

Aus der Orthopädischen Universitätsklinik  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

*Identifizierung der biochemischen Prozesse der Schultersteife*

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Elisabeth Rimkus  
aus Magdeburg  
Magdeburg 2023

### Bibliographische Beschreibung:

Rimkus, Elisabeth:

Identifizierung der biochemischen Prozesse der Schultersteife

Magdeburg - 2023. - 59 Bl., 11 Abb., 13 Tab., 1 Anl.

### Kurzreferat

Die Schultersteife wird klinisch unterteilt in eine idiopathische primäre Form und eine posttraumatische sekundäre Form, welche beide durch entzündliche fibrotische Veränderungen des Schultergewebes entstehen. Bei Patienten/-innen mit postoperativen Arthrofibrosen des Knies wurde ein erhöhtes Vorkommen des Enzyms Xylosyltransferase (XT) nachgewiesen und es ist eine übermäßige Aktivität der Lysyloxidase (LOX) in fibrotischem Gewebe bekannt. Der Einfluss beider Enzyme auf die Schultersteife wurde nach heutigem Kenntnisstand noch nicht im Detail untersucht. Insgesamt wurden 92 Patienten/-innen in die Studie einbezogen und nach entsprechenden Kriterien in drei Gruppen (primäre und sekundäre Schultersteife und Kontrollen) eingeteilt. Immunhistologisch ließ sich ein erhöhtes Auftreten von XT-1 in der primären Schultersteife darstellen, sowie eine gesteigerte Sulfatierung der Proteoglykane. Letztere können in Zusammenhang mit der ebenfalls vermehrten Expression der Sulfatierungsenzyme HS6ST1 und HS2ST1 in der primären Schultersteife gebracht werden. Eine Erhöhung der LOX-Aktivität und der Expression konnte in der primären Schultersteife gefunden werden. Ebenso ergab die Studie ein erhöhtes Vorkommen von Diabetes mellitus (Dm) für die sekundäre Schultersteife. Die Ergebnisse entstanden jeweils durch den Vergleich der drei Gruppen untereinander. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass XT und LOX eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Schultersteife einnehmen. Schlussfolgernd ist die Anwendung von LOX-Inhibitoren in der primären Schultersteife anhand der gezeigten LOX-Aktivitätswerte theoretisch denkbar und bietet Ansätze für weitere Forschungsstudien.

### **Schlüsselwörter**

Adhesive Capsulitis, Schulter, Lox, Proteoglycan, Kollagen, Xylosyltransferase1, Diabetes

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einführung.....</b>	<b>1</b>
1 . 1 Das Schultergelenk.....	1
1 . 1 . 1 Pathologien der Schulter.....	2
1 . 2 Die Schultersteife (auch: Frozen shoulder/Adhäsive Kapsulitis) .....	4
1 . 2 . 1 Primäre Schultersteife (auch: Frozen shoulder) .....	5
1 . 2 . 2 Sekundäre Schultersteife.....	7
1 . 2 . 3 Diagnostik .....	7
1 . 2 . 4 Therapie und Risikofaktoren .....	8
1 . 2 . 5 Korrelation der Schultersteife mit Diabetes.....	9
1 . 3 Xylosyltransferase .....	10
1 . 3 . 1 Proteoglykane und Glykosaminoglykane.....	12
1 . 3 . 2 XT-1 .....	14
1 . 3 . 3 XT-2 .....	16
1 . 4 Lysyloxidase .....	16
1 . 5 Ziel der wissenschaftlichen Arbeit .....	17
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
2 . 1 Material .....	19
2 . 1 . 1 Reagenzien und Verdünnungen .....	19
2 . 1 . 2 Geräte .....	20
2 . 1 . 3 Kits.....	22
2 . 1 . 4 Primer .....	22
2 . 1 . 5 Antikörper .....	23
2 . 1 . 6 Isotyp-Kontrollen.....	24
2 . 2 Methoden.....	25
2 . 2 . 1 Gewebesammlung.....	25
2 . 2 . 1 . a <i>Probandenauswahl</i> .....	25
2 . 2 . 1 . b <i>Gewebegewinnung</i> .....	26
2 . 2 . 2 Datenerhebung .....	27
2 . 2 . 3 Histologie .....	27
2 . 2 . 3 . a <i>Paraffin-Einbettung</i> .....	27
2 . 2 . 3 . b <i>Paraffinlösung und Demaskierung</i> .....	27
2 . 2 . 3 . c <i>Immunfluoreszenzfärbung</i> .....	28
2 . 2 . 3 . d <i>Heparinase-Vorbehandlung für Immunfärbung</i> .....	29
2 . 2 . 3 . e <i>Alcian-PAS-Färbung</i> .....	29

2 . 2 . 4	Molekularbiologie .....	30
2 . 2 . 4 . a	<i>RNA-Extraktion</i> .....	30
2 . 2 . 4 . b	<i>cDNA-Synthese und quantitative real-time PCR</i> .....	31
2 . 2 . 4 . c	<i>Gel-Elektrophorese zur Überprüfung der Primer-Funktionalität</i> .....	32
2 . 2 . 5	Proteinbestimmung .....	33
2 . 2 . 5 . a	<i>Gewebepräparation und Proteinextraktion</i> .....	33
2 . 2 . 5 . b	<i>Proteinmengenbestimmung</i> .....	33
2 . 2 . 5 . c	<i>Bestimmung der LOX-Aktivität</i> .....	33
2 . 2 . 6	Statistische Analyse .....	34
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
3 . 1	Statistische Auswertung der Anamnesedaten .....	35
3 . 2	Sowohl die XT-1 Expression, als auch die Sulfatierung der GAG ist erhöht bei der primären Schultersteife .....	39
3 . 3	Erhöhte Sulfatierungen der GAG könnten auf eine erhöhte Expression von HS6ST1 und HS2ST1 zurückzuführen sein. ....	41
3 . 4	Die Bindung und Aktivität von LOX .....	43
3 . 4 . 1	LOX wird vermehrt in der primären Schultersteife exprimiert und zeigt eine gesteigerte Aktivität. ....	43
3 . 4 . 2	LOX bindet vermehrt an sulfatierte GAG-Ketten in der primären Schultersteife. ....	45
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>46</b>
4 . 1	Welchen Einfluss besitzen Ätiologie und Epidemiologie auf die Entwicklung und Prognose der Schultersteife? .....	47
4 . 1 . 1	Epidemiologie der Schultersteife .....	47
4 . 1 . 2	Risikofaktoren der Schultersteife .....	48
4 . 1 . 3	Die sekundäre Schultersteife zeigt eine Koinzidenz von Diabetes .....	48
4 . 1 . 4	Kontroverser Einsatz der Behandlungsoptionen .....	50
4 . 2	XT-Expression – ein möglicher Biomarker für Arthrofibrose in der Schulter .....	51
4 . 2 . 1	Die Xylosyltransferase wirkt profibrotisch auf die Schultersteife .....	51
4 . 2 . 2	Die Gene XYLT1 und XYLT2 sind nicht vermehrt exprimiert bei der Schultersteife .....	53
4 . 2 . 3	Glykosaminoglykane sind gehäuft in der Schultersteife .....	53
4 . 2 . 4	HS2ST1 und HS6ST2 sulfatieren die GAGs in der Schultersteife .....	54
4 . 3	LOX-Aktivität und Expression in der Schultersteife gesteigert – LOX-Inhibitor als mögliche Therapie .....	55
4 . 4	Limitationen der Studie .....	58

<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>59</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>60</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
<b>Danksagungen .....</b>	<b>68</b>
<b>Ehrenerklärung .....</b>	<b>69</b>
<b>Darstellung des Bildungsweges .....</b>	<b>70</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>71</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AC	Adhäsive Kapsulitis
Ac	Acetyl
ANOVA	Analysis of variance
BCA	Bicinchinonsäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CS	Chondroitinsulfat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
D-GalNAc	N-Acetyl-D-Galaktosamin
D-GlcA	D-Glucuronsäure
D-GlcNAc	N-Acetyl-D-Glukosamin
Dm	Diabetes mellitus
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
dT	Desoxythymin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
GAG	Glykosylaminoglykane
Gal	Galaktose
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GlcA	Glucuronsäure
HBA1C	Hämoglobin-A1c-Werte
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HS	Heparansulfat
IgG	Immunglobulin G
kDA	Kildodalton
LBS	Lange Bizepssehne
LOX	Lysyloxidase
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	Messenger RNA

MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
N	Anzahl
NSAID	Nicht steroidale Antiphlogistika
PAS	Periodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
ROM	Range of Motion
RT	Raumtemperatur
RTM	Rotatorenmanschette
SD	Standardabweichung
SE	Stoffwechselerkrankung
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SLAP	Superiores Labrum von Anterior nach Superior
ST	Sulfotransferase
TAE	Tris-acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEP	Totalendoprothese
TGF-beta	Transforming growth factor beta
TNF-alpha	Tumor necrosis factor alpha
U/min	Umdrehung pro Minute
UDP	Uridinphosphat
XT	Xylosyltransferase
Xyl	Xylose

# 1. E I N F Ü H R U N G

## 1.1 Das Schultergelenk

Etwa 70 % der Patienten/-innen, die eine allgemeinmedizinische Praxis aufsuchen, leiden im Laufe ihres Lebens an Schulterschmerzen, welche zu starken Einschränkungen im täglichen Leben führen können [1]. Wir Menschen nutzen unsere Schulter zum Heben, Zeigen, Ziehen, Drücken, Halten und zeitweise schlafen wir darauf. Schulterschmerzen können bei verschiedenen Krankheitsbildern auftreten und mindestens ebenso facettenreich zur Minderung der Lebensqualität beitragen. Sie erzeugen Bewegungseinschränkungen, die in Hilfsbedürftigkeit und Verlust der Selbstständigkeit enden können und ebenso die Arbeitsfähigkeit der erkrankten Person massiv beeinträchtigen. Zudem wird davon berichtet, dass die persistierenden Schmerzen schwere Schlafstörungen hervorrufen [2]. Entstehende Schonhaltungen und wenig Bewegung bewirken vorübergehend oder in drastischen Fällen chronische Gelenkkontrakturen. Aufgrund dieser potentiellen Gefahr, ist die Erforschung der Pathologien des Schultergelenks von großem Interesse.

Jedoch bietet dieses Gelenk durch seine hohe Funktionalität auch eine größere Angriffsfläche für Verletzungen. Das Schultergelenk zeichnet sich durch einen hohen Bewegungsumfang (range of motion: ROM) und übermäßige Flexibilität aus, weist aber im Gegenzug knöcherne Stabilitätsdefizite auf, welche wiederum durch die umgebenden Ligamente und Muskeln ausgeglichen werden [3]. Der Oberarmkopf (Teil des Humerus) artikuliert mit der relativ kleinen Gelenkfläche (Glenoid) als Teil des Schulterblattes (Scapula) und wird Glenohumeralgelenk benannt. Es ist ähnlich wie das Hüftgelenk ein Kugelgelenk und obendrein das beweglichste Kugelgelenk des gesamten menschlichen Körpers. Die Rotatorenmanschette, eine Gruppe von Muskeln, die das Gelenk umschließen, fixieren den Oberarmknochen am Torso und bewegen ihn in alle Richtungen. Das Gelenk verfügt so über drei Freiheitsgrade mit sechs daraus resultierenden Bewegungsrichtungen: Anteversion und Retroversion, Abduktion und Adduktion, Innen- und Außenrotation.

Die Gelenkpfanne am Schulterblatt ist im Vergleich zu dem gelenkigen Kugelkopf des Oberarmknochens klein, was das Bewegungsausmaß des Gelenks maximiert. Die hohe Beweglichkeit ist außerdem dem Fehlen straffer Bänder geschuldet und führt zu



einer Anfälligkeit für traumatische Ereignisse, Dislokationen und entzündliche Erkrankungen, wie zum Beispiel der Schultersteife (Frozen shoulder).

Die drei Schulterbänder, das Ligamentum coracohumerale, das Ligamentum coracoglenoidale und das Ligamentum glenohumeralia, straffen die Kapsel, welche verhältnismäßig viel Raum um das Gelenk herum einnimmt. Die Kapsel verfügt über einen kaudalen Reserveteil, den Recessus axillaris, der bei entspannter Adduktionsstellung schlaff herabhängt und im Falle der Elevation durch seine Entfaltung mehr Bewegungsraum bietet. Die Gesamtheit der Kompartimente im Zusammenspiel ermöglicht eine aktive Abduktionsbewegung von bis zu 180 Grad. Die einzige Begrenzung für die Abduktion ist das Akromion, ein knöcherner Teil des Schulterblatts. Es bildet ein Dach über dem Glenohumeralgelenk und beschränkt so die passive Abduktionsbewegung auf 90 Grad. Durch die Drehung des Schulterblattes beim Heben des Armes, kann diese Einschränkung umgangen und der Arm über die 90 Grad hinaus angehoben und schlussendlich die sogenannte Elevation ausgeführt werden.

Da wir die Schulter für alltägliche Bewegungen brauchen und auf ihre uneingeschränkte Funktion angewiesen sind, ist ein Bewegungsverlust im Schultergelenk für Patienten/innen ausgesprochen unangenehm und bedarf effektiver Therapiestrategien sowie einer schnellen Genesung.

#### 1 . 1 . 1 Pathologien der Schulter

Das Schultergelenk verfügt über einen hohen Grad an Flexibilität und ein großes Bewegungsausmaß, was es anfällig für traumatische Verletzungen und degenerative Prozesse macht. Häufig sind Menschen, die viel Über-Kopf-Arbeiten durchführen oder in ihrer Freizeit Sportarten, wie Volleyball oder Handball betreiben, von Schulterproblemen betroffen.

Eine häufig anzutreffende Verletzung der Schulter ist die Luxation. Der Mechanismus der Verletzung ist in den meisten Fällen ein Sturz auf den ausgestreckten Arm. In 95 % der Fälle verlässt der Oberarmkopf die Schulterpfanne nach vorne. Dabei treten ein Funktionsverlust, eine tastbare Delle über dem Deltoideus und starke Schmerzen auf. Nach Ausschluss einer Fraktur durch Röntgenaufnahmen muss der Oberarmkopf

mithilfe eines speziellen Manövers manuell wieder in die Gelenkpfanne eingebracht werden. Die Schulterluxation hat jedoch eine hohe Rezidivrate [4, 5].

Im Gegensatz zur Luxation sind Frakturen des Oberarmknochens seltener vorzufinden. Sie treten vermehrt als pathologische Frakturen infolge von Osteoporose und Tumoren auf. Am häufigsten ist die proximale Humerusfraktur, welche auch das Risiko einer Nervus-axillaris-Läsion und einer Gefäßschädigung birgt [6].

Ebenso bei den häufig auftretenden Verletzungen des Schultergelenks zu nennen sind Rotatorenmanschettenrupturen und Tendinopathien. Diese Pathologien können, besonders bei jungen Sportlern/-innen, eine traumatische Ursache haben oder eine Form der Überlastung darstellen. Letzteres wird durch chronische Entzündungen im Gelenk verursacht.

Das Hauptsymptom, unabhängig von der Ätiologie, ist der Bewegungsschmerz [7]. Die spezifischen Symptome hängen von der Lokalisation der Schädigung ab. Vorwiegend ist der Musculus supraspinatus betroffen. Die Verletzung des Muskels führt zu einer schmerzhaft eingeschränkten Abduktionsfähigkeit des Armes. Als Standarddiagnostik wird die Magnetresonanztomographie (MRT) genutzt, um Verletzungen der Rotatorenmanschette nachzuweisen. Anschließend wird eine operative Rekonstruktion in erster Linie bei akuten Verletzungen und jungen Patienten/-innen durchgeführt. Durch eine Verengung unterhalb des Schulterdaches, das sogenannte Impingementsyndrom, kommt es häufig zu reizungsbedingten schmerzhaften Entzündungen der Bursa subacromialis sowie der Sehne des Musculus supraspinatus. Dieses Syndrom bezeichnet definitionsgemäß Schmerzen aufgrund einer "Einklemmung von Sehnenmaterial oder Weichteilen im Gelenk durch Verengung des subacromialen Raumes" [8]. Das diagnostische Zeichen ist der „schmerzhafte Bogen“, eine Limitierung der Humerusabduktion zwischen 60° und 120°. Ein Grund für die Verengung des subakromialen Raumes kann vielseitiger Natur sein. Häufig ist ein nach kaudal ragender Knochensporn des Akromions die Ursache. Neben dem Impingementsyndrom gibt es weitere Pathologien, welche die Integrität des Schultergelenks stören und die Rotatorenmanschette reizen können.

Ein weiteres Beispiel ist die Kalkschulter, Tendinitis calcarea. Erwachsene zwischen 30 und 50 Jahren sind häufiger betroffen und klagen über schmerzhafte Bewegungseinschränkungen sowie Entzündungssymptome (Schwellung, Rötung, Überwärmung). In den meisten Fällen ist eine Operation nicht notwendig da die Verkalkung selbstlimitierend ist und der Heilungsprozess durch eine ausreichende

Analgesie und extrakorporale Stoßwellentherapie zusätzlich gefördert werden kann. Weniger non-invasive Verfahren werden dagegen bei der Therapie der häufig bei Patienten/-innen in höherem Alter auftretenden Omarthrose angewendet.

Bei der Arthrose handelt es sich um einen Knorpelverlust, der durch eine langfristige Belastung des Gelenks oder durch gelenkschädigende Verletzungen wie Luxationen und Gelenkfehlstellungen entstehen kann. Nahezu alle Gelenke des menschlichen Körpers können eine Arthrose entwickeln. Die Hauptrisikofaktoren sind ein hohes Alter, familiäre Veranlagung und rheumatische Erkrankungen. Patienten/-innen mit Omarthrose leiden unter Schulterschmerzen und Beweglichkeitseinschränkungen. Ein Röntgenbild ist zielführend für die Diagnose und die endgültige Therapie ist der teilweise oder vollständige Gelenkersatz mithilfe einer Schultergelenksendoprothese. Der Ursprung und die auslösenden Faktoren der Arthrose sind hinreichend und ausführlich untersucht und bekannt.

Im Gegenzug dazu ist bis dato verhältnismäßig wenig über die Pathophysiologie und Risikofaktoren der ebenfalls gehäuft auftretenden Schultersteife eindeutig nachgewiesen worden. Sie wird auch als adhäsive Kapsulitis bezeichnet, jedoch wird diese Namensgebung zunehmend kritisch betrachtet. Stattdessen wird vermehrt der englische Begriff Frozen shoulder in Publikationen und im klinischen Alltag verwendet, vorwiegend für die Bezeichnung der primären Schultersteife.

## **1 . 2        Die Schultersteife (auch: Frozen shoulder/Adhäsive Kapsulitis)**

Die Schultersteife wurde lange als aktive und passive Bewegungseinschränkung des Glenohumeralgelenks beschrieben, ohne die genaue Ursache zu kennen [9, 10].

S.-E. Duplay erwähnte im 19. Jahrhundert erstmals klinische Fälle von Bewegungseinschränkungen und Schmerzen unbekannter Ursache im Schultergelenk. Er nannte diese rätselhafte Symptomkonstellation Periarthritis [11]. Nevaiser et al. änderten die Bezeichnung in adhäsive Kapsulitis und bezogen sich dabei auf die typische Kontraktion der Kapsel [12].

Mittlerweile wissen wir jedoch, dass keine Verklebung im Sinne von Adhäsionen im inneren des Gelenks stattfindet. Vielmehr ist es wohl eine Vermehrung von Bindegewebe, die zu einer Steifigkeit führt. Daher wird der Begriff der adhäsiven Kapsulitis vermehrt kritisch gesehen und stattdessen „frozen shoulder“ als Bezeichnung für dieses Krankheitsbild bevorzugt. Die Patienten/-innen zeigen eine fortschreitende Fibrose der Schulterkapsel und eine chronische Entzündung, gefolgt

von einer Kapselkontraktur, die zu einem steifen Gelenk führt [13]. Die entzündungsbedingte Neovaskularisation und Verdickung der Kapsel ist im arthroskopischen Befund der Schultersteife sichtbar (siehe Abbildung 1 B).

Lundberg et al. teilten die Schultersteife primär in zwei Gruppen mit unterschiedlicher Ätiologie ein [14]. Sie definierten eine primäre Schultersteife mit unbekannter Ursache und eine sekundäre Schultersteife, die durch eine traumatische Läsion verursacht wird.

Weitere Studien zeigen, dass die Mehrzahl der erkrankten Personen weiblich sind, sowohl in der Gruppe der primären als auch der sekundären Schultersteife. Zudem tritt die Erkrankung unabhängig von der Ätiologie gehäuft im Alter zwischen 40 und 60 Jahren auf [9, 15].

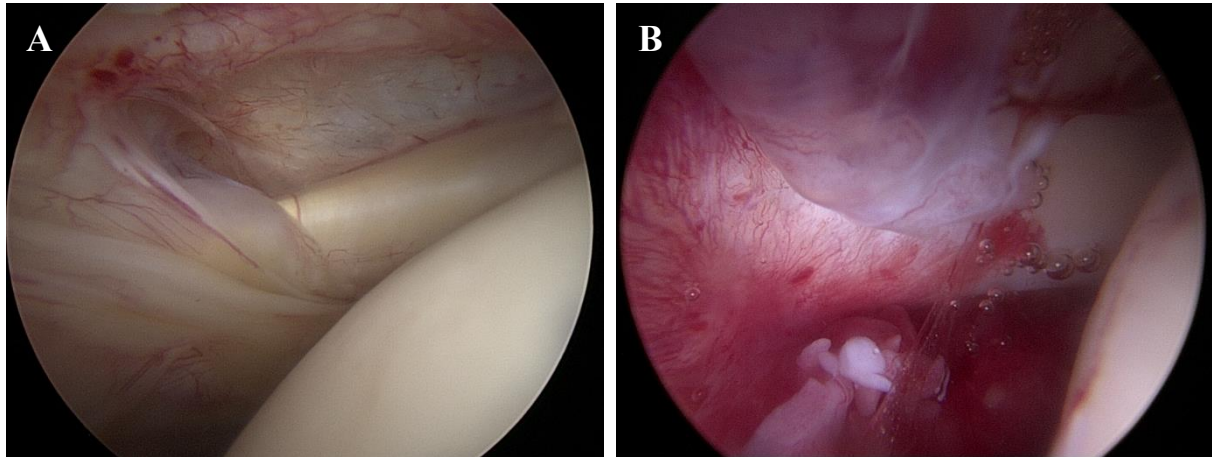
Die Inzidenz der primären Schultersteife liegt in der Weltbevölkerung bei etwa 3-5 % [9, 16]. Die primäre Form ist in den meisten Fällen selbstlimitierend mit einer variablen Dauer von einem Monat bis zu mehr als 3 Jahren [10, 12, 17]. Einzelne Studien berichten von Fällen, bei denen die Bewegungseinschränkung auch über 3 Jahre hinaus bestehen geblieben ist und schlussendlich nur operativ behoben werden konnte [18, 19].

#### 1 . 2 . 1 Primäre Schultersteife (auch: Frozen shoulder)

Die primäre Schultersteife lässt sich durch drei aufeinanderfolgende charakteristische Stadien beschreiben. Zunächst erfolgt das "Einfrieren" (10-36 Wochen, gekennzeichnet durch Schmerzen in Ruhe und in der Nacht, zunehmende Einschränkung der Schulterbeweglichkeit). Daraufhin beginnt das "Frozen"-Stadium (4-12 Monate), welches durch eine maximale Bewegungseinschränkung gekennzeichnet ist. Zuletzt kommt die Wiederherstellung des physiologischen Zustands in der "Auftau-Phase" (5-12 Monate, Schmerz verschwindet, zunehmende Beweglichkeit) [20].

