.....61

4.7 Limitationen der Studie.....63

5 Literaturverzeichnis.....65

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Grafische Darstellung Konzentrationsreihe.....26

Abb. 2: Grafische Darstellung der Stimulation mit TGF.....27

Abb. 3: Evaluation der α-sma Proteinexpression nach 24 h. Stimulation der MD-FB mit 1 – 5 ng/ml TGF-β1 für 24 h. Die Werte sind jeweils auf die unbehandelte Kontrolle (w/o) normiert.....38

Abb. 4: Evaluation der α-sma-Proteinexpression nach 48 h. Stimulation der MD-FB mit 1 – 5 ng/ml TGF-β1 für 48 h. Die Werte sind jeweils auf die unbehandelte Kontrolle (w/o) nach 24 h normiert.....39

Abb. 5: Evaluation der α-sma Proteinexpression nach 72 h. Stimulation der MD-FB mit 1 – 5 ng/ml TGF-β1 für 72 h. Die Werte sind jeweils auf die unbehandelte Kontrolle (w/o) nach 24 h normiert.....39

Abb. 6: Repräsentative Mikroskopaufnahmen von MD-Fibroblasten.....40

Abb. 7: MMP-9 Proteinexpression (n = 11). Relative Veränderung der Proteinexpression bezogen auf den Mittelwert der unbehandelten CTS-FB.....41

Abb. 8: Exemplarische Darstellung einer Western-Blot-Analyse des MMP-9 Proteins.....41

Abb. 9: MMP-14 Proteinexpression (n = 9).....42

Abb. 10: Exemplarische Darstellung einer Western-Blot-Analyse des MMP-14 Proteins.....42

Abb. 11: MMP-2 Proteinexpression (n = 11).....43

Abb. 12: Exemplarische Darstellung einer Western-Blot-Analyse des MMP-2 Proteins.....43

Abb. 13: Thrombospondin-1 Proteinexpression (n =11). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.....44

Abb. 14: Exemplarische Darstellung einer Western-Blot-Analyse des Thrombospondin-1 Proteins. Verglichen wurde die Thrombospondin-1 Expression in MD- und CTS-FB.....44

Abb. 15: Integrin $\alpha v\beta 6$ Proteinexpression (CTS n = 9; MD n = 8).....45

Abb. 16: Exemplarische Darstellung einer Western-Blot Analyse des Integrin αvβ6 Proteins.....45
Abb. 17: Plasminogen Proteinexpression (CTS n = 14; MD n = 12).....46
Abb. 18: Exemplarische Darstellung einer Western-Blot Analyse des Plasminogen Proteins.....46
Abb. 19: Caveolin-1 Proteinexpression (n = 14).....47
Abb. 20: Exemplarische Darstellung einer Western-Blot Analyse des Caveolin-1 Proteins.....47
Abb. 21: Integrin αvβ6 Proteinexpression (CTS n = 2; MD n = 3).....48
Abb. 22: CD44 Proteinexpression (n = 9).....48
Abb. 23: Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der CD44 Proteinexpression in CTS-Fibroblasten.....49
Abb. 24: Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der CD44 Proteinexpression in MD-Fibroblasten.....49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: **nicht biologisches Material**.....14
Tabelle 2: **Substanzen**.....18
Tabelle 3: **Software**.....23
Tabelle 4: **BCA-Standard**.....28
Tabelle 5: **Primärantikörper für die Western-Blot Analyse**.....30
Tabelle 6: **Sekundärantikörper für die Western-Blot-Analyse**.....31
Tabelle 7: **Primer**.....33
Tabelle 8: **Antikörper FACS**.....36
Tabelle 9: **Sekundärantikörper FACS**.....36

1 Einleitung

1.1 Morbus Dupuytren

Der Morbus Dupuytren (MD) zählt als fibroproliferative Erkrankungen zu den gutartigen Tumoren und betrifft die Palmaraponeurose. Bei dieser gutartigen Fibromatose kommt es zu Strang- und Knotenbildung in der Hohlhand, welche häufig Flexionsdeformitäten einer oder mehrerer Finger zur Folge hat [2].

Erstmals wurde die palmare Fibromatose durch Felix Plater um 1614 beschrieben [3], welcher damals eine traumatische Schädigung der Beugesehnen als Ursache vermutete [4]. Die Bezeichnung der Erkrankung geht auf den französischen Chirurgen Guillaume Dupuytren zurück. Dieser machte Stränge aus aponeurotischem Gewebe für die Kontrakturen verantwortlich und beschrieb die chirurgische Durchtrennung der Stränge als Therapieansatz [4].

Die Ätiologie des MD ist multifaktoriell und bis heute nicht abschließend geklärt, allerdings gilt eine genetische Prädisposition mittlerweile als erwiesen [5, 6]. Es besteht ein Zusammenhang zwischen MD und systemischen Erkrankungen wie zum Beispiel Diabetes Mellitus [7]. Ebenso wird eine Assoziation zur Epilepsie beschrieben [8, 9]. Interessanterweise wird der Morbus Ledderhose als fibroproliferative Erkrankung der Plantarfaszie ebenso mit der Epilepsie assoziiert [10]. Eine Studie zeigte, dass insbesondere Männer, die von MD betroffen sind, häufiger ebenso an Morbus Ledderhose erkranken [11]. Weiterhin können exogene Faktoren, wie z. B. Mikrotraumata der Hand [12], Nikotin- und Alkoholabusus die Wahrscheinlichkeit erhöhen, an MD zu erkranken [13]. Männer sind häufiger betroffen als Frauen [14]. Außerdem nimmt die Wahrscheinlichkeit an MD zu leiden mit fortschreitendem Alter zu [15, 16]. Dabei erkranken Männer am häufigsten im 6. Lebensjahrzehnt und Frauen im 7. Lebensjahrzehnt [17].

Angaben zur Epidemiologie unterliegen deutlichen geographischen Schwankungen mit Prävalenzen zwischen 0,6 und 30 % [15, 18]. Die höheren Prävalenzen finden sich am ehesten in Nordeuropa, insgesamt wird ein Gefälle zwischen dem Norden und Süden beschrieben [16, 17].

Der MD kann beidhändig auftreten, betrifft aber häufig eine Hand in stärkerem Ausmaß [19]. Zwischen Dermis und Palmarfaszie entstehen Veränderungen des fibrösen Skeletts, so dass diese miteinander verwachsen und die Hand zunehmend an Flexibilität verliert [20]. Diese ersten Veränderungen werden meist in Form von Spannung und Einziehungen an der Handinnenfläche bemerkt [21]. Im Verlauf entwickeln sich die häufig noch schmerzlosen fibrotischen Knoten in der Palmaraponeurose [19], welche mit Fortschreiten der Erkrankung durch sehnenartige Stränge ersetzt werden [4, 8]. Diese Stränge sind ebenfalls mit der Haut verwachsen [4] und führen durch Kontraktion zu den pathognomonischen Flexionsdeformitäten [22]. Am häufigsten ist der Ringfinger davon betroffen, oft auch in Kombination mit dem kleinen Finger [23].

Auf histologischer Ebene werden in der Pathogenese des MD drei Phasen unterschieden: die proliferative, involutionale und residuale Phase.

Die proliferative Phase ist durch die Anwesenheit zahlreicher Fibroblasten und eine frühe Form der Knotenbildung gekennzeichnet. In dieser Phase kommt es zu einer vermehrten Synthese von Kollagen Typ III, wodurch das Verhältnis von Kollagen Typ III zu Kollagen Typ I im Verlgeich zur normalen Palmarfaszie deutlich ansteigt. In der involutionalen Phase stellen Myofibroblasten den dominierenden Zelltyp dar und das Verhältnis von Kollagen Typ III zu Typ I bleibt weiterhin erhöht, beginnt jedoch im Vergleich zur proliferativen Phase kontinuierlich abzunehmen. In dieser Phase kommt es zur sichtbaren Kontraktion und die darüber liegende Haut wird durch das Schrumpfen der Knoten eingezogen. In der Residualphase werden die Knoten schließlich durch zellarme, kollagenreiche Kontrakturstränge ersetzt. Hierbei zeigt sich histologisch eine Dominanz von Kollagen Typ I, so dass das Gewebe einem reifen, narbenähnlichen Bindgewebe entspricht [24, 25].

Der klinische Schweregrad der Dupuytren Kontraktur lässt sich nach Tubiana in fünf Stadien einteilen. Stadium 0 ist charakterisiert durch aponeurotische Knoten oder Stränge ohne Kontraktur. Die Stadien I bis IV werden nach Streckdefiziten der betroffenen Finger in 45° Schritten eingeteilt. Im Stadium I präsentiert sich demnach ein Streckdefizit von 45° und im Stadium IV ein Streckdefizit von mindestens 135° [26].

Es wurden verschiedene konservative Behandlungsansätze zur Therapie des MD untersucht, ein Beispiel ist die Radiotherapie. Es konnte beobachtet werden, dass ein Fortschreiten der Beugekontrakturen durch die Radiotherapie verhindert werden konnte, wenn die Behandlung in frühen Stadien des MD angewandt wurde. In einigen Fällen wurde darüber hinaus über eine Reduktion der Symptome berichtet [27]. In den fortgeschritteneren Stadien des MD konnte eine Progression durch Radiotherapie nicht verhindert werden [28]. In den Fällen, in denen trotz Radiotherapie im Verlauf eine operative Intervention notwendig wurde, war die Rate an Komplikationen durch die Radiotherapie nicht erhöht [29]. In den Leitlinien für Strahlentherapie gutartiger Erkrankungen wird demnach eine Radiotherapie als prophylaktische Maßnahme für das Stadium 0 empfohlen [30].
In einem weiteren Therapieansatz wird Kollagenase aus dem Clostridium histolyticum in einen Dupuytren Strang injiziert. Durch dieses Enzym soll das Kollagen in dem Strang degradiert werden, so dass die Kontraktur am Tag nach der Injektion durch leichte Manipulation an der Hand gelöst werden kann [31].
Die operative Therapie ist bis heute der Goldstandard für Patienten, die auf Grund des MD an einer Funktionseinschränkung der Hand leiden [32]. Bei einer Flexionskontraktur von 30° über einem Metacarpophalangealgelenk (MCP) und 15° über einem proximalen Interphalangealgelenk (PIP) in Kombination mit einem Funktionsdefizit kann eine chirurgische Intervention indiziert sein [20].
Die Perkutane Nadelfasziotomie (PNF) zählt zu den minimalinvasiven Therapieoptionen des MD und kann ambulant unter Lokalanästhesie durchgeführt werden [33]. Ziel dieser Methode ist es, das Dupuytren-Gewebe durch Stichinzisionen so weit zu schädigen, bis die Stränge durch das Anwenden von passiver Extension durchtrennt werden können [34, 35]. Vorteilhaft an dieser Methode ist, dass die Patienten ihre Hand 24 Stunden nach dem Eingriff wie üblich bewegen dürfen. Zusätzlich kann eine nächtliche Extensionsschiene für etwa einen Monat getragen werden [36]. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist das niedrige Risiko für Komplikationen [35], so dass die PNF ebenfalls für Patienten mit vielen Komorbiditäten geeignet ist [37]. Wiederum sind die Rezidivraten nach 5 Jahren von über 80 % im Vergleich höher als bei anderen Methoden, wie zum Beispiel bei der limitierten Fasziektomie mit 20 % [38]. Bei der limitierten Fasziektomie wird das makroskopisch sichtbar pathologische

Gewebe zusammen mit einem schmalen Rand der gesunden Aponeurose entfernt [39]. Die Erholung von diesem Eingriff dauert etwa vier bis sechs Wochen [40].

Die Dermofasziektomie ist eine operative Methode mit niedrigeren Rezidivraten von etwa 10 %. Hier wird nicht nur die pathologische Aponeurose entfernt, sondern auch die darüber liegende Haut. Der entstandene Defekt wird im Anschluss mit einem autologen Transplantat gedeckt [41]. Auf Grund des höheren Risikos für post-operative Komplikationen ist die Dermofasziektomie eher für Patienten mit einem stark ausgeprägten klinischen Bild des MD und einem hohen Rezidivrisiko vorgesehen [32]. Zu den häufigsten Komplikationen der chirurgischen Interventionen zählen Nerven- und Gefäßverletzungen, Wundheilungsstörungen, postoperative Hämatome und Infektionen. Deshalb ist eine Nutzen-Risiko-Abwägung bei der Indikationsstellung für eine Therapiemethode entscheidend [42].

1.2 Karpaltunnelsyndrom

Als Vergleichsgewebe wurde Gewebe aus Operationen zur Behandlung des Karpaltunnelsyndroms (CTS) entnommen und daraus die Fibroblasten isoliert. Bei dem CTS kommt es zur Kompression des Nervus medianus, welcher zusammen mit den Beugesehnen der Finger durch den Karpaltunnel zieht [43]. Durch die Nervenkompression leiden die Patienten unter Schmerzen von brennendem Charakter, Taubheit und Kribbeln im Versorgungsgebiet des Nervus medianus distal des Karpaltunnels [44]. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des CTS steigt wie bei dem MD mit dem Alter, aber im Gegensatz zum MD sind Frauen häufiger vom CTS betroffen als Männer [45].

1.3 Erhöhte Myofibroblastengenese und TGF-β

Fibroblasten sind spindelförmige Zellen, die unter anderem Bestandteile der Extrazellulären Matrix (EZM) synthetisieren. Des Weiteren wird den Fibroblasten eine große Bedeutung in der Wundheilung zugeschrieben [46], denn sie können als Antwort auf mechanische Reize über eine Zwischenstufe der Protomyofibroblasten zu Myofibroblasten differenzieren [47] und sorgen unter anderem für den Wundverschluss.

Charakteristisch für Myofibroblasten ist die Kombination aus funktionellen und strukturellen Eigenschaften von Fibroblasten und glatten Muskelzellen [48]. Kennzeichnend für die Myofibroblasten sind Bündel aus Aktinfilamenten [48], die über Fibronexus mit extrazellulären Fibrillen verbunden sind, so dass die generierten kontraktilen Kräfte auf die umgebende EZM übertragen werden können [47]. Auf diese Weise sind die kontraktilen Kräfte der Myofibroblasten zum einen ein wesentlicher Aspekt der Wundheilung und können zum anderen durch pathologische Überaktivität zu Narbenbildung und Gewebefibrosen, wie es im MD der Fall ist, führen [49].
Darüber hinaus ist bekannt, dass Myofibroblasten den überwiegenden Anteil an Zellen in den Dupuytren'schen Knoten darstellen [50, 51]. Im Gegensatz zu den Vorläufer-Fibroblasten und Protomyofibroblasten sind Myofibroblasten für die de novo Expression von α-smooth muscle actin (α-sma) bekannt, weshalb α-sma als Surrogatparameter für Myofibroblasten dient [49, 52].
TGF-β1 ist wichtig für eine Vielzahl biologischer Prozesse. Es reguliert Zellwachstum und Zelldifferenzierung.
Abhängig von Zelltyp und Kontext wurden sowohl antiproliferative Effekte des TGF-β1 [53] als auch stimulierende Effekte auf die Zellproliferation beschrieben [54]. TGF-β1 übernimmt immunregulatorische Funktionen, in dem es T-Lymphozyten, deren Differenzierung und Interaktionen beeinflusst [55]. Als Modulator der Kollagensynthese und Angiogenese, ist TGF-β1 ein wichtiger Faktor im Wundheilungsprozess [56]. In chronischen, nicht-heilenden Wunden wurde unterstützend dazu eine reduzierte TGF-β1 Aktivität nachgewiesen [57]. In hypertrophierenden Narben hingegen wurde eine vermehrte TGF-β1-Expression in den Fibroblasten entdeckt [58].

In der TGF-β-Familie [59] sind drei Isoformen bekannt, die in Säugetieren vorkommen: TGF-β1, TGF-β2 [60] und TGF-β3 [61]. Berndt *et al.* zeigten, dass diese drei Isoformen in Fibroblasten aus Knoten des MD exprimiert werden [62]. TGF-β1 wird jedoch nicht nur in Fibroblasten, sondern auch in vielen weiteren Zelltypen, wie beispielsweise Thrombozyten, exprimiert [63, 64].
Es gibt wichtige funktionelle Unterschiede zwischen den drei TGF-β-Isoformen.

TGF-β2 wird vermehrt im zentralen Nervensystem, den Augen und im Herzen exprimiert und spielt eine bedeutende Rolle während der Embryogenese und Organentwicklung [65].
TGF-β3 übernimmt eine wichtige Funktion im Wundheilungsprozess, wobei diesem Wachstumsfaktor im Gegensatz zu TGF-β1 eine anti-fibrotischer Effekt zugeschrieben wird [66]. Im Maus-Modell wurde gezeigt, dass TGF-β3 einen antagonistischen Effekt gegenüber TGF-β1 hat und einen hemmenden Einfluss auf die Differenzierung von Myofibroblasten ausübt [67]. TGF-β1 hingegen fördert die Fibrose und Akkumulation der EZM [68].

Es ist bekannt, dass TGF-β1 wesentlich an der Myofibroblastengenese beteiligt ist [69]. Mehrere Studien haben gezeigt, dass TGF-β1 die Expression von α-sma induziert [70, 71]. Es gilt mittlerweile als erwiesen, dass TGF-β1 eine übergeordnete Funktion in der Pathogenese des MD übernimmt. Einerseits wird TGF-β1 im erkrankten Gewebe des MD signifikant überexprimiert, was auf seine zentrale Bedeutung für die fibrotischen Umbauprozesse hindeutet [72, 73]. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die exogene Zugabe von TGF-β1 zu MD-Fibroblasten eine gesteigerte DNA-Synthese sowie eine erhöhte Zellproliferation induziert, was die fortschreitende Gewebeveränderung weiter verstärkt [74].
Darüber hinaus spielt TGF-β1 eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, die maßgeblich für die pathologische Gewebeverhärtung und Kontrakturbildung verantwortlich ist [75].
Myofibroblasten produzieren vermehrt EZM und entwickeln durch Aktinfilamente eine permanente mechanische Spannung, die zur fortschreitenden Kontraktur der Finger führt [76, 77]. Zusätzlich verstärkt die vermehrte Expression von α-sma in Myofibroblasten die Gewebespannung weiter, was die progressive Beugekontraktur begünstigt [78].

1.4 Aktivierung von TGF-β1 / Prozessierung durch Proteasen

TGF-β1 entsteht zunächst als inaktives Vorläuferprotein und wird durch die Endoprotease Furin prozessiert, bevor es sezerniert wird [79, 80]. Dort ist TGF-β1

nicht-kovalent an das *latency associated peptide* (LAP) gebunden [81]. Zusammen werden LAP und TGF-β als *small latent complex (SLC)* bezeichnet und sezerniert. In diesem Zustand befindet sich TGF-β1 in einer biologisch inaktiven Form [82]. Der SLC ist häufig zusätzlich an das *latent TGF binding protein* (LTBP) assoziiert, das die Verankerung in der EZM unterstützt [83] und gemeinsam mit dem SLC den *large latent complex* (LLC) bildet [81, 84].
In der sezernierten Form ist LAP-TGF-β1 nicht in der Lage, an seine Rezeptoren zu binden und muss deshalb vorher extrazellulär aktiviert werden [81]. Es konnte gezeigt werden, dass für die drei Isoformen des TGF-β auch jeweils verschiedene LAPs (LAP1, LAP2 und LAP3) existieren, welche unterschiedlich mit den TGF-β-Rezeptoren interagieren [85].

Die TGF-β Rezeptoren, TGF-β Rezeptor Typ-I (TβR-I) und TGF-β Rezeptor Typ-II (TβR-II), sind Rezeptoren der Serin/Threonin Kinase Familie [86]. TGF-β1 bindet vornehmlich an den TβR-II, welcher sich in der Zellmembran befindet. Der TβR-I erkennt das an den TβR-II gebundene TGF-β, schließt sich dem Komplex an und wird anschließend vom TGF-βR-II phosphoryliert [87]. Das führt wiederum zu einer Phosphorylierung von bestimmten SMAD Proteinen, wie SMAD2 und SMAD3 [88], welche als Transkriptionsfaktoren in den Nucleus translozieren und dort die Genexpression beeinflussen [89].

1.4.1 Aktivierung des TGF-β1 durch Thrombospondin-1

Thrombospondin-1 (TSP-1) wird von den Thrombozyten wird nach Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin [90] zusammen mit α-Granula freigesetzt und ist im Zuge dessen an der Blutgerinnungskaskade beteiligt [91]. Es konnte gezeigt werden, dass TSP nicht nur Bestandteil von Thrombozyten ist, sondern dass auch andere Zelltypen, wie Endothelzellen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen TSP synthetisieren können [92].
So kann TSP das Wachstum von Fibroblasten anregen [93] und ist im Zusammenhang mit Umbauprozessen der EZM im Rahmen der Wundheilung beteiligt [94].
Als Aktivator von LAP-TGF-β1 bildet TSP-1 einen Komplex mit TGF-β [95] und induziert durch Interaktion mit dem N-terminus des LAP eine

Konformationsänderung des SLC, so dass TGF-β1 in seinen biologisch aktiven Zustand überführt wird [96, 97]. Für die Induktion der Konformationsänderung wird eine KRFK-Aminosäuresequenz im TSP-1 verantwortlich gemacht. Im TSP-2 fehlt diese Sequenz und deshalb kann TGF-β1 nicht aktiviert werden. Die Aktivierung von LAP-TGF-β1 durch TSP-1 kann sogar durch TSP-2 verhindert werden [96]. Die KRFK Sequenz des TSP-1 bindet wiederum an die LSKL-Aminosäuresequenz des LAP [98]. Die LSKL Sequenz wird deshalb als eine entscheidende Stelle für die LAP-TGF-β1 Aktivierung diskutiert [99].
In Hepatozyten aus fibrotischen Leberproben wurde eine vermehrte Expression von TSP-1 und TGF-β1 beobachtet [100]. Im Tiermodell konnte durch Blockade der TSP-1 vermittelten Aktivierung von TGF-β das Voranschreiten der Leberfibrose verhindert werden [101]. Auch in dermalen Fibroblasten wurden nach Inhibierung der TSP-1 vermittelten TGF-β1-Aktivierung anti-fibrotische Effekte beobachtet [102].