Bis heute hat die Zuordnung von Lundberg et al. mit ausgearbeiteten Ergänzungen Bestand und wird in der Praxis bei der Entscheidungsfindung zwischen verschiedenen Therapieoptionen genutzt [14]. Pathophysiologisch ist bisher bekannt, dass sich im Schultergewebe in der ersten Phase der Erkrankung eine synoviale Entzündungsreaktion, begleitet von Neoangiogenese und Neoinnervation, ausbreitet [21]. Die inflammatorischen Prozesse führen zu einer progredienten Fibrosierung der Gelenkkapsel, was dem „Frozen“-Stadium mit zunehmender

Bewegungseinschränkung entspricht. Beispielhaft sind in Abbildung 1 intraoperative Bildbefunde des Schultergelenks in physiologischem Zustand und während der Entzündungsreaktion dargestellt.



**Abbildung 1: Intraoperative Befunde des Schultergelenks physiologisch vs. pathologisch**

- (A) physiologischer Zustand des Schultergelenks ohne Entzündungszeichen
- (B) Schultersteife mit deutlichen Anzeichen einer entzündlichen Synovitis mit starker Neoangiogenese und beginnender Fibrosierung

Der genaue auslösende Faktor der Inflammation im Schultergelenk bei der primären Schultersteife ist bislang nicht im Detail bekannt.

Die primäre Schultersteife tritt spontan auf, ohne jegliche traumatische Einwirkung oder Vorgeschichte, und wird vorwiegend konservativ behandelt. Bisher ist die gängigste Methode zur Kuration neben der suprascapulären Nervenblockade die physikalische Therapie und parallele Einnahme von NSAIDs oder Steroiden [14].

Ziel dieser konservativen Therapie ist es, die Symptome zu lindern und die Auflösung der Kontraktur aktiv zu fördern. Eine chirurgische Behandlung der primären Schultersteife wird nur in seltenen Fällen, z.B. bei Therapieresistenz, praktiziert [22]. Operationsindikation wären eine rezidivierende Fibrose oder ein allgemeines Behandlungsversagen aller konservativen Methoden. Eine vollständige Rehabilitation der primären Schultersteife kann nicht beim gesamten Patientenkollektiv erreicht werden, da in Einzelfällen der Bewegungsumfang dauerhaft eingeschränkt bleibt [17–19].

### 1 . 2 . 2      Sekundäre Schultersteife

Die sekundäre Schultersteife ist definiert als posttraumatische Schultersteife nach Prellungen, Luxationen oder Frakturen [13]. Außerdem wurde die Schultersteife nach Schulteroperationen beobachtet, insbesondere nach Rekonstruktionen der Rotatorenmanschette und Operationen an den oberen Extremitäten. Auch die postoperative Ruhigstellung spielt eine Rolle bei der Entstehung der Schultersteife. Im Gegensatz zur primären Schultersteife ist die sekundäre Schultersteife nicht selbstlimitierend. Die typischen Stadien, die für die primäre Schultersteife beschrieben wurden, sind bei der sekundären Schultersteife weniger gut definierbar und überschneiden sich häufig. In diesen Fällen werden mobilisierende Behandlungen des Schultergelenks in Narkose oder chirurgische arthroskopische Kapselentlastungen sowie intraartikuläre Steroidinjektionen als therapeutische Ansätze eingesetzt [22]. Eine konservative Behandlung, z. B. Physiotherapie, Kühlpacks und Steroidinjektionen, ist auch bei der sekundären Schultersteife von Vorteil, vor allem in der Anfangsphase der Erkrankung [19].

### 1 . 2 . 3      Diagnostik

Es besteht nach wie vor Bedarf an einem standardisierten, eindeutigen diagnostischen Management, vor allem der primären Schultersteife. Eine unkomplizierte Kasuistik, welche frühzeitig und suffizient auf die konservative Therapie anspricht, ist hierbei nicht gemeint. Vielmehr benötigen Patienten/-innen mit einem längeren Leidensweg und therapieresistenter primärer Schultersteife geeignete alternative Therapiestrategien und diagnostische Prognosemarker. Die aktuell praktizierte Diagnostik basiert auf der Anamnese und der körperlichen Untersuchung. Darüber hinaus gibt es keine allgemeingültigen Laborparameter oder Ähnliches, welche diagnostisch und prognostisch Abhilfe schaffen und dem Therapieentscheid hilfreich sein könnten.

Die Einschränkung der aktiven und passiven ROM im Vergleich zur gesunden Gegenseite ist obligat für die Diagnose. Patienten/-innen mit Schultersteife zeigen in der Untersuchung des passiven Bewegungsausmaßes eine geminderte Abduktions- und Elevationsbewegung sowie eine übermäßig limitierte Außenrotation.

Des Weiteren ist zu beachten, dass der Schmerz die Beweglichkeit des Gelenks zusätzlich einschränken kann. Erkrankte Personen berichten sowohl von starken Belastungs-, als auch Ruheschmerzen. Röntgenaufnahmen des steifen

Schultergelenks zeigen nur geringfügig und unspezifisch pathologische Veränderungen [23]. Dennoch ist die radiologische Darstellung des Gelenks zur Diagnostik notwendig, um Differentialdiagnosen auszuschließen. Als solche kommen Arthritis, Frakturen oder Knochentumore in Frage. Diesem Prinzip folgend ist die MRT ebenso hilfreich, um Läsionen im Weichteilgewebe des Glenohumeralgelenks, die ähnliche klinische Symptome wie die Schultersteife aufweisen, zu erkennen.

In neueren Studien wurden bei Patienten/-innen mit einer Schultersteife in den MRT-Aufnahmen pathologische Verdickungen der Rotatorenmanschette (RTM), sowie der inferioren Gelenkkapsel festgestellt. Auch Hyperintensitäten (T2-Wichtung) und ein Kontrastmittelenhancement der Gelenkkapsel waren auffällig [24]. Aktuell ist die Spezifität dieses Befundes in Bezug auf die Erkrankung nicht ausreichend [23, 25].

#### 1 . 2 . 4 Therapie und Risikofaktoren

Derzeit sind die therapeutischen Ergebnisse der Schultersteife in unkomplizierten Fällen der primären Schultersteife zwar zufriedenstellend, jedoch ist das Wissen über die Pathophysiologie und die biochemischen Hintergründe dieser Krankheit nach wie vor unzureichend [15, 26, 27].

Die heute angewandten Behandlungen sind hauptsächlich auf Schmerzlinderung und Wiederherstellung der Mobilität ausgerichtet. Konservative Strategien sind die erste Wahl bei der Behandlung der primären Schultersteife, wobei die Wirksamkeit divergent ist. Bei anhaltenden Schmerz- und Steifheitssymptomen ist eine Injektion von intraartikulären Steroiden aufgrund der entzündungshemmenden Wirkung sinnvoll und oftmals hilfreich. Eine suprascapuläre Nervenblockade oder die Hydrodilataion können alternativ oder ergänzend eingesetzt werden, um die Beweglichkeit zu verbessern. Die Erfolge sind auch bei diesen Therapiemethoden unterschiedlich.

Eine weitere Option stellt die arthroskopische Kapselspaltung dar. Sie wird nach Versagen der konservativen Behandlung in Erwägung gezogen.

Rangan et al. führten einen Vergleich von Physiotherapie, Manipulation unter Anästhesie und Arthrolyse durch. Die Studie zeigte eine ausreichende Wirksamkeit der Behandlungen, wobei jedoch alle angewandten Maßnahmen zueinander äquivalente Ergebnisse erzielten [28]. In einer ergänzenden Publikation wurden Physiotherapie, Steroidinjektionen, lokale Kühlung und eine Nativ-Gruppe verglichen. Hier stellten sich die Ergebnisse analog zu Rangan et al. dar [19].

Bei der Auswahl geeigneter Therapiemethoden mithilfe der genannten Studienergebnisse ist zu beachten, dass ein Großteil der Investigationen ausschließlich die idiopathische primäre Schultersteife betrachtet [15, 26, 28].

Nach allgemeiner Auffassung und aufgrund der Exkludierung der sekundären Schultersteife in der Erforschung der Behandlungsmaßnahmen erfordert die sekundäre Schultersteife eine individuelle Therapie in Abhängigkeit von der ätiologisch zugrundeliegenden Erkrankung. Eine operative Rekonstruktion ist bei einer traumatisch bedingten Schultersteife erforderlich, weshalb konservative Maßnahmen im praktischen Alltag hier häufig nicht durchgeführt werden.

Zur Prävention der Schultersteife gibt es viele Untersuchungen, die sich auf die bekannten Risikofaktoren konzentrieren. Es wird vermutet, dass ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Schultersteife und verschiedenen Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus (Dm), Schilddrüsendysfunktionen, Dyslipidämie, arterieller Bluthochdruck, Autoimmunerkrankungen und Myokardinfarkten besteht [29–31].

Die pathophysiologischen Mechanismen für diese Koexistenz sind nach wie vor Bestandteil von Studien und Hypothesen. Es ist lediglich erwiesen, dass Patienten/-innen mit Diabetes schlechter auf eine konservative Behandlung ansprechen und häufiger Rezidive entwickeln als Nicht-Diabetiker/-innen [32–36].

#### 1 . 2 . 5 Korrelation der Schultersteife mit Diabetes

Zahlreiche Studien beschreiben Diabetes mellitus als Hauptrisikofaktor für die Entstehung des fibrotischen Umbaus in der Schulter. Bridgman et al. stellten 1996 fest, dass 10,3 % bis 22,4 % der Diabetiker/-innen an einer primären Schultersteife leiden [37]. In seiner Studie zeigten nur 2,3 % der nicht-diabetischen Proband/-innen Symptome einer Schultersteife.

Konarski et al. veröffentlichten eine Übersicht, in der Diabetes mellitus als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer sekundären Schultersteife genannt wird [38]. Darüber hinaus kann sich Diabetes negativ auf die Therapieergebnisse der konservativen Methoden auswirken.

Diese Hypothese bestätigten Griggs et al. in einer Studie in der Patienten/-innen mit primärer Schultersteife und Diabetes mellitus ein schlechteres Outcome als Patienten/-innen ohne diese Stoffwechselstörung zeigten [36]. Der molekulare Hintergrund des Einflusses von Diabetes auf die Schultersteife ist noch unklar.



Eine Hypothese ist, dass hohe Blutzuckerwerte durch die vermehrte Glykosylierung von Proteinen und Lipiden die Anreicherung der extrazellulären Matrix (EZM) induzieren [39]. Des Weiteren führt die diabetische Erkrankung zu einem Anstieg entzündlicher Zytokine, was die Fibrose im Weichteilgewebe und die Narbenbildung vermutlich auch in der Schulterkapsel auslösen könnte [39, 40]. Ergänzend dazu sind hohe Hämoglobin-A1c-Werte (HBA1C), sowie unkontrollierte Glukosespiegel nachweislich mit einem gesteigerten Auftreten der primären Schultersteife assoziiert [35, 41].

Eine Herausforderung für das therapeutische Management ist hierbei, dass die primäre Schultersteife bei Diabetikern/-innen, wie bereits erwähnt, vergleichsweise weniger suffizient auf die Behandlung anspricht [32–36]. Aufgrund der schlechteren Prognose, der Therapieresistenz und der individuelleren Behandlungsmodalitäten der Schultersteife in Zusammenhang mit Diabetes mellitus, wird bereits seit einiger Zeit diskutiert, diese Patienten/-innen der Gruppe der sekundären Schultersteife zuzuordnen [42, 43]. Ein allgemeiner Konsens ist bisher jedoch nicht gefunden worden. Zusammenfassend ist zu sagen, dass Diabetes mellitus einen großen Einfluss auf die Entstehung sowohl der primären als auch der sekundären Schultersteife zu haben scheint. Schlussfolgernd ist es für die Erforschung der Pathophysiologie der Erkrankung unerlässlich, die Mechanismen der Glykosylierung von Proteinen zu betrachten und in weitere Überlegungen einfließen zu lassen.

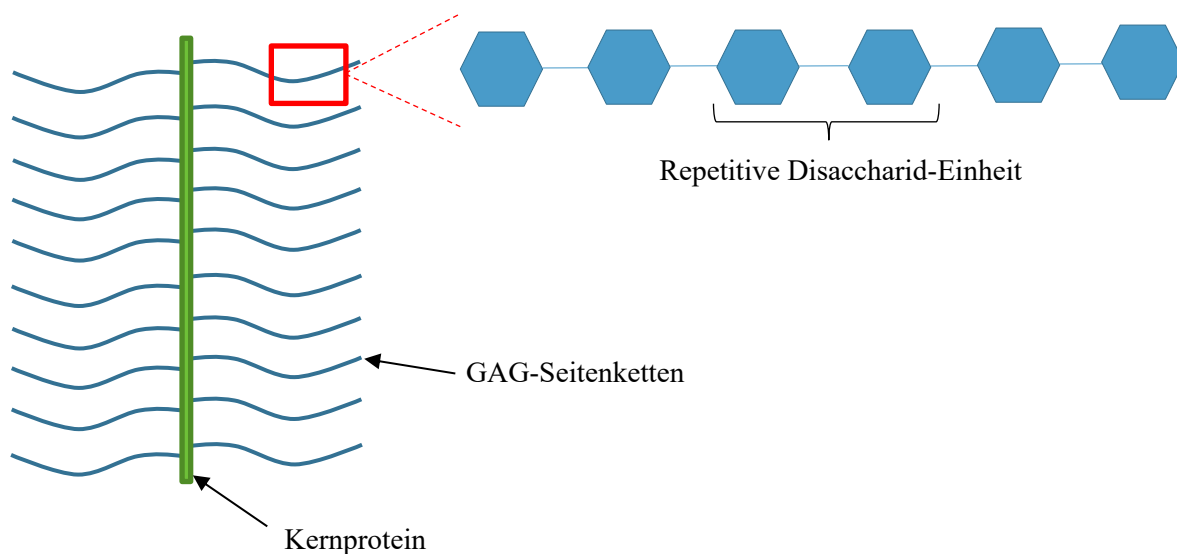
### **1.3 Xylosyltransferase**

Man weiß bereits, dass fibrotische Vorgänge, wie sie bei der Schultersteife zu finden sind, auf einer Vermehrung der EZM basieren. Getriggert durch Wachstumsfaktoren wie TGF-beta und Entzündungsmediatoren, wie Interleukin und TNF-alpha, kommt es im betroffenen Gewebe zu einer Steigerung der Fibroblasten [21]. Diese Fibroblasten wiederum differenzieren sich zu aktiven Myofibroblasten, welche zum einen profibrotische Enzyme, zum Beispiel die Xylosyltransferase (XT), ausschütten und zum anderen Fasergewebe in Form von Kollagenen produzieren [21, 44]. Die Kollagene wiederum bestehen hauptsächlich aus Glykosaminoglykanen (GAG),

welche aneinandergereiht an Proteine gebunden werden und sogenannte Proteoglykane mit unterschiedlichen Eigenschaften und Funktionen bilden.

Verschiedene Zuckerketten lagern sich an die Proteoglykane an, um Bindungsstellen für Enzyme zu bieten und so Verlinkungen (Cross-links) unter den verschiedenen Proteoglykanen herstellen zu können.

Eine übermäßige Produktion dieser EZM und der Cross-links führt zur Fibrose, welche in Organen und Gelenken für Funktionseinschränkungen sorgt. Proteoglykane besitzen eine hohe Wasserbindungskapazität, wodurch sich das daraus bildende Gewebe wiederum durch Gleitfähigkeit und räumliche Ausdehnung auszeichnet.



## Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Proteoglykane

Proteoglykane bilden sich aus einem Kernprotein, an das sich über Serinreste Glykosaminoglykane anlagern. Diese, aus repetitiven Zuckermolekülen (Disaccharid-Einheiten) bestehenden Seitenketten, bilden Angriffspunkte für die Quervernetzung der Proteoglykane untereinander oder mit anderen Strukturen der EZM.

Aufgrund dieser Zusammenhänge wurde der Einfluss der Xylosyltransferase auf die Entwicklung von postoperativer Arthrofibrose im Kniegelenk untersucht.

Bisher sind das Enzym Xylosyltransferase-1 (XT-1) und dessen Isoform Xylosyltransferase-2 (XT-2) bekannt. Beide sind Teil der Biosynthese der Proteoglykane und übertragen aktivierte D-Xylose auf einen Serinrest eines

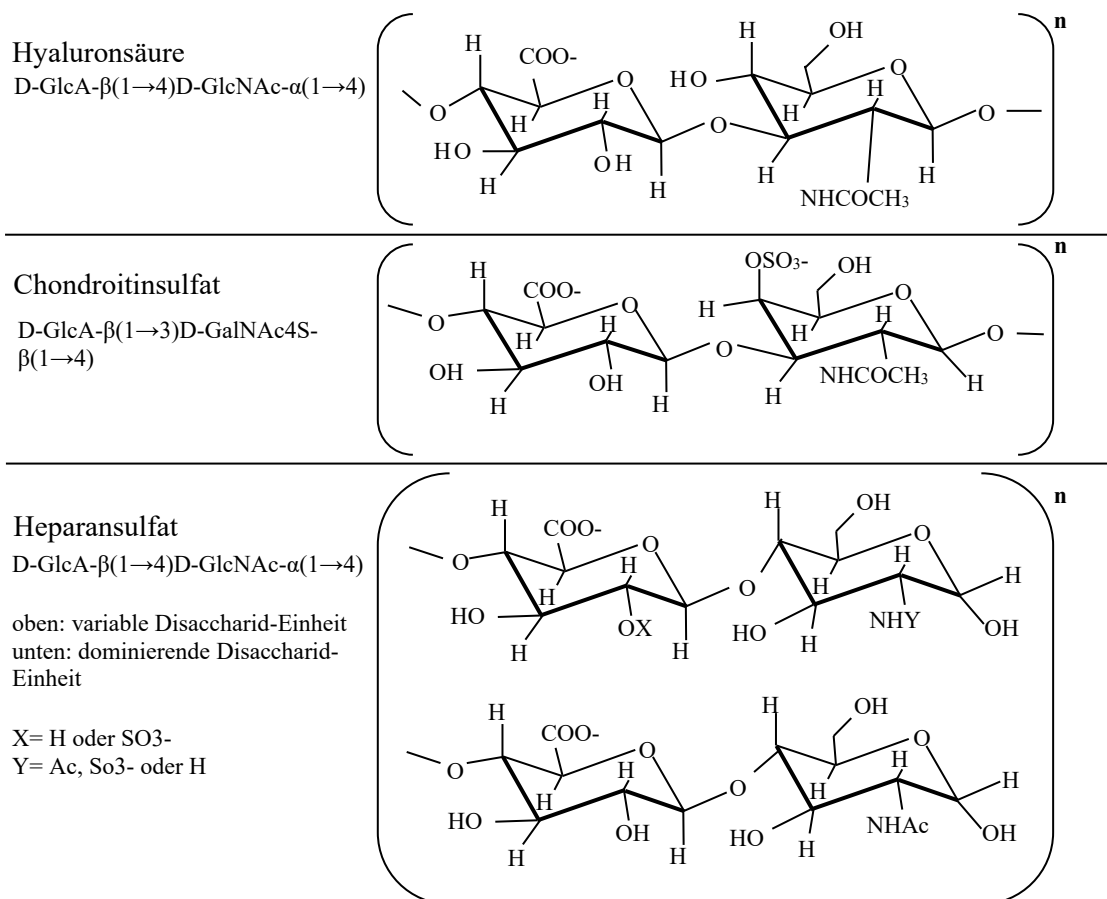
Kernproteins. XT-2 erfüllt diese Funktion jedoch nach aktuellem Kenntnisstand mit deutlich geringerer Aktivität. Die physiologische Funktion von XT-2 ist bisher unklar. Über XT-1 ist dagegen bereits bekannt, dass es eine Starterfunktion in der Biosynthese der Proteoglykane einnimmt und eine Mutation des Enzyms zu systemischer Sklerose und Fibrose führen kann. Schlussfolgernd daraus könnte XT-1 als Biomarker für die Gelenksteifigkeit (Arthrofibrose) genutzt werden.

Eine entsprechende Arbeit zu dem Thema wurde von Faust et al. 2015 veröffentlicht [45].

Das Enzym XT gehört zur Familie der Glykosyltransferasen. Seine hauptsächliche Funktion ist die Glykosylierung, die Übertragung eines aktivierten Zuckermoleküls (Glycosylrest) auf einen entsprechenden Akzeptor, z.B. ein Protein, ein Lipid oder einen Alkohol. Dabei reagiert die Halbacetal-Hydroxylgruppe des Zuckerrestes mit einer weiteren Hydroxyl- oder Stickstoffgruppe eines Kohlenhydrates oder mit anderen Reaktionspartnern (Alkohol, Phenolen, Lipiden, Proteinen). Durch diesen Vorgang können Eigenschaften des Akzeptors, wie die Wasserlöslichkeit, modifiziert werden. Dieser Transfer markiert den Beginn der Synthese von Oligosaccharidketten und ist ein entscheidender Schritt in der Bildung von GAG. Er kann sowohl als N-Glykosylierung im endoplasmatischen Retikulum ablaufen, als auch als O-Glykosylierung im Golgi-Apparat.

#### 1.3.1 Proteoglykane und Glykosaminoglykane

GAG enthalten eine sich wiederholende Disaccharid-Einheit, die anhand von Beispielen in Abbildung 3 dargestellt ist und teilweise durch Sulfatierung oder Carboxylierung modifiziert wird [46].



### Abbildung 3: Strukturformeln der GAG

(modifizierte Abbildung: Gandhi 2008 – *The structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins*) [47]

Hyaluronsäure setzt sich zusammen aus repetitiven Sequenzen von D-Glucuronsäure (D-GlcA) und N-Acetyl-D-Glukosamin (D-GlcNAc), die abwechselnd über eine 1→4- und 1→3-glykosidische Verknüpfung aneinander gebunden sind.

D-Glucuronsäure in Verbindung mit N-Acetyl-D-Galactosamin (D-GalNAc) bilden die Monomere des GAG Chondroitinsulfat. Diese Disaccharid-Einheiten sind teilweise sulfatiert (D-GalNAc4S).

Heparansulfat besteht aus repetitiven Einheiten von N-Acetyl-Glukosamin und Glucuronsäure im Wechsel mit der C5-epimeren Iduronsäure.

GAGs, die nach der Translation aus der Zelle transportiert werden, spielen eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung und dem Aufbau der EZM. Sie sorgen auch für die Zelladhäsion und induzieren die Zellproliferation [48]. Die wichtigsten GAGs sind Heparansulfat (HS), Chondroitinsulfat (CS), Hyaluronsäure und Keratansulfat. Ein Hauptbestandteil der EZM ist die Hyaluronsäure. Sie erhöht die Elastizität des menschlichen Gewebes, insbesondere im Knorpel, in der Synovialflüssigkeit und im Glaskörper des Auges. Dieses Polysaccharid wird durch Hyaluronan-Synthasen gebildet, welche Glucuronsäure und N-Acetylglycosamin an die wachsende Kette anlagern.

Wird die Aufreihung der GAG anschließend oder zu Beginn der Synthese an ein Protein gebunden, nennt man dies Proteoglykan. Bekannte Vertreter dieser Familie sind Kollagen und Aggrecan. Sie sind im Knorpelgewebe zu finden. Zudem sind sie gehäuft mit Keratansulfat oder Chondroitinsulfat verbunden, was die Wasserbindungskapazität des entsprechenden Gewebes verstärkt.

Diese Modifizierung mittels Bindung unterschiedlicher Faktoren an die GAG-Kette ist verantwortlich für die diversen Funktionen der Proteoglykane. Sie können so auf verschiedene zelluläre Prozesse Einfluss nehmen, wie zum Beispiel die Zellsignalisierung, die Zellproliferation, die Gewebemorphogenese und die Interaktion mit Wachstumsfaktoren.

Heparansulfat, zum Beispiel, ist an der Regulierung der Neovaskularisierung und der Zelladhäsion beteiligt. Eine Einheit aus N-Acetylglycosamin und Glucuronsäure, über einen Tetrasaccharid-Linker gebunden an ein Kernprotein, bildet das Enzym. Anschließend werden die Ketten durch Deacetylierung und N- oder O-Sulfatierung verändert [49].