1.4.2 Integrin vermittelte Freisetzung des TGF-β1

Integrine sind Membranproteine, die zum einen die Adhäsion von Zellen an die EZM und zum anderen die Verbindung von Zellen untereinander vermitteln. Sie bestehen aus zwei Untereinheiten: der α- und der β-Untereinheit [103]. Einige Integrine, wie z. B. Integrin αvβ6, erkennen Proteine, welche die RGD Sequenz tragen [104, 105]. Die LAPs von TGF-β1 und TGF-β3 enthalten die RGD Sequenz und sind damit Liganden für diese Integrine [106, 107].
Es sind verschiedene Mechanismen bekannt, wie Integrine an der Aktivierung von TGF-β1 beteiligt sein können. Sie sind beispielsweise an der mechanischen Freisetzung von TGF-β1 beteiligt. Myofibroblasten üben über α-sma mechanische Kräfte auf den latenten Komplex aus. Diese Kräfte werden über Integrine, die auf der Oberfläche der Myofibroblasten sitzen, auf das LAP übertragen, wodurch es zur Konformationsänderung des LAP kommt. Die mechanische Dehnung löst die Verbindung zwischen LAP und TGF-β1 auf und TGF-β1 wird in seiner aktiven Form freigesetzt [108]. Wichtig für die Aktivierung ist dabei die Bindung des LLC über das LTBP an die EZM [109].

Außerdem vermitteln Integrine durch Bindung an die RGD-Sequenz am C-Terminus des LAP die Aktivierung von TGF-β1 über Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) [107, 110, 111].

Es gibt Hinweise darauf, dass TGF-β1 selbst wiederum die Synthese einiger Integrine, zum Beispiel die des Integrins αvβ6 erhöhen kann [112]. Integrin αvβ6 i st an Prozessen der Wundheilung beteiligt [113, 114]. In Zusammenhang mit TGF-β1 gilt Integrin αvβ6 als progressiver Faktor in fibrotischen Erkrankungen. Dies wurde in verschiedenen Studien zum Beispiel im Rahmen der Lungenfibrose [110] und Fibrose der Gallengänge [115] untersucht.

Es gibt erste Hinweise darüber, dass sowohl TGF-β1 als auch αv Integrine in den Knoten des MD vermehrt exprimiert werden [116]. Außerdem wurden bereits einige Zusammenhänge zwischen TGF-β1 und dem Integrin αvβ6 beschrieben, daher führten wir eine weiterführende Untersuchung der Proteinexpression von Integrin αvβ6, vor- und nach Zugabe von TGF-β1, durch.

1.4.3 Aktivierung des TGF-β1 durch MMPs

Als Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) werden eine Gruppe von strukturverwandten Proteinasen bezeichnet, welche an den Umbauprozessen der EZM beteiligt sind und durch spezifische *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) inhibiert werden können [117]. Bekannt sind beim Menschen 23 MMPs deren Funktionen unterschiedlich gut untersucht sind [118]. Die Gruppe der MMPs kann weiter unterteilt werden, z. B. in die Gruppe der Gelatinasen, wie MMP-2 und MMP-9 [119]. Das sind Enzyme, die zahlreiche Komponenten der EZM, wie z. B. verschiedene Kollagene abbauen [120].

Die Aktivität der MMPs wird nicht nur über die TIMPs, sondern auch über das α2-Makroglobulin reguliert [121]. Die Umbauprozesse der EZM sind daher abhängig von dem Gleichgewicht zwischen den MMPs und ihren regulatorischen Proteinen. Im Rahmen des MD wird vermutet, dass diese Balance gestört und somit von Bedeutung für die Pathogenese sein könnte [122].

Am Beispiel von Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass MMP-2 und MMP-9 LAP-TGF-β1 über den proteolytischen Weg aktivieren können, wobei sie an unterschiedlichen Stellen des LAP-TGF-β1 binden und folglich verschiedene Spaltprodukte bei der Aktivierung hinterlassen. Auch am Beispiel von

Keratinozyten wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu MMP-2 die Aktivierung von LAP-TGF-β1 durch MMP-9 abhängig von CD44 ist [123].
Weiterhin kann auch MMP-14 an einem Mechanismus beteiligt sein, aktives TGF-β1 freizusetzen. Dieser Mechanismus wird über Integrin αvβ8 vermittelt. Hier bindet Integrin αvβ8 an den SLC, so dass sich ein Komplex aus SLC, Integrin αvβ8 und MMP-14 bildet und LAP-TGF-β1 proteolytisch spaltet und freisetzt [124, 125].

1.4.4 Aktivierung des TGF-β1 durch CD44

In seiner Funktion als Oberflächenrezeptor für Hyaluron ist CD44 an der Interaktion von Zellen untereinander und der Adhäsion an die EZM beteiligt und ermöglicht auf diese Weise die Kommunikation dieser miteinander [126, 127]. Die Bedeutung der CD44 Expression wird im Rahmen von malignen Prozessen, wie Tumorwachstum und Metastasierung diskutiert [128]. In Zusammenhang mit Hyaluron konnte beispielsweise demonstriert werden, dass CD44 begünstigend für das Überleben von malignen Zellen im Gewebe wirkt [129]. Zu den zahlreichen Funktionen des Oberflächenrezeptors gehören die Freisetzung von Zytokinen [130], Umbauprozesse des Zytoskeletts und die Migration von Fibroblasten [131].
Im Rahmen der Tumorforschung konnte gezeigt werden, dass CD44 als Oberflächenrezeptor für MMP-9 dafür sorgt, dass dieses an die Zelloberfläche exponiert wird und dort proteolytisch aktiv werden kann [123, 129]. So konnte für Keratinozyten gezeigt werden, dass CD44 an der proteolytischen Aktivierung von TGF-β1 durch MMP-9 beteiligt ist [123, 131].

1.4.5 Aktivierung des TGF-β1 durch Plasminogen

Als Vorläuferprotein von Plasmin wird Plasminogen zu einem großen Teil in der Leber synthetisiert [132] und zählt zu den wichtigsten Enzymen der Fibrinolyse, da es zur Spaltung von Fibrin und folglich zum Abbau von Blutgerinnseln führt [133]. Darüber hinaus ist Plasmin unter anderem durch Aktivierung von MMPs, in Umbauprozesse des Bindegewebes, wie zum Beispiel die Degradierung der EZM involviert [134, 135]. Die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin wird durch maßgeblich durch 2 Faktoren katalysiert: zum einen durch den *tissue-type*

plasminogen activator (tPA) [136] und zum anderen durch den *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) [137]. Die Aktivität dieser beiden Serinproteasen wird wiederum durch die *plasminogen activator inhibitors* (PAI) PAI-1 und PAI-2 negativ reguliert [138].

Als Serinprotease zählt Plasmin zu den Enzymen, welche LAP-TGF-β1 aktivieren können [139]. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von LAP-TGF-β1 durch Plasmin einem sich selbst regulierendem Prozess unterliegt. Mit steigenden Konzentrationen von aktiviertem TGF-β1, konnte eine vermehrte Synthese von PAI-1 beobachtet werden, wodurch die Konzentration an aktiviertem Plasmin abnimmt und folglich auch die Umwandlung von LAP-TGF-β1 in aktives TGF-β1 [140].

Im Rahmen von Untersuchungen zur Lungenfibrose wurde eine Zunahme an fibrotischen Prozessen bei Plasmin Knock-out-Mäusen beobachtet [141]. Nicht nur in Studien zur Wundheilung wurden in fibrotischem Gewebe erhöhte Level an PAI beobachtet [142], sondern auch in den Knoten der fortgeschritteneren Phasen des MD konnten erhöhte Mengen an PAI nachgewiesen werden [143].

1.4.6 Die Auswirkungen von Caveolin-1 auf die Signaltransduktion von TGF-β1

Caveolin-1 (Cav-1) wird eine bedeutsame Rolle in der Regulation der TGF-β1 Signaltransduktion zugeschrieben. Durch Bindung an den TβR-I kommt es zur Internalisierung des TβR-I, was zu einer Degradierung des TGF-β1 Signals und zum Abbau des TβR-I führt [144].

Es wird ein Zusammenhang zwischen der Dysregulation von Cav-1 und der Pathogenese verschiedener pro-fibrotischer Erkrankungen, wie z. B. der idiopathischen Lungenfibrose (IPF) [145] und der Systemischen Sklerose [146], beschrieben. Drab *et al.* zeigten, dass Cav-1 Knock-out-Mäuse eher eine Lungenfibrose entwickeln [147]. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass Fibroblasten aus dem Gewebe der IPF weniger Cav-1 exprimieren. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Zugabe von TGF-β1 zu einer geringeren Expression von Cav-1 in den Fibroblasten aus dem IPF-Gewebe führt [145].

Auch in den Fibroblasten aus Hautbiopsien der Systemischen Sklerose wurde eine verminderte Expression von Cav-1 nachgewiesen. Hier wurde in gesunden dermalen Fibroblasten durch die Zugabe von TGF-β1 ebenfalls eine Abnahme

der Cav-1 Expression beobachtet [146]. Welchen Einfluss eine vermeintliche Dysregulation von Cav-1 und TGF-β1 in der Pathogenese des MD haben ist bis dato nicht geklärt.

1.5 Ziele der Arbeit

Vorergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten erhöhte Level an LAP-TGF-β im Gewebe des MD nachweisen und nach exogener Zugabe von Plasmin eine verringerte α-sma Expression beobachten.
Ziel dieser Arbeit war es, weitere Proteine zu identifizieren, die im MD differentiell exprimiert werden und möglicherweise an der gestörten Aktivierung und Degradation von TGF-β1 beteiligt sein könnten. Dazu wurde die Proteinexpression mittels Western-Blot-Analyse und Durchflusszytometrie evaluiert.

Zum einen wurden insbesondere die Proteine fokussiert, die an der Aktivierung des TGF-β1-Singals beteiligt sind. Dazu erfolgte eine Analyse der differenziellen Expression von TSP-1, Plasmin, verschiedenen MMPs, CD44 und Integrin αvβ6 in MD-Gewebe im Vergleich zu Kontrollgewebe (CTS).

Der Aspekt, ob eine fehlerhafte Degradation des TGF-β1-Signals zur vermehrten TGF-β1-Expression im MD führt, wurde bislang nicht untersucht. Daher lag der weitere Fokus auf Caveolin-1, das über die Internalisierung des TβR-I zum Abbau des TGF-β1-Signals führt. Hier sollte untersucht werden, ob die Expression des Caveolin-1 in den Fibroblasten des MD verändert ist.

Diese Untersuchungen sollen dazu beitragen, ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen zu gewinnen, die zur Pathogenese des MD beitragen, um zukünftig neue therapeutische Ansatzpunkte entwickeln zu können.

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Patientenproben

Das Durchführen der Studie - mit der Studiennummer: 5882R - wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proben wurden aus der Palmarfaszie von Morbus Dupuytren (MD) Patienten gewonnen. Vergleichbares Gewebe von Patienten mit dem Karpaltunnelsyndrom (CTS) diente als Kontrolle. Die Proben stammen aus kurativen Eingriffen der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf und wären ansonsten verworfen worden. Die Patienten oder deren gesetzliche Vertreter wurden aufgeklärt und stimmten einer Verwendung des Gewebes zu Forschungszwecken schriftlich zu. Insgesamt nahmen 18 Patienten mit MD und 16 Patienten mit CTS an der Studie teil. Unter den MD-Patienten waren 13 Männer und 5 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 67 Jahren. Der Median des Alters war 67 Jahre. Von den 16 Patienten mit CTS waren 6 Männer und 10 Frauen. Der Mittelwert des Alters betrug hier 65 Jahre und der Median war 64 Jahre.

2.1.2 Nicht biologisches Material

Tabelle 1: **nicht biologisches Material**

6-Well-Platten	CELLSTAR® 6 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
48-Well-Platten	MicroAmp Fast Optical 48-Well Reaction Plate (0,1 ml), Applied Biosystems	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE
Abzug	TA 1500 x 900 – 900 (Laborsystem mc6)	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, DE
Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2)	Heracell 150i CO_2 Incubator	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE
Cryo Freezing	Nalgene Cryo 1 °C Freezing	Thermo Fisher Scientific

Container	Container, Cat. No. 5100 0001	GmbH, Dreieich, DE
Elektrophorese Spannungsquelle	VWR Power Source 300 V Electrophoresis Power Supply	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
	PowerPac Basic Power Supply	Bio Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Durchfluss-zytometer	BD FACS Lyric, IC-Nr.: 87135, Serien-Nr.: R659180000179	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, DE
Falcons	50 ml Polypropylene Conical Tube	Corning Science Mèxico S.A. de C.V., MEX
Folie für 48-Well-Platten	MicroAmp 48-Well Optical Film Applied Biosystems	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE
Kühlschrank	Model Number: QCR2304U14	Queue Systems, Inc., Asheville, USA
Kryo-Röhrchen	CRYO.S 2 ml, Art.-Nr.: 122263	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Magnetrührer	VWR Standard 620, Cat. No.: 12365-392	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Mikroskop	Axio Vert.A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Mikrowelle	HMT842C	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, DE
Nanodrop	Nanodrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE
Pasteurpipetten aus Glas	Glass Pasteur Pipettes, 225 mm	BRAND GMBH + CO. KG, Wertheim, DE
PCR-Gerät	Applied biosystems StepOne Real-Time PCR System, 4369074	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE
Petrischalen	TC Schale 100, Cell+	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht, DE
Pipetten	eppendorf research plus 0,1 -	Eppendorf AG, Hamburg,

	2,5 µl	DE
	eppendorf research plus 0,5 - 10 µl	
	eppendorf research plus 10 - 100 µl	
	eppendorf research 100 - 1000 µl	
Pipettierhilfe	pipetus ®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
	accu-jet® pro	BRAND GMBH + CO. KG, Wertheim, DE
Pipettenspitzen	1000 µl Graduated Tip	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, DE
	200 µl Bevelled Tip	
	10/20 µl XL Graduated Tip	
	ep Dualfilter T.I.P.S. 0,1-10 µl, PCR clean	Eppendorf AG, Hamburg, DE
	ep Dualfilter T.I.P.S. 0,5-20 µl, PCR clean	
	ep Dualfilter T.I.P.S. 2-100 µl, PCR clean	
	ep Dualfilter T.I.P.S. 1000 µl, PCR clean	
Reaktionsgefäße	PCR SoftTubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, DE
	Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
	Safe-Lock Tubes 2 ml	
	SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Plattenphotometer	Victor X3 Multimode Plate Reader	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau, DE
Saugpumpe	Integra Vacusafe 158 3xx	INTEGRA Biosciences AG,

		Zizers, CHE
sterile Werkbank	Euroflow EF5E	CleanAir by Baker, Utrecht, NL
Stripetten	corning costar serological pipet 5 ml	Corning Incorporated, USA
	corning costar serological pipet 10 ml	
	corning costar serological pipet 25 ml	
Taumelrollenmischer	CAT RM 5	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen, DE
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, DE
	T100 Thermal Cycler	Bio Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Tiefkühlschrank -20 °C	Labor-Gefrierschrank, Froster	Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, DE
Tiefkühlschrank -80 °C	HERA Freeze HDE Series powered by H-Drive	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE
Transfer System Western-Blot	Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Ultraschallgerät	UPH50 mit Sonotrode MS1, Welabo	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, DE
Vortex-Mixer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., USA
	Heidolph Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Waage (d = 0,01 g)	M-Prove Präzisionswaage AY612	Sartorius Mechatronics T&H GmbH, Hamburg, DE
Wärmeblock	Dry bath FB15101	Fisher Scientific GmbH,

		Schwerte, DE
Wasserbad	Wasserbad WNB10	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, DE
Western-Blot Imaging Instrument	ChemiDoc MP Imaging System	Bio Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Zählkammer	Neubauer Zählkammer, 0,1 mm Tiefe	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda Königshofen, DE
Zellkultur Flaschen	Cellstar T75 Zellkultur Flaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellschaber	Corning Cell Lifter, steril, Product Number: 3008	Corning Science Mèxico S.A. de C.V., MEX
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
	Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE
	MiniSpin	Eppendorf AG, Hamburg, DE

2.1.3 Substanzen

Tabelle 2: **Substanzen**

Aqua ad iniectabilia	Ampuwa Spüllösung Plastipur	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, DE
Albumin	Albumin Fraktion V, proteasefrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Agarose	Agarose A9539-500G	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Blotting Membran	Nitrocellulose Blotting-Membran (0,2 µm)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Bromphenolblau	Bromphenolblau Natriumsalz A512.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
DNA-Ladepuffer	Fermentas & X MassRuler	Thermo Fisher Scientific

	Loading Dye, R0621	GmbH, Dreieich, DE
DNA-Leiter	Fermentas MassRuler Express DNA Ladder LR Forward, #SM1263	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE
DMEM	gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium [+] 4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamine	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE
DMSO	Dimethyl sulfoxide, ≥ 99,5 % (GC), D4540-500ML	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Donkey-Anti-Sheep	Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Sheep IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Ely, UK
FACS-Puffer	Cellwash, Cat. No. 349524	Becton Dickinson GmbH , Heidelberg, DE
Fetales Rinderserum (FBS)	S0615 FBS Superior Supplemented FBS, sterile filtered	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Filterpapier Western-Blot	Invitrogen Blotting Filter Paper 2,5 mm thick; 7,5 x 8,4 cm	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE
Glycerol	Glycerin Rotipuran ≥ 99,5 %, p. a., wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Glycin	Glycin, ≥ 99 %, Blotting-Grade, Art.-Nr.: 0079.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Kit für die cDNA Synthese	QuantiTect Reverse Transcription Kit (200), Cat. No. 205313	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Kit für die Protein-bestimmung	Pierce BCA Protein Assay Kit, Katalognummer: 23225	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE
Kit für die RNA Isolation	RNeasy Mini Kit (250). Cat. No. 74106	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Mercaptoethano	2-Mercaptoethanol, M3148-	Sigma-Aldrich, Merck

l	250ML	KGaA, Darmstadt, DE
Methanol	Uvasol Methanol for spectroscopy, CAS-No: 67-56-1	Merck KGaA, Darmstadt, DE
NaCl	Natriumchlorid, ≥ 99,5 %, p. a. ACS, ISO, Art. Nr. 3957.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Na-deoxycholat	Sodium deoxycholate 30970-25G, BioXtra, ≥ 98,0 % (dry matter, NT)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
NP-40	Nonidet-P40, Nonylphenylpolyethylene glycol	United States Biological, Salem, USA
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (w/o calcium, chloride and magnesium)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Penicillin-Streptomycin	Penicillin-Streptomycin 1514022, 10.000 U/ml Penicillin , 10 mg/ml Streptomycin in mM	Life Technologies Corporation, New York, USA
Protease Inhibitor Tabletten	Complete mini, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Random Primers	Random Octamers, PM-302L, 100 µM	Jena Bioscience GmbH, Jena, DE
SDS	Sodium dodecyl sulfate, ≥ 98,5 % (GC), L3771-100G	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Stain-Free Gel	Mini-PROTEAN TGX Stain Free Gel 12 %, 15-well-comb, 15 µl	Bio Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
	Mini-PROTEAN TGX Stain Free Gel 4 – 15 %, 15-well-comb, 15 µl, Bio Rad	
SYBR Gold	Invitrogen SYBR Gold nucleic acid gel stain, 2261461	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE
SYBR Green	POWER SYBR Green PCR-Master-Mix, Katalognummer:	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE

	4367659	
TGF-β1	Recombinant Human TGF-β1, Cat. Nr.: 100-21	PeproTech Germany, Hamburg, DE
TRIS	TRIS Pufferan ≥ 99,3 %, Buffer Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Tris-Base	Trizma base 93362-250G, BioUltra, for molecular biology, ≥ 99,8 % (T)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Tris-Hcl	TRIS-HCl 1 M Stock Solution	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Trypanblau-Lösung	Trypan Blue Solution, T8154	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Trypsin	Trypsin/EDTA Solution 10X; 5,0 g porcine trypsin and 2 g EDTA, sterile filtered	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Tween	Tween 20 for synthesis	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, DE
Western-Blot, Proteinmarker	Roti-Mark Western Set	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Western HRP Substrate	Immobilon Forte Western HRP Substrate	Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, DE

2.1.4 Lösungen

RIPA-Puffer nach Abcam

50 mM Tris pH = 8

150 mM NaCl

1 % NP-40

0,5 % Na-deoxycholat

0,1 % SDS

RIPA + Complete: Plus Protease-Inhibitor (Lagerung bei - 20 °C)

Laufpuffer

25 mM Tris, pH = 8,3-8,8
192 mM Glycin
0,1 % SDS

Transferpuffer

Für 1x Puffer:	für 25x Puffer:
12 mM Tris-Base	18,2 g
96 mM Glycin	90 g

Blotting-Puffer

Für 2 Minigele:	25x Transferpuffer	40 ml
	Methanol	50 ml
	H_2O	ad 500 ml

TBS

1x Puffer:	für 10x Puffer:
7,7 mM Tris (pH 7,5)	12,1 g
150 mM NaCl	87,7 g
	ad 1000 ml H_2O

TBST-T

100 ml 1x TBS
1 ml Tween 20
ad 1000 ml H_2O

4x Tris-Glycine SDS Sample Buffer (4x Laemmli-Puffer)

252 mM Tris-Hcl	2,5 ml 1 M Tris-Hcl, pH = 6,8
40 % Glycerol	4 ml
8 % SDS	0,8 g
0,01 % Bromphenolblau	eine Spatelspitze
	ad 10 ml H_2O

TAE-Puffer

Für 50 x TAE-Puffer (1000 ml):

Lösung 1: 2 M TrisAcetat

242 g Tris HCl

57,2 ml CH_3COOH

Lösung 2: 50 mM EDTA

100 ml 0,5 M EDTA pH = 8

Lösungen 1 + 2 und ad 1000 ml mit H_2O auffüllen

2.1.5 Software

Tabelle 3: **Software**

FACS Software	BD FACSuite Software	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, DE
Nanodrop Spectrophotometer	Nanodrop 2000/2000c, Version 1.4.2., 2009	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE
Plattenphotometer	PerkinElmer 2030 Manager	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau, DE
Real-Time PCR Software	StepOne Software, Version 2.2.2., 2011 Applied Biosystems	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE
Western-Blot Auswertung	Image Lab Version 6.1.0 build 7, Standard Edition, 2020	Bio Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

2.2 Zellkultur Methoden

2.2.1 Zellkultur

Als Zellkulturmedium wurde Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) (in 4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamine), unter Zusatz von 10 % fetalem Rinderserum (FBS) und Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml), verwendet.