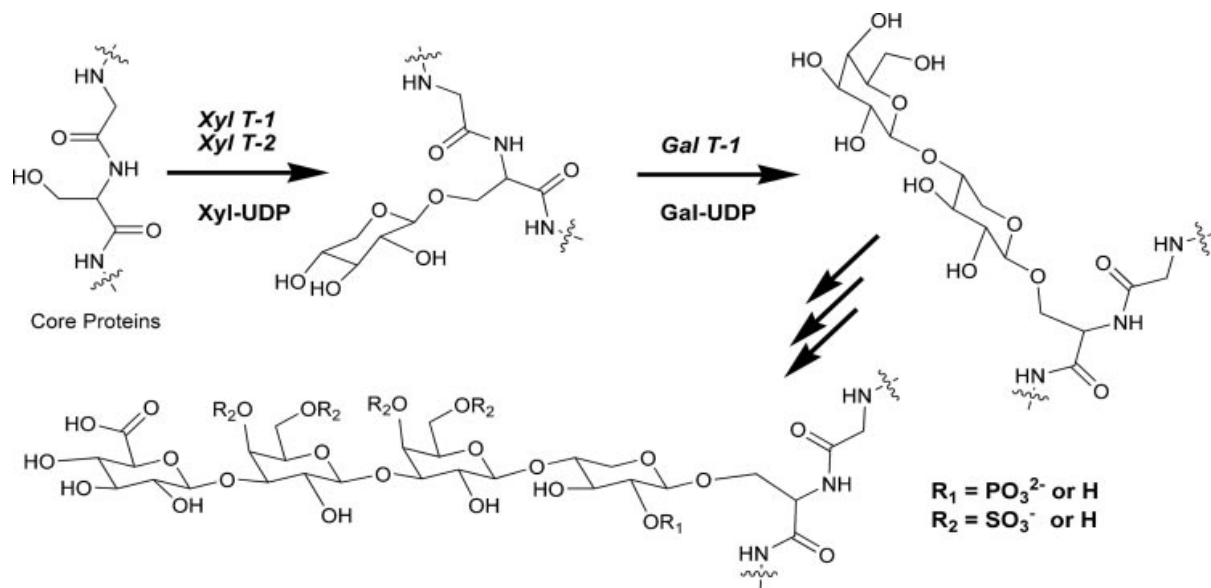
Der Ort der Biosynthese der Proteoglykane beginnt im Golgi-Apparat. Während sich die GAGs ausdehnen, wird ihr Kernprotein im rauen endoplasmatischen Retikulum gebildet. Eine Ausnahme ist die Hyaluronsäure. Hier findet die Synthese außerhalb der intrazellulären Kompartimente statt, da sie von integralen Membransynthasen ausgeführt wird [48].

### 1.3.2 XT-1

Die Xylosyltransferase ist ein Schlüsselenzym in der Biosynthese von Zuckerketten an Proteoglykanen. Transferasen übertragen molekulare Komponenten von einer Bindung auf die Nächste. Es existieren mehr als 450 gleichartige Enzyme [47].

In dieser Arbeit interessiert uns die Xylosyltransferase, da sie maßgeblich an der Biosynthese von Proteoglykanen beteiligt ist.

Die beiden Hauptvertreter sind XT-1 und XT-2. Erstere leitet den primären Schritt der Biosynthese von Heparansulfat und Chondroitinsulfat ein [48]. Das Enzym überträgt D-Xylose aus UDP-D-Xylose auf einen spezifischen Serinrest des Kernproteins des Proteoglykans und startet dadurch die Aneinanderreihung von GAG an das Kernprotein [48].



#### Abbildung 4: Funktionsweise der Xylosyltransferase

(Garud et al. 2008 - Inhibition of Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate Proteoglycan Biosynthesis) [50]

Die Xylosyltransferase überträgt die Xylose (Xyl) in aktivierter Form (UDP-Xylose) auf den Serinrest eines Proteins. Anschließend kann mit Xylose als Ausgangspunkt die Anlagerung weiterer Zuckermoleküle durch andere Transferasen, wie hier abgebildet die Galactosyltransferase (Gal T-1), fortgeführt werden. XT übernimmt auf diese Weise den Beginn der Biosynthese der GAG-Ketten.

In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung wurde die Pathogenese der Kniearthrofibrose mit der Aktivität der XT-1 in Verbindung gebracht und als hypothetischer diagnostischer Marker für Arthrofibrose und andere fibrotische Erkrankungen betrachtet [45, 51, 52].

XT-1 ist im menschlichen Körper ubiquitär vorhanden und hat eine wichtige Funktion beim Aufbau der EZM. Erhöhte Aktivitätswerte wurden bei fibrotischen Lebererkrankungen und systemischer Sklerose festgestellt [52, 53].

Gotting et al. stellten die Hypothese auf, dass XT-1 ein Marker für eine erhöhte Proteoglykanbiosynthese und schlussfolgernd fibrotische Prozesse sein könnte [52]. Bestätigen konnten sie die Annahme jedoch nicht. Bemerkenswert ist jedoch, dass die Studie zeigte, dass die Xylosyltransferase, die bisher nur als intrazelluläres Enzym nachgewiesen wurde, gleichzeitig mit Chondroitinsulfat in den Extrazellularraum sezerniert wird und dort aktiv bleibt [52].

Die erhöhte Expression von XT-1 kann im Blut von Patienten/-innen mit Sklerodermie nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu sind bei Polyarthrit nur erhöhte Spiegel von XT-1 in der Synovialflüssigkeit nachweisbar, jedoch nicht im Kreislauf [45, 54].

Ein diagnostischer Marker für Arthrofibrose könnte in weiteren Studien hilfreich sein, um alternative Behandlungen zu untersuchen und eine genauere Prognose des Krankheitsverlaufs zu geben.

### 1 . 3 . 3 XT-2

Neben XT-1, vermittelt auch XT-2 gleichartige Schritte in der Biosynthese der GAGs, aber mit einer geringeren physiologischen Bedeutung. Der Einfluss der XT-2 bei physiologischen Prozessen und der Arthrofibrose ist im Detail noch unklar [55, 56]. Die Existenz der beiden Isoformen ist einzigartig. Jede andere Glykosyltransferase, die an der Biosynthese von Proteoglykanen beteiligt ist, kommt mit nur einer Isoform aus [57]. Es wird vermutet, dass XT-2 ebenso wie XT-1 an der Biosynthese von Heparansulfat und Chondroitinsulfat beteiligt ist, allerdings von geringerer Bedeutung [55].

Der Hauptunterschied zwischen den beiden Enzymen scheint ihre Lokalisation zu sein. Beide werden in den extrazellulären Raum sezerniert [48, 55]. Dennoch ist nur XT-2 nachweislich für die Aktivitätswerte im Blutserum verantwortlich [57].

Darüber hinaus führt eine Inaktivierung des XYLT2-Gens zu zystischen Erkrankungen in mehreren Organen, die in Knock-out-Mäusen nachgewiesen werden konnten [58]. Insgesamt scheint XT-2 ubiquitär zu sein und ein Funktionsverlust des Enzyms mit einer system übergreifenden geringeren Synthese von Proteoglykanen einherzugehen. Darüber hinaus zeigen Variationen im XYLT2-Gen eine signifikante Korrelation mit der Ausprägung von Pseudoxanthoma elasticum, einer systemischen degenerativen Erkrankung des Bindegewebes [58].

XT-1 ist dagegen vor allem an der lokal unausgewogenen Biosynthese von GAGs beteiligt, z.B. Arthrofibrose [45, 59].

### 1 . 4 Lysyloxidase

Im Anschluss an die Synthese der GAGs folgt im extrazellulären Raum die posttranslationale Modifikation. An diesem Prozess ist die Lysyloxidase (LOX) beteiligt. LOX wird von Fibroblasten außerhalb der Zelle sezerniert. Es ist ein kupferhaltiges Enzym, das an der Biosynthese von Kollagen und Elastin beteiligt ist und unter anderem auf die embryonale Entwicklung verschiedener Organe Einfluss nimmt [60].

Ein pathologischer Funktionsverlust führt zur Entwicklung der Cutis Laxa, einer Bindegewebsstörung, die die Elastizität der Haut beeinträchtigt [61].

LOX oxidiert ein Peptidyl-Lysin in der Seitenkette des Kollagens zu einem Peptidyl-Aldehyd, das wirksamer in der Lage ist, Quervernetzungen einzugehen [62]. Die Widerstandsfähigkeit der EZM hängt von dieser oxidativen Desaminierung von Lysylresten ab, die von LOX in verschiedenen kollagen- und elastinhaltigen Geweben ausgeführt wird. Man vermutet, dass Kollagenfibrillen, die zu vernetzten Fasern geformt werden, resistenter gegen den von Metalloproteinasen durchgeführten Abbau sind [63].

Bislang sind vier Isoenzyme bekannt [54].

Die Regulierung von LOX über Signalwege ist umfassend untersucht worden. In Studien wurde ein Zusammenhang zwischen übermäßig hohen Werten bei Fibrose in Lunge, Niere und Leber, sowie einer höheren Aktivität bei entzündlichen Prozessen festgestellt [64].

Mitglieder der LOX-Familie sind extrazelluläre Enzyme, die die Vernetzung von strukturellen und stabilisierenden EZM-Komponenten in fibrotischen Geweben vermitteln [60, 65]. Die daraus resultierende EZM-Stabilisierung durch Vernetzung trägt zur Fibroseprogression bei und verzögert die Fibrolyse, z. B. durch den von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) induzierten proteolytischen Abbau [66]. Die Rolle von LOX in der Entstehung der Arthrofibrose in der Schulter wurde bisher nicht speziell untersucht.

## **1.5 Ziel der wissenschaftlichen Arbeit**

Das derzeitige Wissen über die molekularen Mechanismen der Schultersteife ist unzureichend und bleibt umstritten. In der klinischen Praxis gibt es verschiedene Behandlungsstrategien und keine Einigung über klare Indikationen für eine Operation oder Nicht-Operation. Von einem Verständnis der biochemischen Aspekte der Schultersteife versprechen wir uns Optionen für die Entwicklung alternativer Behandlungen und bessere diagnostische Parameter sowie eine genauere Prognose. Ziel der Dissertation ist es daher, die Rolle von XT-1 und LOX bei primärer und sekundärer Schultersteife unter Berücksichtigung relevanter Komorbiditäten wie Stoffwechselerkrankungen zu untersuchen.

Ausgehend von der Feststellung einer erhöhten Expression von Xylosyltransferase bei Kniearthrofibrose konzentrierten wir uns darauf, vergleichbare Ergebnisse bei der Schulterarthrofibrose zu ermitteln. Darüber hinaus haben wir ein übermäßiges



Vorkommen von GAG als Produkte der erhöhten XT-Aktivität, sowie eine verhältnismäßig erhöhte Sulfatierung der GAGs im Gewebe nachgewiesen.

Es ist erwiesen, dass Fibroblasten der vorherrschende Zelltyp des fibrotischen Gewebes sind und sie, wie bereits erwähnt, das Enzym LOX sezernieren.

In diesem Zusammenhang haben wir das Vorhandensein von LOX und dessen Aktivität in den Schultersteife-Proben getestet.

Nach positivem Ausgang dieser Untersuchungen war es notwendig, die Ergebnisse zu kombinieren und nachzuweisen, ob LOX vorzugsweise an modifizierte GAGs bindet, die im Gewebe der Schultersteife bewiesenermaßen vermehrt vorkommen.

Um die wissenschaftlichen Aussagen praxisrelevant zu gestalten, unterscheiden wir zwischen primärer und sekundärer Schultersteife und verglichen beide in allen Experimenten mit einer Kontrollgruppe.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

In den Experimenten wurden Chemikalien folgender Firmen verwendet: Sigma-Aldrich (München, Deutschland), AppliChem (Darmstadt, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland). Reaktionsbehälter verschiedener Größen wurden bei Eppendorf (Hamburg, Deutschland) gekauft.

Eine Auswahl an Pipetten, zugehörige Spitzen und sterile Filter wurden bei Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Sartorius (Göttingen, Deutschland) und Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) gekauft. 384-Well Reaktionsplatten wurden von Thermo Scientific (Waltham, USA) gekauft. Abweichende Hersteller und Produkte sind in nachfolgenden Tabellen detailliert aufgelistet.

#### 2.1.1 Reagenzien und Verdünnungen

Alle speziellen Reagenzien und Verdünnungen sind in der Tabelle 1 aufgelistet.

*Tabelle 1: Reagenzien und Verdünnungen*

<b>Reagenz</b>	<b>Lösungsverhältnis</b>	<b>Manufaktur</b>
0,5 % Periodsäure	1% Periodsäure in H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
1x PBS	gebrauchsfertig (#D8537)	Sigma Aldrich, München, Deutschland
4% PFA (pH 7.4)	10g PFA in 1000ml 1xPBS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	gebrauchsfertig (#A8963)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Alcian blue 8GX	1% Alcian blue in 0,1M HCl, pH 1.0	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Blocking Lösung	4% BSA in 1x TBS	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Citratpuffer pH 6	1:10 Verdünnung in Aqua dest.	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Citratpuffer pH 9	1:10 Verdünnung in Aqua dest.	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Dako Waschpuffer	gebrauchsfertig (#S3006)	Agilent Tech. Santa Clara, USA

DNA-Leiter 100bp	gebrauchsfertig (#N0467)	New England Biolabs, Ipswich, USA
Gel loading Farbstoff	gebrauchsfertig (#B7025S)	New England Biolabs, Ipswich, USA
HCL	gebrauchsfertig (#4625.1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Heparitinase Lösung	0,01 U Heparitinase in 20µl 01% BSA/H2O	Amsbio, Abingdon, USA
RNase-freies Wasser	gebrauchsfertig (#T143.4)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Mount Fluorcare DAPI	gebrauchsfertig (#HP20.1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schiff'sche Reagenz	gebrauchsfertig (#X900.1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SYBR Green PCR Master Mix	gebrauchsfertig (#4309155)	Applied Biosys., Foster City, USA
TAE Puffer	Doppelt-dest. Wasser 40 mM Tris (pH 7,6)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRizol lysis Reagenz	gebrauchsfertig (#15596018)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Trypsin/EDTA 10X	gebrauchsfertig (#L2153)	Biochrom, Berlin, Deutschland

## 2.1.2 Geräte

*Tabelle 2: Geräte*

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose gel imager Infinity-1000/26M	PeqLab, Erlangen, Deutschland
CO2 Inkubator, CB150	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Elektrophoresis cell, Wide Mini-Sub Cell-GT	Bio-Rad, Hercules, USA
Embedding Center Shandon HistoCentre 2	GMI, Ramsey, Minnesota, USA
Gefrierschrank (-80°C), HFU400TV	Thermo Scientific, Waltham
Gewebeinfiltrationsautomat TP1020	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Homogenisator, Precellys® 24	Bertin, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Inkubator ThermoMixer C	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Inverse microscope Axio Observer.Z1	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Microplate reader Infinite F200 Pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon, Tokio, Japan
Mikrotom Hyrax M55	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mixer RS-TR05	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
PerfectSpin Plate Spinner C1000-PEQ-230EU	PeqLab, Erlangen, Deutschland
QuantStudio 6 Flex	Applied Biosystems, Foster City, USA
Real-Time PCR Detection System ABI PRISM 7500	Applied Biosystems, Foster City, USA
Real-Time PCR Detection System ABI PRISM 7900HT	Applied Biosystems, Foster City, USA
Rotor Fa-45-30-11	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Sicherheitswerkbank KS18	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sicherheitswerkbank S2020 1.5	Thermo Scientific, Waltham, USA
Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen, Deutschland
sterile Tubes verschiedener Größen	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Thermocycler T100	Bio-Rad, Hercules, USA
Tubes verschiedener Größen	Eppendorf Hamburg, Deutschland
UV-Licht-Kammer Infinity-1000/26M	VWR, Erlangen, Deutschland
Vortex mixer G560E	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage A120 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Waage Kern EWB 620-2M	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad WBT 12	medingLab, Freital, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16R	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Mirko 200R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Sprout	Heathrow Scientific, Illinois, USA
Zentrifuge, Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifugenröhrchen	Falcon Tewksbury, Deutschland

### 2.1.3 Kits

Nachfolgend sind alle eingekauften Komplett-Sets in Tabelle 3 gelistet, die für die Experimente genutzt wurden. Alle Sets wurden entsprechend der Angaben des Herstellers eingesetzt.

*Tabelle 3: Verwendete Kits*

<b>Einsatzform</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Proteinbestimmung	BCA protein assay kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
Bestimmung Enzymaktivität	Lysyl Oxidase Activity Assay Kit (Fluorometric)	Abcam, Cambridge, Großbritannien
RNA Extraktion	Precellys Lysing kit	Bertin, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Reverse Transkription	High-Capacity cDNA RT Kit	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Reverse Transkription	First Strand cDNA synthesis Kit	Thermo Scientific, Langenselbold

### 2.1.4 Primer

Alle in dieser Studie verwendeten Primer wurden in einer Konzentration von 100µM gelöst und von Metabion (Martinsried, Planegg, Ger) bezogen und sind nachfolgend aufgelistet (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Humane Primer für die quantitative real-time PCR

Gene		Sequenz
XYLT1	vorwärts	GTCTACGATGAGCCTGACGG
	rückwärts	GGGTAGTATCGGCAGCTGTT
XYLT2	vorwärts	ACACAGATGACCCGCTTGTGG
	rückwärts	TTGGTGACCCGCAGGTTGTTG
	rückwärts	GTGGAAGTTCCTGGACGGTCT
HS3ST1	vorwärts	CCAGAACTTGCTCTACCCG
	rückwärts	TTTCAGGCCTTCAATTACTGAGC
HS2ST1	vorwärts	CTG TGG CCA TAG CTC CGA AT
	rückwärts	GAA AAA CCG GGG CAA TGC TG
HS6ST1	vorwärts	CTT GGC TCT TCT CCC GCT TC
	rückwärts	TCG GGG ATG AAG GAC AGG TT
LOX	vorwärts	GACATCTAGAGCCCGCGAA
	rückwärts	GGGAGACCGTACTGGAAGTAGC

#### 2.1.5 Antikörper

Alle für die Immunhistochemie verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgeführt. Sie wurden alle mit 4 % BSA verdünnt.

Tabelle 5: Primäre Antikörper

Antikörper	Typ	Verdünnung	Hersteller
XYLT-1	rabbit IgG	1:200	Abcam (ab197193)
XYLT-2	rabbit IgG	1:200	Biozol (GTX110376)
LOX	rabbit IgG	1:700	NovusBio (NB100-2527)

*Tabelle 6: Sekundäre Antikörper*

<b>Antikörper</b>	<b>Typ</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor® 555	anti-rabbit IgG	1:200	Thermo Scientific (A-31572)
Biotin	Goat pAb to Rabbit IgG	1:500	Abcam (Ab97049)
Streptavidin Alexa 555	HRP	1:400	Life Technologies (S32355)

#### 2.1.6 Isotyp-Kontrollen

Zur Kontrolle der unspezifischen Antikörperbindung wurden Isotyp-Kontrollen auf Gewebeschnitte aufgetragen und entsprechend der aufgeführten Protokolle behandelt.

*Tabelle 7: Isotyp-Kontrollen*

<b>Isotyp Kontrolle</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-rabbit IgG	für XT-1: 1:2000 für XT-2: 1:1000 für LOX: 1:5000	Thermo Scientific (QC215167)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Gewebesammlung**

#### **2.2.1.a Probandenauswahl**

Die Patienten/-innen stellten sich initial in der Schulterambulanz der Universitätsklinik Magdeburg vor und wurden auf klinische Anzeichen einer Schultersteife untersucht. Die Zuordnung in Subgruppen erfolgte anhand der Diagnosekriterien in drei verschiedene Kohorten: primäre Schultersteife, sekundäre Schultersteife und Kontrollgruppe. Patienten/-innen mit primärer oder sekundärer Schultersteife wurden bei gegebener Indikation arthroskopisch behandelt. Im Falle der Kontrollpatienten/-innen wurden die Operationen zum Teil auch offen durchgeführt. Zu den Indikationen zählten hier vorwiegend Verletzungen der RTM, degenerative Arthrose der Schulter oder Revisionseingriffe am Schultergelenk. Die Ergebnisse der klinischen Untersuchung hinsichtlich des Bewegungsumfanges, der Dauer der Beschwerden und der radiologischen Befunde wurden in einem präoperativen Vorgespräch erhoben und dokumentiert.

Wir schlossen 24 Patienten/-innen mit primärer Schultersteife und 21 Patienten/-innen mit sekundärer Schultersteife in unsere Betrachtung ein. 47 Patienten/-innen mit RTM-Verletzungen, Arthrose der Schulter und Revisionsoperationen von Endoprothesen wurden als Kontrollen hinzugezogen. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme wiesen die Patienten/-innen der Kontrollgruppe keine klinischen Symptome oder radiologischen Zeichen einer Schultersteife auf.

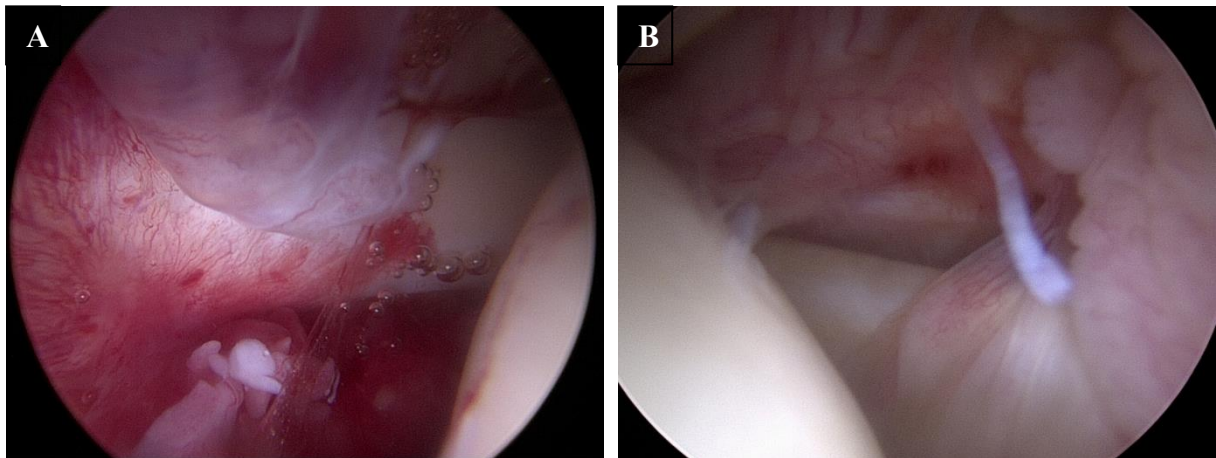
Die Schultersteife wurde nach folgendem Protokoll als primär oder sekundär eingestuft:

Schmerzhafte Steifigkeit ohne begleitende Läsionen des Schultergelenks und ohne nachweisbare Pathologien auf Röntgenbildern und MRT-Aufnahmen wurden als "primäre Schultersteife" definiert. Posttraumatische, postoperative Schultersteife, Läsionen im glenohumeralen oder subakromialen Gelenk und Risse der Rotatorenmanschette wurden als "sekundäre Schultersteife" definiert.

Die Krankheitsstadien wurden anhand des intraoperativen Erscheinungsbildes des Synovialgewebes mit einer stark entzündeten Synovialitis (Stadium 1) oder einem



fortgeschrittenen und fibrotischen Erscheinungsbild (Stadium 2) beurteilt. Die entsprechenden intraoperativen Befunde sind exemplarisch in Abbildung 5 zu sehen.