Ein Mediumwechsel erfolgte im Abstand von 2 – 3 Tagen. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Fibroblasten mit Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen. Anschließend wurden 12 – 13 ml frisches Medium auf

die Fibroblasten gegeben, wenn diese sich in Petrischalen befanden und 20 ml, wenn die Fibroblasten in T75 Flaschen waren. Die MD- und CTS-Fibroblasten wurden im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO_2 in luftfeuchter Umgebung inkubiert.
Das Splitting erfolgte 1:2 oder 1:3 auf T75 Zellkulturflaschen, sobald die Fibroblasten konfluent waren. Dafür wurde eine 10 %-ige Trypsin-EDTA-Lösung in PBS hergestellt. Das Medium wurde abgenommen, die Fibroblasten mit PBS gewaschen und mit 5 ml der 10 % igen Trypsin-EDTA-Lösung trypsiniert. In dieser Lösung inkubierten die Fibroblasten ca. 5 min bei 37 °C und 5 % CO_2, um so die optimale Temperatur für die Aktivität des Trypsins zu gewährleisten, welches die Adhäsionsproteine andauen soll. Dieser Vorgang wurde mikroskopisch kontrolliert. Durch anschließendes Abklopfen des Zellkulturgefäßes wurden die Fibroblasten von dem Boden der Zellkulturflasche gelöst. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 5 ml Medium hinzugegeben. Nach mehrfachem Auf- und Abpipettieren wurde die Suspension überführt und 5 min bei mindestens 340 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und auf neue T75 Flaschen aufgeteilt, in welchen sich 15 ml frisches Medium befanden. Durch leichtes Schwenken wurde die Zellsuspension gleichmäßig verteilt.

2.2.2 Isolation der Fibroblasten

Die Gewebeproben befanden sich in PBS unter Zusatz von Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml). Unter sterilen Bedingungen wurde das Fettgewebe makroskopisch entfernt. Das Bindegewebe wurde in Petrischalen verteilt und mit einem Skalpell zerkleinert. Im Anschluss wurden 12 – 13 ml Zellkulturmedium hinzugegeben und wie oben beschrieben kultiviert. Sobald adhärente Fibroblasten mikroskopisch sichtbar waren, wurden die Bindegewebsstücke entfernt.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen der Fibroblasten

Mit einer Zellzahl von mindestens 1 x 10^6/ml wurden die Fibroblasten in 1 ml Einfriermedium in Kryoröhrchen überführt. Das Einfriermedium bestand aus 90 % FBS und 10 % Dimethyl Sulfoxide (DMSO). Auf Grund der zellschädigenden Wirkung des DMSO sollte zügig und auf Eis gearbeitet werden. Die Kryoröhrchen

wurden in Cryo Freezing Containern bei -80 °C eingefroren. Zum Auftauen der Fibroblasten wurden die Kryoröhrchen zuerst schonend in der Hand erwärmt. In halbflüssigem Zustand wurden die Fibroblasten mit 1 ml Medium durch sanftes Auf- und Abpipettieren weiter aufgetaut und durchmischt. Anschließend wurden die aufgenommenen Fibroblasten in eine Petrischale, mit 12 – 13 ml frischem Medium, gegeben. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel.

2.2.4 Aussaat der Fibroblasten

Die Fibroblasten wurden, wie zuvor erläutert, trypsiniert und nach der Zentrifugation in 5 ml Medium resuspendiert. Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gut durchmischt. Von dieser Suspension wurden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer unter das Deckglas pipettiert. Mittels folgender Formel wurde die Zellzahl ermittelt:

$$Zellzahl \quad pro \quad ml = \frac{Anzahl \quad Zellen}{4} * 2 * 10 \wedge 4$$

4 = 4 Quadrate, 2 = Verdünnungsfaktor, 10^4 = Kammerfaktor

Anschließend wurden die Fibroblasten mit einer Zellzahl von 5 X 10^4 Zellen/Well auf 6-Well-Platten in 2 ml Medium/Well ausgesät. Um die Fibroblasten in der gewünschten Konzentration auszusäen wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{Zh}{Zw} = Verdünnungsfaktor$$

$$\frac{Vg}{Verd\,ü\,nnungsfaktor} = V\,1$$

Zh = Zellzahl pro ml, die mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt wurde, Zw = gewünschte Zellkonzentration

Vg = Gesamtvolumen, V1 = Volumen in ml der geernteten Zellkonzentration Zh, das zu der Gesamtsuspension hinzugegeben werden muss, um die gewünschte Konzentration Zw zu erreichen.

2.3 Stimulation der Fibroblasten mit Transforming growth factor-β1 (TGF-β1)

2.3.1 Konzentrationsreihe

Die Fibroblasten wurden wie zuvor beschrieben ausgesät. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und die Zugabe von 0 - 5 ng/ml TGF-ß1 (Abb. 1). Auf die Fibroblasten wurden jeweils 2 ml des Zellkulturmediums gegeben. Die Fibroblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen von TGF-ß1 stimuliert und jeweils nach 24 h, nach 48 h und nach 72 h geerntet. Mittels Western-Blot wurde im Anschluss die α-smooth muscle actin (α-sma) Expression analysiert.

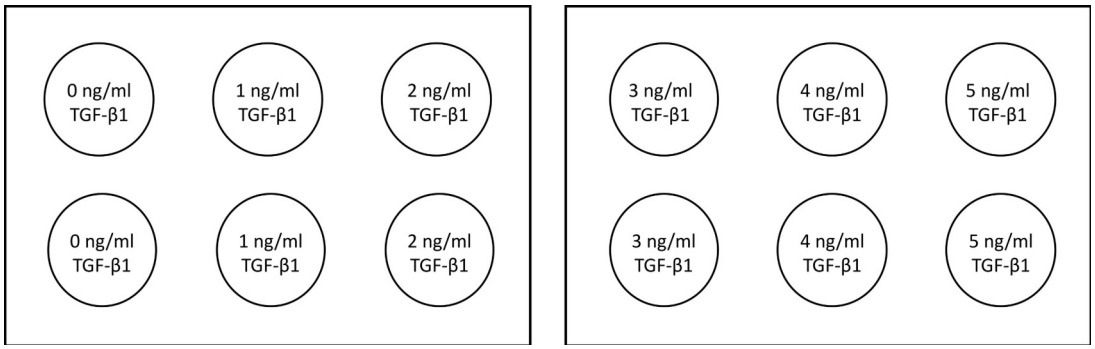

Abb. 1: Grafische Darstellung Konzentrationsreihe

2.3.2 Stimulation mit 4 ng/ml TGF-β1

Zur weiterführenden Untersuchung der Proteinexpression wurden die Fibroblasten ebenfalls mit 5 X 10^4 Zellen/Well ausgesät. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und die Zugabe von 4 ng/ml TGF-ß1 in jeweils 2 ml Medium (Abb. 2). Die Zellernte erfolgte nach 72 h.

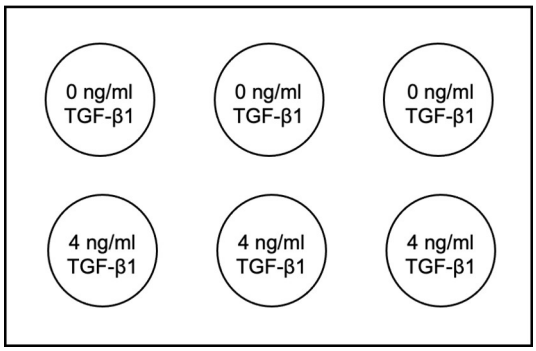

Abb. 2: Grafische Darstellung der Stimulation mit TGF

2.4 Western-Blot-Analyse

2.4.1 Ernte der Fibroblasten zur Proteinbestimmung

Die Fibroblasten wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,5 ml/Well Trypsin-EDTA abgelöst. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 wurden die Fibroblasten hinsichtlich der Ablösung mikroskopisch kontrolliert und die Reaktion mit jeweils 0,5 ml Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde resuspendiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend 30 sek bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Fibroblasten mit 1 ml PBS gewaschen, erneut 30 sek zentrifugiert und der Überstand verworfen. Je nach Pelletgröße wurde dieses mit 20 – 30 µl RIPA-Puffer (Lysepuffer) resuspendiert und bei -80 °C eingefroren.

2.4.2 Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

Zur Proteinisolierung wurde das Pierce ™ BCA Protein Assay Kit von ThermoFisher Scientific verwendet. Die Proteindetektion basiert auf dem Prinzip der Reduktion von Cu^{+2} zu Cu^{+1} durch Proteine in alkalischem Milieu und der Reaktion von Bicinchoninsäure (BCA) mit dem Kupferion, welche anschließend photometrisch analysiert werden kann.

Mit einem Ultraschallgerät wurden die in RIPA-Puffer gelösten Fibroblasten zum Zellaufschluss ca. 10-mal sonifiziert (50 W, Amplitude 80 %, Cycle 0,5) und anschließend auf Eis gekühlt. In 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden 20 µl PBS und 4 µl der Probe miteinander vermischt. Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde ein BSA-Standard mitgeführt, der nach Tabelle 4 pipettiert wurde. Anschließend wurden 10 µl des BSA-Standards und jeweils 10 µl des PBS-Probe-Gemischs in

eine 96-Well-Platte zur Doppelbestimmung pipettiert. Das Working Reagent wurde aus 50 Teilen Reagent A und 1 Teil Reagent B hergestellt. Von dem Working Reagent wurden 200 µl in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde mit einer Folie abgedeckt und inkubierte 30 min bei 37 °C. Nachdem die Proben auf RT abgekühlt waren, erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit einem Plattenphotometer (Victor X3) bei einer Absorption von λ = 562 nm.

Herstellung des BCA Standards

Albumin Standard: 1 Ampulle enthält 1 ml BSA Standard in einer Konzentration von 2 mg/ml. Der Standard wird in saubere 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 4: **BCA-Standard**

Konzentration (µg/µl)	Probe	BSA Standard (µl)	PBS oder RIPA (µl)
2	A	300	0
1,5	B	375	125
1,0	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

2.4.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient dazu, Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Es wurden entweder 10 µg oder 20 µg (s. Tabelle 5) Protein für die Western-Blot-Analysen verwendet. Es wurde ein Puffer aus 80 % Laemmli-Puffer und 20 % Mercaptoethanol hergestellt und von diesem jeweils 4 µl zu den Proben gegeben. Durch das SDS aus dem Laemmli-Puffer werden die Proteine negativ geladen, deren Eigenladung überdeckt. Das Mercaptoethanol dient als Reduktionsmittel

und führt dazu, dass Disulfidbrücken reduziert werden. Ziel ist eine Linearisierung der Proteine, um diese nach ihrer Länge, welche proportional zur Molekülmasse ist, aufzutrennen. Das Gemisch wurde 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Hitzedenaturierung im Thermoblock für 5 min bei 95 °C. Nach den 5 min wurden die Proteine auf Eis gekühlt. In der Zwischenzeit wurde die Kammer zusammengebaut und ein Stain Free Gel eingespannt. Der Laufpuffer (1x) wurde bis zur Markierung in die Kammer gegossen. In die erste Tasche des Gels wurden 7 µl der Proteinleiter (Roti®-Mark WESTERN-Set) pipettiert und die zweite Tasche frei gelassen. Anschließend wurden 13 µl der Proben in die jeweiligen Geltaschen luftblasenfrei pipettiert. Die Elektrophorese wurde für 5 min bei 60 V gestartet und lief danach bei 120 – 140 V. Die elektrische Spannung bewirkt, dass die negativ geladenen Proteine durch das Gel in Richtung Anode wandern und nach ihrer Molekulargröße getrennt werden. Dabei durchlaufen kleine Proteine das Gel schneller als große Proteine. Der Lauf wurde beendet, kurz nachdem der Marker auslief. Zur Kontrolle wurde mit dem BioRad ChemiDoc Imaging System ein Bild von dem Gel erstellt.

2.4.4 Western-Blotting Analysen von den untersuchten Proteinen TSP-1, Plasminogen, Cav-1, Integrin αvβ6, MMP-2, MMP-9 und MMP-14

Für den Proteintransfer von dem Gel auf die Membran wurde das Trans-Blot Turbo Transfer System von BioRad benutzt. Das Gel wurde in dem Transferpuffer aus 10 % Methanol, 8 % Transferpuffer (25x) und 82 % aqua dest. aquilibriert, während die Nitrocellulosemembran und das Filterpapier ebenfalls kurz in dem Transferpuffer eingeweicht wurden. Die Membran und das Gel wurden zwischen den nassen Filterpapieren übereinandergelegt und in der Kassette platziert. Der Transfer erfolgte bei 25 V und 2,5 A für 15 min. Nach dem Transfer inkubierte die Membran 1 h in 10 ml einer 5 %-igen BSA-TBST-Lösung auf der Taumelrolle bei RT, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.
Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Rollenmischer. Die Anwendung der Primärantikörper ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Am nächsten Tag wurde die Membran 3-mal für 5 min bei RT in TBS-T gewaschen. Anschließend wurde der entsprechende Sekundärantikörper (1:1000) (Tabelle 6) in TBS-T hinzugegeben und für 1 h im Dunkeln bei RT auf der Taumelrolle inkubiert. Danach wurde die Membran erneut 3-mal mit TBS-T gewaschen. Bevor das Bild mittels ChemiDoc Imaging System erstellt wurde, wurden 100 µl des Western Meerrettichperoxidase (HRP) Substrate gleichmäßig auf der Membran verteilt.

Tabelle 5: **Primärantikörper für die Western-Blot Analyse der untersuchten Proteine TSP-1, Plasminogen, Cav-1, Integrin αvβ6, MMP-2, MMP-9 und MMP-14**

Antikörper	Spezies	Größe	Konzentration	Hersteller	Applikation
α-smooth-muscle actin	Maus	40 kDa	1:4000 in 5 % BSA	Abcam, ab7817	10 µg Protein
Caveolin-1	Hase	20 kDa	1:1000 in 5 % BSA	Abcam, ab2910	20 µg Protein
Integrin αvβ6	Hase	35 kDa	1:1000 in 5 % BSA	Antikörper online, ABIN714806	20 µg Protein
MMP-2	Hase	65 kDa	1:1000 in 5 % BSA	Cell Signaling Technology, #13132, (D8N9Y)	20 µg Protein
MMP-9	Hase	35 kDa	1:1000 in 5 % BSA	Cell Signaling Technology, #13667, (D6O3H)	20 µg Protein
MMP-14	Hase	66 kDa	1:1000 in 5 % BSA	Abcam, ab53712	20 µg Protein
Plasmino-gen	Maus	60 kDa	1:500 in 5 % BSA	Santa Cruz Biotechnology, plasminogen (b-11):	20 µg Protein

				sc-376324	
Thrombo-spondin-1	Hase	80 kDa	1:1000 in 5 % BSA	Antibodies-online, (pSer1) ABIN3022979	10 µg Protein

Tabelle 6: **Sekundärantikörper für die Western-Blot-Analyse**

Sekundärantikörper	Konzentration	Hersteller
Goat-Anti-Mouse	1:1000 in TBS-T	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
Goat-Anti-Rabbit	1:1000 in TBS-T	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK

2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Analyse der LAP-Sequenzen

2.5.1 RNA-Isolation aus den Fibroblasten

Zur RNA-Isolation aus den Fibroblasten wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Proben wurden während der Reaktionsschritte auf Eis gekühlt. Zuerst wurde der Lyse-Puffer (RLT Plus Buffer) mit 10 µl Mercaptoethanol pro ml Puffer unter dem Abzug versetzt. Anschließend wurden 350 µl des Puffers auf das Pellet gegeben und gut durchmischt, um RNasen zu deaktivieren. Optional können die Proben danach auch bei -80 °C eingefroren werden. Das Lysat wurde auf QIAshredder pipettiert und 2 min bei 16.000 x g abzentrifugiert. Die Säule wurde verworfen. Jeweils 350 µl 70 %-iges Ethanol wurden durch Auf- und Abpipettieren mit dem Eluat vermischt und anschließend auf eine RNeasy Mini-Säule gegeben. Diese wurde 30 sek bei 16.000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um die membrangebundene RNA zu lösen, erfolgte die Zugabe von jeweils 700 µl Waschpuffer (RW1 Buffer), mit anschließender Zentrifugation für 30 sek bei 16.000 x g. Danach wurden 500 µl des RPE-Waschpuffers dazugegeben und die Proben 30 sek zentrifugiert. Nach erneuter Zugabe von 500 µl RPE Buffer wurde 2 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches 2 ml Collection-Tube überführt und für 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Danach wurde die Säule

in ein 1,5 ml Collection-Tube platziert und 40 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert und 5 min gewartet. Danach wurden die Proben wieder für 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde erneut auf die Säule gegeben und nach 1 min Wartezeit erneut für 1 min bei 16.000 x g abzentrifugiert.

2.5.2 Enzymatische Verdauung der DNA

Zu den Proben wurden 4 µl DNAse Puffer (10x DNAse Buffer) und 1 µl gekühlte rDNAse dazugegeben und gut durchmischt. Die Proben inkubierten für 30 min bei 37 °C im Thermoblock. Nach der Zugabe von 4 µl DNAse Inactivation Reagent inkubierten die Proben 2 min bei RT und wurden dann 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand mit der enthaltenen RNA wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA-Konzentration mittels NanoDrop bestimmt.

2.5.3 Reverse Transkription zur Vorbereitung der Real-Time PCR

Für die reverse Transkription wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen verwendet. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zuerst wurden RNase freies Wasser und 2 µl gDNA Wipeout Puffer (7x) in 200 µl Reaktionsgefäßen vorgelegt. Um nach der reversen Transkription eine cDNA Konzentration von 50 ng/µl zu erhalten, wurden 1 µg der RNA in die Reaktionsgefäße pipettiert und anschließend 2 min bei 42 °C im Thermocycler inkubiert, um mit dem gDNA Puffer mögliche DNA-Kontaminationen zu entfernen. In der Zwischenzeit wurde der Mastermix aus RT Puffer (5x), welcher die dNTPs enthält, reverse Transkriptase und entweder dem RT Primer-Mix (oligodT), oder Random Primers angefertigt. Es wurden beide Primer verwendet. Davon wurden 6 µl auf die Proben pipettiert. Diese inkubierten 30 min bei 42 °C im Thermocycler, mit einer darauffolgenden Inaktivierung für 3 min bei 95 °C. Im Anschluss wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.5.4 Real-Time PCR der LAP-TGF Primer

Alle Reaktionsschritte erfolgten auf Eis. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde ein Mastermix mit folgenden Zusätzen hergestellt:

Power SYBR Green PCR-Master-Mix	12,5 µl * (Anzahl der Proben + 1)
cDNA (50 ng/µl)	1,0 µl * (Anzahl der Proben + 1)
H_2O	9,5 µl * (Anzahl der Proben+ 1)

Jeweils 23 µl von diesem Mastermix wurden in die entsprechenden Wells einer 48-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden jeweils 1 µl des Forward- und 1 µl des Reverse Primers (100 µM) pro Well luftblasenfrei hinzugefügt. Die Platte wurde mit einer Folie verschlossen und 2 min bei 340 x g zentrifugiert.

Im PCR Gerät (Applied biosystems StepOne Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific GmbH) wurde das Programm (StepOne Software v2.2.2) gestartet. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl angesetzt. Das Temperaturprofil der qPCR umfasste eine initiale Aktivierungsphase bei 95°C für 10 min, gefolgt von 40 Amplifikationszyklen. Jeder Zyklus bestand aus einer Denaturierung bei 95°C für 15 sek, einer Annealing-Phase bei 53°C für 15 sek sowie einer Elongationsphase bei 60°C für 1 min. Vor der Amplifikationsphase wurde eine initiale Vorinkubation mi 95°C für 15 sek, 60°C für 1 min und 50°C für 2 min durchgeführt. Die Messungen wurden im Standardmodus („Standard 7300“) des Geräts durchgeführt.