#### **Abbildung 5: Intraoperative Befunde der Schultersteife**

**(A)** Intraoperativer Befund des Synovialgewebes des Schultergelenks mit stark ausgeprägter Synovialitis. Sichtbar vermehrte Neoangiogenese, leicht verkleinerter Gelenkspalt, beginnende Fibrosierung (Stadium 1).

**(B)** Intraoperativer Befund des Synovialgewebes des Schultergelenks mit fibrotischem Erscheinungsbild. Leichte Neoangiogenese, verkleinerter Gelenkspalt, starke Fibrosierung (Stadium 2).

#### 2.2.1.b Gewebegewinnung

Gewebeproben des Synovialgewebes im Schultergelenk wurden während der studienunabhängigen chirurgischen Behandlung entnommen. Die Proben sind aus dem vorderen Teil des Schultergelenks und dem mittleren glenohumeralen Ligament entnommen worden. Neben dem Gewebe für die histologischen Analysen wurde Blut unmittelbar vor der Operation abgenommen und unverzüglich zentrifugiert, um das Serum zu sammeln. Alle Patienten/-innen gaben im Anschluss an ein ausführliches persönliches Aufklärungsgespräch ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie und erhielten ein entsprechendes Informationsblatt (siehe Anhang 2). Das Institutional Review Board der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Nr. 97/18, siehe Anhang 1) erteilte die ethische Genehmigung für diese Studie.

### 2 . 2 . 2 Datenerhebung

Die demografischen Daten der Patienten/-innen (z. B. Alter und Geschlecht) zum Zeitpunkt der Operation wurden erfasst. Ebenso wurden bereits diagnostizierte Stoffwechselerkrankungen (z. B. Diabetes mellitus, Hypothyreose, Myokardinfarkt, Hypolipoproteinämie und Parkinson-Krankheit) erfragt und dokumentiert. Im Zuge der präoperativen Aufnahme wurde die passive und aktive ROM beider Schultergelenke der Patienten/-innen bestimmt.

### 2 . 2 . 3 Histologie

#### 2 . 2 . 3 . a Paraffin-Einbettung

Die Proben wurden entnommen und in frisch zubereitetem 4 %-igem Paraformaldehyd (PFA) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) bei 4 °C für 24 h fixiert. Anschließend wurden sie mit einem Gewebeprozessor dehydriert und in Paraffin eingebettet. Die Schnitte (5µm) wurden am Mikrotom geschnitten und die beladenen Objektträger zur Vorbereitung der Färbung über Nacht bei 37° gelagert.

#### 2 . 2 . 3 . b Paraffinlösung und Demaskierung

Für die immunhistochemische Färbung muss das Paraffin aufgelöst und das Gewebe auf dem Objektträger rehydriert werden. Dafür wurden zunächst die Schnitte zweimal 10 Minuten lang in Xylol inkubiert. Die Hydratisierung erfolgte mit einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70% und 50% Ethanol) für jeweils 5 Minuten. Das entsprechende Protokoll ist in Tabelle 8 dargestellt.

Abschließend wurden die Objektträger gewaschen, um das Ethanol vollständig zu entfernen. Für die Waschung wurde destilliertes Wasser (für die Alcain-PAS-Färbung) oder 1x Waschpuffer (10x Waschpuffer (Dako), 1:10 in destilliertem H<sub>2</sub>O verdünnt) (für die Immunfluoreszenzfärbung) verwendet.

*Tabelle 8: Protokoll zur Entfernung des Paraffins und Rehydratation*

<b>Reagenz</b>	<b>Inkubationszeit in Minuten</b>
Xylol	10
Xylol	10
100% Ethanol	5
96% Ethanol	5
70% Ethanol	5
50% Ethanol	5
Dako Waschpuffer / Aqua dest.	5

### 2.2.3.c Immunfluoreszenzfärbung

Für die Darstellung des Antigens wurden Primärantikörper für XT-1, XT-2 und LOX verwendet. Die Gewebeschnitte wurden wie beschrieben vorbehandelt (siehe 2.2.3.b). Anschließend wurde für die XT-1- und XT-2-Färbung eine hitzeinduzierte Antigen-Demaskierung durchgeführt. Dazu wurden die Objektträger 25 Minuten lang bei 96°C mit Citratpuffer (für XT-1 Citrat pH9; für XT-2 Citrat pH6) bedeckt und danach zur Abkühlung 25 Minuten bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

Für die LOX-Färbung wurden die Schnitte mit Trypsin über 10 min bei 37°C behandelt, um Antigenbindungsstellen zu demaskieren.

Freie Epitope wurden mit 4% BSA in PBS für 1 h bei RT blockiert. Der spezifische Primärantikörper wurde auf die Schnitte aufgetragen und eine Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 min mit Waschpuffer gewaschen, um ungebundene Antikörperteile zu entfernen.

Abschließend wurden sie mit dem sekundären Antikörper, Alexa Fluor® 555, gefärbt. Die mit XT-2 gefärbten Schnitte wurden nach dem ersten Tag mit Biotin für 1 h bei RT markiert. Anschließend wurden die Objektträger für 1 h bei RT mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper, Streptavidin AL 555, gefärbt. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Aqua dest. und Waschpuffer für jeweils 5 min gewaschen und mit Roti®-Mount FluorCare DAPI fixiert.

Für jede Antikörperfärbung wurde eine IgG-Isotypkontrollfärbung durchgeführt, die als interne Kontrolle für die Antikörperspezifität diente. Bei der Zugabe von Sekundärantikörpern wurde jeder nachfolgende Schritt unter Lichtabschirmung durchgeführt, um die Fluoreszenzeigenschaften zu erhalten, und die Schnitte wurden bis zur Mikroskopie unter Lichtausschluss gelagert. Alle Färbungen wurden mit einem Zeiss Axio Observer Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung fotografiert.

Zur Analyse der Antigenexpression wurde der Prozentsatz der gefärbten (roten) Fläche gemessen.

#### 2.2.3.d Heparinase-Vorbehandlung für Immunfärbung

In den Gewebeproben wurden durch die Inkubation mit Heparinase Heparansulfatstrukturen aufgelöst. Um die Ergebnisse mit unbehandeltem Gewebe zu vergleichen, wurde eine LOX-Färbung durchgeführt. Zunächst wurden die Schnitte wie oben beschrieben entparaffiniert und rehydriert (siehe 2.2.3.b). Daraufhin wurden die Objektträger mit 100µl 0,5 mU Heparitinase pro Schnitt für 2 h bei 37°C vorab inkubiert. Die Immunfluoreszenzfärbung mit LOX wurde nach dem oben beschriebenen Protokoll für Immunfluoreszenz durchgeführt (siehe 2.2.3.c).

Von allen gefärbten Objektträgern wurden Bilder in 400-facher Vergrößerung mit einem Zeiss Axio Observer Mikroskop aufgenommen. Für die statistische Auswertung wurde der Prozentsatz der roten Fläche gemessen.

#### 2.2.3.e Alcian-PAS-Färbung

Für die Alcian-PAS-Färbung durchliefen die Schnitte ebenfalls die beschriebene Vorbereitung (siehe 2.2.3.b). Zur Untersuchung sulfatierter Glykoproteine wurden die Gewebeproben anschließend 3 min in 0,1 M HCl pH 1 gelagert und dann 30 min bei RT mit 1% Alcianblau 8GX gefärbt. Die PAS-Reaktion beinhaltet die Inkubation mit 0,5%iger Periodsäure für 5 Minuten. Danach wurde 15 Minuten lang Schiff'sches Reagenz zugegeben. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Schnitte mit Wasser gespült und in Aqua dest gewaschen.

Die gefärbten Schnitte wurden abschließend mit Kanadabalsam und einem Glasobjektträger abgedeckt, nachdem die Objektträger dreimal mit 96%igem Ethanol und zweimal mit 100%igem Xylol für jeweils 1 Minute rehydriert worden waren.

Von allen Färbungen wurden Bilder in 100facher Vergrößerung mit einem Zeiss Axio Observer Mikroskop aufgenommen. Für die statistische Auswertung wurde der Prozentsatz der gefärbten (blauen) Fläche gemessen.

#### 2 . 2 . 4      Molekularbiologie

##### 2 . 2 . 4 . a    RNA-Extraktion

Die Gesamt-RNA wurde mit dem TRIzol<sup>®</sup>-Lysereagenz aus dem Gewebe extrahiert, nachdem es mit dem Precellys<sup>®</sup> 24-Homogenisator aufgelöst worden war. Gemäß dem Herstellerprotokoll wurden kleine Gewebeteile in ein mit 1 ml TRIzol<sup>®</sup>-Lysereagenz gefülltes Precellys Lysing Kit gegeben und anschließend 2x20 Sekunden bei 6500 U/min inkubiert. Dieser Schritt wurde bis zur vollständigen Homogenität der Lösung wiederholt, und die Röhrcchen wurden zwischen den einzelnen Schritten auf Eis gestellt. Der Überstand wurde abgetrennt und erneut in TRIzol<sup>®</sup> Lysis Reagent für 5 Minuten bei RT inkubiert. Der so entstandene Überstand wurde abgetrennt und durch Zentrifugieren bei 12.000 U/min für 10 min geklärt.

Dann wurden 200 µl Chloroform in jedes den Überstand enthaltende Röhrcchen gegeben, die Lösung wurde gemischt und blieb 15 Minuten lang auf Eis. Jede folgende Zentrifugation wurde bei 4°C durchgeführt, um die RNA vor dem Verfall zu schützen. Die Röhrcchen wurden 15 Minuten lang bei 12.000 U/min zentrifugiert und anschließend mit der gleichen Menge eiskaltem Isopropanol versetzt. Die Lösung wird gemischt und 20 Minuten auf Eis gelagert, um einen RNA-haltigen Niederschlag zu erzeugen. Der resultierende Überstand wurde nach 40-minütigem Zentrifugieren der Lösung bei 20.000 U/min abgetrennt, wobei die komprimierte RNA im Röhrcchen verblieb. Nach Verflüssigung in 1ml 70%igem Ethanol und Zentrifugation bei 20.000 U/min für 10 min, sowie anschließender Entfernung des Überstandes, wurde das RNA-Pellet für 15 min bei RT getrocknet. Zur Lagerung und weiteren Verarbeitung wurde das getrocknete RNA-Pellet in RNase-freiem Wasser aufgelöst.

Mit dem Spektralphotometer Tecan Infinite R Pro200 (Tecan, Männedorf, Schweiz) konnten Konzentration und Qualität der isolierten RNA durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt werden.

## 2.2.4.b cDNA-Synthese und quantitative real-time PCR

Eine reverse Transkription der extrahierten Gesamt-RNA wurde mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit und dem First Strand cDNA Synthesis Kit unter Verwendung von oligo dT Primern durchgeführt. Zur Synthese von cDNA wurden 500 ng RNA in 10 µl RNase-freies Wasser gegeben und mit 10 µl Reverse Transkriptions-Mastermix (Tabelle 9) vermischt. Die gelöste RNA wurde mit dem vorliegenden Protokoll (Tabelle 10) im Thermocycler transkribiert.

*Tabelle 9: Reverse Transcription master mix*

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen pro Reaktion [µl]</b>
Reverse Transkriptase Puffer	2,0
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
10X Reverser Transkriptase Random Primers	2,0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0
RNase Inhibitor	1,0
RNase freies Wasser	3,2
Gesamt	10,0

*Tabelle 10: Protokoll Reverse Transkription*

	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit [min]</b>
Schritt 1	25	10
Schritt 2	37	120
Schritt 3	85	5
Schritt 4	4	∞

Die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurde mit dem asymmetrischen Cyaninfarbstoff SYBR Green I unter Verwendung des Applied Biosystems™ PRISM 7900HT durchgeführt. Dazu wurde die aufbereitete cDNA mit 80 µl RNase-freiem Wasser gemischt, um ein Verhältnis von 1:5 zu erreichen, und spezifische Primer wurden dem SYBR Green-Mastermix nach dem in Tabelle 11 aufgeführten Pipettierschema zugesetzt.

Tabelle 11: Reagenzien Real-Time PCR

Reagenz	Volumen pro Reaktion [µl]
forward Primer (10 µM)	0,5
reverse Primer (10 µM)	0,5
SYBR Green master mix	5,0
RNase freies Wasser	1,5
gesamt	7,5

Die Menge von 7,5 µl RT-PCR-Mastermix wurde zusammen mit 2,5 µl flüssiger cDNA in jede Vertiefung einer 384-Well-Platte pipettiert, und nach dem Zentrifugieren wurde die qPCR gemäß dem in Tabelle 12 aufgeführten Protokoll durchgeführt.

Die quantitative Echtzeit-PCR wurde zum Nachweis der relativen Expression von XYLT-1, XYLT-2, LOX, HS2ST1, HS6ST2 und HS3ST1 verwendet (Primer-Sequenzen sind in Tabelle 4 aufgeführt). Die absolute Quantifizierung wurde anhand von Standardkurven durchgeführt. Die Zielgenexpression wurde auf Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert.

Tabelle 12: Protokoll qPCR

	Temperatur [°C]	Zeit [sec]
Initiale Denaturierung	95	900
Denaturierung	95	30
Hybridisierung 40x	60	30
Elongation	72	30
Dissoziation	95	15
Dissoziation	60	15
Dissoziation	95	15

#### 2.2.4.c Gel-Elektrophorese zur Überprüfung der Primer-Funktionalität

Zur Überprüfung der einzelnen Primer wurden mithilfe einer Agarosegelelektrophorese DNA-Proben aufgetrennt. Für die DNA-Elektrophorese wurden 1-2%ige Agarosegele

hergestellt. 1g Agarose wurde in 1x TAE-Puffer geschmolzen und 5µl Ethidiumbromid pro 100ml hinzugefügt. Das polymerisierte Gel wurde in die Elektrophoresekammer überführt und mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt. Anschließend wurden die DNA-Proben jeweils im Verhältnis 1:6 mit 6x Gel loading Färbung gemischt. Nach dem Auftragen der Proben und einer 100bp DNA-Leiter zur Skalierung, wurde die DNA bei 150 V für 1h größenabhängig aufgetrennt. Ein Bild des Gels wurde abschließend mit dem Agarosegel-Imager Infinity-1000/26M aufgenommen.

#### 2.2.5 Proteinbestimmung

##### 2.2.5.a Gewebepreparation und Proteinextraktion

Die Gewebeproben wurden mit dem Precellys Lysing Kit für die Proteinbestimmung vorbereitet. Das Protokoll ist in Abschnitt 2.2.4. beschrieben. Die jeweils entstandene homogene Lösung wurde im folgenden Prozedere genutzt.

##### 2.2.5.b Proteinmengenbestimmung

Für jede Probe wurde der Proteingehalt mithilfe des BCA Protein Assay Kits gemessen. Das Assay nutzt die Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>1+</sup> Ionen aus. Das Reaktionsprodukt bildet im basischen Milieu einen farbintensiven Komplex aus Cu<sup>1+</sup> Ionen und Bicinchoninsäure (BCA). Die resultierende Verbindung zeigt eine nahezu lineare Korrelation zum Proteingehalt der Probe bei 526nm Absorption.

Als Referenz zum Proteingehalt wurden gleichzeitig gemessene BSA-Standards genutzt. Für die Messung wurde eine 96-well Mikroplatte und ein Spectralphotometer verwendet.

##### 2.2.5.c Bestimmung der LOX-Aktivität

Die LOX-Aktivität wurde mit dem Lysyl Oxidase Activity Assay Kit (Fluorometric) unter Verwendung von gereinigtem Protein analysiert. Das Protokoll wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Das Assay bedient sich eines LOX-Substrates welches eingesetzt wird, um in Anwesenheit des Enzyms Wasserstoffperoxid freizusetzen. Mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs kann dieses frei gewordene Wasserstoffperoxid anschließend nachgewiesen werden. Die Messung erfolgt mit



einem Spektralphotometer bei einer Anregung/Emission von 540/590nm. Die Aktivitätswerte wurden auf den jeweiligen Proteingehalt der Proben normiert.

#### 2 . 2 . 6 Statistische Analyse

Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$ SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer einfachen ANOVA mit Bonferroni-Post-hoc-Test für Mehrfachtests (GraphPad Prism 8.0.2) oder einem Mann-Whitney-Test beim Vergleich von zwei Gruppen. Abweichungen von den genannten Teststrategien sind zusätzlich beschrieben. Die Ergebnisse wurden als signifikant angesehen, wenn die p-Werte  $<0,05$  waren. (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ )

## 3. E R G E B N I S S E

### 3.1 Statistische Auswertung der Anamnesedaten

Die Daten von 92 Patienten/-innen wurden ausgewertet, um eine mögliche Korrelationen zwischen dem Auftreten der beiden Formen der Schultersteife und metabolischen Störungen zu identifizieren. Die Kohorte für die primäre Schultersteife setzte sich aus 22 Probanden/-innen zusammen. Patienten/-innen mit Rotatorenmanschettenläsion, verkalkender Sehnenentzündung, SLAP- (Superiores Labrum von Anterior nach Posterior) oder LBT-Läsion (Lange Bizepssehne) sowie Arthrose des akromioklavikulären Gelenks wurden von der primären Schultersteife-Kohorte ausgeschlossen (Tabelle 13). Die exkludierte Fraktion wurde entweder in die sekundäre Schultersteife-Kohorte oder in die Kontrollkohorte aufgenommen.

Die sekundäre Schultersteife-Kohorte umfasste 23 Patienten/-innen. Vier Personen der sekundären Schultersteife-Kohorte wiesen eine postoperative Schultersteife auf. Die intraoperativ dokumentierten Bildbefunde zeigen entweder Anzeichen einer aktiven Entzündung im Sinne einer Synovialitis oder bereits eine deutliche Proliferation des Bindegewebes. Alle Schultersteifen wiesen mindestens einen dieser Befunde in der arthroskopischen Untersuchung auf. Es stellte sich kein Unterschied in der Häufigkeit von Synovialitis oder Synovialfibrose zwischen primärer und sekundärer Schultersteife dar.

Insgesamt 47 Patienten/-innen wurden in die Kontrollgruppe eingeschlossen. Einschlusskriterium war das vollständige Fehlen von Anzeichen einer Synovialitis oder Fibrose (Tabelle 13). Andernfalls wären entsprechende Patienten/-innen aus der Kontrollgruppe ausgeschlossen worden. Es erhielten 46% der Patienten/-innen mit primärer Schultersteife und 30% der Patienten/-innen mit sekundärer Schultersteife vor der Operation intraartikuläre Steroidinjektionen, welche die Synovialitis mildernd beeinflusst haben könnten (Tabelle 13). Kein Patient/-in der Kontrollgruppe erhielt Cortisol-Injektionen. In jeder Gruppe wurde ein Teil vorab von Physiotherapeuten behandelt. Interessanterweise wurde eine präoperative Physiotherapie bei 20 von 21 Patienten/-innen mit sekundärer Schultersteife durchgeführt. In der Gruppe der primären Schultersteife war dies nur bei 7 von 21 der Fall.

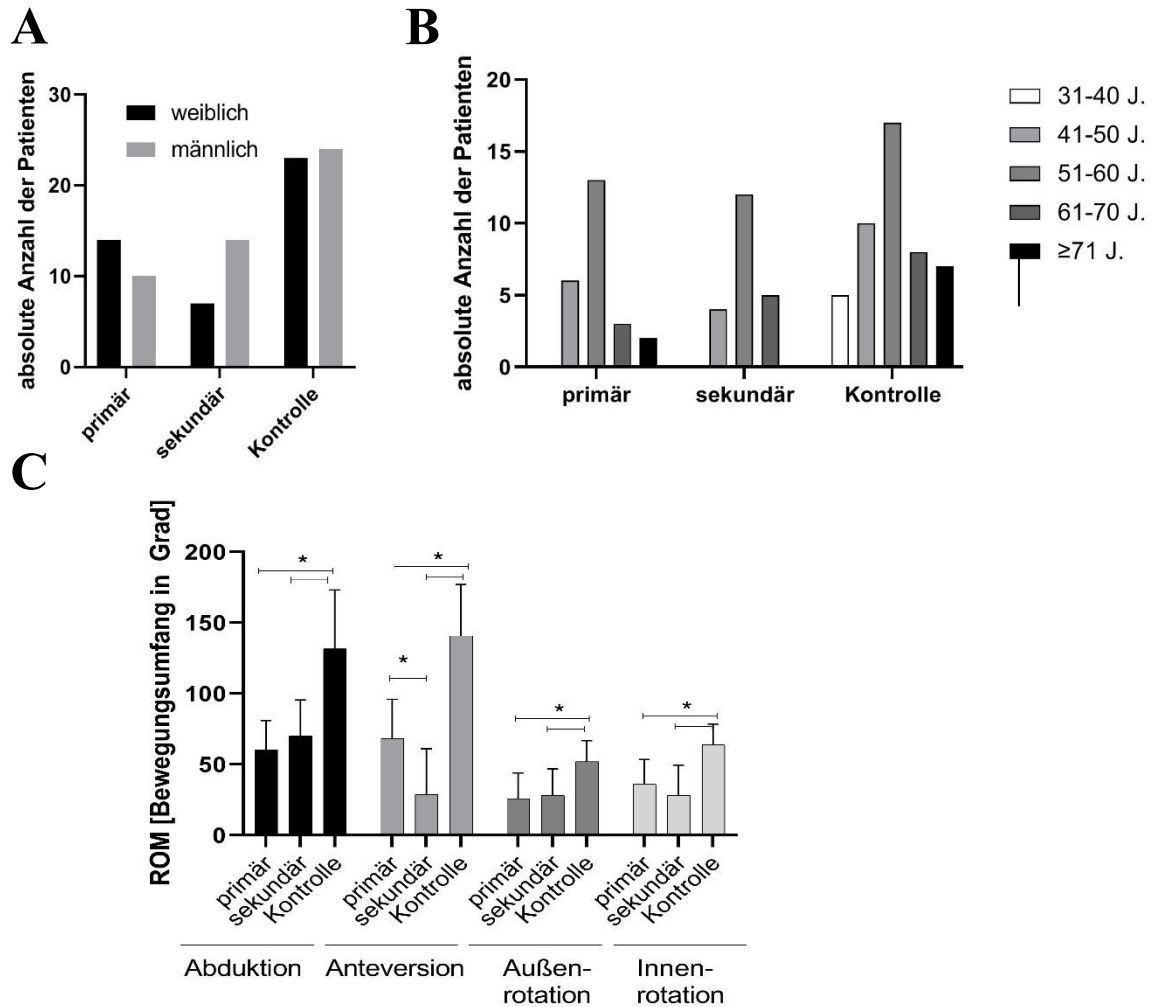
Tabelle 13: Klinische Diagnosen und präoperative Therapien der drei Kohorten

	<b>Prim. Schultersteife N=22</b>	<b>Sek. Schultersteife N=23</b>	<b>Kontrolle N=47</b>
RTM-Ruptur	0	9	17
Kalkschulter	0	4	4
SLAP/ LBS- Degeneration	0	6	10
Omarthrose	0	3	16
Synovialitis (Stadium 1)	14/22	16/23	0
Fibrose (Stadium 2)	17/22	17/23	0
Kortison Infiltration	11/24	7/21	0
Physiotherapie	7/21	20/21	18/21

Es gab keinen Unterschied zwischen der Anzahl weiblicher und männlicher Probanden/-innen in den drei Kohorten (Abbildung 6 A).

Die Kontrollgruppe umfasste die jüngsten Patienten/-innen (zwischen 30 und 40 Jahren). Das Durchschnittsalter war in allen drei Gruppen annähernd gleich (Abbildung 6 B). Sowohl in der primären als auch in der sekundären Gruppe war die Mehrzahl der Patienten/-innen im Alter von 40-60 Jahren.

Erwartungsgemäß war der Umfang der Schulterbewegung (ROM) für Abduktion, Anteversion, externe Rotation und interne Rotation bei Patienten/-innen mit Schultersteife signifikant geringer als bei den Kontrollpatienten/-innen. Letztere erreichten im Durchschnitt den vollen physiologischen Bewegungsumfang. Interessanterweise war die Anteversion bei sekundärer Schultersteife signifikant niedriger als bei primärer Schultersteife (Abbildung 6 C). Alle anderen Parameter waren für primäre und sekundäre Schultersteife annähernd gleich (Abbildung 6 C).