Tabelle 7: **Primer**

h-GAPDH forward	5’-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GGC G-3‘	100 pmol/µl, Eurofins
h-GAPDH reverse	5‘-CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG-3’	
LAP-TGF1 forward	5‘-ACC TGC CAC AGA TCC CCT AT-3’	100 µM, Biolegio
LAP-TGF1 reverse	5’-GCA CTT CAA CAG TGC CCA AG-3’	
LAP-TGF2 forward	5’-GAC GGA TCT CTC TCC GAC CT-3’	
LAP-TGF2	5’-GTA GTG TTC CCC ACT GGT	

reverse	CC-3’	
LAP-TGF3 forward	5’-TTG AGA CTT TTC CGT TGC CG-3‘	
LAP-TGF3 reverse	5‘-GAG CAA CAC GGG TTC AGG TA-3’	
LAP-TGF4 forward	5’-GAG ACT TTT CCG TTG CCG C-3’	
LAP-TGF4 reverse	5’-GGT TTC CAC CAT TAG CAC GC-3’	
LAP-TGF5 forward	5’-CGC GTG CTA ATG GTG GAA AC-3‘	
LAP-TGF5 reverse	5‘-TGA CAC AGA GAT CCG CAG TC-3’	

2.5.5 Gelelektrophorese zur Kontrolle der Amplifikatlänge

Um die Amplifikate der PCR zu überprüfen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde ein 1,8 %-iges Agarosegel gegossen. 1,8 g Agarose wurden mit 100 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer (1x)) vermischt und in der Mikrowelle für ca. 1:30 min bei 600 W erhitzt. Das Gemisch wurde etwas heruntergekühlt und anschließend in eine Kammer gegossen. Nachdem das Gel ausgehärtet und abgekühlt war, wurde es in die Elektrophoresekammer in den Elektrophoresepuffer (TAE-Puffer 1x) gelegt.

In 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden die Proben vorbereitet. 5 µl der DNA-Leiter (Fermentas MassRuler Express DNA Ladder) wurden mit 4 µl DNA-Ladefarbstoff (Fermentas & X MassRuler Loading Dye) vermischt. In die restlichen Reaktionsgefäße wurden jeweils 20 µl der PCR-Proben pipettiert und anschließend ebenfalls 4 µl des DNA-Ladefarbstoffs hinzugefügt. Zu dem Marker und den Proben wurden 2,5 µl SYBR-Gold hinzugegeben und die Proben gut durchmischt. Nach kurzer Abzentrifugation wurden der Marker und die Proben in die Geltaschen pipettiert.

Die Spannungsquelle (VWR Power Source 300 V) wurde auf 80 V eingestellt und gestartet. Nach ca. 45 min wurde der Gellauf gestoppt. Im Anschluss wurde ein Bild mittels ChemiDoc Imaging System erstellt.

Der experimentelle Ansatz zur Untersuchung verschiedener LAP-TGF-β1-Primer mittels PCR erwies sich als nicht aussagekräftig, da die verwendeten Primerkombinationen keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferten. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiterverforlgt und nicht in die Ergebnisdarstellung mit aufgenommen.

2.6 Durchflusszytometrische Analyse der Proteinexpression

Zur Vorbereitung auf die durchflusszytometrische Untersuchung der Proteinexpression wurden die Fibroblasten in den 6-Well-Platten mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber abgelöst. Die Fibroblasten wurden 5 min bei 340 x g zentrifugiert, in FACS-Puffer (Cellwash + 3 % FBS) aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die folgenden Reaktionsschritte erfolgten auf Eis. Die Proben wurden 5 min bei 340 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blocken, erfolgte die Zugabe von 50 µl FBS pro Probe. Nach 5 min wurde der jeweilige Erstantikörper (Tabelle 8) in der entsprechenden Konzentration dazu gegeben. Im Eisbad inkubierten die Proben für 30 min im Dunkeln. Im Anschluss wurden die Fibroblasten mit 4 ml FACS-Puffer (Cellwash + 3 % FBS) gewaschen und wieder zentrifugiert. Der entsprechende Zweit-antikörper (Tabelle 9) wurde in einer Verdünnung von 1:100 in FACS-Puffer gemischt. Davon wurden jeweils 100 µl zu den Proben gegeben, wenn der Erstantikörper nicht konjugiert war. Im Dunkeln inkubierten die Proben erneut 30 min im Eisbad. Im Anschluss wurden die Fibroblasten mit 4 ml FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Nach dem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet in 100 – 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und mit dem BD FACS Lyric und der FACSuite Software analysiert. Die ungefärbten Kontrollfibroblasten wurden auf maximal 2 % positiv eingestellt.

Tabelle 8: **Antikörper FACS**

Antikörper	Fluorochrom	Spezies	Konzentration	Hersteller

CD44	APC	Maus	10 % (5 µl auf 50 µl)	BD Pharminogen, Cat: 559942
Integrin αvβ3		Maus	6 % (3 µl auf 50 µl)	Abcam, ab190147
Integrin αvβ5		Hase	6 % (3 µl auf 50 µl)	Bioss Antibodies, bs-1356R
Integrin αvβ6		Hase	6 % (3 µl auf 50 µl)	Antikörper online, ABIN714806

Tabelle 9: **Sekundärantikörper FACS**

Spezies	Konjugat	Konzentration	Hersteller
Goat-Anti-Mouse	Fluorescein (FITC)-conjugated	1:100 in FACS-Puffer	Jackson Immunoresearch, Code: 115-095-003
Goat-Anti-Rabbit	Fluorescein (FITC)-conjugated	1:100 in FACS-Puffer	Jackson Immunoresearch, Code: 111-095-006

2.7 Statistische Auswertung

Im Rahmen der Datenverarbeitung wurde mit Microsoft Excel für Mac, Version 16.47.1, gearbeitet. Die statistische Auswertung und die Erstellung der Grafiken erfolgte mit Prism 9 für macOS, Version 9.0.2 (134). Die ermittelten Daten wurden relativ zum Mittelwert der unbehandelten CTS-Fibroblasten gesetzt. In der Darstellung der Grafiken ist die Standardabweichung mit aufgeführt. Die statistische Analyse wurde mittels *t*-Test und Varianzanalyse (ANOVA) mit

nachgeschaltetem post-hoc-Test nach Tukey durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % lag ($p < 0,05$). Es wurde ein Konfidenzintervall von 95 % festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Stimulation der Fibroblasten mit TGF-β1

Um die maximale Aktivierung der MD-Fibroblasten zur Myofibroblastengenese zu bestimmen, wurden die MD-Fibroblasten mit 1 – 5 ng/ml TGF-ß1 für 24 – 72 h stimuliert. Für MD-Fibroblasten ist eine vermehrte Myofibroblastengenese charakteristisch und diese kann durch TGF-β1 induziert werden. Als Surrogatparameter für die Myofibroblastengenese gilt α-sma. Daher wurde die α-sma Proteinexpression mittels Western-Blot-Analysen analysiert. Hier zeigte sich bei den MD-Fibroblasten die größte α-sma Expression bei einer Stimulation mit 4 ng/ml TGF-β1 über 72 h und daraufhin wurden die folgenden Versuche nach diesem Schema durchgeführt.

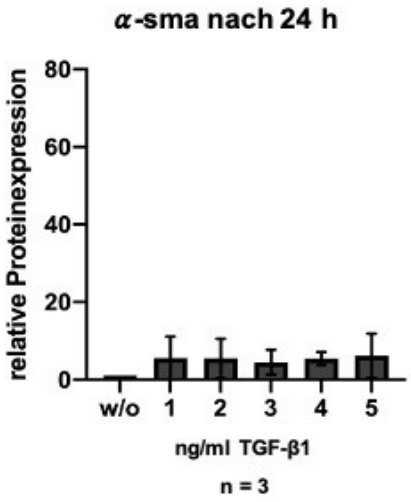

Abb. 3: *Evaluation der* α-sma Proteinexpression nach 24 h. *Stimulation der MD-FB mit 1 – 5 ng/ml TGF-β1 für 24 h. Die Werte sind jeweils auf die unbehandelte Kontrolle (w/o) normiert.*

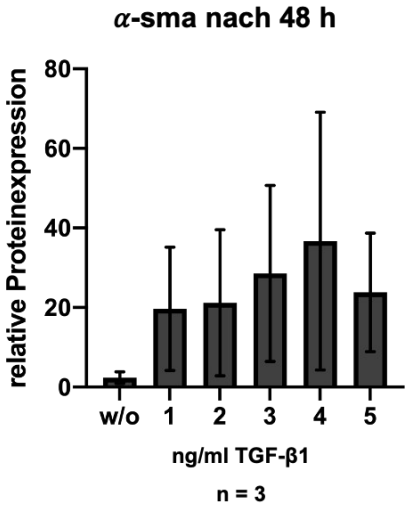

Abb. 4: Evaluation der α-sma-Proteinexpression nach 48 h. *Stimulation der MD-FB mit 1 – 5 ng/ml TGF-β1 für 48 h. Die Werte sind jeweils auf die unbehandelte Kontrolle (w/o) nach 24 h normiert.*

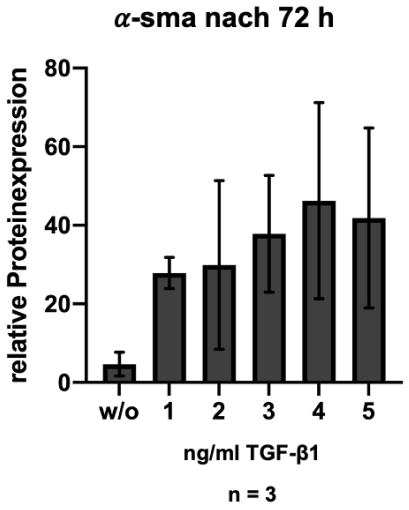

Abb. 5: Evaluation der α-sma Proteinexpression nach 72 h. *Stimulation der MD-FB mit 1 – 5 ng/ml TGF-β1 für 72 h. Die Werte sind jeweils auf die unbehandelte Kontrolle (w/o) nach 24 h normiert.*

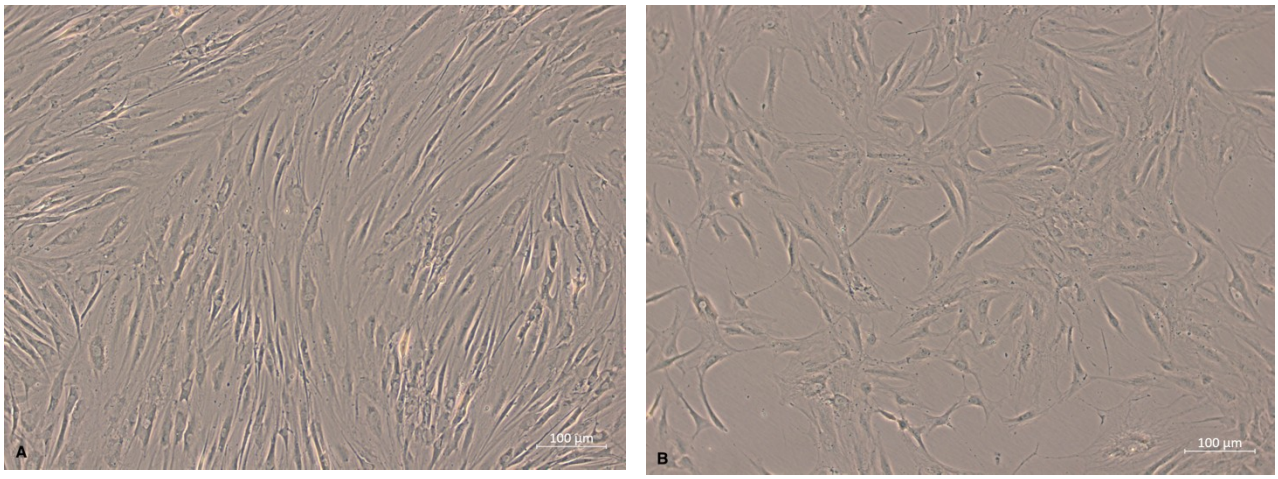

Abb. 6: Repräsentative Mikroskopaufnahmen von MD-Fibroblasten
Ablichtung der Fibroblasten 72 h nach Aussaat in 6-Well-Platten. A: Kontrolle mit 0 ng/ml TGF-β1; B: Stimulation mit 4 ng/ml TGF-β1.

3.2 Analyse der Proteinexpression nach Stimulation mit 4 ng/ml TGF-β1

In der Versuchsreihe wurde die Proteinexpression in MD- und CTS-Fibroblasten ohne Stimulation und nach Aktivierung durch TGF-β1 verglichen. Zur Aktivierung der Fibroblasten wurden diese, wie zuvor beschrieben, für 72 h mit 4 ng/ml TGF-β1 stimuliert.

3.2.1 Vergleich der MMP-9 Proteinexpression

Im Folgenden wurde die MMP-9 Expression in MD- und CTS-Fibroblasten mit und ohne Stimulation durch TGF-β1 verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der MMP-9 Expression zwischen den MD- und den CTS-Fibroblasten beobachtet werden. Ebenfalls konnte kein signifikanter Effekt der TGF-β1 Stimulation auf die MMP-9 Expression der MD- und CTS-Fibroblasten festgestellt werden (Abb. 6).

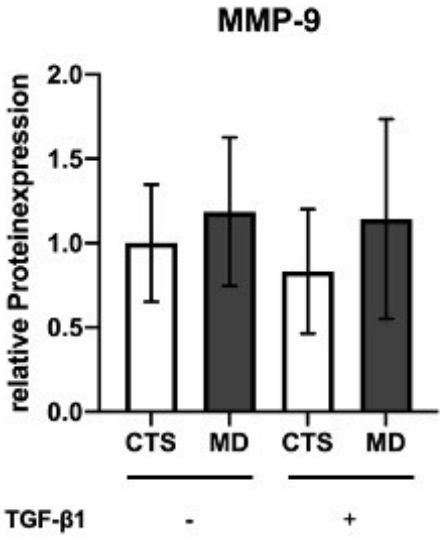

Abb. 7: MMP-9 Proteinexpression (n = 11). Relative Veränderung der Proteinexpression bezogen auf den Mittelwert der unbehandelten CTS-FB.

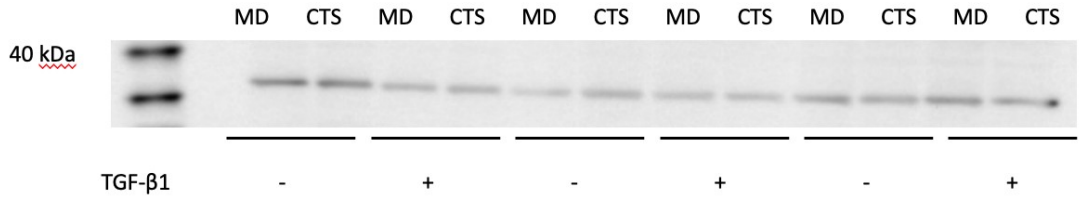

Abb. 8: Exemplarische Darstellung einer Western-Blot-Analyse des MMP-9 Proteins.

3.2.2 Vergleich der MMP-14 Proteinexpression

CTS-Fibroblasten zeigten nach der Aktivierung durch TGF-β1 eine signifikant vermehrte MMP-14 Expression im Vergleich zu den unbehandelten CTS-Fibroblasten. Bei den MD-Fibroblasten änderte sich die MMP-14 Expression nach der Aktivierung durch TGF-β1 hingegen nicht signifikant (Abb. 8).

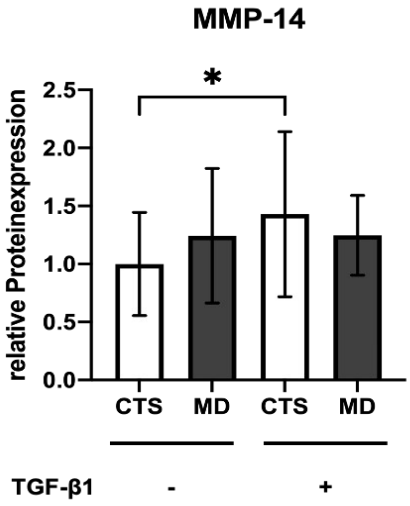

Abb. 9: MMP-14 Proteinexpression (n = 9).
Relative Veränderung der Proteinexpression bezogen auf den Mittelwert der unbehandelten CTS-FB. Signifikanz: * = $p < 0,05$.

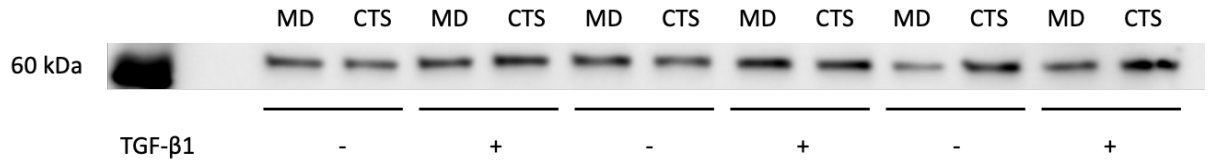

Abb. 10: Exemplarische Darstellung einer Western-Blot-Analyse des MMP-14 Proteins.

3.2.3 Vergleich der MMP-2 Proteinexpression

Bei den unbehandelten MD-Fibroblasten zeigte sich eine stärkere MMP-2 Proteinexpression im Vergleich zu den unbehandelten CTS-Fibroblasten. Nach Aktivierung mit TGF-β1 konnte sowohl bei den MD- als auch bei den CTS-Fibroblasten eine signifikant gesteigerte MMP-2 Proteinexpression beobachtet werden (Abb. 10).

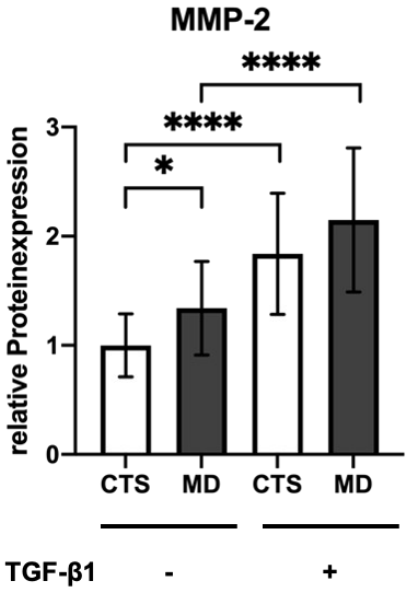

Abb. 11: MMP-2 Proteinexpression (n = 11).
Relative Veränderung der Proteinexpression bezogen auf den Mittelwert der unbehandelten CTS-FB. * = p < 0,05; **** = p < 0,0001.

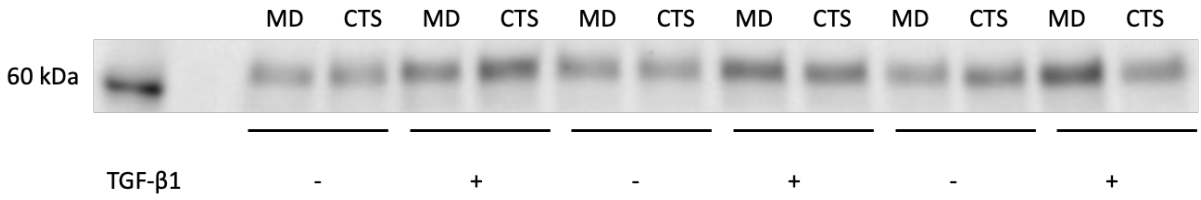

Abb. 12: Exemplarische Darstellung einer Western-Blot-Analyse des MMP-2 Proteins.
Vergleichende MMP-2 Expression bei MD- und CTS-FB.

3.2.4 Vergleich der Thrombospondin-1 Proteinexpression

In MD-Fibroblasten wurde Thrombospondin-1 im Vergleich zu den CTS-Fibroblasten signifikant stärker exprimiert. Außerdem konnte bei den CTS-Fibroblasten nach Stimulation mit TGF-β1 eine signifikant vermehrte Thrombospondin-1 Expression im Vergleich zu den unbehandelten CTS-Fibroblasten beobachtet werden (Abb. 12).

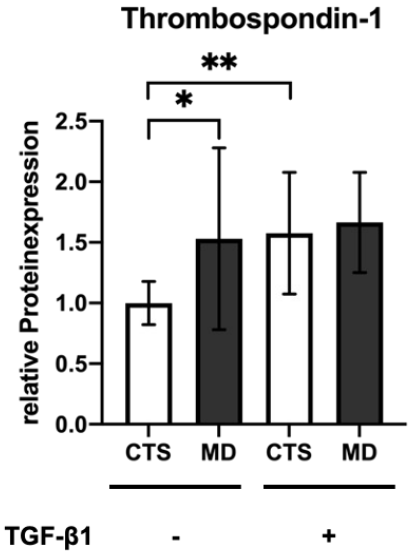

Abb. 13: Thrombospondin-1 Proteinexpression (n =11). * = p < 0,05; ** = p < 0,01.

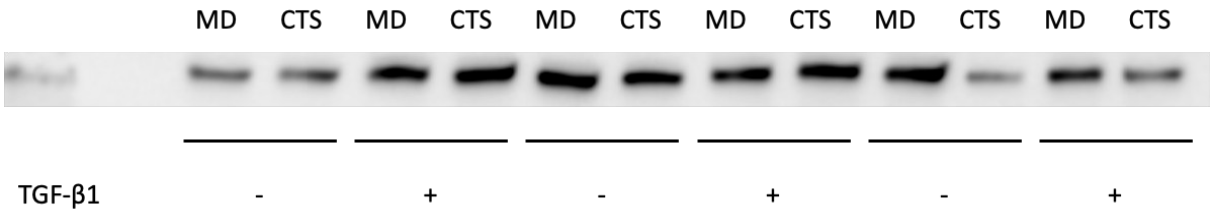

Abb. 14: Exemplarische Darstellung einer Western-Blot-Analyse des Thrombospondin-1 Proteins. Verglichen wurde die Thrombospondin-1 Expression in MD- und CTS-FB.