**Abbildung 6: Patientenkollektiv und Ausmaß der Bewegungseinschränkung**

(A) Diagramm mit der Geschlechterverteilung der Patienten/-innen innerhalb der drei Kohorten.

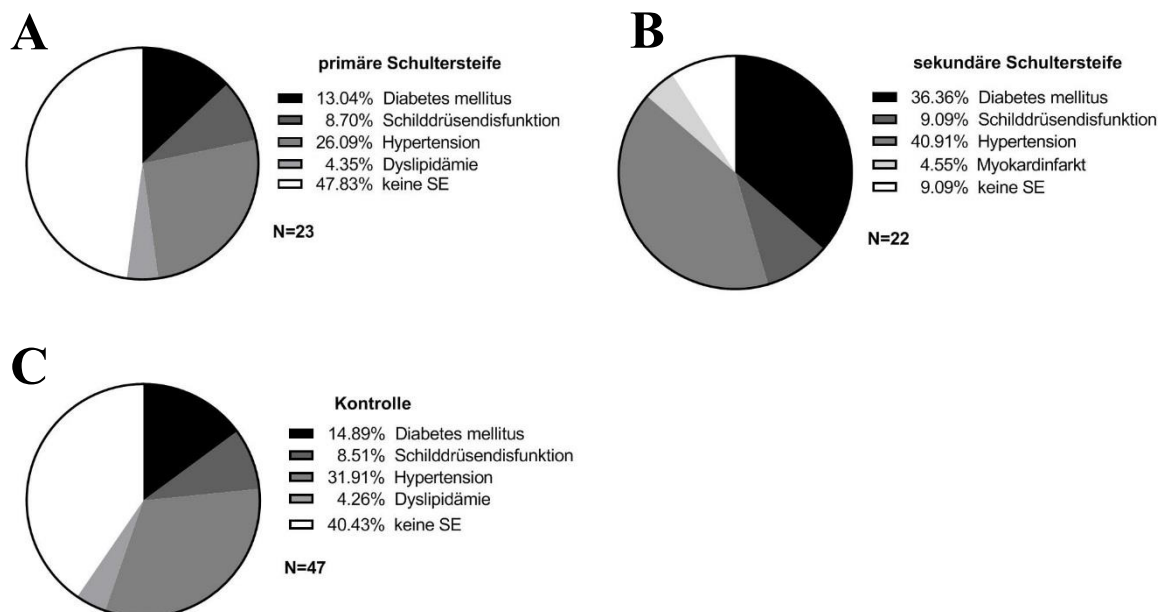
(B) Altersverteilung der Patienten/-innen in den drei Kohorten in Jahren (J) (Mittelwert ± SD für Kontrolle: 56,34 ± 11,9 Jahre; primär: 55,45 ± 8,3 Jahre; sekundär: 55,9 ± 5,3 Jahre).

(C) Erhebung der relevanten Bewegungsausmaße des betroffenen Schultergelenks in Grad. Die Bewegungsgrade sind für jede Kohorte und jeden Bewegungstyp als Mittelwert ± SD angegeben (ANOVA mit zwei Schwänzen und Bonferroni-Post-hoc-Test: primäre Schultersteife vs. Kontrolle  $p < 0,001$ , sekundäre Schultersteife vs. Kontrolle  $p < 0,0001$ , primäre vs. sekundäre Schultersteife für Anteversion:  $p < 0,001$ )

In der präoperativen Vorbereitung wurde die Anamnese des Patienten/-in ermittelt. Es wurden explizit Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus, Hypothyreose, Hypolipoproteinämie, Herzinfarkt und Morbus Parkinson abgefragt. Eine Neubewertung der Komorbiditäten in einer anschließenden Konsultation wurde nicht durchgeführt.

Interessanterweise war der Gesamtprozentsatz der Patienten/-innen mit Stoffwechselerkrankungen in der sekundären Schultersteife-Kohorte 5-mal höher als in der Primär- und der Kontrollkohorte (Abbildung 7 A-C).

Die Prävalenz des Diabetes mellitus bei der sekundären Schultersteife zeigte sich signifikant erhöht (36%). Währenddessen wiesen nur 13% in der Primär- und 15% in der Kontrollkohorte einen Diabetes mellitus auf (Abbildung 7 a und C). Keiner der befragten Patienten/-innen litt an einem Morbus Parkinson. Lediglich eine Person mit sekundärer Schultersteife berichtete, in der Vergangenheit einen Myokardinfarkt gehabt zu haben. In der Gruppe der primären Schultersteife verneinte die Hälfte der Patienten/-innen, an den erwähnten Pathologien erkrankt zu sein. Bei der Untersuchung der Prävalenzrate von Stoffwechselerkrankungen der sekundären Schultersteife fanden wir 36,36% mit Diabetes mellitus und 40,91% mit arterieller Hypertonie (Abbildung 7 B). Die sekundäre Gruppe hatte den geringsten Anteil an Patienten/-innen ohne Stoffwechselerkrankungen (9,09%).



**Abbildung 7: Ausmaß der nebenbefundlichen Stoffwechselerkrankung (SE) in der Kohorte**

- (A)** Prozentualer Anteil der Patienten/-innen mit Stoffwechselerkrankungen in der primären Schultersteife. (N=23)
- (B)** Prozentualer Anteil der Patienten/-innen mit Stoffwechselerkrankungen in der sekundären Schultersteife. (N=22)
- (C)** Prozentualer Anteil der Patienten/-innen mit Stoffwechselerkrankungen in der Kontrollkohorte (N=47)

### **3 . 2      Sowohl die XT-1 Expression, als auch die Sulfatierung der GAG ist erhöht bei der primären Schultersteife**

Es ist bereits bekannt, dass XT-1 den fibrotischen Gewebeumbau positiv beeinflusst. Daher haben wir eine Immunfärbung für XT-1 in Gewebeproben von primärer, sekundärer Schultersteife, sowie einer Kontrollgruppe durchgeführt. Der Zellkern von Fibroblasten und anderen Zellen erscheint blau auf den Fluoreszenzbildern, während XT-1 positive Zellen rot leuchten. Auf den Fluoreszenzbildern kann man einen hohen Anteil an rot gefärbter Fläche bei der primären Schultersteife erkennen. Außerdem ist im Gewebe der Schultersteife eine übermäßige Zahl an blau gefärbten Fibroblasten im Vergleich zum Kontrollgewebe sichtbar. Die IgG-Färbung zeigt keine roten Anteile, was die Funktionalität des Antikörpers belegt. Anschließend ermittelten wir prozentual den rot gefärbten Bereich.

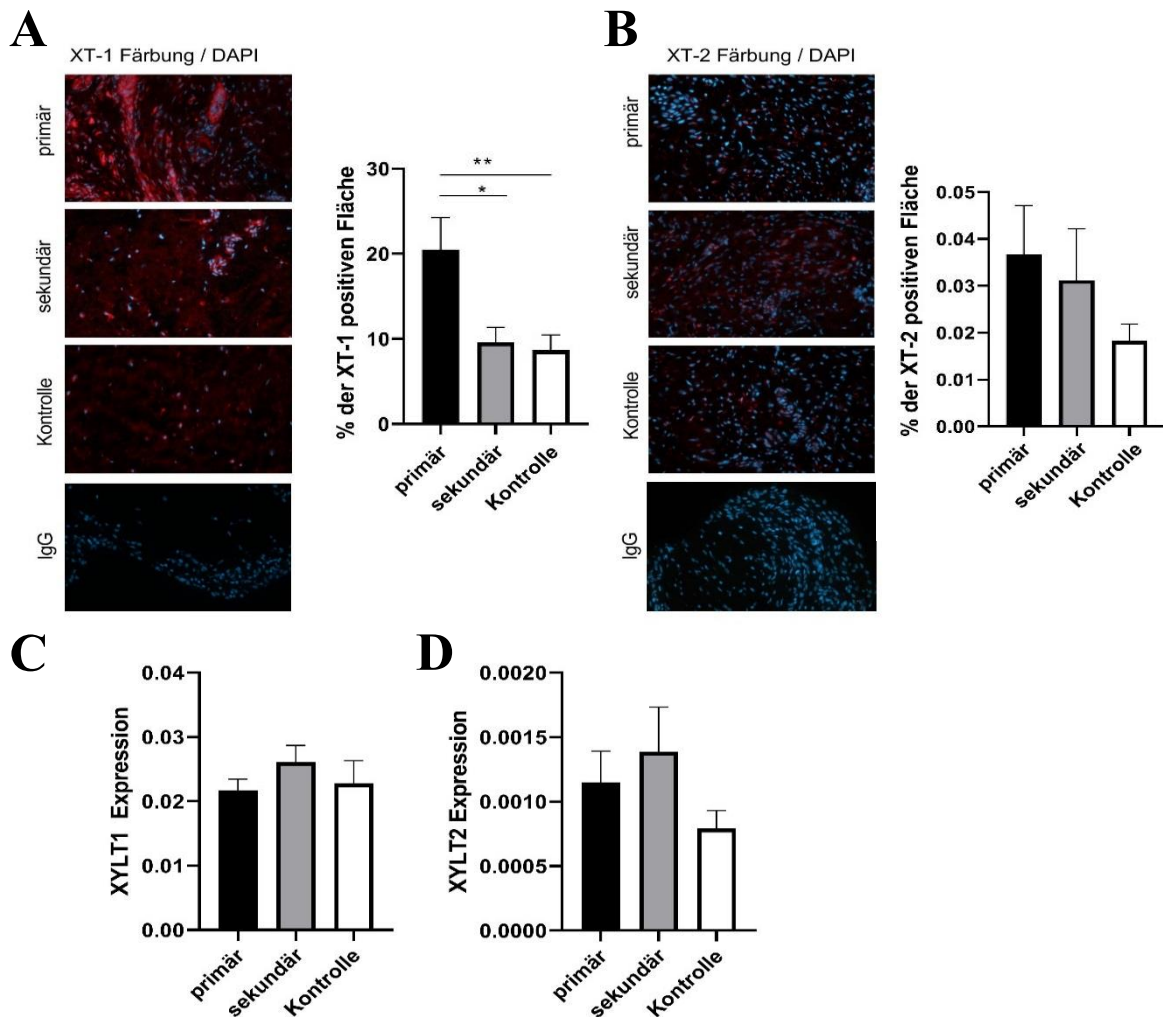
Betrachtet man die sekundäre Schultersteife, zeigt sich kein signifikanter Unterschied zum Kontrollgewebe (Abbildung 8 A). Beide wiesen 10% der XT-1-positiven Fläche auf. Dagegen berechnete sich bei der primären Schultersteife eine XT-1-positive Fläche von bis zu 20%. Die primäre Schultersteife hatte signifikant höhere Werte an positiver Fläche im Vergleich zur Sekundär- und Kontrollgruppe (Abbildung 8 A:  $F(2, 48) = 6,712, p = 0,027$ ).

Gegensätzlich dazu zeigte die XT-2-Färbung in allen drei Gruppen minimal rot gefärbte Flächen sowie einen geringeren Anteil blau gefärbter Zellen. Die IgG-Färbung fiel positiv aus und zeigte keine rote Färbung. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen finden (Abbildung 8 B:  $F(2, 15) = 0,49, p = 0,62$ ). Alle drei Gruppen weisen weniger als 1% an XT-2 positiver Fläche auf.

Da die Proteinspiegel für XT-1 im primären Schultersteife -Gewebe erhöht waren, untersuchten wir zusätzlich die Expressionsniveaus für XT-1. Die qRT-PCR für XYLT-1 und XLYT-2 zeigte keinen signifikanten Anstieg in der primären Schultersteife (Abbildung 8 C:  $F(2, 30) = 1,20; p = 0,31$ ). Ebenso gab es keine relevanten Unterschiede in der Expression zwischen Sekundär- und Kontrollgruppe. Gleiches gilt für den Vergleich von Primär- und Sekundärgruppe.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung bestätigten sich auch in der qRT-PCR mit XYLT-2. Die Expression des Gens war sehr gering ausgeprägt. Alle Messungen endeten mit Expressionswerten unter 0,01%. Auch hier wiesen alle drei

Gruppen ähnliche Level auf, und es wurde keine differenzielle Regulation des Transkriptionsniveaus beobachtet (Abbildung 8 D:  $F(2, 38) = 0,13, p=0,88$ ).



**Abbildung 8: Mehr XT-1 in der primären Schultersteife im Vergleich zur sekundären Schultersteife oder dem Kontrollgewebe.**

**A)** XT-1-Immunsustanz (XT-1: rot, DAPI: blau). Die Quantifizierung der rot gefärbten Gewebefläche wird im Diagramm als Mittelwert  $\pm$  SEM ( $N \geq 13$  pro Gruppe) angegeben. IgG-Färbung wurde durchgeführt, um die Spezifität des Primärantikörpers zu kontrollieren. ( $F(2,48) = 6,712, p = 0,027$ ; primäre vs. Kontrollgruppe: 95% CI: 3,462 bis 20,17 ( $p = 0,003$ ) und primäre vs. sekundäre 95% CI: 1,558 bis 20,24;  $p = 0,011$ ).

**(B)** XT-2 (XT-2: rot, DAPI: blau). Die Quantifizierung der rot gefärbten Gewebefläche ist im Diagramm dargestellt. ( $N \geq 10$  pro Gruppe) ( $F(2,30) = 1,05, p = 0,36$ ). IgG-Färbung wurde durchgeführt, um die Spezifität des Primärantikörpers zu kontrollieren.

**C)** Quantitative RT-PCR für XYLT-1-Expression im Gewebe der drei untersuchten Kohorten ( $F(2, 30) = 0,7799, p = 0,46$ ).

**D)** Quantitative RT-PCR für die XYLT-2-Expression im Gewebe der drei untersuchten Kohorten ( $F(2, 59) = 1,329, p = 0,27$ ).

### **3 . 3      Erhöhte Sulfatierungen der GAG könnten auf eine erhöhte Expression von HS6ST1 und HS2ST1 zurückzuführen sein.**

XT-1 vermittelt den ersten Schritt der GAG-Synthese. Um zu überprüfen, ob sich der Anteil an sulfatierten Proteoglykanen aufgrund einer Zunahme der Zuckerketten verändert, führten wir eine Alcianblau-PAS-Färbung bei pH1 durch. Diese Methode färbt alle sauren Muzine, wie sulfatierte GAGs, tiefblau an. Wiederum erscheinen die neutralen Muzine magentafarben.

Die Färbungen zeigen einen hohen Anteil an blau gefärbten Zellen im Gewebe der primären Schultersteife. Im Gegensatz dazu war das Gewebe der sekundären Schultersteife und das Kontrollgewebe zum Großteil magenta eingefärbt. Ebenso wies das Gewebe der Schultersteife eine stärkere Gefäßinfiltration auf als das Kontrollgewebe. Außerdem sahen wir eine Intensivierung der blauen Farbe um die Gefäße in der primären Schultersteife.

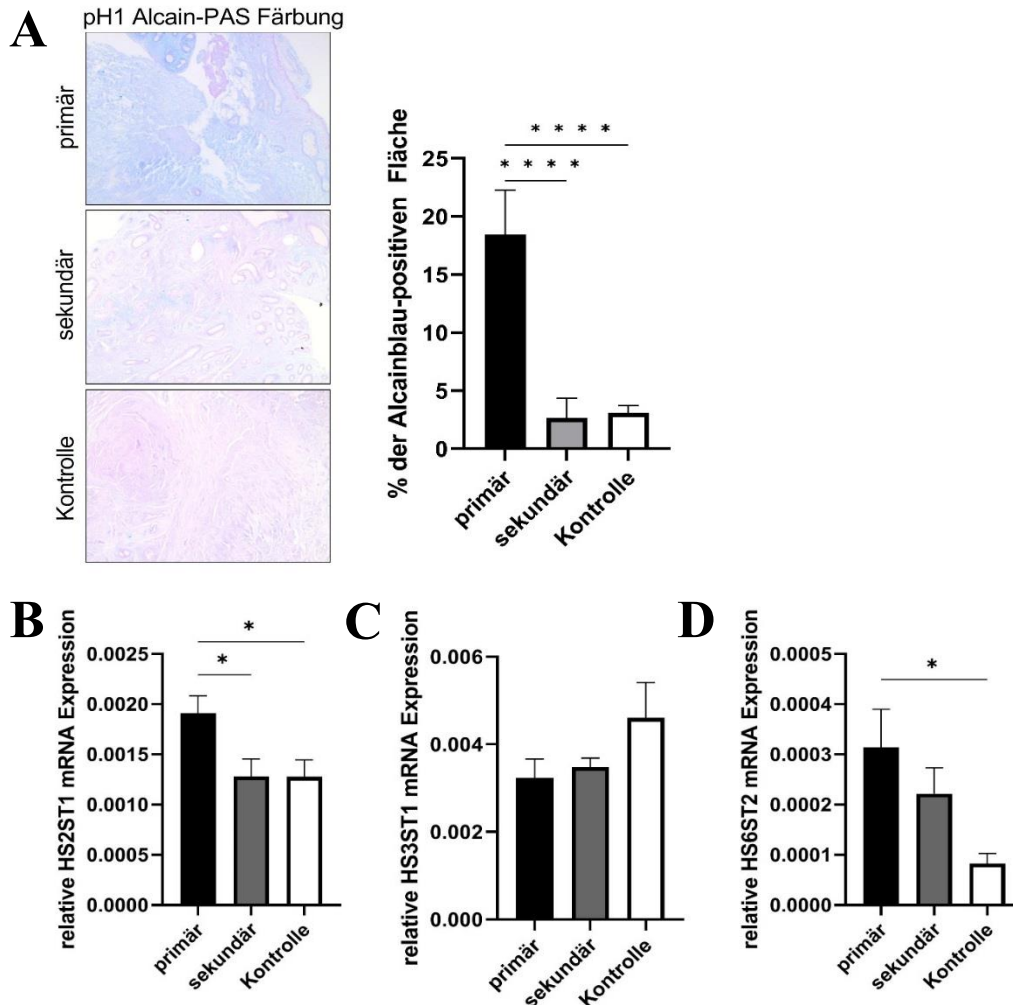
Die Quantifizierung der blau gefärbten Gewebefläche ergab, dass die GAGs in den primären Schultersteife-Geweben im Vergleich zu den Sekundären und der Kontrollgruppe stärker sulfatiert sind (Abbildung 9 A:  $F(2, 38) = 26,72, p < 0,0001$ ).

In der primären Schultersteife zeigten sich 20 % Alcianblau-positive Bereiche. Die Sekundär- und die Kontrollgruppe wiesen weniger als 5 % Alcianblau-positive Flächen auf. Ähnlich wie bei der immunhistochemischen XT-1-Färbung gab es keinen Unterschied zwischen der sekundären Schultersteife- und der Kontrollgruppe (Abbildung 9 A). Beide wiesen einen Anteil von weniger als 5 % Alcianblau-positiver Fläche auf.

Um die Quelle der erhöhten Sulfatierung zu untersuchen, führten wir eine quantitative RT-PCR für die HS-sulfatierenden Enzyme durch. Zu diesem Zweck testeten wir drei verschiedene Gene, die für sulfatierende Enzyme transkribieren, HS2ST1, HS6ST2 und HS3ST1. HS2ST1 wurde in der primären Schultersteife stärker exprimiert als in der sekundären Schultersteife und in der Kontrollgruppe (Abbildung 9 B:  $F(2, 37) = 4,465, p = 0,018$ ). Bei den HS2ST1-Werten gab es keine Unterschiede zwischen der sekundären Schultersteife- und der Kontrollgruppe (Abbildung 9 B). Die Expression von HS6ST2 war in der primären Schultersteife im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls signifikant erhöht (Abbildung 9 D:  $F(2, 32) = 4,128, p = 0,025$ ). Allerdings wurde HS6ST2 im Vergleich zu HS2ST1 fünfmal weniger exprimiert (Abbildung 9 B und D).



Bei HS3ST1 gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen (Abbildung 9 C:  $F(2, 32) = 1,78, p=0,184$ ). HS2ST1 und HS3ST1 wiesen eine nahezu gleich starke Expression auf (Abbildung 9 B und C).



**Abbildung 9: Das Auftreten von HS6ST1 und HS2ST1 in der primären Schultersteife**

**A)** Alcainblau-PAS-Färbung von primärer, sekundärer Schultersteife und Kontrollgewebe mit Quantifizierung des blau gefärbten Gewebeanteils, im Diagramm als Mittelwert  $\pm$  SEM ( $N \geq 6$  pro Gruppe) angegeben. ( $F(2, 38) = 26,72, p < 0,0001$ ; primäre vs. Kontrollgruppe: 95% CI: 9,935 bis 20,75 ( $p < 0,0001$ ) und primäre vs. sekundäre Schultersteife: 95% CI: 9,320 bis 22,26 ( $p < 0,0001$ )).

**B)** Quantitative RT-PCR für HS2ST1-Sulfotransferase im Gewebe der drei untersuchten Kohorten. ( $N \geq 13$  pro Gruppe) ( $F(2, 37) = 4,465, p = 0,018$ ; primär vs. sekundär: 95% CI:  $2,45 \cdot 10^{-5}$  bis 0,00 ( $p = 0,039$ ) und primär vs. Kontrolle: 95% CI:  $1,836 \cdot 10^{-5}$  bis 0,001 ( $p = 0,041$ )).

**C)** Quantitative RT-PCR für HS3ST1-Sulfotransferase im Gewebe der drei untersuchten Kohorten. ( $N \geq 11$  pro Gruppe) ( $F(2, 32) = 1,783, p = 0,184$ )

**D)** Quantitative RT-PCR für HS6ST2-Sulfotransferase im Gewebe der drei untersuchten Kohorten. ( $N \geq 11$  pro Gruppe) ( $F(2, 32) = 4,128, p = 0,025$ ; Kontrolle vs. primäre Schultersteife: 95% CI:  $2,74 \cdot 10^{-5}$  bis 0,0004,  $p = 0,0218$ )

### 3 . 4 Die Bindung und Aktivität von LOX

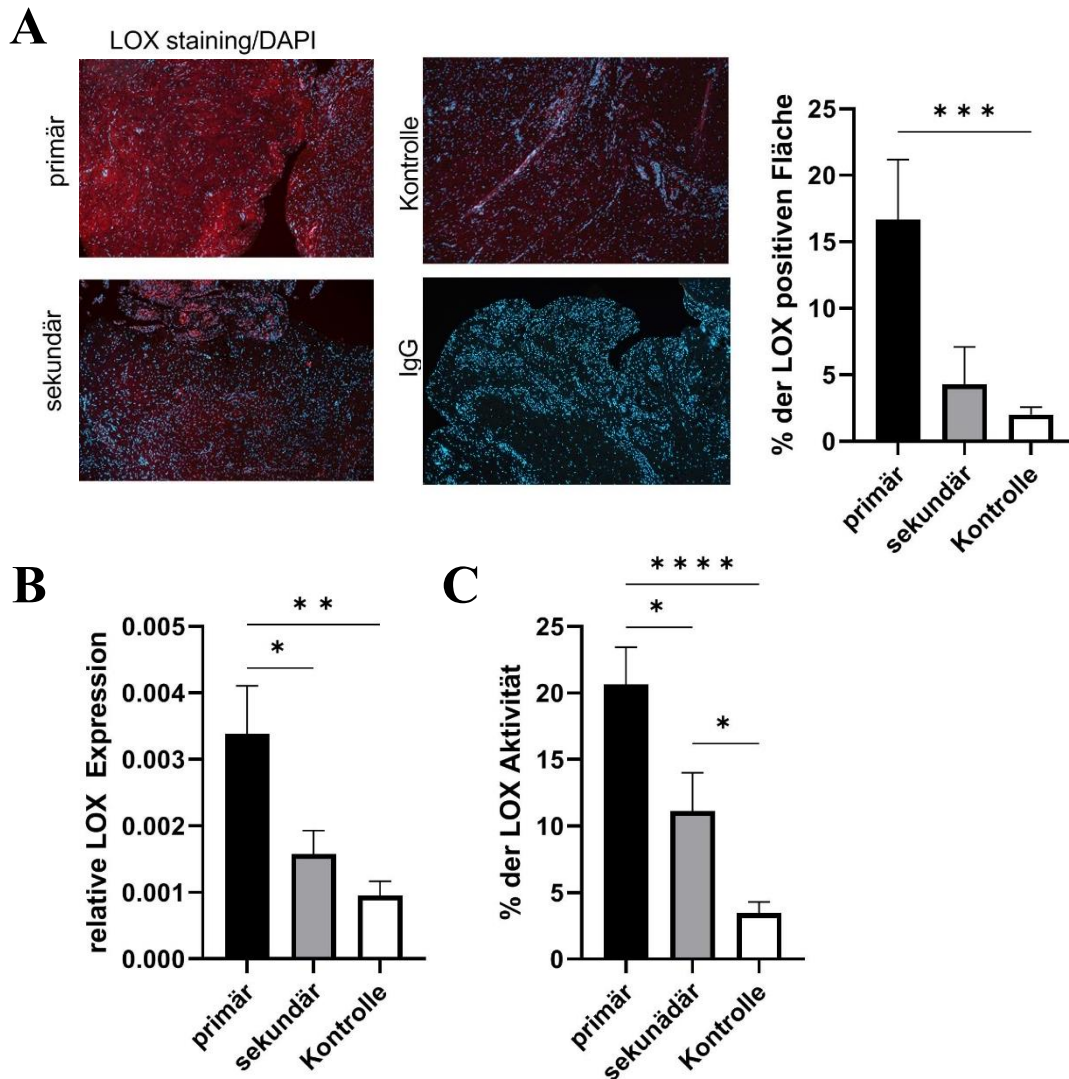
#### 3 . 4 . 1 LOX wird vermehrt in der primären Schultersteife exprimiert und zeigt eine gesteigerte Aktivität.