3.2.5 Vergleich der Integrin αvβ6 Proteinexpression

Hier zeigte sich eine signifikant reduzierte Integrin αvβ6 Expression der MD-Fibroblasten im Vergleich zu den CTS-Fibroblasten. Außerdem war die Integrin αvβ6 Proteinexpression der CTS-Fibroblasten nach Stimulation mit TGF-β1 signifikant reduziert.

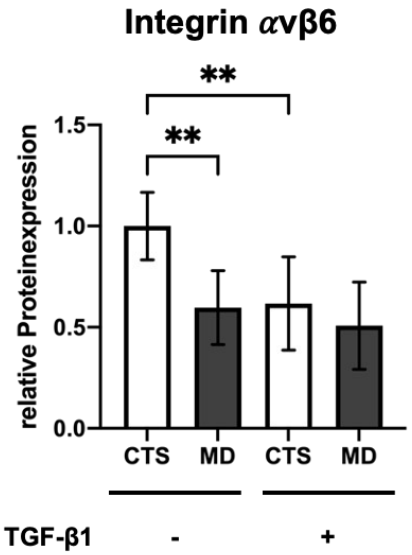

Abb. 15: Integrin αvβ6 Proteinexpression (CTS n = 9; MD n = 8).
Relative Veränderung der Proteinexpression bezogen auf den Mittelwert der unbehandelten CTS-FB. Signifikanzniveau ** = p < 0,01.

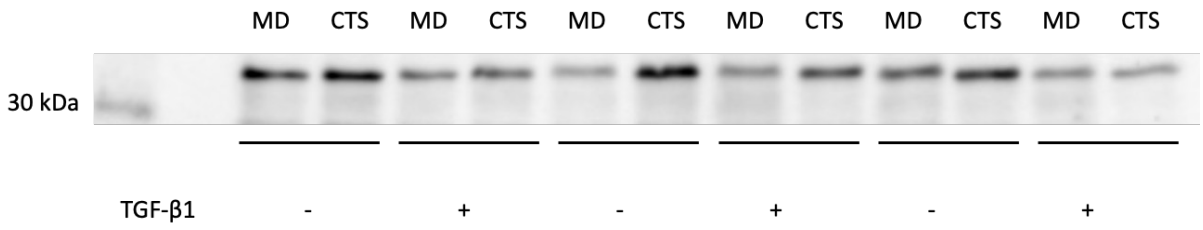

Abb. 16: Exemplarische Darstellung einer Western-Blot Analyse des Integrin αvβ6 Proteins.
Verglichen wurde die Integrin αvβ6 Proteinexpression in MD- und CTS-FB.

3.2.6 Beeinflussung der Plasminogen Expression

Verglichen wurde die Plasminogen Expression von MD- und CTS Fibroblasten. Es zeigte sich, dass Plasminogen in den unbehandelten MD-Fibroblasten signifikant weniger exprimiert wurde als in den unbehandelten CTS-Fibroblasten. Außerdem führte die Aktivierung durch TGF-β1 in den CTS-Fibroblasten zu einer signifikanten Reduktion der Plasminogen Expression (Abb. 17 + 18).

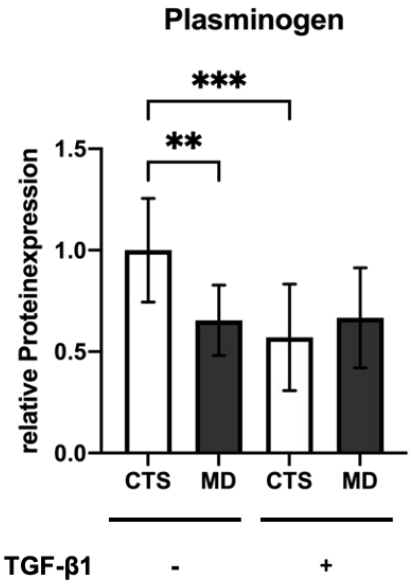

Abb. 17: Plasminogen Proteinexpression (CTS n = 14; MD n = 12).
Relative Veränderung der Proteinexpression bezogen auf den Mittelwert der unbehandelten CTS-FB. Die stimulierten FB wurden über 72 h mit 4 ng/ml TGF-β1 behandelt. Signifikanz: ** = p < 0,01; *** = p < 0,001.

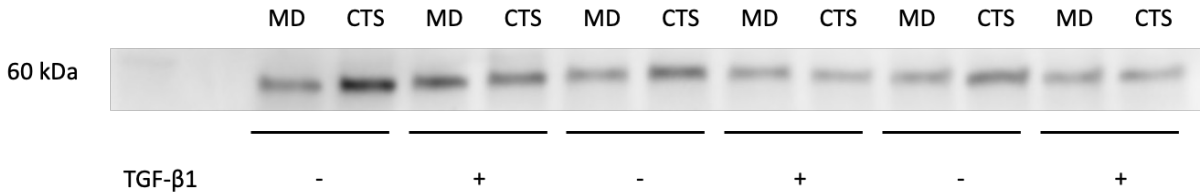

Abb. 18: Exemplarische Darstellung einer Western-Blot Analyse des Plasminogen Proteins.
Verglichen wurde die Plasminogen Expression in MD- und CTS-FB.

3.2.7 Vergleich der Caveolin-1 Proteinexpression

Die Expression von Caveolin-1 wurde in MD- und CTS-Fibroblasten verglichen. Die Caveolin-1 Expression der unbehandelten MD-Fibroblasten war signifikant niedriger als die der unbehandelten CTS-Fibroblasten. Die Stimulation mit TGF-β1 führte in den CTS-Fibroblasten zu einer signifikanten Reduktion der Caveolin-1 Proteinexpression. (Abb. 19).

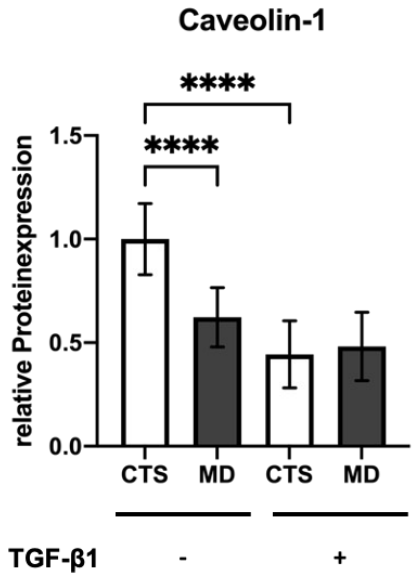

Abb. 19: Caveolin-1 Proteinexpression (n = 14).

Relative Veränderung der Proteinexpression bezogen auf den Mittelwert der unbehandelten CTS-FB. Signifikanz: **** = p < 0,0001.

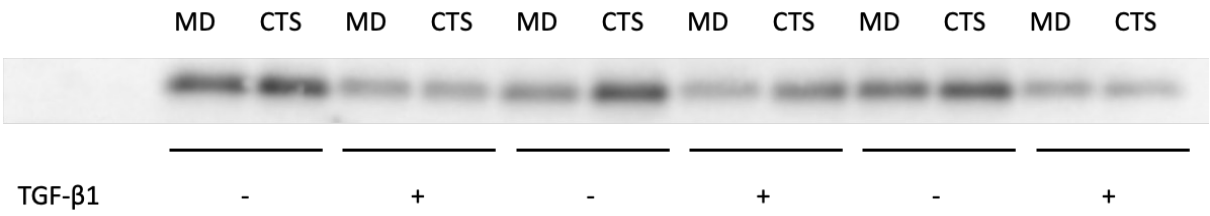

Abb. 20: Exemplarische Darstellung einer Western-Blot Analyse des Caveolin-1 Proteins. Verglichen wurde die Caveolin-1 Expression in MD- und CTS-FB.

3.3 Analyse der Integrin αvβ6 -Proteinexpression

In dieser Versuchsreihe wurde die Integrin αvβ6 Proteinexpression der MD- und CTS-Fibroblasten miteinander verglichen.

Es zeigte sich, dass Integrin αvβ6 in MD-Fibroblasten tendenziell weniger exprimiert wurde als in CTS-Fibroblasten.

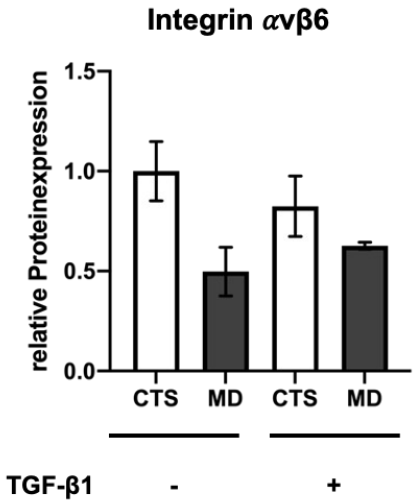

Abb. 21: Integrin αvβ6 Proteinexpression (CTS n = 2; MD n = 3).
Relative Veränderung der Proteinexpression normiert auf die unbehandelten CTS-FB.

3.3.1 Vergleich der CD44 Proteinexpression

Hier konnte eine signifikant schwächere CD44 Proteinexpression der unbehandelten MD-Fibroblasten beobachtet werden. Durch die Stimulation mit TGF-β1 nahm die CD44 Expression in MD-Fibroblasten stärker ab als in CTS-Fibroblasten (Abb. 21).

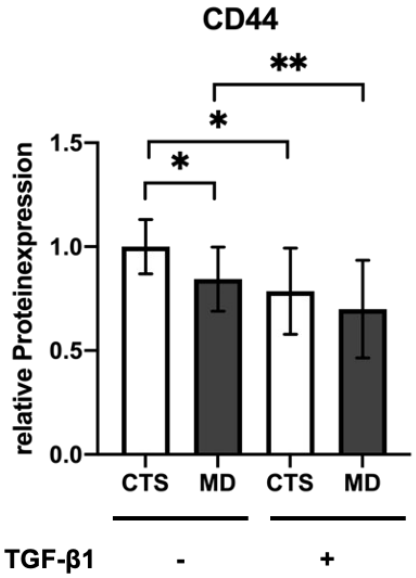

Abb. 22: CD44 Proteinexpression (n = 9).

Relative Veränderung der Proteinexpression normiert auf die unbehandelten CTS-FB. Signifikanz: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

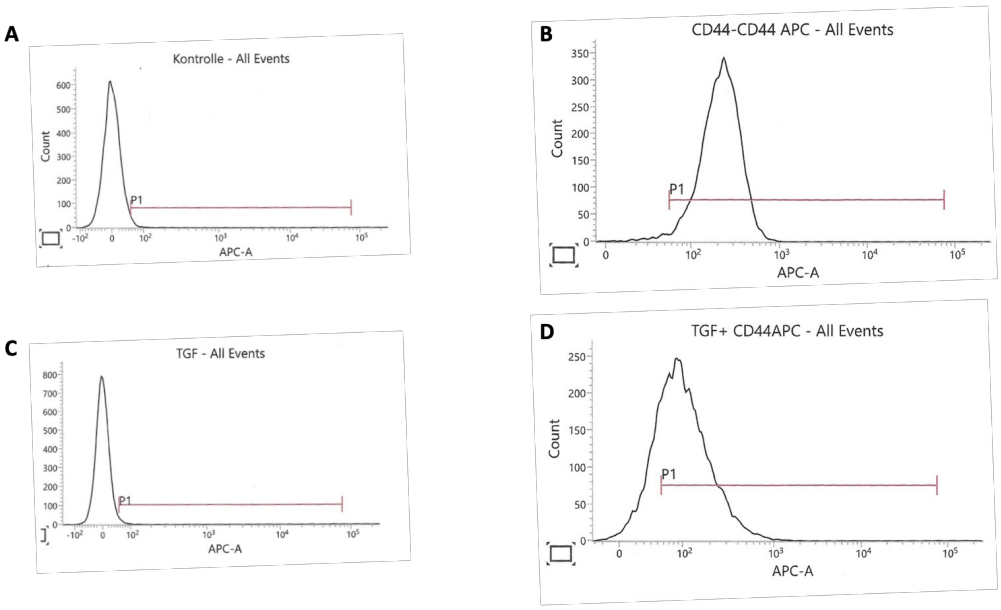

Abb. 23: Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der CD44 Proteinexpression in CTS-Fibroblasten.

A: Kontrolle. B: CTS-FB mit 0 ng/ml TGF-β1, CD44-APC Antikörper. C: Mit TGF-β1 behandelte FB, Kontrolle ohne Antikörper. D: TGF-β1 behandelte FB, CD44-APC. Die stimulierten FB wurden für 72 h mit 4 ng/ml TGF-β1 behandelt.

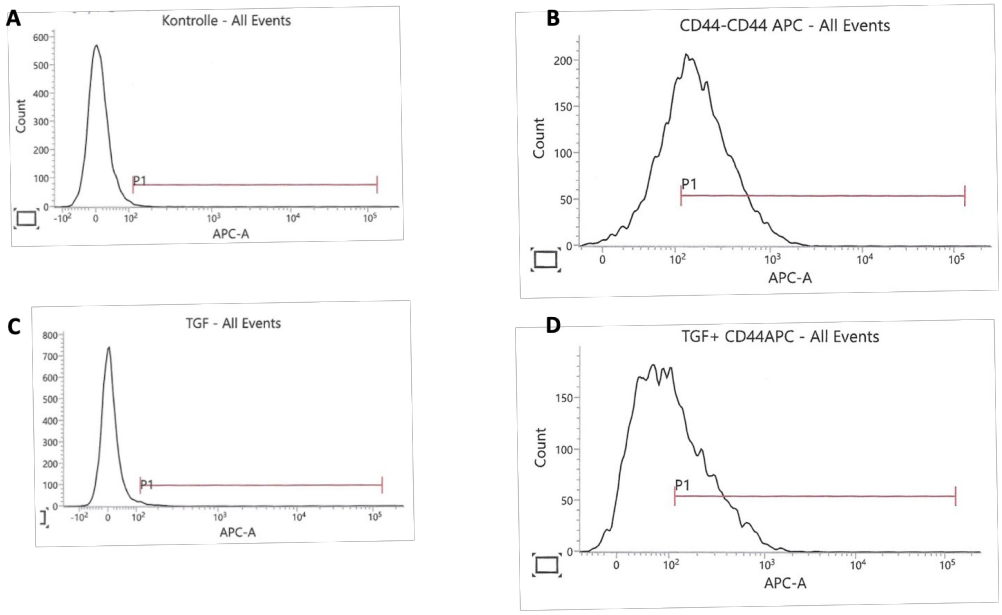

Abb. 24: Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der CD44 Proteinexpression in MD-Fibroblasten.

A: Kontrolle. B: MD-FB mit 0 ng/ml TGF-β1, CD44-APC Antikörper. C: Mit TGF-β1 behandelte FB, Kontrolle ohne Antikörper. D: TGF-β1 behandelte MD-FB, CD44-APC. Die stimulierten FB wurden für 72 h mit 4 ng/ml TGF-β1 behandelt.

4 Diskussion

Die exakte Pathogenese des MD ist bis heute nicht vollständig geklärt und Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Bekannt ist, dass im Rahmen der Pathogenese eine vermehrte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten stattfindet. TGF-β1 induziert hauptverantwortlich diese Differenzierung [148] und konnte in erhöhten Konzentrationen intrazellulär im MD Gewebe nachgewiesen werden [149].
Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob Proteine die an der Regulation der TGF-β1 Aktivität und dessen Abbau beteiligt sind, im Gewebe des MD differenziell exprimiert werden.

TGF-β1 wirkt nicht nur begünstigend auf die Differenzierung zu Myofibroblasten, sondern induziert auch die Expression des Surrogatparameters der Myofibroblasten: α-sma [148]. Denn durch TGF-β1 werden die kontraktilen Kräfte der Myofibroblasten verstärkt [150, 151]. Dementsprechend wurde α-sma in dieser Arbeit als Nachweis der Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten genutzt.
Um die Differenzierung der Myofibroblasten zu induzieren, wurden die MD-Fibroblasten zu Beginn mit verschiedenen Konzentrationen von TGF-β1 über 24 h bis 72 h inkubiert. Im Anschluss wurde die α-sma Proteinexpression analysiert, um zu ermitteln, bei welcher Konzentration und nach welcher Inkubationszeit die maximale α-sma Proteinexpression, erreicht wurde. Unter welchen Bedingungen eine Stimulation mit TGF-β1 eine maximale α-sma Expression bewirkt, wurde bereits von einigen Autoren an Fibroblasten des MD untersucht. Vaughan *et al*. beobachteten eine vermehrte Expression von Myofibroblasten nach Inkubation der Fibroblasten mit 1 ng/ml TGF-β1 nach fünf Tagen [151], während Bisson *et al*. eine maximale α-sma Expression nach vier Tagen Inkubation mit 2 ng/ml TGF-β1 beobachteten [152]. Dabei stand in der Arbeit von Bisson *et al.* nicht die konzentrationsabhängige Stimulation der Fibroblasten im Vordergrund, sondern die Inkubationszeit.
In anderen Studien konnte beobachtet werden, dass die TGF-β1 abhängige Stimulation der MD-Fibroblasten einem konzentrationsabhängigem Feedback

Mechanismus unterliegt. So beobachteten Wong & Mudera einen Anstieg der Myofibroblasten-Expression bis zu einem *Peak* bei einer Konzentration von 12,5 ng/ml TGF-β1 und bei Konzentrationen von mehr als 12,5 ng/ml einen Rückgang der Expression [153]. Hierbei betrug der Beobachtungszeitraum 24 h. Im Gegensatz dazu stellte sich in unseren Untersuchungen bereits ein Rückgang der α-sma Proteinexpression ab einer Konzentration von 5 ng/ml TGF-β1 nach 48 h dar. Aufgrund unserer Untersuchungsergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit die Fibroblasten für 72 h mit 4 ng/ml TGF-β1 stimuliert (Abb. 5).

4.1 Proteinexpression von MMP-2, MMP-9 und MMP-14 im MD

MMPs können durch Interaktion von LAP-TGF-β1 die Aktivität von TGF-β1 beeinflussen [123] und es gibt einige Hinweise auf eine Dysregulation der MMPs im MD [154-156].

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Ulrich *et al.* zeigten unsere Analysen keinen signifikanten Unterschied der MMP-9 Proteinexpression im MD [157]. Auch die Stimulation mit TGF-β1 führte zu keiner Veränderung der MMP-9 Proteinexpression (Abb. 7). Es ist jedoch zu beachten, dass Ulrich et al. die MMP-9-Expression auf Ebene der mRNA mittels quantitativer Real-Time PCR untersuchten, während in der vorliegenden Arbeit die Proteinexpression mittels Western-Blot analysiert wurde. Die abweichenden Ergebnisse könnten daher auf die verschiedenen Untersuchungsmethoden zurückzuführen sein.

Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit, übereinstimmend mit den Arbeiten von Johnston *et al.* und Qian *et al.*, eine signifikant erhöhte MMP-2 Proteinexpression in den MD-Fibroblasten nachgewiesen werden (Abb. 11) [155, 156]. Ulrich *et al.* beobachteten ebenfalls eine erhöhte MMP-2-Expression im MD-Gewebe und verwendeten gleichermaßen Fibroblasten aus dem Gewebe des Karpaltunnelsyndroms als Vergleichsgruppe. Im Gegensatz zu unserer Studie gab es bei den Proben von Ulrich *et al.* eine Unterscheidung zwischen Gewebe aus Knoten und Strängen. So konnten sie feststellen, dass die MMP-2-Expression in den MD-Knoten signifikant höher ist als die in den Strängen [157]. Interessanterweise zeigte sich, dass eine vermehrte MMP-2-Aktivität unabhängig vom klinischen Stadium des MD nachgewiesen werden kann [158]. Passend zu den Beobachtungen der MMP-2 Expression im Gewebe des MD wurde in der mit

dem MD verwandten Peyronie-Krankheit ebenfalls eine erhöhte MMP-2 Genexpression nachgewiesen [156]. So scheinen profibrotische Erkrankungen häufig mit einer erhöhten MMP-2-Aktivität einherzugehen. Da MMPs bekanntermaßen durch proteolytische Spaltung des LAP-TGF-β1 zur Aktivierung von TGF-β1 führen, untersuchten wir auch die MMP-2 Proteinexpression in den MD- und CTS-Fibroblasten nach exogener Zugabe von TGF-β1. Nach Zugabe von TGF-β1 konnte sowohl bei den MD- als auch bei den CTS-Fibroblasten eine signifikant erhöhte MMP-2 Proteinexpression beobachtet werden (Abb. 11). Es ist bekannt, dass TGF-β1 nicht nur durch MMP-2 aktiviert wird, sondern umgekehrt auch die MMP-2 Aktivität steigern kann. Am Beispiel von Fibroblasten des vorderen Kreuzbandes wurde nach exogener TGF-β-Gabe eine erhöhte MMP-2-Aktivität festgestellt [159].

Dass im MD eine Überexpression von TGF-β1 vorliegt ist bekannt [72]. Da sich die MMP-2 Expression zwischen den MD- und CTS-Fibroblasten nur ohne vorherige exogene Zugabe von TGF-β1 unterscheidet, könnte man vermuten, dass die erhöhte basale MMP-2 Aktivität in MD-Fibroblasten auf der vermehrten endogenen Überexpression von TGF-β1 beruht. Unterstützend dazu lässt sich anführen, dass die Zugabe von TGF-β1 in beiden Gruppen zu einer starken Zunahme der MMP-2 Expression führte.