Es ist bekannt, dass LOX an der Kollagenvernetzung in der EZM beteiligt ist und vorwiegend HS-Proteoglykane bindet. Es wird in der EZM exprimiert. Daher untersuchten wir immunhistochemisch das Vorhandensein von LOX in der primären und sekundären Schultersteife. Der rote Bereich, in den mit Fluoreszenzmikroskopie aufgenommenen Bildern, stellt die LOX-positive EZM dar. Wir machten erneut einen Isotypen-Test mit IgG-Antikörpern und sahen keine rot gefärbten Stellen, was zum Beweis der Funktionalität des Antikörpers beiträgt. In allen drei Gewebe-Entitäten konnten LOX-positive Zellen dargestellt werden. Interessanterweise wies die primäre Schultersteife die höchste Menge an Rotfärbung auf. Diese schien sich um die Gefäße herum zu verstärken.

Für die Berechnung wurde der Prozentsatz des gefärbten Gewebes verwendet. Wie die Färbung bereits angedeutet hatte, beobachteten wir, dass die LOX-Färbung in der primären Schultersteife im Vergleich zur sekundären Schultersteife und der Kontrollgruppe signifikant erhöht ist (Abbildung 10 A:  $F(2, 44) = 11,65$ ,  $p < 0,0001$ ). Außerdem gibt es keinen Unterschied zwischen der farbigen Fläche der Sekundär- und der Kontrollgruppe. Beide zeigten nur einen LOX-positiven Bereich von unter 5 %, während die primäre Schultersteife über 15 % positiver Fläche aufwies.

Auch in dieser Experimentreihe haben wir geprüft, ob der erhöhte Proteingehalt mit einer erhöhten Expression einhergeht. Wir fanden eine dreifach gesteigerte LOX-mRNA-Expression in der primären Schultersteife im Vergleich zur sekundären Schultersteife und zur Kontrolle (Abbildung 10 B:  $F(2, 56) = 5,949$  ( $p = 0,004$ )). In der sekundären Gruppe wurde jedoch keine signifikante Steigerung der LOX-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt.

Außerdem beobachteten wir eine nahezu 20-fache Erhöhung der LOX-Aktivität in primärer Schultersteife im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 10 C:  $F(2, 28) = 23,23$  ( $p < 0,0001$ )). Es ergab sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg der LOX-Aktivität in der sekundären Schultersteife-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 10 C).



**Abbildung 10: LOX-Bindung und -Aktivität sind in der primären Schultersteife erhöht.**

**A)** Immunhistochemische Färbung von LOX in primärer und sekundärer Schultersteife sowie in Kontrollgewebe (LOX: rot; DAPI: blau) ( $N \geq 13$  pro Gruppe) ( $F(2, 48) = 9,935$  ( $p=0,0002$ ); 95% CI für primäre vs. Kontrolle: -22,31 bis -6,95 ( $p<0,0001$ )). Zur Kontrolle der Spezifität des primären Antikörpers wurde eine IgG-Färbung durchgeführt.

**B)** Quantitative RT-PCR für LOX mRNA-Expression im Gewebe ( $N \geq 16$  pro Gruppe) ( $F(2, 56) = 5,949$  ( $p=0,004$ ); 95% CI primär vs. Kontrolle: 0,0006 bis 0,004 ( $p=0,0064$ ); primär vs. sekundär:  $9,7 \cdot 10^{-5}$  bis 0,003 ( $p=0,035$ ))

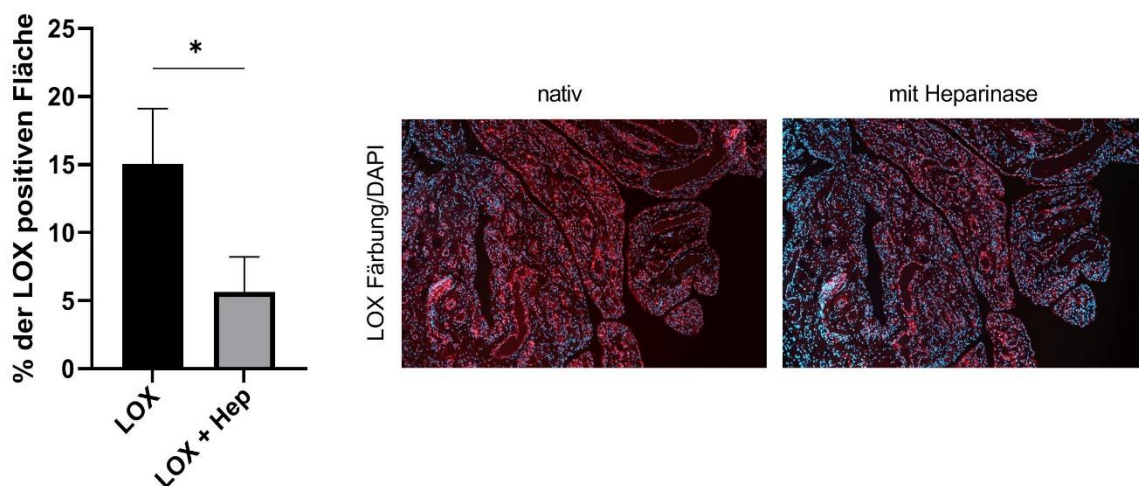
**C).** Die LOX-Aktivität wurde in den jeweiligen Geweben gemessen und auf den jeweiligen Proteingehalt normiert ( $N \geq 8$  pro Gruppe) ( $F(2, 28) = 23,23$  ( $p<0,0001$ ), 95% CI primär vs. Kontrolle: 10,72 bis 23,64 ( $p<0,0001$ ); 95% CI sekundär vs. Kontrolle: 0,95 bis 14,45 ( $p=0,021$ ); 95% CI primär vs. sekundär: 1,77 bis 17,21 ( $p=0,012$ ))

### 3 . 4 . 2 LOX bindet vermehrt an sulfatierte GAG-Ketten in der primären Schultersteife.

Wir konnten das vermehrte Vorhandensein von LOX und dessen hochregulierte Aktivität bei primärer Schultersteife nachweisen, sowie eine hohe Prävalenz von GAGs zeigen. Anschließend haben wir unsere Hypothese getestet, ob LOX an die GAG-Ketten bindet. Zu diesem Zweck behandelten wir Gewebeschnitte der primären Schultersteife mit Heparinase, um die HS-Ketten abzuspalten.

Bereits auf den Bildern der Färbung sahen wir eine Verringerung der LOX-positiven Bereiche (rot) nach der Heparinase-Behandlung. Nach genauerer Analyse fanden wir eine dreifache Abnahme der LOX-Färbung im Anschluss der Behandlung mit Heparinase (Abbildung 11: primäre Schultersteife:  $15,05 \pm 4,06$ , Heparinase:  $5,63 \pm 2,58$ ,  $p=0,0043$ ).

Eine ähnliche Testreihe mit dem Gewebe der sekundären Schultersteife wurde aufgrund der fehlenden LOX-Expression, die in der vorherigen Untersuchung festgestellt wurde, nicht durchgeführt.



**Abbildung 11: LOX-Immunfärbung nach Behandlung mit Heparinase**

Die LOX-positiven Strukturen sind mithilfe der Antikörper-Fluoreszenzfärbung rot markiert. Die Zellkerne sind blau angefärbt mittels DAPI-Färbung. ( $N \geq 14$  pro Gruppe,  $p=0.0245$ ) Zur Analyse der statistischen Signifikanz wurde ein Wilcoxon-Test durchgeführt.

## 4. DISKUSSION

Die Schultersteife ist eine Erkrankung, die erstmals im 19. Jahrhundert beschrieben wurde. Viele Menschen sind vor allem in ihren aktiven Berufsjahren betroffen. Es handelt sich um eine Arthrofibrose in der Schulter, welche mit starken Schmerzen und einer enormen Bewegungslimitierung einhergeht. Resultierend daraus schildern Betroffene starke Einschränkungen im Alltag und Schlafstörungen. Röntgen- und MRT-Aufnahmen haben wenig Einfluss auf die Diagnostik, da bisher keine radiologischen Früherkennungszeichen bekannt sind. Die Reaktion auf Therapiebehandlungen ist so unterschiedlich wie die multiplen Behandlungsstrategien selbst. In der Literatur bekannt sind dagegen bereits mehrere Risikofaktoren und demografische Daten. Aufgrund dessen bleibt der Wille bestehen, die biochemischen Prozesse der Schultersteife näher untersuchen zu wollen. Wiederum erleichtere dies die Entwicklung einer suffizienten und einheitlichen Therapiestrategie.

Die meisten aktuellen Studien und Rezensionen zeigen ein besseres Ergebnis bei Patienten/-innen, die mit konservativen Methoden behandelt werden [67]. Chirurgische Maßnahmen werden erst im Falle der Therapieresistenz eingesetzt. Dies erschwert die Gewinnung von Gewebeproben zu Forschungszwecken. Ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Prozesse ermöglicht jedoch das Ansprechen und die Wirksamkeit bestehender Behandlungswege sowie Präventivmaßnahmen zu verbessern.

Die konservativen Methoden sind in der Lage, den Schmerz teilweise zu lösen und damit eine Verbesserung der Beweglichkeit zu erzielen, auch wenn sie keine spezifische Wirkung auf die Lockerung der fibrotischen Verbindungen im Gelenk haben. Des Weiteren nimmt die konservative Behandlung viel Zeit in Anspruch und erfordert Geduld. Letzteres ist nicht immer vorhanden und kann zur Durchführung unnötiger adhäsolytischer Eingriffe führen. Diagnostische Biomarker und das Verständnis des genauen pathophysiologischen Prozesses könnten zusätzlich helfen, neue Therapiestrategien sowie individuelle Prognosen für Betroffene zu erforschen.

Ähnliche Fragen wirft die Entstehung der Arthrofibrose im Knie auf. Zur Klärung wurden bereits mehrere Studien durchgeführt. XT-1 hat sich theoretisch als potentieller Biomarker für Arthrofibrose nach Totalendoprothesen-Implantation (TEP) erwiesen [45]. Unserem Kenntnisstand entsprechend, wurde der Einfluss von XT auf die Arthrofibrose in der Schulter noch nicht untersucht.

Grundlegend für diese Untersuchung ist die Tatsache, dass sowohl XT-1 als auch XT-2 an der Biosynthese von Glykosaminoglykanen beteiligt sind [48, 55]. Diese Zuckerketten sind essentieller Teil der EZM. Für die Steifigkeit des Gewebes erfolgt die Quervernetzung der GAG in der EZM durch Lysyloxidase [64, 65].

Schlussfolgernd war unsere Hypothese, dass das fibrotische Gewebe in der Schultersteife durch eine hohe Rate an GAGs gebildet wird. Darüber hinaus sind die Zuckerketten im entstehenden Bindegewebe durch eine erhöhte LOX-Aktivität pathologisch übermäßig untereinander vernetzt. Ein gleichzeitiges Auftreten dieser Fehlregulationen fanden wir vorwiegend in der idiopathischen Schultersteife.

#### **4 . 1        Welchen Einfluss besitzen Ätiologie und Epidemiologie auf die Entwicklung und Prognose der Schultersteife?**

##### **4 . 1 . 1        Epidemiologie der Schultersteife**

Patienten/-innen erkranken in der Regel im Alter von 50-60 Jahren an einer Schultersteife [9, 10]. Diese Altersverteilung spiegelt sich auch in unserer Kohorte wieder. Das Durchschnittsalter der Betroffenen lag bei 55 Jahren. Eine degenerative Ursache für die Schultersteife wird aufgrund der Prävalenz im mittleren Alter als nicht wahrscheinlich angesehen.

Im Mittel sind häufiger Frauen von primärer Schultersteife betroffen als Männer. Letztere zeigen eine höhere Prävalenz der sekundären Schultersteife [12, 17, 20]. Auch hier deckt sich die Literatur mit den Ergebnissen unserer Studie. Der Anteil an Männern in der Gruppe der sekundären Schultersteife war geringfügig höher als der der Frauen. Das Gegenteil zeigt sich in der Gruppe der primären Schultersteife, in welcher die Frauen mehr vertreten waren.

Möglicherweise sind hormonelle Unterschiede zwischen den Geschlechtern mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Fibrose verbunden. Das weibliche Hormon Östrogen zeigt einen positiven Einfluss auf die Kollagensynthese in der EZM und kann zudem antiinflammatorisch wirken [68–70]. So wurde vom „Duke Departments of Orthopedics and Obstetrics and Gynecology“ eine vielversprechende Studie angekündigt, in der Frauen in der Menopause (natürlicher Östrogenmangelzustand) beobachtet wurden. Die Studie soll zeigen, dass abhängig vom Einsatz einer Hormonersatztherapie das Risiko der Entwicklung einer Schultersteife bei Frauen minimiert werden kann.

Die endgültigen Studienergebnisse wurden bisher noch nicht veröffentlicht [71].

Smith et al. untersuchten den protektiven Einfluss von Östrogen auf die Entwicklung der Lungenfibrose, da vorhergehende Studien zeigten, dass Frauen seltener von einer idiopathischen Lungenfibrose betroffen seien als Männer [72]. Ob Östrogen ein auslösender Faktor der Schultersteife ist, wurde bisher noch nicht weitergehend untersucht. Auch ist unklar, ob die hormonellen Unterschiede zwischen den Geschlechtern ausschlaggebend für die ungleiche Prävalenz sind oder stattdessen soziokulturelle Differenzen und variierende Lebensweisen ausschlaggebend sind.

#### 4 . 1 . 2 Risikofaktoren der Schultersteife

Ebenfalls noch nicht abgeschlossen ist die Definition der Schultersteife. Es herrscht Uneinigkeit über die genaue Einteilung der Schultersteife und der Wunsch nach einer detaillierten Definition. Von der „International Society of Arthroscopy, Knee surgery and Orthopaedic Sports Medicine“ wird eine Einteilung in primäre und sekundäre Schultersteife nach dem Beispiel von Lundberg et al. [14] favorisiert, wobei die sekundäre Schultersteife definiert ist als „Schultersteife durch intra- bzw. extraartikuläre und/oder neurologische Ursachen“ [73]. Dazu zählen unter anderem Schultertraumatologien in der Vorgeschichte, als auch Parkinsonerkrankungen und Zervikalsyndrome.

Nach dieser Definition wird Diabetes vorwiegend als Risikofaktor für Entwicklung der Schultersteife betrachtet und nicht als direkter Auslöser der Pathologie.

Ebenfalls in der Literatur erwähnt werden die Dupuytren-Kontraktur, Schilddrüsenerkrankungen und Lipidstoffwechselstörungen als mögliche Risikofaktoren [14, 16, 35]. Immer mehr Studien belegen, dass Stoffwechselerkrankungen einen Einfluss auf die Entstehung der Schultersteife haben und zum fibrotischen Umbau im Schultergelenk beitragen [20]. Dies kann sowohl idiopathisch im Falle der primären Schultersteife vorkommen, als auch postoperativ bzw. posttraumatisch.

#### 4 . 1 . 3 Die sekundäre Schultersteife zeigt eine Koinzidenz von Diabetes

Am häufigsten untersucht ist der Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und dem Auftreten einer Fibrose im Schultergelenk [16, 20, 74]. Goldin et al. zeigten eine Korrelation zwischen Blutzuckerwerten und dem Aufbau der EZM. Sie beschrieben ein erhöhtes Auftreten von „Advanced Glycation Endproducts“ bei Patienten/-innen mit

gesteigerten Blutzuckerwerten [75]. Dies bewirkt eine Aktivierung der fibrotischen Vorgänge im betroffenen Gewebe.

Chan et al. ermittelten in ihrer Studie 2017, dass Diabetiker/-innen mit einer langfristig schlechten Blutzuckereinstellung gefährdeter sind hätten. Unsere Daten zeigen keine Korrelation zwischen idiopathischer Schultersteife und Diabetes mellitus. Ebenso wurden die beschriebenen Komorbiditäten in der Kohorte zum Zeitpunkt der Intervention nicht vermehrt erfasst.

Die Gruppe der primären Schultersteife zeigte nahezu den gleichen Anteil an Diabetes wie die Kontrollgruppe. Auch wurde kein erhöhtes Vorkommen von Schilddrüsenfunktionsstörungen in der Kohorte ermittelt. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die vergleichsweise geringe Anzahl von Probanden/-innen, die an der Studie teilnahmen. Studien mit einer höheren Probandenzahl konnten eine Korrelation zwischen der Schultersteife und Diabetes mellitus darstellen [16, 17, 31]. In diesen zeigte sich eine Häufung von Schultersteifen bei Patienten/-innen mit Diabetes.

Nennenswert ist jedoch auch, dass der Großteil dieser Studien ausschließlich die idiopathische Schultersteife einbezogen hat. Sekundäre Schultersteifen wurden in der Regel im Vorhinein ausgeschlossen. Aufgrund der Inklusion der sekundären Schultersteifen in unserer Studie konnten wir einen Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und sekundärer Schultersteife veranschaulichen. Der Anteil an Patienten/-innen mit Diabetes war in der Gruppe der sekundären Schultersteife doppelt so hoch wie in der Gruppe der primären Schultersteife. Gleiches zeigte sich beim Vergleich mit der Kontrollgruppe. Auch hier gab ein geringerer Teil der Patienten/-innen Diabetes als Nebendiagnose an. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass von Diabetes betroffene Personen eine Prädisposition haben, postoperativ eine sekundäre Schultersteife zu entwickeln.

Eine ähnliche Erkenntnis hatten auch Dias et al. [13]. Sie bezeichneten Diabetes als Hauptfaktor für die Entstehung einer sekundären Schultersteife. Bei der Interpretation der variierenden Studienergebnisse sollten immer die angewandten Definitionen der Schultersteife verglichen werden und eventuell auftretende systemische Fehler betrachtet werden.



Einen möglichen Selektionsfehler in dieser Studie stellt die Lebensregion der Patienten/-innen dar. Der Hauptanteil der Probanden/-innen wohnt und arbeitet in Sachsen-Anhalt. Von 2009 bis 2015 hatte Sachsen-Anhalt die höchste Diabetes-Prävalenz in Deutschland, verglichen mit den anderen Bundesländern. 12,38% wurden dem Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung gemeldet [76]. Dies kann sich in der Kontrollgruppe widergespiegelt und den Vergleich beeinflusst haben. Aufgrund der hohen Prävalenz von Diabetes mellitus stellt sich die Frage, ob die Schultersteife auch in Sachsen-Anhalt im Vergleich zu anderen Bundesländern eine erhöhte Prävalenz aufweist. Dies wurde bisher noch nicht gegenübergestellt. Außerdem sind für die Belegung der Hypothese sowohl eine deutlich höhere Probandenzahl als auch ein anderes Studiendesign erforderlich.

#### 4 . 1 . 4 Kontroverser Einsatz der Behandlungsoptionen

Die primäre Schultersteife soll laut Leitlinie vorwiegend konservativ mithilfe von Physiotherapie, Kortisoninjektion und anderen in der Einführung bereits genannten Methoden behandelt werden [77]. Zahlreiche Studien und Meta-Analysen belegen die Wirksamkeit dieser Behandlungen [15, 16, 28, 33, 36]. Im Gegensatz dazu wird bei der sekundären Schultersteife frühzeitig eine operative Maßnahme angesetzt. Diese Aussagen sind durch die Literatur belegt. Jedoch zeigt sich in unserer Kohorte das Gegenteil.

Nur ein Drittel der Patienten/-innen mit primärer Schultersteife erhielten vor der Überweisung ins Krankenhaus eine Physiotherapie. Ebenso wurde nur der Hälfte der Betroffenen eine Kortisoninjektion vorab zgedacht. Gründe für dieses Vorgehen könnten bei der erkrankten Person selbst liegen. Viele sind ungeduldig oder haben einen starken Leidensdruck. Zudem ist die Lebenssituation der Einzelpersonen nicht bekannt. Diese kann unter Umständen zu einer individuellen Entscheidung abweichend von den Leitlinien führen.

Betrachtet man den Einsatz der konservativen Therapie in der Gruppe der sekundären Schultersteifen fällt auf, dass diese wider Erwarten vermehrt eingesetzt wurden. So erhielten nahezu alle Patienten/-innen präoperativ eine Physiotherapie und ein Drittel die Kortisoninjektion. Schlussendlich ist festzuhalten, dass bei den eingeschlossenen Probanden/-innen die konservativen Maßnahmen keine ausreichenden Erfolge gebracht haben.

Die Einschätzung der Stadien fiel in beiden Gruppen gleich aus. Bei über der Hälfte der Patienten/-innen wurde intraoperativ eine Synovialitis festgestellt. Lediglich bei denen ohne Synovialitis kann man eine Wirksamkeit der entzündungshemmenden Kortisoninjektion mutmaßen. Für eine genaue Hypothese müsste jedoch gegenübergestellt werden, ob es sich bei den Betroffenen ohne Synovialitis auch um diejenigen mit vorheriger Kortisoninjektion handelt.

Obendrein ist eine größere Kohorte notwendig. Eine Aussage über die Wirksamkeit der konservativen Methoden ist mit unserem Studienmodell gleichermaßen nicht möglich, da rein konservativ behandelte Patienten/-innen exkludiert wurden.

## **4 . 2        XT-Expression – ein möglicher Biomarker für Arthrofibrose in der Schulter**

### **4 . 2 . 1        Die Xylosyltransferase wirkt profibrotisch auf die Schultersteife**

Die Xylosyltransferase ist bewiesenermaßen für die Regulierung der Synthese von Glykosaminoglykanen verantwortlich [48]. Mit dem Wissen, dass sich Glykosaminoglykane vermehrt in fibrotischem Gewebe befinden und den Hauptbestandteil dessen bilden, kann man eine gesteigerte Aktivität der XT in der Schultersteife vermuten. Ein Anstieg der XT-Aktivität konnte bereits bei Patienten/-innen mit Hepatitis C induzierter Leberfibrose nachgewiesen werden [53]. Ebenso ist ein Anstieg der XT-Konzentrationen im Blut bei systemischer Sklerodermie bekannt [52, 53]. Beide Erkrankungen gehen mit einer pathophysiologischen Erhöhung der Proteoglykane und einer vermehrten Kollagenproduktion einher.

Faust et al. untersuchten 2015 den Einfluss von Xylosyltransferase auf die Arthrofibrose [45]. Als Grundlage dienten ihnen Probanden/-innen mit einer postoperativen Arthrofibrose nach Knie-TEP. Sie konnten zeigen, dass sich im entnommenen Gewebe sowohl eine erhöhte Expression des Enzyms finden ließ, als auch eine erhöhte Aktivität. Hier sahen sie die Chance, einen Biomarker für die Diagnostik der Arthrofibrose zu finden. Die ermittelten Aktivitätswerte von XT-1 im Serum waren jedoch unverändert im Vergleich zu den herangezogenen Kontrollgruppen. Daraus schlussfolgerten sie, dass XT-1 vorwiegend im intraartikulären Gewebe wirkt, ohne in den extraartikulären Blutkreislauf überzutreten. Bernstein et al. griffen diese Ergebnisse auf und untersuchten ebenfalls Gewebeproben von Patienten/-innen mit postoperativer Arthrofibrose [59].

Sie nutzten immunhistochemische Färbungen, um die Expression von XT-1 und XT-2 nachzuweisen. In den fibrotischen Geweben fand sich deutlich mehr XT-1 als in denen der Kontrollgruppe. Auch XT-2 war vermehrt, jedoch nicht in dem Maße wie XT-1. Hervorzuheben ist, dass das Enzym am meisten um die Gefäße herum akkumuliert war. Die Gruppe um Bernstein hat in dieser Studie nur eine sehr kleine Zahl an Probanden/-innen untersucht, was die Signifikanz und Übertragbarkeit der Ergebnisse schmälert. Trotzdem zeigten sie, dass neben XT-1 auch XT-2 eine Rolle in der Entwicklung der Arthrofibrose spielt. Anhand der durchgeführten Färbungen ergab sich auch eine deutliche Korrelation zwischen dem Vorhandensein vieler Myofibroblasten und einer erhöhten XT-Expression. Myofibroblasten sind verantwortlich für die Collagensynthese und fördern damit die Bildung der EZM. Dieses Zusammenspiel verdeutlicht den Einfluss der Xylosyltransferase auf die Entwicklung der Arthrofibrose.

Anhand der Ergebnisse dieser und einiger weiterer Studien beschäftigte uns die Frage, inwiefern eine Übertragbarkeit auf die Entwicklung der Arthrofibrose in der Schulter möglich sei. Ähnlich wie Bernstein et al. beobachteten wir eine Zunahme von XT-1 in der immunhistochemischen Färbung in der primären Schultersteife [59]. Ebenfalls zeigen die Färbungen auch bei unseren Gewebeproben eine vermehrte Anfärbung um die Gefäße herum. Die XT-2 ist dagegen, wie auch bei Bernstein et al., nicht signifikant erhöht. Schlussfolgernd kann man also bei der primären Schultersteife von einer sehr analogen Pathophysiologie ausgehen, wie bei der postoperativen Arthrofibrose. Gegensätzlich dazu verhält es sich mit der sekundären Schultersteife. Bei dieser konnte nicht der gleiche Anstieg von XT-1 beobachtet werden. Schlussfolgernd werden die primäre und sekundäre Schultersteife durch verschiedene biochemische Prozesse reguliert und beeinflusst. Festzuhalten ist, dass die primäre Schultersteife durch bekannte fibrotische Enzyme wie XT-1 aktiviert wird. Dies konnten wir mit unseren Ergebnissen belegen. Die sekundäre Schultersteife dagegen wird eventuell vordergründig durch Gewebeschädigung verursacht und könnte zudem mit überschießenden Wundheilungsmechanismen verbunden sein.

Vergleichbare Vermutungen wurden in einer Studie von Kabbabe et al. erhoben [78]. Innerhalb derer wurden Schultersteifen auf das Vorkommen von inflammatorischen und profibrotischen Zytokinen untersucht. Dabei wurde nicht genau definiert, welcher Genese die Schultersteifen waren. Dennoch zeigte sich ein Unterschied zwischen den untersuchten Geweben bei Patienten/-innen mit oder ohne Diabetes.

In den Schultersteifen ohne Diabetes ermittelten sie deutlich erhöhte Zytokinwerte. Das Gegenteil war bei den Schultersteifen mit Diabetes der Fall. Hier waren die Werte physiologisch. Für künftige Studien könnte es von Vorteil sein, sowohl zwischen sekundärer und primärer Schultersteife zu unterscheiden, als auch zwischen denen mit und ohne Diabetes.

#### 4 . 2 . 2 Die Gene XYLT1 und XYLT2 sind nicht vermehrt exprimiert bei der Schultersteife

Ein erhöhtes Vorkommen von XT-1 im Gewebe und die vermehrte Aktivität sind nicht gleichzusetzen mit einer gesteigerten Expression des Enzyms. Die PCR-Untersuchungen unserer Studie zeigten in allen drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Expression von XT-1 und XT-2 gegenüber der Kontrollgruppe. In den Messungen der Studiengruppe um Faust, zeigten sich ebenfalls geringere Level der Expression in den Geweben der Arthrofibrose im Vergleich zur Kontrollgruppe [45]. Sie untersuchten jedoch vordergründig den Einfluss von TGF-beta1 auf die Arthrofibrose. Dazu inkubierten sie das Gewebe. Durch die anschließenden Messungen, konnten Sie zeigen, dass sich die XT-Expression mittels Wachstumseinfluss in fibrotischem Gewebe mehr steigern lässt, als in nicht-fibrotischem Gewebe. Diesen zusätzlichen profibrotischen Faktor haben wir nicht mit einbezogen. Es bleibt trotzdem weiterhin unklar, welche Regulatoren für die mRNA-Expression in arthrofibrotischem Gewebe verantwortlich sind.

Die Untersuchungen zeigen lediglich, dass eine vermehrte Expression durch profibrotische Faktoren erreicht werden kann. Eine Erklärung für die vergleichsweise niedrigen basalen Werte von XYLT-1 und XYLT-2 muss weiterhin gesucht werden. Möglicherweise ist das Stadium der Schultersteife hierbei entscheidend. Es ist daher auch empfehlenswert, vorab oder retrospektiv eine Stadieneinteilung der betreffenden Probanden/-innen vorzunehmen.

#### 4 . 2 . 3 Glykosaminoglykane sind gehäuft in der Schultersteife

Trotz der normwertigen Expression, besteht bei der Schultersteife ein erhöhtes Vorkommen von XT-1 und vergleichsweise geringer auch XT-2. Die Folge ist eine übermäßige Produktion der GAGs und übergeordnet der EZM. Der Ursprung dessen liegt in der vermehrten Synthese von Proteoglykanen, welche durch die Xylosyltransferase enzymatisch angefeuert wird [48].

Bereits 1968 versuchten Lundberg et al. ein erhöhtes Vorkommen von GAGs und deren Sulfatierung mittels histochemischer Färbungen in der Schultersteife festzustellen. Ihre Ergebnisse blieben jedoch ohne Signifikanz [14].

Eine weitere Untersuchung in diesem Feld unternahm Hagiwara et al. [79]. Sie konnten mithilfe einer Alcianblau Färbung das erhöhte Vorkommen von GAGs in der Schultersteife nachweisen.

Dies wollten wir ebenfalls mit unseren Proben umsetzen. Dazu färbten wir die Gewebeschnitte mit Alcianblau-PAS. Mithilfe der PAS-Reaktion konnten wir auch das Gehalt der nicht-sulfatierten Glykoproteine darstellen und einander gegenüberstellen. Die Färbung zeigte einen signifikant höheren Gehalt an sulfatierten GAGs in der primären Schultersteife im Vergleich zu der sekundären Schultersteife und den Kontrollen. Erneut kann man hier einen Unterschied in der Pathophysiologie der primären und sekundären Schultersteife erkennen. Schlussfolgernd ist bei der idiopathischen Schultersteife die erhöhte XT-1-Aktivität und das vermehrte Vorkommen des Enzyms, welches hauptsächlich bei der primären Gruppe beobachtet wurde, verantwortlich für die vermehrte Produktion von sulfatierten GAGs.

#### 4 . 2 . 4 HS2ST1 und HS6ST2 sulfatieren die GAGs in der Schultersteife

Durch die Sulfatierung der Glykosaminoglykane besteht unter anderem in vitro die Möglichkeit, sie untereinander zu vernetzen und eine erhöhte Stabilität des Gewebes zu erreichen. Dies ist auch entscheidend für die Steifigkeit des Gewebes. Es sind viele verschiedene Sulfatierungsenzyme bekannt. Wir wollten herausfinden, welches vorrangig vorhanden ist und in der Schultersteife übermäßig aktiv wird. Wir konnten mittels qRT-PCR zeigen, dass eine vergleichsweise hohe Expression der HS-modulierenden Enzyme HS2ST1 und HS6ST2 vor allem im primären Schultersteife-Gewebe existiert. Bei den sekundären Schultersteifen konnte nur eine erhöhte Expression von HS6ST2 gefunden werden. Im Vergleich dazu haben wir zudem HS3ST1 im Gewebe unserer Probanden/-innen detektieren können. Dieses war in Bezug auf die Kontrollgruppe in beiden Schultersteife-Gruppen supprimiert.

Uns ist nicht bekannt, dass bisher ähnliche Untersuchungen zur Schultersteife und der Arthrofibrose durchgeführt wurden.

Nakayama et al. zeigte einen Anstieg der beiden Enzyme HS2ST1 und HS6ST2 im Zusammenhang mit der profibrotischen Wirkung von oxidativem Stress auf

Keratinocyten [80]. HS2ST1 ist in die Synthese von Heparansulfat eingebunden und ermöglicht die 2-O-Sulfatierung.

HS6ST2 ist dafür bekannt vorwiegend im Knorpelgewebe regulatorisch zu wirken. Einige Forschungsgruppen zeigten eine Mindereexpression des Gens bei Arthrose und eine Korrelation zwischen Chondrozytenwachstum und erhöhter Expression [81–83]. HS6ST2 codiert ebenfalls ein Sulfatierungsenzym, welches in die Synthese von Heparansulfat eingebunden ist. Es übernimmt vorwiegend die 6-O-Sulfatierung.

Die verschiedenen O-sulfatierten Enden der Zuckerketten bieten spezifische Bindungspunkte für Wachstumsfaktoren, Zytokine und andere Komponenten der EZM [84]. Heparansulfat selbst ist ein wichtiger Bestandteil der EZM. Ein Überangebot an solchen freien Bindungsstellen kann folglich für einen vermehrten Wachstumsreiz im Gewebe sorgen, wie es bei der Fibrose vermutlich der Fall ist. Die entsprechenden profibrotischen Wachstumsfaktoren, wie TGF-beta und Matrix-Metalloproteasen, wurden in erhöhtem Maße bei der Schultersteife entdeckt [85].

Die weitere Erforschung der Sulfatierung der GAG und der bindenden Wachstumsfaktoren kann zukünftig zu neuen Interventionsmöglichkeiten führen, indem man den Wachstumsreiz frühzeitig zu Beginn der Schultersteife unterdrückt. Weitere Untersuchungen sollten auch eine klare Trennung von primärer und sekundärer Schultersteife vornehmen. Die Unterscheidung der Gruppen kann dazu führen, dass sie spezifischere Behandlungsempfehlungen erhalten können und zufriedenstellende Therapieerfolge erzielen. Es scheint, dass beide Entitäten auf unterschiedlichen biochemischen Prozessen beruhen. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum die primären Schultersteifen, im Gegensatz zu den Sekundären, besser auf eine konservative Therapie ansprechen.

#### **4 . 3            LOX-Aktivität und Expression in der Schultersteife gesteigert – LOX-Inhibitor als mögliche Therapie**

Durch inflammatorische Prozesse bildet sich fibrotisches Narbengewebe im Gelenk. Dieses sorgt für die Einschränkung der Bewegung und bildet sich nur schleichend wieder zurück. Es wird von der EZM gebildet. Diese besteht hauptsächlich aus Kollagensträngen, welche netzartig miteinander verbunden sind, um Stabilität zu erzeugen. Für die Verbindung solcher Quervernetzungen ist das Enzym LOX verantwortlich [60].

Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits eine Assoziation zwischen LOX-Aktivität und Fibrose in verschiedenen Organen, wie Leber, Lunge, Niere und Haut nachweisen [60, 64]. Andersherum wurde von Debret et al. am Beispiel der Haut gezeigt, dass eine Inaktivierung von LOX zu einem Verlust von Gewebestruktur führt [61]. Es ist demnach ein wichtiges Enzym für die Festigkeit und strukturelle Stabilität des Bindegewebes. Eine übermäßige LOX-Aktivität könnte, wie im Falle der Schultersteife, zu einer abnormen Steifigkeit führen.

Cohen et al. untersuchten die idiopathische Schultersteife hinsichtlich des Vorkommens mehrerer kollagen-modifizierender Enzyme, darunter LOX. Sie konnten keine signifikante Erhöhung von LOX im Schultergewebe darstellen. Jedoch war ihre Stichprobengröße ausgesprochen klein mit nur 9 Probanden/-innen [86]. Im Gegensatz zur aktuellen Studie inkludierten sie ausschließlich Patienten/-innen mit idiopathischer Schultersteife, welche konservativ und ohne Erfolg behandelt wurden. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass sowohl in den histochemischen Färbungen als auch in den RT-PCR bei der primären Schultersteife LOX übermäßig vorhanden war. Bei der sekundären Schultersteife traf dies nicht zu. Interessanterweise war die Enzymaktivität von LOX bei beiden Entitäten im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Dies weist darauf hin, dass die LOX-Aktivität unabhängig von primärer oder sekundärer Schultersteife universell mit Schulterfibrose verbunden sein könnte.

Zudem ist es möglich, dass die Expression des Gens, der Aktivität zeitlich nachhängt. Die Patienten/-innen mit primärer Schultersteife werden tendenziell in späteren Stadien nach erfolgloser konservativer Therapie operiert. Die Patienten/-innen mit einer sekundären Schultersteife bekommen aufgrund der zugrundeliegenden Schulterpathologie bereits in der frühen Entwicklung eine chirurgische Behandlung. Schlussfolgernd könnte ein Vergleich der LOX-Aktivität mit der Kontraktur des Schultergelenks sowie der Steifigkeit des fibrotischen Gewebes als Marker für den Schweregrad der Erkrankung und die Prognose des Krankheitsverlaufs nutzbar sein. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse können bei der Festlegung von Leitlinien für klinische Interventionen hilfreich sein.

In unserer Studie haben wir auch eine Korrelation zwischen LOX und GAG dargestellt. Die GAG der EZM werden durch die Sulfatierung der Zuckerreste vor dem Abbau geschützt und bieten gleichzeitig Angriffspunkte für modulierende Enzyme, wie LOX [87]. Wir nahmen an, dass ein Zusammenhang zwischen der vermehrten Sulfatierung im Gewebe der Schultersteife und der übermäßigen Aktivität von LOX besteht.

Mittels immunhistochemischer Färbung wollten wir diese Hypothese bestätigen.

LOX-Färbungen der primären Schultersteife wurden vorab mit Heparatinase behandelt um die Bindungsstellen aufzulösen. Wir konnten anschließend ein geringeres Vorkommen von LOX in den behandelten Färbungen zeigen. Dies verdeutlicht, dass LOX vorzugsweise an die sulfatierten Zuckerketten bindet und seine Aktivität mit geringerer Menge an sulfatierten GAGs vermindert sein muss.

Ähnliche Untersuchungen dieser Art sind uns zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt. Eine Inhibition des Enzyms LOX kann zu einem besseren Outcome bei Patienten/-innen mit Schultersteife führen und den Progress möglicherweise stoppen. LOX-Inhibitoren wurden bereits als mögliche Therapie für organische Fibrose, wie idiopathische Lungenfibrose, erfolgreich getestet [88]. In einer weiteren Studie wurde Simtuzumab, ein LOX-like2-Enzymhemmer, bei Lungenfibrose eingesetzt [89]. Orientierend daran besteht die Möglichkeit, intraartikuläre Injektionen mit LOX-Inhibitoren durchzuführen. Um zu diesem Ziel zu gelangen, ist jedoch noch eine umfangreiche weitere Erforschung der Funktionsweise von LOX in der Schultersteife erforderlich.



#### 4 . 4 Limitationen der Studie

Eine wichtige Einschränkung unserer Studie haben wir bereits erwähnt. Alle eingeschlossenen Patienten/-innen wiesen ein fortgeschrittenes Stadium der Schultersteife auf. Darüber hinaus erhielt nur ein Teil dieser eine konservative Therapie im Vorfeld. Darunter waren teilweise intraartikuläre Kortikosteroidinjektionen. Die enthaltenen Wirkstoffe können die Entzündungsreaktion im Gewebe vermindert haben. Die Auswahl geeigneter Teilnehmer/-innen richtete sich nach dem Operationsbedarf. Dies betraf überwiegend Patienten/-innen, die unter konservativer Therapie über einen längeren Zeitraum keine ausreichende Besserung ihrer Beschwerden erreichen konnten. Die Anwendung der verschiedenen Therapieverfahren kann den Zustand des Gewebes im Vorfeld beeinflusst haben. Trotzdem konnten wir hohe Konzentrationen der fibrotischen Enzyme XT und LOX feststellen. Diese Umstände unterstützen das Verständnis des fibrotischen Umbaus als langfristigen variablen Prozess. Die Diagnosen waren regelhaft eindeutig und der Krankheitsprozess fortgeschritten. Alle eingeschlossenen Patienten/-innen zeigten deutliche klinische Symptome. Obligat war ebenfalls intraoperative Darstellung eindeutiger makroskopischer Befunde. Ein weiterer Einfluss auf das Gewebe des/der Patienten/-innen ist der exakte Entnahmepunkt und die Entnahmetechnik. Um möglichst viele Proben zu erhalten, waren in unserer Studie mehrere Chirurgen/-innen für die Gewebeentnahme zuständig. Diese unterlag somit subjektiven Schwankungen hinsichtlich der Entnahmestelle, der Probenmenge und der Operationstechnik. Die Anzahl der Proben hing auch vom Ausmaß der Fibrose ab. Des Weiteren wurde eine postinterventionelle Beobachtung und spätere Konsultierung der Patienten/-innen im Rahmen der Studie nicht durchgeführt. Somit bestand die Möglichkeit, dass die Betroffenen zum Zeitpunkt der Operation bereits einen nicht erkannten asymptomatischen Dm hatten. Knip et al. zeigten, dass es vor der klinischen Diagnose ein asymptomatisches Stadium der Dm gibt, welches bereits Auswirkungen auf den Organismus haben kann [90]. Die Schultersteife ist eine Krankheit, die gehäuft beidseits auftritt. Außerdem sind Fälle beschrieben, bei denen eine Schultersteife ipsilateral erneut aufgetreten ist [15, 20, 22] Diese Studie berichtet nur über den aktuellen Zustand der Patienten/-innen zum Zeitpunkt der Operation. Über Rezidive in der Kohorte unserer Studie kann somit keine Aussage getroffen werden.

## 5.

# ZUSAMMENFASSUNG

Die Schultersteife ist eine Erkrankung, die zahlreiche Patienten/-innen im arbeitsfähigen Alter betreffen kann und stark im Alltag einschränkt. Verlust der Selbstständigkeit, soziale Isolation und Schlafstörungen können Folgen der Beschwerden sein. Der Krankheitsverlauf kann mehrere Jahre dauern und ist in der Regel selbstlimitierend. Klinisch wird die Schultersteife eingeteilt in eine primäre und sekundäre Form. Erstere tritt idiopathisch auf. Letztere entwickelt sich dagegen posttraumatisch. In unserer Kohorte zeigte sich eine starke Korrelation der untersuchten Stoffwechselerkrankungen mit der sekundären Schultersteife. So wiesen 36% der zugehörigen Probanden/-innen einen Dm auf. Pathophysiologisch geht die Schultersteife aus einer inflammatorischen Reaktion hervor, deren Resultat eine starke Vermehrung des Bindegewebes im Schultergelenk ist. Nach unserem Kenntnisstand ist dies die erste Studie, die die Regulation der Schultersteife durch profibrotische Enzyme wie XT-1 und LOX untersucht. Wir konnten darstellen, dass XT-1 in der primären Schultersteife im Vergleich zur Sekundären und der Kontrolle verdoppelt ist. Zudem zeigten wir, dass die GAG vermehrt in beiden Formen der Schultersteife vorkommen. Des Weiteren werden diese Zuckerketten, nach unseren Erkenntnissen, sulfatiert durch HS2ST1 und HS6ST2. Diese Sulfatierungen bieten Bindungsstellen für das Enzym LOX, welches Quervernetzungen im Gewebe aufbaut. LOX scheint für die Versteifung des Gewebes bei der Schultersteife verantwortlich zu sein. Wir konnten nachweisen, dass sich die Aktivität des Enzyms in beiden Schultersteife-Gruppen im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Schlussfolgernd ist es für zukünftige Forschungsprojekte interessant, LOX-Inhibitoren zu testen, um die Matrixvernetzung zu verringern und damit die Beweglichkeit des Schultergelenks sowohl bei der primären als auch der sekundären Schultersteife zu erhalten bzw. frühzeitig zu regenerieren. Die eingesetzten konservativen Behandlungsmethoden sollten durch zusätzliche Maßnahmen ergänzt werden, die in der Lage sind, eine Lockerung des fibrotischen Gewebes auf biochemischer Ebene herbeizuführen. Beide Komponenten könnten sich gegenseitig positiv beeinflussen. Eine weitere Untersuchung der pathophysiologischen Mechanismen der Schultersteife ist notwendig. Zur Umsetzung dessen besteht ein Bedarf an Tiermodellen für die Schultersteife. Diese würden weitere Forschungen ermöglichen.