Interessanterweise konnten wir nach der Aktivierung durch TGF-β1 eine erhöhte MMP-14 Proteinexpression in den CTS-Fibroblasten, jedoch nicht in den MD-Fibroblasten beobachten (Abb 9). Johnston *et al.* beschrieben eine erhöhte MMP-14 Genexpression in MD-Knoten im Vergleich zu CTS-Fibroblasten ohne vorherige Aktivierung durch TGF-β1 [155]. Diese Tendenz war ebenfalls in unseren Versuchen erkennbar.

In den Arbeiten von Mirastschijski *et al.* und Daniels *et al.* gibt es Hinweise dafür, dass durch Inhibition der MMPs die Kontraktion einer Wunde im Rahmen der Wundheilung abnimmt und dass die α-sma-Expression herunterreguliert wird [160, 161]. Beispielsweise wurde in Knock-out-Modellen von MMP-2 und MMP-14 eine verminderte Kontraktilität der Kollagenfasern im Gewebe beobachtet. Im Umkehrschluss könnte man anhand dieser Ergebnisse vermuten, dass insbesondere MMP-2, welches nachweislich im MD-Gewebe überexprimiert wird, und auch MMP-14 an der erhöhten Kontraktilität im MD-Gewebe und an der

Pathogenese des MD beteiligt sein könnten [162]. Diese These wurde im Kontext des MD von Townley *et al.* unter Einsatz des MMP-Inhibitors Ilomastat untersucht. Sie zeigten, dass nach Zugabe von Ilomastat die kontraktilen Kräfte der MD-Fibroblasten im Vergleich zu Retinaculum flexorum Fibroblasten abnahmen [163]. Demzufolge scheinen die MMPs maßgeblich an dieser Regulation im MD beteiligt zu sein und stellen somit eine interessante Schnittstelle für weiterführende Forschungsarbeiten dar. Einschränkend zu erwähnen ist, dass der beobachtete Effekt in der Arbeit von Townley *et al.* an einer geringen Fallzahl von n = 5 untersucht wurde. Im Widerspruch dazu steht eine onkologische Studie, in der einige Patienten unter der Therapie mit dem MMP-Inhibitor Marimastat einen MD entwickelten [154].

Im Zusammenhang mit der TGF-β1 Aktivierung durch MMPs spielt auch CD44 eine Rolle, ein Marker für mesenchymale Stammzellen, Zelladhäsion und Zell-Zell-Interaktionen [164]. CD44 ist als Oberflächenrezeptor an der Aktivierung des TGF-β1 beteiligt, indem es MMP-9 und MMP-2 an die Zelloberfläche rekrutiert, wo diese dann LAP-TGF-β1 proteolytisch spalten können [123]. Damit ist CD44 nicht direkt an der Aktivierung des TGF-β1 beteiligt, moduliert jedoch die perizelluläre Proteolyse.

Unsere Ergebnisse zeigten eine schwächere CD44 Proteinexpression in den MD- im Vergleich zu den CTS-Fibroblasten ohne vorherige Aktivierung durch TGF-β1 (Abb. 22). Die reduzierte CD44-Expression in unbehandelten MD-Fibroblasten könnte auf eine veränderte Regulation zellulärer Interaktions- und Signalprozesse hindeuten, die mit der Pathogenese des MD assoziiert sind.

Eine veränderte Zelladhäsion könnte die Interaktion der Fibroblasten mit ihrer Umgebung beeinträchtigen und zur verstärkten Differenzierung in Myofibroblasten beitragen. *Xiangwei Huang et al.* zeigten, dass mechanische Faktoren und Zelladhäsion die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten wesentlich beeinflussen [165].

Neben einer potenziell veränderten Zelladhäsion erscheint auch eine Modulation perizellulärer Proteolyseprozesse denkbar. Da CD44 als Andockstelle für MMP-2 und MMP-9 dient, könnte eine reduzierte CD44-Expression die lokale Aktivierung von latentem TGF-β1 beeinflussen. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass TGF-

β1 über mehrere alternative Mechanismen aktiviert werden kann, beispielsweise durch TSP-1 und Plasminogen [166]. Daher lässt sich die funktionelle Konsequenz einer verminderten CD44-Expression nicht eindeutig vorhersagen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen detektierten Hindocha *et al.* vermehrt CD44 in den Knoten, Strängen und im umliegenden Fettgewebe des MD [164]. Die Untersuchungen von Hindocha *et al.* untersuchten allerdings keine Fibroblasten, sondern mesenchymale und hämatopoetische Stammzellen. Das Ziel deren Arbeit war es, die verschieden Stammzellpopulationen im MD-Gewebe zu analysieren.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach Stimulation mit TGF-β1 eine stärkere Abnahme der CD44-Expression in MD-Fibroblasten im Vergleich zu CTS-Fibroblasten (Abb. 22). Dies deutet darauf hin, dass Veränderungen in der CD44-Expression mit einer differenzierten TGF-β1-abhängigen Signalantwort assoziiert sein könnten. Da CD44 mit Komponenten des TGF-β1-Signalwegs interagiert und dessen Modulation beeinflussen kann [167], erscheint eine funktionelle Verknüpfung plausibel. Allerdings erlaubt die alleinige Analyse der CD44-Expression keine Rückschlüsse darüber, ob tatsächlich eine Dysregulation oder verstärkte Aktivierung der TGF-β1-Signaltransduktion vorliegt. Die beobachtete stärkere Abnahme der CD44-Expression ist daher eher als indirekter Hinweis auf eine differenzierte zelluläre Reaktion gegenüber TGF-β1 zu werten, ohne dass darauf eine kausale Störung des Signalwegs abgeleitet werden kann.

4.2 Proteinexpression von TSP-1 im MD unter Einfluss von TGF-β1

TSP-1 übernimmt in verschiedenen biologischen Prozessen eine zentrale Rolle, wie z. B. Blutgerinnung, Zellmigration, Fibroblastenproliferation und der Umbau der EZM [93, 168]. Eine der bedeutenden Funktionen ist die Regulation der Angiogenese, die für die Bildung neuer Blutgefäße verantwortlich ist und somit möglicherweise einen Einfluss auf die Pathogenese des MD haben könnte.

Im Gewebe von Patienten mit MD konnte eine erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren, darunter dem *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), nachgewiesen werden, die an Prozessen der Neoangiogenese beteiligt sind [169]. Angiogenese ist nicht nur entscheidend für die Wundheilung, sondern hat

auch einen stimulierenden Einfluss auf fibrotische Prozesse, die charakteristisch für MD sind [170].

In Studien mit TSP-1-Knock-out-Mäusen wurde eine verzögerte Wundheilung beobachtet, was die Bedeutung von TSP-1 für die Gewebereparatur und die Regulation von Heilungsprozessen unterstreicht [171]. Das legt die Vermutung nahe, dass eine dysregulierte TSP-1-Expression bei MD-Fibroblasten die normale Wundheilung stören und zur übermäßigen Fibrose beitragen könnte.

Die Aktivierung von LAP-TGF-β1 durch TSP-1 erfordert spezifische Interaktionen zwischen bestimmten Aminosäuresequenzen. Zum einen ist die RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp) des LAP entscheidend für die Bindung von TSP-1 an das LAP. Zum anderen enthält TSP-1 ein WSXW-Motiv (Trp-Ser-X-Trp), welches entscheidend für die Bindung an LAP ist und damit die Aktivierung von TGF-β1 ermöglicht. Die spezifischen Interaktionen ermöglichen es TSP-1, die strukturelle Inaktivierung durch LAP zu überwinden und TGF-β1 aus diesem Komplex zu befreien und damit zu aktivieren [96]. Daher war eines der Ziele dieser Arbeit, zu untersuchen, ob TSP-1 in MD-Fibroblasten differentiell exprimiert wird. Der genaue Mechanismus durch den TSP-1 TGF-β1 aktiviert ist aber noch Gegenstand von Diskussionen. Denn Grainger *et al.* beschrieben in ihrer Arbeit am Beispiel von glatten Muskelzellen, dass TSP-1 alleine nicht zu einer signifikanten Aktivierung von TGF-β1 führt [172].

Um den Einfluss von TSP-1 auf die Aktivierung von TGF-β1 im Gewebe des MD zu untersuchen, analysierte unsere Arbeitsgruppe in einer weiteren Studie die Proteinexpression von LAP-TGF-β, α-SMA und PAI nach exogener Zugabe von TSP-1. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Veränderungen der Proteinexpression von LAP-TGF-β, α-SMA und PAI nach der Zugabe von TSP-1 [1]. So scheint TSP-1 allein im MD keine Aktivierung von TGF-β1 zu bewirken. Die in diesen Analysen beobachtete ausbleibende Aktivierung von TGF-β1 durch TSP-1 könnte verschiedene Ursachen haben. So ist es denkbar, dass strukturelle Eigenschaften oder posttranslationale Veränderungen von TSP-1 oder LAP im Gewebe die Interaktion und somit Aktivierung beeinträchtigen. Zum anderen könnten zusätzliche Kofaktoren oder Bedingungen erforderlich sein, welche in vivo eine entscheidende Rolle spielen, um die vollständige Aktivierung von TGF-β1 durch TSP-1 zu ermöglichen.

In dieser Arbeit wurden TSP-1 und Plasmin getrennt voneinander untersucht. Es gibt Hinweise darauf, dass TSP-1 und Plasmin in ihrer Wirkung nicht unabhängig, sondern kooperativ wirken. Laut Jenkins *et al.* hat TSP-1 eine unterstützende Rolle in der TGF-β1-Aktivierung durch Plasmin, in dem es die latente Form von TGF-β1 stabilisiert und so den Zugang zum latenten TGF-β1 für Plasmin und andere Proteasen erleichtert [173].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass signifikant erhöhte TSP-1 Level in den MD-Fibroblasten im Vergleich zu den CTS-Fibroblasten zu detektieren sind (Abb. 13). Interessanterweise führen diese aber nicht zu einer vermehrten proteolytischen Freisetzung des TGF-ß1 [1]. Nach der Zugabe von TGF-β1 stieg die TSP-1-Expression in den CTS-Fibroblasten signifikant an. Im Gegensatz dazu konnte in den MD-Fibroblasten nach Zugabe von TGF-β1 keine erhöhte TSP-1-Expression beobachtet werden (Abb. 13).

Zukünftige Studien könnten die gestörte Aktivierung von TGF-β1 durch TSP-1 einerseits genauer im Hinblick auf die Bindungssequenzen und andererseits die Aktivierung von TGF-β1 durch TSP-1 im Zusammenhang mit Plasmin untersuchen.

4.3 Veränderung der Integrin αvβ6 Proteinexpression unter Einfluss von TGF-β1 im MD

Für einige Erkrankungen wurden die Integrine schon als profibrotische Faktoren im Rahmen der Pathogenese identifiziert, nicht aber im MD [174]. In fibrotischen Prozessen sind die Integrine als Transmembranproteine zum Beispiel an der Interaktion zwischen der EZM und Fibroblasten beteiligt [175]. Im Rahmen der Entstehung von fibrotischen Erkrankungen ist auch die Beziehung zwischen den Integrinen und TGF-β1 interessant. Insbesondere die αv Integrine sind an der Aktivierung von TGF-β1 beteiligt [174]. Integrin αvβ6, welches in dieser Arbeit untersucht wurde, bindet an die RGD-Sequenz des LAP-TGF-β1 und aktiviert dieses [110]. Im Tierversuch wurde beobachtet, dass Integrin αvβ6 Knock-out-Mäuse, weniger Bleomycin induzierte Lungenfibrose entwickelten [110]. In einer weiteren Studie konnte durch Blockade der Integrin αvβ6 vermittelten TGF-β1

Aktivierung die Entwicklung von strahleninduzierter Lungenfibrose verhindert werden [176].

In dieser Arbeit zeigte sich ohne Zugabe von TGF-β1 eine signifikant verringerte Proteinexpression des Integrin αvβ6 in den MD-Fibroblasten im Vergleich zu den CTS-Fibroblasten (Abb.15). Die reduzierte Integrin αvβ6-Expression in MD-Fibroblasten könnte darauf hindeuten, dass TGF-β1 in dem Zusammenhang möglicherweise durch alternative Mechanismen oder andere Integrine aktiviert wird. Nach exogener Zugabe von TGF-β1 veränderte sich die Integrin αvβ6 Proteinexpression der MD-Fibroblasten nicht signifikant. Die Zugabe von TGF-β1 führte bei den CTS-Fibroblasten hingegen zu einer signifikanten Reduktion der Integrin αvβ6 Proteinexpression (Abb. 15). Die Beobachtung, dass die Integrinαvβ6-Proteinexpression in CTS-Fibroblasten nach TGF-β1-Stimulation signifikant abnimmt, könnte auf eine negativen Rückkopplungsmechanismus hinweisen, in der hohe TGF-β1-Level die Expression von Integrinαvβ6 herunterregulieren, um eine Überaktivierung des TGF-β1-Signalwegs zu verhindern. Diese negative Rückkopplung könnte dazu beitragen, das Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Hemmung von TGF-β1 zu wahren und somit eine überschießende Fibrose zu verhindern.

4.4 Proteinexpression von Plasmin im MD unter Einfluss von TGF-β1

Die wechselseitige Beziehung zwischen TGF-β1 und Plasmin ist ein zentraler Aspekt in der Pathophysiologie von fibrotischen Erkrankungen wie dem MD. Plasmin zählt zu den Proteasen, die LAP-TGF-β1 aus dem Komplex freisetzen und aktivieren können [139]. Auf der anderen Seite kann TGF-β1 die Expression von Proteaseinhibitoren, wie z. B. PAI-I, stimulieren, um die Degradation der extrazellulären Matrix (EZM) zu verhindern [177]. Als Serin-Protease-Inhibitor verhindert PAI-I die durch uPA und tPA vermittelte Konversion von Plasminogen zu Plasmin. Es wurde gezeigt, dass in fibrotischem Gewebe erhöhte Level von PAI-I vorhanden sind. Man geht davon aus, dass die erhöhte PAI-I-Expression auf eine erhöhte TGF-β1-Aktivität in dermalen Fibroblasten zurückzuführen ist [178]. Auch in Proben aus dermalen Fibroblasten der systemischen Sklerose, in denen ebenfalls eine gesteigerte TGF-β1-Aktivität vermutet wird, war die mRNA-

Expression des PAI-I erhöht [178, 179]. Entsprechend dieser Beobachtungen konnten wir in unserer Studie eine signifikant verringerte Plasminogen-Expression in Fibroblasten von Patienten mit MD im Vergleich zu Patienten mit CTS nachweisen (Abb.17). Diese Beobachtung könnte durch eine verminderte Expression von Plasminogen in Folge einer gestörten Aktivierung von TGF-β1 hindeuten.

In den MD-Fibroblasten wurde nach Aktivierung durch TGF-β1 keine Veränderung der Plasminogenexpression beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigten CTS-Fibroblasten nach TGF-β1-Aktivierung eine signifikante Reduktion der Plasminogenexpression (Abb. 17). Dies legt nahe, dass TGF-β1 möglicherweise über den PAI-I-Weg die Plasminogenexpression verringert.

Die reduzierte Plasminexpression könnte folglich die Akkumulation von extrazellulärem Material fördern, was die Bildung von Dupuytren-Knoten begünstigt. Interessanterweise wurde in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe beobachtet, dass die exogene Zugabe von Plasmin zu MD-Fibroblasten zu einer Reduktion der TGF-β1-Aktivität sowie der Myofibroblastengenese führte, obwohl Plasmin als Aktivator des TGF-β1 gilt. Dies steht im Einklang mit weiteren Ergebnissen, die eine signifikante Reduktion der Proteinexpression von LAP-TGF-β, PAI und α-SMA nach exogener Plasminzugabe in MD-Fibroblasten zeigen [1]. Die Modulation der Plasminogen-/Plasmin-Achse könnte als ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung von MD gelten.

4.5 Verminderte Caveolin-1 Proteinexpression im MD

Cav-1 kann die Aktivität von TGF-β1 auf mehreren Ebenen beeinflussen. TGF-β1 vermittelt seine Effekte über die Rezeptoren TβR-I und Tβ1R-II. TGF-β1 bindet als Ligand an die extrazelluläre Domäne des TGF-βR-II. Diese Bindung führt zur Bildung eines Komplexes aus TβR-II und TβR-I, wobei TβR-I durch Phosphorylierung aktiviert wird [87]. Dies initiiert intrazelluläre Signalkaskaden und aktiviert die SMAD-Proteine (SMAD2 und SMAD3), die ihre Funktion als Transkriptionsfaktoren ausüben [86]. Cav-1 verhindert die Phosphorylierung von SMAD3 und hemmt somit dessen Translokation in den Zellkern [180]. Diese Hemmung der SMAD3-Aktivierung führt zu einer Inhibition der TGF-β1-Signalübetragung. Zum anderen ist Cav-1 an der Endozytose des TβR-I beteiligt.

Im Fall der Cav-1 vermittelten Endozytose von TβR-I führt dies zu einer Degradierung des TGFβ-1 Signals [181].

Daraus ergibt sich, dass eine reduzierte Cav-1-Expression - wie sie im Gewebe von MD-Fibroblasten durch diese Arbeit demonstriert werden konnte – zu einer verlängerten Verfügbarkeit des TGF-β1-Signals (durch geringere Rezeptor-Degradation). Dieser Mechanismus könnte zur verstärkten Induktion profibrotischer Gene wie α-sma beitragen und somit die fibrotischen Prozesse im MD begünstigen.

Die Funktion des Cav-1 wird im Kontext verschiedener fibrotischer Erkrankungen diskutiert. Eine interessante Beobachtung ist, dass Cav-1 die TGF-β1 induzierte Produktion von Kollagen-Typ 1 in Lungenfibroblasten hemmt [145]. Dies legt nahe, dass Cav-1 ein entscheidender Regulator der Kollagensynthese sein könnte, die ein charakteristisches Merkmal der Fibrose ist. In Bezug auf systemische Sklerose wurde festgestellt, dass das fibrotische Gewebe niedrigere Level an Cav-1 aufweist, während gleichzeitig die Aktivität von TGF-β1 erhöht ist [146]. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass ein Mangel an Cav-1 möglicherweise zu einer verstärkten TGF-β1-Aktivierung und somit zu einer gesteigerten Fibrogenese beiträgt. In einer weiteren Studie zur idiopathischen Lungenfibrose (IPF) wurde festgestellt, dass die experimentell induzierte Fibrose in Alveolarepithelzellen von Mäusen durch einen Cav-1 Gentransfer verhindert werden konnte [182]. Diese Befunde verdeutlichen, dass Cav-1 eine wichtige regulatorische Funktion in fibrotischen Signalwegen einnimt. Obwohl Cav-1 nicht direkt die Myofibroblastendifferenzierung hemmt, kann eine reduzierte Cav-1-Expression indirekt zu einer verstärkten α-sma-Induktion und Fibroseprogression beitragen. Aus therapeutischer Sicht könnte daher eine gezielte Erhöhung von Cav-1 dazu beitragen, diese Prozesse zu modulieren.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass in CTS-Fibroblasten die Expression von Cav-1 nach Zugabe von TGF-β1 signifikant reduziert wird (Abb. 19). Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Sanders *et al.* überein, die ebenfalls eine herunterregulierte Cav-1-Expression in Lungenfibroblasten nach Zugabe von TGF-β1 nachgewiesen haben [183]. Daraus könnte man schließen, dass nicht nur Cav-1 zu einer Reduktion des TGF-β1 Signals führt, sondern umgekehrt auch TGF-β1 die Cav-1 Proteinexpression negativ reguliert. So wurde in

Gefäßendothelzellen eine dosis- und zeitabhängige Herunterregulation von Cav-1 durch TGF-β1 beoachtet [184]. Interessanterweise zeigte sich bei MD-Fibroblasten keine Reduktion der Cav-1-Expression nach Zugabe von TGF-β1. Allerdings war die Cav-1-Expression in unbehandelten MD-Fibroblasten bereits signifikant niedriger im Vergleich zu unbehandelten CTS-Fibroblasten. Dies könnte darauf hinweisen, dass die endogen erhöhten TGF-β1-Level in MD-Fibroblasten für die niedrige Cav-1-Expression verantwortlich sind. Damit könnte die verminderte Cav-1-Expression als mögliche Folge einer TGF-β1 Überexpression im MD erheblich zur Progression der Erkrankung beitragen. Sanders *et al.* vermuteten, dass die verminderte Cav-1-Expression in Myofibroblasten ein entscheidender regulatorischer Mechanismus ist, um der Apoptose zu entgehen. Es ist bekannt, dass differenzierte Myofibroblasten geringere Apoptoseraten aufweisen [185]. Nach experimenteller Erhöhung der Cav-1-Expression wurde hingegen eine erhöhte Apoptoserate der Myofibroblasten beobachtet [183], was die These von Sanders *et al.* unterstützt. Zhang *et al.* zeigten an Keloid-Fibroblasten, dass Cav-1 die TGF-β1-vermittelte Proteinexpression von α-SMA inhibieren kann. Zudem konnte durch die Gabe eines Cav-1-Peptids die TGF-β1-induzierte Aktivierung von PAI-I reduziert werden [186].

Zusammenfassend legen diese Studien nahe, dass die Interaktion zwischen Cav-1 und TGF-β1 Komplex und kontextabhängig ist. Während TGF-β1 die Expression von Cav-1 herunterregulieren kann, scheint eine verminderte Cav-1-Expression auch ein Mechanismus zu sein, der fibrotischen Zellen erlaubt, TGF-β1 Signale zu verstärken und apoptotischen Signalen zu entgehen.