## Literaturverzeichnis

- [1] Luime, J.J.; Koes, B.W.; Hendriksen, I.J.M. et al.: Prevalence and incidence of shoulder pain in the general population; a systematic review. *Scandinavian journal of rheumatology*. 33 (2), 73–81. (2004)
- [2] Gartsman, G.M.; Brinker, M.R.; Khan, M. et al.: Self-assessment of general health status in patients with five common shoulder conditions. *Journal of shoulder and elbow surgery*. 7 (3), 228–237. (1998)
- [3] Rumschik, U.; Wittner, B.: Topographie und funktionelle Anatomie des Schultergelenks. *OP-Journal*. 18 (3), 184–189. (2002)
- [4] Cutts, S.; Prempeh, M.; Drew, S.: Anterior shoulder dislocation. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*. 91 (1), 2–7. (2009)
- [5] Hayes, K.; Callanan, M.; Walton, J. et al.: Shoulder instability: management and rehabilitation. *The Journal of orthopaedic and sports physical therapy*. 32 (10), 497–509. (2002)
- [6] Launonen, A.P.; Lepola, V.; Flinkkilä, T. et al.: Treatment of proximal humerus fractures in the elderly: a systemic review of 409 patients. *Acta orthopaedica*. 86 (3), 280–285. (2015)
- [7] Littlewood, C.; Ashton, J.; Chance-Larsen, K. et al.: Exercise for rotator cuff tendinopathy: a systematic review. *Physiotherapy*. 98 (2), 101–109. (2012)
- [8] Garving, C.; Jakob, S.; Bauer, I. et al.: Impingement Syndrome of the Shoulder. *Deutsches Arzteblatt international*. 114 (45), 765–776. (2017)
- [9] Manske, R.C.; Prohaska, D.: Diagnosis and management of adhesive capsulitis. *Current reviews in musculoskeletal medicine*. 1 (3), 180–189. (2008)
- [10] Anton, H.A.: Frozen shoulder. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*. 39, 1773–1778. (1993)
- [11] S. Duplay: De la periarthrite scapulo-humerale. *Rev. pract. d. trav. de. med.* (53), 226. (1896)
- [12] Neviasser, T.J.: Arthrography of the Shoulder. *Orthopedic Clinics of North America*. 11 (2), 205–217. (1980)
- [13] Dias, R.; Cutts, S.; Massoud, S.: Frozen shoulder. *BMJ (Clinical research ed.)*. 331 (7530), 1453–1456. (2005)
- [14] Lundberg, B.J.: The frozen shoulder. Clinical and radiographical observations. The effect of manipulation under general anesthesia. Structure and glycosaminoglycan content of the joint capsule. Local bone metabolism. *Acta orthopaedica Scandinavica. Supplementum*. 119, 1–59. (1969)
- [15] Cho, C.-H.; Bae, K.-C.; Kim, D.-H.: Treatment Strategy for Frozen Shoulder. *Clinics in orthopedic surgery*. 11 (3), 249–257. (2019)
- [16] Neviasser, A.S.; Hannafin, J.A.: Adhesive capsulitis: a review of current treatment. *The American journal of sports medicine*. 38 (11), 2346–2356. (2010)
- [17] Grey, R.G.: The natural history of "idiopathic" frozen shoulder. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 60 (4), 564. (1978)
- [18] Binder, A.I.; Bulgen, D.Y.; Hazleman, B.L. et al.: Frozen shoulder: a long-term prospective study. *Annals of the rheumatic diseases*. 43 (3), 361–364. (1984)

- [19] Bulgen, D.Y.; Binder, A.I.; Hazleman, B.L. et al.: Frozen shoulder: prospective clinical study with an evaluation of three treatment regimens. *Annals of the rheumatic diseases*. 43 (3), 353–360. (1984)
- [20] Pogorzelski, J.; Imhoff, A.B.; Degenhardt, H. et al.: Primäre (idiopathische) Schultersteife : Definition, Krankheitsverlauf, Epidemiologie und Ätiologie. *Der Unfallchirurg*. 122 (12), 917–924. (2019)
- [21] Tamai, K.; Akutsu, M.; Yano, Y.: Primary frozen shoulder: brief review of pathology and imaging abnormalities. *Journal of orthopaedic science: official journal of the Japanese Orthopaedic Association*. 19 (1), 1–5. (2014)
- [22] Rangan, A.; Goodchild, L.; Gibson, J. et al.: Frozen Shoulder. *Shoulder & elbow*. 7 (4), 299–307. (2015)
- [23] Park, J.; Choi, Y.-H.; Chai, J.W. et al.: Anterior capsular abnormality: another important MRI finding for the diagnosis of adhesive capsulitis of the shoulder. *Skeletal radiology*. 48 (4), 543–552. (2019)
- [24] Hawi, N.; Falck, C. von; Krettek, C. et al.: Typische Veränderungen bei der „frozen shoulder“ in der bildgebenden MRT-Untersuchung. *Der Unfallchirurg*. 122 (12), 944–949. (2019)
- [25] Suh, C.H.; Yun, S.J.; Jin, W. et al.: Systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging features for diagnosis of adhesive capsulitis of the shoulder. *European radiology*. 29 (2), 566–577. (2019)
- [26] Buchbinder, R.; Hoving, J.L.; Green, S. et al.: Short course prednisolone for adhesive capsulitis (frozen shoulder or stiff painful shoulder): a randomised, double blind, placebo controlled trial. *Annals of the rheumatic diseases*. 63 (11), 1460–1469. (2004)
- [27] Rhind, V.; Downie, W.W.; Bird, H.A. et al.: Naproxen and indomethacin in peri-arthritis of the shoulder. *Rheumatology and rehabilitation*. 21 (1), 51–53. (1982)
- [28] Rangan, A.; Brealey, S.D.; Keding, A. et al.: Management of adults with primary frozen shoulder in secondary care (UK FROST): a multicentre, pragmatic, three-arm, superiority randomised clinical trial. *Lancet (London, England)*. 396 (10256), 977–989. (2020)
- [29] Bulgen, D.Y.; Binder, A.; Hazleman, B.L. et al.: Immunological studies in frozen shoulder. *The Journal of rheumatology*. 9 (6), 893–898. (1982)
- [30] Cakir, M.; Samanci, N.; Balci, N. et al.: Musculoskeletal manifestations in patients with thyroid disease. *Clinical endocrinology*. 59 (2), 162–167. (2003)
- [31] Sung, C.-M.; Jung, T.S.; Park, H.B.: Are serum lipids involved in primary frozen shoulder? A case-control study. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 96 (21), 1828–1833. (2014)
- [32] Huang, Y.-P.; Fann, C.-Y.; Chiu, Y.-H. et al.: Association of diabetes mellitus with the risk of developing adhesive capsulitis of the shoulder: a longitudinal population-based followup study. *Arthritis care & research*. 65 (7), 1197–1202. (2013)
- [33] Zreik, N.H.; Malik, R.A.; Charalambous, C.P.: Adhesive capsulitis of the shoulder and diabetes: a meta-analysis of prevalence. *Muscles, ligaments and tendons journal*. 6 (1), 26–34. (2016)

- [34] Arkkila, P.E.; Kantola, I.M.; Viikari, J.S. et al.: Shoulder capsulitis in type I and II diabetic patients: association with diabetic complications and related diseases. *Annals of the rheumatic diseases*. 55 (12), 907–914. (1996)
- [35] Bunker, T.D.; Anthony, P.P.: The pathology of frozen shoulder. A Dupuytren-like disease. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 77 (5), 677–683. (1995)
- [36] Griggs, S.M.; Ahn, A.; Green, A.: Idiopathic adhesive capsulitis. A prospective functional outcome study of nonoperative treatment. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 82 (10), 1398–1407. (2000)
- [37] Bridgman, J.F.: Periarthritis of the shoulder and diabetes mellitus. *Annals of the rheumatic diseases*. 31 (1), 69–71. (1972)
- [38] Konarski, W.; Poboży, T.; Hordowicz, M. et al.: Current concepts of natural course and in management of frozen shoulder: A clinical overview. *Orthopedic reviews*. 12 (4), 8832. (2020)
- [39] Ban, C.R.; Twigg, S.M.: Fibrosis in diabetes complications: pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers. *Vascular health and risk management*. 4 (3), 575–596. (2008)
- [40] Laslett, L.L.; Burnet, S.P.; Redmond, C.L. et al.: Predictors of shoulder pain and shoulder disability after one year in diabetic outpatients. *Rheumatology (Oxford, England)*. 47 (10), 1583–1586. (2008)
- [41] Chan, J.H.; Ho, B.S.; Alvi, H.M. et al.: The relationship between the incidence of adhesive capsulitis and hemoglobin A1c. *Journal of shoulder and elbow surgery*. 26 (10), 1834–1837. (2017)
- [42] Robinson, C.M.; Seah, K.T.M.; Chee, Y.H. et al.: Frozen shoulder. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 94 (1), 1–9. (2012)
- [43] Zuckerman, J.D.; Rokito, A.: Frozen shoulder: a consensus definition. *Journal of shoulder and elbow surgery*. 20 (2), 322–325. (2011)
- [44] Hinz, B.; Gabbiani, G.: Fibrosis: recent advances in myofibroblast biology and new therapeutic perspectives. *F1000 biology reports*. 2, 78. (2010)
- [45] Faust, I.; Traut, P.; Nolting, F. et al.: Human xylosyltransferases--mediators of arthrofibrosis? New pathomechanistic insights into arthrofibrotic remodeling after knee replacement therapy. *Scientific reports*. 5, 12537. (2015)
- [46] Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Gatto jr., G.J. et al.: Kohlenhydrate. In: Berg, Jeremy M.; Tymoczko, John L.; Gatto jr., Gregory J.; Stryer, Lubert: *Stryer Biochemie*, 373–403. Springer Spektrum: Berlin, Heidelberg. (2018)
- [47] Gandhi, N.S.; Mancera, R.L.: The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chemical biology & drug design*. 72 (6), 455–482. (2008)
- [48] Müller S.: *Untersuchungen zur biochemischen Charakterisierung der humanen Xylosyltransferase I und II*. Bielefeld University, Bielefeld, 2005
- [49] Kjellén, L.; Lindahl, U.: Proteoglycans: structures and interactions. *Annual review of biochemistry*. 60, 443–475. (1991)

- [50] Garud, D.R.; Tran, V.M.; Victor, X.V. et al.: Inhibition of heparan sulfate and chondroitin sulfate proteoglycan biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*. 283 (43), 28881–28887. (2008)
- [51] Kara Rogers: Biomolecule. *Encyclopedia Britannica* (2022), <https://www.britannica.com/science/biomolecule>; letzter Zugriff am 14.03.2023
- [52] Götting, C.; Sollberg, S.; Kuhn, J. et al.: Serum xylosyltransferase: a new biochemical marker of the sclerotic process in systemic sclerosis. *The Journal of investigative dermatology*. 112 (6), 919–924. (1999)
- [53] Kuhn, J.; Gressner, O.A.; Götting, C. et al.: Increased serum xylosyltransferase activity in patients with liver fibrosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 409 (1-2), 123–126. (2009)
- [54] Kleesiek, K.; Götting, C.: Xylosyltransferase. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik - Springer* (2018), [https://www.springermedizin.de/emedpedia/lexikon-der-medizinischen-laboratoriumsdiagnostik/xylosyltransferase?epediaDoi=10.1007%2F978-3-662-49054-9\\_3730](https://www.springermedizin.de/emedpedia/lexikon-der-medizinischen-laboratoriumsdiagnostik/xylosyltransferase?epediaDoi=10.1007%2F978-3-662-49054-9_3730); letzter Zugriff am 27.04.2023
- [55] Pönighaus, C.; Ambrosius, M.; Casanova, J.C. et al.: Human xylosyltransferase II is involved in the biosynthesis of the uniform tetrasaccharide linkage region in chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans. *The Journal of biological chemistry*. 282 (8), 5201–5206. (2007)
- [56] Munns, C.F.; Fahiminiya, S.; Poudel, N. et al.: Homozygosity for frameshift mutations in XYLT2 result in a spondylo-ocular syndrome with bone fragility, cataracts, and hearing defects. *American journal of human genetics*. 96 (6), 971–978. (2015)
- [57] Kuhn, J.; Götting, C.; Beahm, B.J. et al.: Xylosyltransferase II is the predominant isoenzyme which is responsible for the steady-state level of xylosyltransferase activity in human serum. *Biochemical and biophysical research communications*. 459 (3), 469–474. (2015)
- [58] Condac, E.; Silasi-Mansat, R.; Kosanke, S. et al.: Polycystic disease caused by deficiency in xylosyltransferase 2, an initiating enzyme of glycosaminoglycan biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (22), 9416–9421. (2007)
- [59] Bernstein, A.; Reichert, S.N.A.; Südkamp, N.P. et al.: Expression of xylosyltransferases I and II and their role in the pathogenesis of arthrofibrosis. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 15 (1), 27. (2020)
- [60] Mäki, J.M.: Lysyl oxidases in mammalian development and certain pathological conditions. *Histology and histopathology*. 24 (5), 651–660. (2009)
- [61] Debret, R.; Cenizo, V.; Aimond, G. et al.: Epigenetic silencing of lysyl oxidase-like-1 through DNA hypermethylation in an autosomal recessive cutis laxa case. *The Journal of investigative dermatology*. 130 (11), 2594–2601. (2010)
- [62] Pinnell, S.R.; Martin, G.R.: The cross-linking of collagen and elastin: enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to alpha-amino adipic-delta-semialdehyde (allysine) by an extract from bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 61 (2), 708–716. (1968)
- [63] Robins, S.P.: Biochemistry and functional significance of collagen cross-linking. *Biochemical Society transactions*. 35 (5), 849–852. (2007)

- [64] Laczko, R.; Csiszar, K.: Lysyl Oxidase (LOX): Functional Contributions to Signaling Pathways. *Biomolecules*. 10 (8), 1093. (2020)
- [65] Myllylä, R.; Wang, C.; Heikkinen, J. et al.: Expanding the lysyl hydroxylase toolbox: new insights into the localization and activities of lysyl hydroxylase 3 (LH3). *Journal of cellular physiology*. 212 (2), 323–329. (2007)
- [66] Zhang, X.; Wang, B.; Li, J.-P.: Implications of heparan sulfate and heparanase in neuroinflammation. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. 35, 174–181. (2014)
- [67] Chambler, A.F.W.; Carr, A.J.: The role of surgery in frozen shoulder. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 85 (6), 789–795. (2003)
- [68] Pettersson, K.; Gustafsson, J.A.: Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annual review of physiology*. 63, 165–192. (2001)
- [69] Gustafsson, J.A.: Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *The Journal of endocrinology*. 163 (3), 379–383. (1999)
- [70] Gruber, C.J.; Tschugguel, W.; Schneeberger, C. et al.: Production and actions of estrogens. *The New England journal of medicine*. 346 (5), 340–352. (2002)
- [71] Sarah Avery: Hormone Therapy Appears to Reduce Risk of Shoulder Pain in Older Women. *Duke University School of Medicine* (2022), <https://obgyn.duke.edu/news/hormone-therapy-appears-reduce-risk-shoulder-pain-older-women>; letzter Zugriff am 27.04.2023
- [72] Smith, L.C.; Moreno, S.; Robertson, L. et al.: Transforming growth factor beta1 targets estrogen receptor signaling in bronchial epithelial cells. *Respiratory research*. 19 (1), 160. (2018)
- [73] Itoi, E.; Arce, G.; Bain, G.I. et al.: Shoulder Stiffness: Current Concepts and Concerns. *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 32 (7), 1402–1414. (2016)
- [74] Cole, A.; Gill, T.K.; Shanahan, E.M. et al.: Is diabetes associated with shoulder pain or stiffness? Results from a population based study. *The Journal of rheumatology*. 36 (2), 371–377. (2009)
- [75] Goldin, A.; Beckman, J.A.; Schmidt, A.M. et al.: Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 114 (6), 597–605. (2006)
- [76] Goffrier B; Schulz M; Bätzing-Feigenbaum J: Administrative Prävalenzen und Inzidenzen des Diabetes mellitus von 2009 bis 2015. *Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland. Versorgungsatlas-Bericht Nr 17/03*, Berlin. (2017)
- [77] Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie e.V.: Schultersteife. *D-A-CH Vereinigung für Schulter- und Ellenbogenchirurgie e.V., Auflage 1.0* (2022), [https://register.awmf.org/assets/guidelines/187-020I\\_S2e\\_Schultersteife\\_2022-07.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/187-020I_S2e_Schultersteife_2022-07.pdf); letzter Zugriff am 27.04.2023
- [78] Kabbabe, B.; Ramkumar, S.; Richardson, M.: Cytogenetic analysis of the pathology of frozen shoulder. *International journal of shoulder surgery*. 4 (3), 75–78. (2010)

- [79] Hagiwara, Y.; Ando, A.; Onoda, Y. et al.: Coexistence of fibrotic and chondrogenic process in the capsule of idiopathic frozen shoulders. *Osteoarthritis and cartilage*. 20 (3), 241–249. (2012)
- [80] Nakayama, F.; Hagiwara, A.; Yamamoto, T. et al.: Hydrogen peroxide as a potential mediator of the transcriptional regulation of heparan sulphate biosynthesis in keratinocytes. *Cellular & molecular biology letters*. 13 (3), 475–492. (2008)
- [81] Wang, W.; Ju, X.; Sun, Z. et al.: Overexpression of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-2 enhances fibroblast growth factor-mediated chondrocyte growth and differentiation. *International journal of molecular medicine*. 36 (3), 825–832. (2015)
- [82] Guo, Y.; Min, Z.; Jiang, C. et al.: Downregulation of HS6ST2 by miR-23b-3p enhances matrix degradation through p38 MAPK pathway in osteoarthritis. *Cell death & disease*. 9 (6), 699. (2018)
- [83] Wang, W.; Zhong, B.; Sun, J. et al.: Down-regulated HS6ST2 in osteoarthritis and Kashin-Beck disease inhibits cell viability and influences expression of the genes relevant to aggrecan metabolism of human chondrocytes. *Rheumatology (Oxford, England)*. 50 (12), 2176–2186. (2011)
- [84] Haubeck, H.D.: Heparansulfat-Proteoglykane. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik - Springer* (2017), [https://www.springermedizin.de/emedpedia/lexikon-der-medizinischen-laboratoriumsdiagnostik/heparansulfat-proteoglykane?epediaDoi=10.1007%2F978-3-662-49054-9\\_1418](https://www.springermedizin.de/emedpedia/lexikon-der-medizinischen-laboratoriumsdiagnostik/heparansulfat-proteoglykane?epediaDoi=10.1007%2F978-3-662-49054-9_1418); letzter Zugriff am 27.04.2023
- [85] Lubis, A.M.T.; Lubis, V.K.: Matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinase and transforming growth factor-beta 1 in frozen shoulder, and their changes as response to intensive stretching and supervised neglect exercise. *Journal of orthopaedic science: official journal of the Japanese Orthopaedic Association*. 18 (4), 519–527. (2013)
- [86] Cohen, C.; Leal, M.F.; Belangero, P.S. et al.: The roles of Tenascin C and Fibronectin 1 in adhesive capsulitis: a pilot gene expression study. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 71 (6), 325–331. (2016)
- [87] van der Slot, A.J.; Zuurmond, A.-M.; van den Bogaerdt, A.J. et al.: Increased formation of pyridinoline cross-links due to higher telopeptide lysyl hydroxylase levels is a general fibrotic phenomenon. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. 23 (4), 251–257. (2004)
- [88] Saito, S.; Alkhatib, A.; Kolls, J.K. et al.: Pharmacotherapy and adjunctive treatment for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *Journal of thoracic disease*. 11 (14), 1740-54. (2019)
- [89] Raghu, G.; Brown, K.K.; Collard, H.R. et al.: Efficacy of simtuzumab versus placebo in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a randomised, double-blind, controlled, phase 2 trial. *The Lancet. Respiratory medicine*. 5 (1), 22–32. (2017)
- [90] Knip, M.: Natural course of preclinical type 1 diabetes. *Hormone research*. 57 (1), 6–11. (2002)



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Intraoperative Befunde des Schultergelenks physiologisch vs. pathologisch .....	6
Abbildung 2:	Schematischer Aufbau der Proteoglykane .....	11
Abbildung 3:	Strukturformeln der GAG.....	13
Abbildung 4:	Funktionsweise der Xylosyltransferase .....	15
Abbildung 5:	Intraoperative Befunde der Schultersteife .....	26
Abbildung 6:	Patientenkollektiv und Ausmaß der Bewegungseinschränkung .....	37
Abbildung 7:	Ausmaß der nebenbefundlichen Stoffwechselerkrankung (SE) in der Kohorte.....	38
Abbildung 8:	Mehr XT-1 in der primären Schultersteife im Vergleich zur sekundären Schultersteife oder dem Kontrollgewebe. ....	40
Abbildung 9:	Das Auftreten von HS6ST1 und HS2ST1 in der primären Schultersteife .....	42
Abbildung 10:	LOX-Bindung und -Aktivität sind in der primären Schultersteife erhöht. ....	44
Abbildung 11:	LOX-Immunfärbung nach Behandlung mit Heparinase .....	45

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Reagenzien und Verdünnungen.....	19
Tabelle 2:	Geräte .....	20
Tabelle 3:	Verwendete Kits .....	22
Tabelle 4:	Humane Primer für die quantitative real-time PCR.....	23
Tabelle 5:	Primäre Antikörper .....	23
Tabelle 6:	Sekundäre Antikörper.....	24
Tabelle 7:	Isotyp-Kontrollen .....	24
Tabelle 8:	Protokoll zur Entfernung des Paraffins und Rehydratation.....	28
Tabelle 9:	Reverse Transcription master mix.....	31
Tabelle 10:	Protokoll Reverse Transkription .....	31
Tabelle 11:	Reagenzien Real-Time PCR .....	32
Tabelle 12:	Protokoll qPCR.....	32
Tabelle 13:	Klinische Diagnosen und präoperative Therapien der drei Kohorten.....	36

## **Danksagungen**

In dieser Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

## **Ehrenerklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Identifizierung der biochemischen Prozesse der Schultersteife

in der Orthopädischen Universitätsklinik

mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. C. Lohmann, Prof. Dr. rer. nat. J. Bertrand

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Unterschrift

## **Darstellung des Bildungsweges**

In dieser Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

# Anhang

## Anhang 1: Ethikvotum

UNIVERSITÄTSKLINIKUM  
MAGDEBURG A.Ö.R.



OTTO VON GUERICKE  
UNIVERSITÄT  
MAGDEBURG



Ethik-Kommission, Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Leipziger Str. 44 Haus 28, 39120 Magdeburg

Herrn Prof. Dr. med. Lohmann, Frau Prof. Dr. rer. nat. Bertrand,  
Frau Dr. med. Märtens  
Orthopädische Universitätsklinik, Universitätsklinikum Magdeburg A. ö. R.  
Leipziger Str. 44  
39120 Magdeburg

Ethik-Kommission der  
Otto-von-Guericke-  
Universität an der  
Medizinischen Fakultät und  
am Universitätsklinikum  
Magdeburg A.ö.R.

Univ.-Prof. Dr. med. Christof Huth  
Vorsitzender

Dr. med. Norbert Beck  
Geschäftsführer

Datum  
30.07.2018

Telefon: +49 391 67-14314  
Telefax: +49 391 67-14354  
elektr.Fax: +49 391 67-290185  
eMail: ethikkommission@ovgu.de

Az.: 97/18

### Untersuchung des Einflusses der Xylosyltransferase (XT) auf die Entstehung der primären und sekundären Schultersteife

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Lohmann, sehr geehrte Frau Prof. Dr. Bertrand,  
sehr geehrte Frau Dr. Märtens, sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,

die Ethik-Kommission der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Magdeburg hat die übergebenen Unterlagen zur o. g. Studie überprüft, in der letzten Kommissionssitzung eingehend erörtert und ist zu der Auffassung gekommen, dass gegen die Durchführung keine ethischen Bedenken bestehen.

Diese **zustimmende Bewertung** ergeht unter dem Vorbehalt gleichbleibender Gegebenheiten.

Die Verantwortlichkeit des jeweiligen Prüfwissenschaftlers / behandelnden Prüfarztes bleibt in vollem Umfang erhalten und wird durch diese Entscheidung nicht berührt. Alle zivil- oder haftungsrechtlichen Folgen, die sich ergeben könnten, verbleiben uneingeschränkt beim Projektleiter und seinen Mitarbeitern.

Beim Monitoring sind die Bestimmungen des Bundes- und Landesdatenschutzgesetzes sowie die sich aus der ärztlichen Schweigepflicht ergebenden Einschränkungen zu beachten, was eine Aushändigung kompletter Patientenakten zum Monitoring ausschließt.

Ein Monitoring personen- und studienbezogener Daten wird dadurch nicht beeinträchtigt.

Hinsichtlich der EU-Datenschutzgrundverordnung (DSGUVU), welche ab 25.05.2018 Wirksamkeit entfaltet, werden folgende Hinweise gegeben: Datenschutzrechtliche Aspekte von Forschungsvorhaben werden durch die Ethikkommission grundsätzlich nur cursorisch geprüft. Diese Bewertung ersetzt mithin nicht die Konsultation des zuständigen Datenschutzbeauftragten.

Um die Übersendung von studienbezogenen Jahresberichten / Abschlussberichten / Publikationen wird unter Nennung unserer Registraturnummer gebeten.

Mit freundlichen Grüßen

(i. A. Dr. med. Norbert Beck, Geschäftsführer)

Prof. Dr. med. C. Huth  
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Ethik-Kommission

der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät  
und am Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R.  
Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. med. C. Huth