Unsere Arbeitsgruppe konnte auf der Basis von den Ergebnissen dieser Arbeit die Frage, ob die verminderte Cav-1-Expression in MD-Fibroblasten mit einer beeinträchtigen Myofibroblastengenese einhergeht, weiterführend untersuchen. Hierzu wurden MD-Fibroblasten mit 5-Fluorouracil (5-FU) behandelt, da 5-FU die Cav-1 Expression induziert [187]. Nach der Zugabe von 5-FU zeigte sich in den MD-Fibroblasten eine Zunahme der Cav-1-Expression und eine Abnahme der α-sma-Expression [1]. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass eine erhöhte Cav-1-Expression die Myofibroblastengenese inhibiert. Unterstützt werden diese Befunde durch eine Studie von Del Gado *et al.* zur Fibrose in Lunge und Haut bei

systemischer Sklerose. In dieser Studie wurde ebenfalls eine reduzierte Cav-1-Expression im fibrotischen Gewebe festgestellt. Durch ein Cav-1 ähnliches Peptid wurde die Funktion des Cav-1 imitiert, was zu einer Unterdrückung der TGF-β1 vermittelten Signale und einer geringeren Ausprägung der Fibrose führte [188]. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung von Cav-1 als Regulator fibrotischer Prozesse. Die Interaktionen zwischen Cav-1 und TGF-β1 scheinen eine kritische Schnittstelle in der Pathogenese von MD zu sein. Die Beobachtungen, dass eine erhöhte Cav-1-Expression die Myofibroblastengenese hemmt, legen nahe, dass Cav-1 ein vielversprechender therapeutischer Ansatzpunkt darstellen könnte. Die gezielte Modulation der Cav-1-Expression könnte daher eine Strategie zur Behandlung des MD sein.

4.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse deuten auf eine gestörte Aktivierung von TGβ-1 im Gewebe von Patienten mit Morbus Dupuytren hin. Diese Störung äußert sich unter anderem in einer veränderten Proteinexpression von TGF-β1-regulierten Genen wie beispielsweise Plasminogen und Cav-1. Die fehlende Aktivierung des TGF-β1 ist ein zentraler Mechanismus in der Pathogenese des Morbus Dupuytren, der die Förderung der Myofibroblasten-Differenzierung, unterstützt. Vor diesem Hintergrund erscheint die gezielte Modulation der TGF-β1-Aktivierung als vielversprechender therapeutischer Ansatz zur Verhinderung oder Reduktion der Fibrose, beispielsweise durch die Entwicklung von spezifischen TGF-β1-Inhibitoren, die die pathologische Fibroblastenaktivierung und Myofibroblastengenese unterbinden könnten.

In diesem Zusammenhang wurde in einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe der selektive TGF-β1-Rezeptorkinase-Inhibitor SB-431542 eingesetzt, um die TGF-β1-Signalübertragung in MD-Fibroblasten pharmakologisch zu blockieren.

Durch den Einsatz von SB-431542 wurde die TGF-β1 induzierte α-sma-Proteinexpression in Dupuytren-Zellen signifikant reduziert [189]. Diese Ergebnisse unterstreichen das therapeutische Potenzial von TGF-β1-Inhibitoren zur Hemmung profibrotischer Signalwege, die wesentlich zur Pathogenese des MD beitragen.

Allerdings zeigten experimentelle Tiermodelle auch die Risiken einer systemischen TGF-β1-Blockade auf. Shull *et al.* untersuchten die Auswirkungen einer in vivo TGF-β1-Blockade, in dem sie das TGF-β1-Gen in Mäusen mithilfe der Knock-out-Methode deaktivierten. Daraufhin zeigten die TGF-β1-Knock-out-Mäuse Anzeichen von schweren Entzündungsreaktionen und Gewebeschäden auf. Nachfolgende histologische Untersuchungen haben ergeben, dass diese Reaktionen in erster Linie auf eine Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen zurückzuführen sind. Die systemische Blockade von TGF-β1 führte dazu, dass die Mäuse in frühem Alter an den massiven systemischen Infektionen verstorben sind [190]. Während eine generelle Hemmung von TGF-β1 in fibrotischen Erkrankungen vielversprechend erscheint, muss die Balance zwischen der Reduktion pathologischer Fibrose und der Erhaltung phsyiologischer immunologischer Funktionen sorgfältig berücksichtigt werden. Somit scheint eine grundsätzliche Inhibition der TGF-Signalkaskade, wie bereits erläutert, nicht praktikabel. Im Gegensatz dazu könnte der schnellere Abbau des TGF-β1-Signals durch 5-FU besonders vielversprechend sein. Durch lokale Injektionen könnte die Fibrose direkt am Ort des Geschehens adressiert werden, um systemische Nebenwirkungen zu reduzieren.

Derzeit sind in der klinischen Praxis keine spezifischen Cav-1-Modulatoren für die Behandlung von MD verfügbar. Medikamente mit nachgewiesener Wirkung auf Cav-1, wie 5-FU, könnten jedoch therapeutisch nutzbar sein. So zeigt die Literatur, dass 5-FU die Expression von Cav-1 induzieren kann [1]. Ein erhöhtes Cav-1-Level begünstigt die Caveolin-vermittelte Endozytose und Degradation von TGF-β-Rezeptoren, wodurch die Verfügbarkeit von TGF-β1 für die Signalübertragung reduziert wird. In der Folge kann die Aktivierung von Fibroblasten sowie die Differenzierung zu Myofibroblasten abgeschwächt werden, was die Progression der Fibrose potenziell verlangsamt.

Erste Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe unterstreichen diesen Ansatz, da gezeigt werden konnte, dass nach Zugabe von 5-FU die α-sma-Expression in MD-Fibroblasten deutlich reduziert war [1].

Daher wäre eine genauere Untersuchung von 5-FU im Zusammenhang mit Cav-1 und MD wichtig, um so möglicherweise fibrotische Prozesse in der Hand

zu reduzieren. Dies könnte zu einer Verlangsamung des Krankheitsfortschritts und zur Verbesserung der Handfunktion der betroffenen Patienten führen.
Zukünftige Forschungsansätze könnten sich auf eine spezifische Modulation von einzelnen TGF-β1-Signalkaskaden konzentrieren, um gezielt fibrotisches Gewebe zu behandeln. Eine Alternative wäre sonst auch lokale TGF-β1-Inhibitoren, um eine gezielte Therapie des erkrankten Gewebes ohne systemische Nebenwirkungen zu bewirken.
Darüber hinaus deuten Daten aus einer retrospektiven Studie darauf hin, dass Angiotensin-I-Rezeptorblocker zu einer geringeren Ausprägung und Schwere des MD führen [191]. Da Angiotensin-I-Rezeptorblocker als bereits getestete und gut verträgliche Medikamente bekannt sind, wäre es interessant genauer zu untersuchen, ob diese im Rahmen des Morbus Dupuytren als relevante Therapieoption infrage kommen.
Die Erkenntnisse dieser Arbeit schaffen eine wichtige Grundlage für weiterführende Forschungen und die Entwicklung neuer Therapien im Bereich des MD. Insbesondere die Untersuchungen im Bereich der TGF-β1-Aktivierung und des TGF-β1-Abbaus als Schlüsselmechanismus in der Entstehung der Pathogenese könnten zukünftig dazu beitragen, gezielte therapeutische Strategien zu entwickeln und damit die Lebensqualität von Betroffenen deutlich zu verbessern.

4.7 Limitationen der Studie

Wie die epidemiologischen Daten des MD nahelegen, unterliegt die vorliegende Arbeit einem Geschlechterbias, da Männer häufiger von MD betroffen sind. Für die MD-Proben wurden Daten von 13 männlichen und 5 weiblichen Spendern verwendet. Im Gegensatz dazu wurden bei den CTS-Proben mehr Proben von Frauen untersucht: 6 Männer und 10 Frauen wurden in dieser Arbeit analysiert.
Ein weiterer limitierender Aspekt dieser Arbeit besteht darin, dass bei den untersuchten MD-Proben nicht zwischen Primärmanifestationen und Rezidiven unterschieden wurde. Da Rezidive des MD typischerweise nach therapeutischen Eingriffen wie Operationen auftreten, handelt es sich dabei um Gewebe, das bereits einen Heilungsprozess durchlaufen hat und anschließend erneut eine Phase fibrotischer Umwandlung durchläuft. Daher wäre es denkbar, dass sich

Fibroblasten aus Rezidiven von den primär betroffenen Fibroblasten unterscheidet, was die Vergleichbarkeit der Proben beeinflussen könnte.
Zudem wurde innerhalb der MD-Proben keine Differenzierung zwischen den verschiedenen histopathologischen Stadien vorgenommen, was Auswirkungen auf die Ergebnisse haben könnte, da Proben aus verschiedenen Stadien unterschiedliche biologische Merkmale aufweisen. In früheren Stadien dominiert beispielsweise das Bild einer Entzündungsreaktion mit Fibroblasten reichem Gewebe, während die späten Stadien stärker fibrotisch und von Myofibroblasten dominiert sind. Dadurch könnte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinträchtigt werden. Zusätzlich wurde in den verwendeten Proben nicht zwischen Knoten- und Stranggewebe differenziert. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Proteinexpression der untersuchten Proteine in Reaktion auf TGF-β1 in Knoten- und Stranggebewe unterscheidet. Zudem könnte die Fokussierung auf TGF-β1 und das Fehlen der Betrachtung von TGF-β2 und TGF-β3 Auswirkungen auf die Interpretation der Ergebnisse haben. TGF-β2 spielt eine Rolle in der Gewebeheilung und der Regulation von Entzündungsprozessen, was für die früheren Phasen von MD von Bedeutung sein könnte, wenn noch entzündliche Komponenten eine Rolle spielen. TGF-β3 hingegen ist stärker an der Geweberegeneration und der Kollagenumstrukturierung beteiligt und hat potentiell eine hemmende Wirkung auf die Fibrose, was in späteren Stadien des MD von Bedeutung sein könnte, um eine überschießende Narbenbildung zu vermeiden. Da TGF-β2 und TGF-β3 teilweise antagonistisch zur Wirkung von TGF-β1 auf die Myofibroblastenregulation wirken, könnte das Fehlen ihrer Berücksichtigung dazu führen, dass die Untersuchung lediglich einen Ausschnitt des komplexen regulatorischen Netzwerkes abbildet und potenziell relevante biologische Zusammenhänge unvollständig erfasst werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Oezel, L., et al., *Dupuytren’s Disease Is Mediated by Insufficient TGF-β1 Release and Degradation*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**(20): p. 15097.
2. Wooldridge, W.E., *Four related fibrosing diseases*. Postgraduate Medicine, 1988. **84**(2): p. 269-274.
3. Benson, L.S., C.S. Williams, and M. Kahle, *Dupuytren's contracture*. J Am Acad Orthop Surg, 1998. **6**(1): p. 24-35.
4. Shaw, R.B., Jr., et al., *Dupuytren's disease: history, diagnosis, and treatment*. Plast Reconstr Surg, 2007. **120**(3): p. 44e-54e.

5. Larsen, S., et al., *Genetic and environmental influences in Dupuytren's disease: a study of 30,330 Danish twin pairs.* J Hand Surg Eur Vol, 2015. **40**(2): p. 171-6.
6. Dolmans, G.H., G.H. de Bock, and P.M. Werker, *Dupuytren Diathesis and Genetic Risk.* The Journal of Hand Surgery, 2012. **37**(10): p. 2106-2111.
7. Ravid, M., Y. Dinai, and E. Sohar, *Dupuytren's disease in diabetes mellitus.* Acta diabetologia latina, 1977. **14**(3): p. 170-174.
8. Skoog, T., *Dupuytren's Contracture.* Postgraduate Medicine, 1957. **21**(1): p. 91-99.
9. Arafa, M., et al., *Dupuytren's and epilepsy revisited.* The Journal of Hand Surgery: British & European Volume, 1992. **17**(2): p. 221-224.
10. Veith, N.T., et al., *Plantar fibromatosis—topical review.* Foot & Ankle International, 2013. **34**(12): p. 1742-1746.
11. Gudmundsson, K.G., T. Jónsson, and R. Arngrímsson, *Association of Morbus Ledderhose with Dupuytren's contracture.* Foot Ankle Int, 2013. **34**(6): p. 841-5.
12. Mikkelsen, O.A., *Dupuytren's disease — The influence of occupation and previous hand injuries.* The Hand, 1978. **10**(1): p. 1-8.
13. Burge, P., et al., *SMOKING, ALCOHOL AND THE RISK OF DUPUYTREN'S CONTRACTURE.* The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume, 1997. **79-B**: p. 206-210.
14. Mikkelsen, O.A., *The prevalence of Dupuytren's disease in Norway. A study in a representative population sample of the municipality of Haugesund.* Acta Chir Scand, 1972. **138**(7): p. 695-700.
15. Lanting, R., et al., *A systematic review and meta-analysis on the prevalence of Dupuytren disease in the general population of Western countries.* Plast Reconstr Surg, 2014. **133**(3): p. 593-603.
16. Gudmundsson, K.G., et al., *Epidemiology of Dupuytren's disease: clinical, serological, and social assessment. The Reykjavik Study.* J Clin Epidemiol, 2000. **53**(3): p. 291-6.
17. Brenner, P., A. Krause-Bergmann, and V.H. Van, *[Dupuytren contracture in North Germany. Epidemiological study of 500 cases].* Unfallchirurg, 2001. **104**(4): p. 303-11.
18. Hindocha, S., D.A. McGrouther, and A. Bayat, *Epidemiological evaluation of Dupuytren's disease incidence and prevalence rates in relation to etiology.* Hand (N Y), 2009. **4**(3): p. 256-69.
19. Gonzalez, S.M. and R.I. Gonzalez, *Dupuytren's disease.* West J Med, 1990. **152**(4): p. 430-3.
20. Rayan, G.M., *Dupuytren Disease: Anatomy, Pathology, Presentation, and Treatment.* JBJS, 2007. **89**(1): p. 189-198.
21. Feldman, G., N. Rozen, and G. Rubin, *Dupuytren's Contracture: Current Treatment Methods.* Isr Med Assoc J, 2017. **19**(10): p. 648-650.
22. O'Gorman, D.B., L. Vi, and B.S. Gan, *Molecular mechanisms and treatment strategies for Dupuytren's disease.* Ther Clin Risk Manag, 2010. **6**: p. 383-90.
23. Mikkelsen, O.A., *Dupuytren's Disease—A Study of the Pattern of Distribution and Stage of Contracture in the Hand.* Hand, 1976. **8**(3): p. 265-271.
24. Luck, J.V., *Dupuytren's contracture; a new concept of the pathogenesis correlated with surgical management.* J Bone Joint Surg Am, 1959. **41-a**(4): p. 635-64.
25. Lam, W.L., et al., *Re-visiting Luck's classification: a histological analysis of Dupuytren's disease.* J Hand Surg Eur Vol, 2010. **35**(4): p. 312-7.
26. Tubiana, R., J. Michon, and J.M. Thomine, *Scheme for the assessment of deformities in Dupuytren's disease.* Surg Clin North Am, 1968. **48**(5): p. 979-84.
27. Betz, N., et al., *Radiotherapy in early-stage Dupuytren's contracture. Long-term results after 13 years.* Strahlenther Onkol, 2010. **186**(2): p. 82-90.
28. Adamietz, B., et al., *Die Radiotherapie des Morbus Dupuytren im FrühstadiumLangzeitresultate nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 10 Jahren.* Strahlentherapie und Onkologie, 2001. **177**(11): p. 604-610.
29. Keilholz, L., M.H. Seegenschmiedt, and R. Sauer, *Radiotherapy for prevention of disease progression in early-stage Dupuytren's contracture: initial and long-term results.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996. **36**(4): p. 891-7.
30. Seegenschmiedt, M.-H., *Strahlentherapie Gutartiger Erkrankungen.* 2013.
31. Hurst, L.C., et al., *Injectable Collagenase Clostridium Histolyticum for Dupuytren's Contracture.* New England Journal of Medicine, 2009. **361**(10): p. 968-979.
32. R, M., H. S, and K. W, *Recent Surgical and Medical Advances in the Treatment of Dupuytren's Disease - A Systematic Review of the Literature.* Open Orthop J, 2012. **6**: p. 77-82.
33. Van Rijssen, A.L. and P.M.N. Werker, *Percutaneous Needle Fasciotomy in Dupuytren's Disease.* Journal of Hand Surgery, 2006. **31**(5): p. 498-501.
34. Soreide, E., et al., *Treatment of Dupuytren's contracture: a systematic review.* Bone Joint J, 2018. **100-b**(9): p. 1138-1145.
35. Therkelsen, L.H., et al., *Percutaneous needle fasciotomy in Dupuytren contracture: a register-based, observational cohort study on complications in 3,331 treated fingers in 2,257 patients.* Acta Orthop, 2020. **91**(3): p. 326-330.

36. Foucher, G., J. Medina, and K. Malizos, *Percutaneous Needle Fasciotomy in Dupuytren Disease.* Techniques in Hand & Upper Extremity Surgery, 2001. **5**(3): p. 161-164.
37. Denkler, K., *Surgical complications associated with fasciectomy for dupuytren's disease: a 20-year review of the English literature.* Eplasty, 2010. **10**: p. e15.
38. van Rijssen, A.L., H. Ter Linden, and P.M.N. Werker, *Five-year results of a randomized clinical trial on treatment in Dupuytren's disease: percutaneous needle fasciotomy versus limited fasciectomy.* Plast Reconstr Surg, 2012. **129**(2): p. 469-477.
39. Shaw, M.H., *The Treatment of Dupuytren's Contracture.* Postgraduate Medical Journal, 1964. **40**(463): p. 287.
40. Rodrigues, J.N., et al., *Surgery for Dupuytren's contracture of the fingers.* Cochrane Database Syst Rev, 2015. **2015**(12): p. Cd010143.
41. Armstrong, J.R., J.S. Hurren, and A.M. Logan, *Dermofasciectomy in the management of Dupuytren's disease.* The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume, 2000. **82-B**(1): p. 90-94.
42. Henry, M., *Dupuytren's disease: current state of the art.* Hand (N Y), 2014. **9**(1): p. 1-8.
43. Padua, L., et al., *Carpal tunnel syndrome: clinical features, diagnosis, and management.* Lancet Neurol, 2016. **15**(12): p. 1273-1284.
44. Aroori, S. and R.A. Spence, *Carpal tunnel syndrome.* Ulster Med J, 2008. **77**(1): p. 6-17.
45. Wipperman, J. and K. Goerl, *Carpal Tunnel Syndrome: Diagnosis and Management.* Am Fam Physician, 2016. **94**(12): p. 993-999.
46. McAnulty, R.J., *Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007. **39**(4): p. 666-671.
47. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling.* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002. **3**(5): p. 349-363.
48. Tomasek, J.J., M.B. Vaughan, and C.J. Haaksma, *Cellular structure and biology of Dupuytren's disease.* Hand Clin, 1999. **15**(1): p. 21-34.
49. Li, B. and J.H.C. Wang, *Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement.* Journal of tissue viability, 2011. **20**(4): p. 108-120.
50. Gabbiani, G. and G. Majno, *Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study.* The American journal of pathology, 1972. **66**(1): p. 131-146.
51. Iwasaki, H., et al., *Palmar fibromatosis (Dupuytren's contracture).* Virchows Archiv A, 1984. **405**(1): p. 41-53.
52. Darby, I., O. Skalli, and G. Gabbiani, *Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing.* Lab Invest, 1990. **63**(1): p. 21-9.
53. Shipley, G.D., et al., *Reversible inhibition of normal human prokeratinocyte proliferation by type β transforming growth factor-growth inhibitor in serum-free medium.* Cancer research, 1986. **46**(4_Part_2): p. 2068-2071.
54. Battegay, E.J., et al., *TGF-β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop.* Cell, 1990. **63**(3): p. 515-524.
55. Kehrl, J.H., et al., *Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth.* The Journal of experimental medicine, 1986. **163**(5): p. 1037-1050.
56. Roberts, A.B., et al., *Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1986. **83**(12): p. 4167-4171.
57. Pastar, I., et al., *Attenuation of the transforming growth factor β-signaling pathway in chronic venous ulcers.* Molecular medicine, 2010. **16**: p. 92-101.
58. Wang, R., et al., *Hypertrophic scar tissues and fibroblasts produce more transforming growth factor-β1 mRNA and protein than normal skin and cells.* Wound Repair and Regeneration, 2000. **8**(2): p. 128-137.
59. Palladino, M.A., et al., *The transforming growth factor-betas. A new family of immunoregulatory molecules.* Ann N Y Acad Sci, 1990. **593**: p. 181-7.
60. Cheifetz, S., et al., *The transforming growth factor-β system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors.* Cell, 1987. **48**(3): p. 409-415.
61. Derynck, R., et al., *A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3.* The EMBO journal, 1988. **7**(12): p. 3737-3743.
62. Berndt, A., et al., *TGFβ and bFGF synthesis and localization in Dupuytren's disease (nodular palmar fibromatosis) relative to cellular activity, myofibroblast phenotype and oncofetal variants of fibronectin.* The Histochemical journal, 1995. **27**: p. 1014-1020.
63. Barnard, J.A., R.M. Lyons, and H.L. Moses, *The cell biology of transforming growth factor β.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1990. **1032**(1): p. 79-87.
64. Assoian, R.K., et al., *Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization.* Journal of Biological Chemistry, 1983. **258**(11): p. 7155-7160.
65. Roberts, A.B. and M.B. Sporn, *Differential expression of the TGF-β isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues.* Molecular reproduction and development, 1992. **32**(2): p. 91-98.

66. Chang, Z., et al., *TGF-β3 modulates the inflammatory environment and reduces scar formation following vocal fold mucosal injury in rats*. Disease models & mechanisms, 2014. **7**(1): p. 83-91.
67. Kis, K., X. Liu, and J.S. Hagood, *Myofibroblast differentiation and survival in fibrotic disease*. Expert reviews in molecular medicine, 2011. **13**: p. e27.
68. Badalamente, M.A., et al., *The role of transforming growth factor beta in Dupuytren's disease*. The Journal of Hand Surgery, 1996. **21**(2): p. 210-215.
69. Desmoulière, A., et al., *Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts*. The Journal of cell biology, 1993. **122**(1): p. 103-111.
70. Stocks, S.Z., S.M. Taylor, and I.A. Shiels, *Transforming growth factor-β1 induces α-smooth muscle actin expression and fibronectin synthesis in cultured human retinal pigment epithelial cells*. Clinical & Experimental Ophthalmology, 2001. **29**(1): p. 33-37.
71. Hindman, H.B., et al., *Regulation of expression of alpha-smooth muscle actin in cells of Dupuytren's contracture*. J Bone Joint Surg Br, 2003. **85**(3): p. 448-55.
72. Baird, K.S., J.F. Crossan, and S.H. Ralston, *Abnormal growth factor and cytokine expression in Dupuytren's contracture*. Journal of clinical pathology, 1993. **46**(5): p. 425-428.
73. Ratajczak-Wielgomas, K., et al., *Expression of MMP-2, TIMP-2, TGF-β1, and decorin in Dupuytren's contracture*. Connect Tissue Res, 2012. **53**(6): p. 469-77.
74. Kloen, P., et al., *Transforming growth factor-β: possible roles in Dupuytren's contracture*. The Journal of hand surgery, 1995. **20**(1): p. 101-108.
75. Webber, J., et al., *Modulation of TGFbeta1-dependent myofibroblast differentiation by hyaluronan*. Am J Pathol, 2009. **175**(1): p. 148-60.
76. Sandbo, N. and N. Dulin, *Actin cytoskeleton in myofibroblast differentiation: ultrastructure defining form and driving function*. Transl Res, 2011. **158**(4): p. 181-96.
77. Klingberg, F., B. Hinz, and E.S. White, *The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis*. J Pathol, 2013. **229**(2): p. 298-309.
78. Satish, L., et al., *Reversal of TGF-β1 stimulation of α-smooth muscle actin and extracellular matrix components by cyclic AMP in Dupuytren's-derived fibroblasts*. BMC Musculoskelet Disord, 2011. **12**: p. 113.
79. Dubois, C.M., et al., *Evidence that Furin Is an Authentic Transforming Growth Factor-β1-Converting Enzyme*. The American Journal of Pathology, 2001. **158**(1): p. 305-316.
80. Dubois, C.M., et al., *Processing of Transforming Growth Factor β1 Precursor by Human Furin Convertase **. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(18): p. 10618-10624.
81. Munger, J.S., et al., *Latent transforming growth factor-β: Structural features and mechanisms of activation*. Kidney International, 1997. **51**(5): p. 1376-1382.
82. Khalil, N., *TGF-β: from latent to active*. Microbes and Infection, 1999. **1**(15): p. 1255-1263.
83. Taipale, J., et al., *Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein*. J Cell Biol, 1994. **124**(1-2): p. 171-81.
84. Abe, M., et al., *Augmented binding and activation of latent transforming growth factor-beta by a tryptic fragment of latency associated peptide*. Endothelium, 2002. **9**(1): p. 25-36.
85. Sun, T., et al., *TGFβ2 and TGFβ3 isoforms drive fibrotic disease pathogenesis*. Science translational medicine, 2021. **13**(605): p. eabe0407.
86. Heldin, C.-H., K. Miyazono, and P. ten Dijke, *TGF-β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins*. Nature, 1997. **390**(6659): p. 465-471.
87. Wrana, J.L., et al., *Mechanism of activation of the TGF-β receptor*. Nature, 1994. **370**(6488): p. 341-347.
88. Hoodless, P.A., et al., *MADR1, a MAD-Related Protein That Functions in BMP2 Signaling Pathways*. Cell, 1996. **85**(4): p. 489-500.
89. Massagué, J., *TGF-β SIGNAL TRANSDUCTION*. Annual Review of Biochemistry, 1998. **67**(1): p. 753-791.
90. Lawler, J.W., H.S. Slayter, and J.E. Coligan, *Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets*. Journal of Biological Chemistry, 1978. **253**(23): p. 8609-8616.
91. Bornstein, P., *Thrombospondins: structure and regulation of expression*. Faseb j, 1992. **6**(14): p. 3290-9.
92. Raugi, G.J., et al., *Thrombospondin: synthesis and secretion by cells in culture*. J Cell Biol, 1982. **95**(1): p. 351-4.
93. Phan, S.H., et al., *Stimulation of fibroblast proliferation by thrombospondin*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **163**(1): p. 56-63.
94. Raugi, G.J., J.E. Olerud, and A.M. Gown, *Thrombospondin in early human wound tissue*. J Invest Dermatol, 1987. **89**(6): p. 551-4.
95. Schultz-Cherry, S. and J.E. Murphy-Ullrich, *Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism*. The Journal of cell biology, 1993. **122**(4): p. 923-932.
96. Schultz-Cherry, S., et al., *Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7304-10.

97. Schultz-Cherry, S., et al., *Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor-beta in a chemically defined system.* J Biol Chem, 1994. **269**(43): p. 26775-82.
98. Ribeiro, S.M., et al., *The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta.* J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 13586-93.
99. Young, G.D. and J.E. Murphy-Ullrich, *Molecular interactions that confer latency to transforming growth factor-beta.* J Biol Chem, 2004. **279**(36): p. 38032-9.
100. El-Youssef, M., et al., *Increased Expression of Transforming Growth Factor-β1 and Thrombospondin-1 in Congenital Hepatic Fibrosis: Possible Role of the Hepatic Stellate Cell.* Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 1999. **28**(4): p. 386-392.
101. Kondou, H., et al., *A blocking peptide for transforming growth factor-β1 activation prevents hepatic fibrosis in vivo.* Journal of hepatology, 2003. **39**(5): p. 742-748.
102. Yamashita, T., et al., *Glycyrrhizin ameliorates fibrosis, vasculopathy, and inflammation in animal models of systemic sclerosis.* Journal of Investigative Dermatology, 2017. **137**(3): p. 631-640.
103. Ruoslahti, E., *Integrins.* J Clin Invest, 1991. **87**(1): p. 1-5.
104. Pierschbacher, M.D. and E. Ruoslahti, *Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule.* Nature, 1984. **309**(5963): p. 30-33.
105. Maeda, T., et al., *A novel cell adhesive protein engineered by insertion of the Arg-Gly-Asp-Ser tetrapeptide.* J Biol Chem, 1989. **264**(26): p. 15165-8.
106. Munger, J.S., et al., *Interactions between growth factors and integrins: latent forms of transforming growth factor-beta are ligands for the integrin alphavbeta1.* Mol Biol Cell, 1998. **9**(9): p. 2627-38.
107. Margadant, C. and A. Sonnenberg, *Integrin–TGF-β crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing.* EMBO reports, 2010. **11**(2): p. 97-105.
108. Wipff, P.J., et al., *Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix.* J Cell Biol, 2007. **179**(6): p. 1311-23.
109. Annes, J.P., et al., *Integrin αVβ6-mediated activation of latent TGF-β requires the latent TGF-β binding protein-1.* The Journal of cell biology, 2004. **165**(5): p. 723-734.
110. Munger, J.S., et al., *The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis.* Cell, 1999. **96**(3): p. 319-28.
111. Yang, Z., et al., *Absence of integrin-mediated TGFbeta1 activation in vivo recapitulates the phenotype of TGFbeta1-null mice.* The Journal of cell biology, 2007. **176**(6): p. 787-793.
112. Sheppard, D., et al., *Transforming growth factor beta differentially regulates expression of integrin subunits in guinea pig airway epithelial cells.* J Biol Chem, 1992. **267**(24): p. 17409-14.
113. Breuss, J., et al., *Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling.* Journal of cell science, 1995. **108**(6): p. 2241-2251.
114. Häkkinen, L., et al., *Increased expression of beta6-integrin in skin leads to spontaneous development of chronic wounds.* Am J Pathol, 2004. **164**(1): p. 229-42.
115. Patsenker, E., et al., *Inhibition of integrin alphavbeta6 on cholangiocytes blocks transforming growth factor-beta activation and retards biliary fibrosis progression.* Gastroenterology, 2008. **135**(2): p. 660-70.
116. Matsui, Y., et al., *Increased expression of αv integrin as a regulator of fibrosis in Dupuytren's nodules.* J Hand Surg Eur Vol, 2017. **42**(1): p. 18-25.
117. Matrisian, L.M., *Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling.* Trends in Genetics, 1990. **6**: p. 121-125.
118. Massova, I., et al., *Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification.* The FASEB Journal, 1998. **12**(12): p. 1075-1095.
119. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.* Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 562-73.
120. Allan, J.A., et al., *Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components.* Biochem J, 1995. **309 (Pt 1)**(Pt 1): p. 299-306.
121. Nagase, H., Y. Itoh, and S. Binner, *Interaction of α2-Macroglobulin with Matrix Metalloproteinases and Its Use for Identification of Their Active Forms a.* Annals of the New York Academy of Sciences, 1994. **732**(1): p. 294-302.
122. Ulrich, D., K. Hrynyschyn, and N. Pallua, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in sera and tissue of patients with Dupuytren's disease.* Plast Reconstr Surg, 2003. **112**(5): p. 1279-86.
123. Yu, Q. and I. Stamenkovic, *Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis.* Genes Dev, 2000. **14**(2): p. 163-76.
124. Mu, D., et al., *The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1.* J Cell Biol, 2002. **157**(3): p. 493-507.
125. Jenkins, G., *The role of proteases in transforming growth factor-beta activation.* Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1068-78.

126. Kincade, P.W., et al., *The importance of cellular environment to function of the CD44 matrix receptor*. Current opinion in cell biology, 1997. **9**(5): p. 635-642.
127. Aruffo, A., et al., *CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate.* Cell, 1990. **61**(7): p. 1303-1313.
128. Sy, M.S., Y.-J. Guo, and I. Stamenkovic, *Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo.* The Journal of experimental medicine, 1991. **174**(4): p. 859-866.
129. Yu, Q., B.P. Toole, and I. Stamenkovic, *Induction of apoptosis of metastatic mammary carcinoma cells in vivo by disruption of tumor cell surface CD44 function.* Journal of Experimental Medicine, 1997. **186**(12): p. 1985-1996.
130. Webb, D.S., et al., *LFA-3, CD44, and CD45: physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release.* Science, 1990. **249**(4974): p. 1295-7.
131. Acharya, P.S., et al., *Fibroblast migration is mediated by CD44-dependent TGFβ activation.* Journal of Cell Science, 2008. **121**(9): p. 1393-1402.
132. Raum, D., et al., *Synthesis of Human Plasminogen by the Liver*. Science, 1980. **208**(4447): p. 1036-1037.
133. Cesarman-Maus, G. and K.A. Hajjar, *Molecular mechanisms of fibrinolysis.* British journal of haematology, 2005. **129**(3): p. 307-321.
134. Collen, D., *The plasminogen (fibrinolytic) system.* Thrombosis and haemostasis, 1999. **82**(08): p. 259-270.
135. Andreasen, P.A., et al., *The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review*. International journal of cancer, 1997. **72**(1): p. 1-22.
136. Collen, D., *On the regulation and control of fibrinolysis.* Thrombosis and haemostasis, 1980. **43**(02): p. 077-089.
137. Ellis, V., N. Behrendt, and K. Danø, *Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(19): p. 12752-12758.
138. Ellis, V., et al., *Inhibition of receptor-bound urokinase by plasminogen-activator inhibitors.* Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(17): p. 9904-9908.
139. Lyons, R.M., J. Keski-Oja, and H.L. Moses, *Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium.* J Cell Biol, 1988. **106**(5): p. 1659-65.
140. Sato, Y., et al., *Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system*. The Journal of cell biology, 1990. **111**(2): p. 757-763.
141. Swaisgood, C.M., et al., *The Development of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice Deficient for Components of the Fibrinolytic System.* The American Journal of Pathology, 2000. **157**(1): p. 177-187.
142. Ghosh, A.K. and D.E. Vaughan, *PAI-1 in tissue fibrosis.* Journal of cellular physiology, 2012. **227**(2): p. 493-507.
143. Merlo, G., et al., *Fibrin/fibrinogen and fibrinolytic activity of the palmar fascia in Dupuytren's contracture.* The Journal of Hand Surgery: British & European Volume, 1986. **11**(1): p. 55-57.
144. Razani, B., et al., *Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6727-38.
145. Wang, X.M., et al., *Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis.* J Exp Med, 2006. **203**(13): p. 2895-906.
146. Del Galdo, F., et al., *Decreased expression of caveolin 1 in patients with systemic sclerosis: crucial role in the pathogenesis of tissue fibrosis.* Arthritis Rheum, 2008. **58**(9): p. 2854-65.
147. Drab, M., et al., *Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice.* Science, 2001. **293**(5539): p. 2449-52.
148. Desmoulière, A., et al., *Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts.* Journal of Cell Biology, 1993. **122**(1): p. 103-111.
149. Badalamente, M.A., et al., *The role of transforming growth factor beta in Dupuytren's disease.* J Hand Surg Am, 1996. **21**(2): p. 210-5.
150. Hinz, B., et al., *Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity*. Molecular Biology of the Cell, 2001. **12**(9): p. 2730-2741.
151. Vaughan, M.B., E.W. Howard, and J.J. Tomasek, *Transforming Growth Factor-β1 Promotes the Morphological and Functional Differentiation of the Myofibroblast*. Experimental Cell Research, 2000. **257**(1): p. 180-189.
152. Bisson, M., et al., *The different characteristics of Dupuytren's disease fibroblasts derived from either nodule or cord: expression of α-smooth muscle actin and the response to stimulation by TGF-β1.* Journal of Hand Surgery, 2003. **28**(4): p. 351-356.
153. Wong, M. and V. Mudera, *Feedback inhibition of high TGF-β1 concentrations on myofibroblast induction and contraction by Dupuytren's fibroblasts.* Journal of Hand Surgery, 2006. **31**(5): p. 473-483.
154. Hutchinson, J., et al., *Dupuytren's disease and frozen shoulder induced by treatment with a matrix metalloproteinase inhibitor*. The Journal of bone and joint surgery. British volume, 1998. **80**(5): p. 907-908.
155. Johnston, P., et al., *A complete expression profile of matrix-degrading metalloproteinases in Dupuytren's disease*. The Journal of hand surgery, 2007. **32**(3): p. 343-351.

156. Qian, A., et al., *Comparison of gene expression profiles between Peyronie's disease and Dupuytren's contracture.* Urology, 2004. **64**(2): p. 399-404.
157. Ulrich, D., et al., *Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in cords and nodules of patients with Dupuytren's disease.* Archives of orthopaedic and trauma surgery, 2009. **129**(11): p. 1453-1459.
158. Ratajczak-Wielgomas, K., et al., *Expression of MMP-2, TIMP-2, TGF-β1, and decorin in Dupuytren's contracture.* Connective tissue research, 2012. **53**(6): p. 469-477.
159. Wang, Y., et al., *TGF-β1 promoted MMP-2 mediated wound healing of anterior cruciate ligament fibroblasts through NF-κB.* Connective Tissue Research, 2011. **52**(3): p. 218-225.
160. Mirastschijski, U., et al., *Matrix metalloproteinase inhibitor GM 6001 attenuates keratinocyte migration, contraction and myofibroblast formation in skin wounds.* Experimental cell research, 2004. **299**(2): p. 465-475.
161. Daniels, J.T., et al., *Matrix metalloproteinase inhibition modulates fibroblast-mediated matrix contraction and collagen production in vitro.* Investigative ophthalmology & visual science, 2003. **44**(3): p. 1104-1110.
162. Wilkinson, J.M., et al., *MMP-14 and MMP-2 are key metalloproteases in Dupuytren's disease fibroblast-mediated contraction.* Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(6): p. 897-905.
163. Townley, W.A., et al., *The role of an MMP inhibitor in the regulation of mechanical tension by Dupuytren's disease fibroblasts.* Journal of Hand Surgery (European Volume), 2009. **34**(6): p. 783-787.
164. Hindocha, S., et al., *Characterization of stem cells in Dupuytren's disease.* British Journal of Surgery, 2010. **98**(2): p. 308-315.
165. Huang, X., et al., *Matrix stiffness-induced myofibroblast differentiation is mediated by intrinsic mechanotransduction.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2012. **47**(3): p. 340-8.
166. Venkatraman, L., et al., *Plasmin triggers a switch-like decrease in thrombospondin-dependent activation of TGF-β1.* Biophys J, 2012. **103**(5): p. 1060-8.
167. Porsch, H., et al., *Platelet-derived growth factor β-receptor, transforming growth factor β type I receptor, and CD44 protein modulate each other's signaling and stability.* J Biol Chem, 2014. **289**(28): p. 19747-57.
168. Adams, J.C. and J. Lawler, *The thrombospondins.* Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2011. **3**(10): p. a009712.
169. Bianchi, E., et al., *Involvement of pro-inflammatory cytokines and growth factors in the pathogenesis of Dupuytren's contracture: a novel target for a possible future therapeutic strategy?* Clin Sci (Lond), 2015. **129**(8): p. 711-20.
170. Holzer, L.A., et al., *Expression of VEGF, its receptors, and HIF-1α in Dupuytren's disease.* Acta Orthopaedica, 2013. **84**(4): p. 420-425.
171. Agah, A., et al., *The lack of thrombospondin-1 (TSP1) dictates the course of wound healing in double-TSP1/TSP2-null mice.* The American journal of pathology, 2002. **161**(3): p. 831-839.
172. GRAINGER, D.J. and E.K. FROW, *Thrombospondin 1 does not activate transforming growth factor β1 in a chemically defined system or in smooth-muscle-cell cultures.* Biochemical Journal, 2000. **350**(1): p. 291-298.
173. Jenkins, G., *The role of proteases in transforming growth factor-β activation.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2008. **40**(6): p. 1068-1078.
174. Henderson, N.C. and D. Sheppard, *Integrin-mediated regulation of TGFβ in fibrosis.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2013. **1832**(7): p. 891-896.
175. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.* cell, 2002. **110**(6): p. 673-687.
176. Puthawala, K., et al., *Inhibition of integrin αvβ6, an activator of latent transforming growth factor-β, prevents radiation-induced lung fibrosis.* American journal of respiratory and critical care medicine, 2008. **177**(1): p. 82-90.
177. Verrecchia, F. and A. Mauviel, *Control of connective tissue gene expression by TGFβ: role of Smad proteins in fibrosis.* Current rheumatology reports, 2002. **4**(2): p. 143-149.
178. Ghosh, A.K. and D.E. Vaughan, *PAI-1 in tissue fibrosis.* J Cell Physiol, 2012. **227**(2): p. 493-507.
179. Wei, J., et al., *PPARγ downregulation by TGFß in fibroblast and impaired expression and function in systemic sclerosis: a novel mechanism for progressive fibrogenesis.* PloS one, 2010. **5**(11): p. e13778.
180. Razani, B., et al., *Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-β/SMAD signaling through an interaction with the TGF-β type I receptor.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(9): p. 6727-6738.
181. Di Guglielmo, G.M., et al., *Distinct endocytic pathways regulate TGF-β receptor signalling and turnover.* Nature cell biology, 2003. **5**(5): p. 410-421.
182. Lin, X., et al., *Caveolin-1 gene therapy inhibits inflammasome activation to protect from bleomycin-induced pulmonary fibrosis.* Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 19643.
183. Sanders, Y.Y., et al., *SMAD-independent down-regulation of caveolin-1 by TGF-β: effects on proliferation and survival of myofibroblasts.* PloS one, 2015. **10**(2): p. e0116995.
184. Igarashi, J., et al., *Transforming growth factor-β1 downregulates caveolin-1 expression and enhances sphingosine 1-phosphate signaling in cultured vascular endothelial cells.* American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2009. **297**(5): p. C1263-C1274.

185. Horowitz, J.C., et al., *Activation of the pro-survival phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway by transforming growth factor-β1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(2): p. 1359-1367.
186. Zhang, G.Y., et al., *Role of caveolin-1 in the pathogenesis of tissue fibrosis by keloid-derived fibroblasts in vitro*. British Journal of Dermatology, 2011. **164**(3): p. 623-627.
187. Wang, Z., et al., *Caveolin-1 mediates chemoresistance in breast cancer stem cells via β-catenin/ABCG2 signaling pathway*. Carcinogenesis, 2014. **35**(10): p. 2346-2356.
188. Galdo, F.D., et al., *Decreased expression of caveolin 1 in patients with systemic sclerosis: crucial role in the pathogenesis of tissue fibrosis*. Arthritis & Rheumatism, 2008. **58**(9): p. 2854-2865.
189. Jaekel, C., et al., *Illuminating the effect of beneficial blue light and ROS-modulating enzymes in Dupuytren's disease*. PLoS One, 2021. **16**(7): p. e0253777.
190. Shull, M.M., et al., *Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-β1 gene results in multifocal inflammatory disease*. Nature, 1992. **359**(6397): p. 693-699.
191. Bergen, S.v., *Association of antihypertensive medication and severity of Dupuytren's disease*. 2021.