

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

**Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 β und
TGF- β 1 auf die Differenzierung von
Fibroblasten und zur Bedeutung von blauem
Licht beim Morbus Dupuytren**

Dissertation

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

vorgelegt von
Annika Borgschulze
(2016)

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

Gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Referent: Prof. Dr. med. Tim Lögters

Korreferent: Prof. Dr. med. Timm Filler

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Der Morbus Dupuytren ist eine proliferative Palmarfibromatose, deren Ätiologie sowie Pathogenese bis heute nicht im Detail geklärt sind. Zwar bestehen Kenntnisse über begünstigende Kofaktoren der Ätiologie wie z. B. Alkoholabusus, Diabetes mellitus, genetische Disposition etc., inwieweit diese aber wirklich eine Ursache und nicht nur eine Begleiterscheinung darstellen, ist ungeklärt. Es wird angenommen, dass die verstärkte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und eine veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM) und ihrer Komponenten (z. B. Kollagen) eine Schlüsselrolle einnehmen. Als Einflussfaktoren auf die Differenzierung und die EZM werden Zytokine, hier insbesondere TGF- β sowie Enzyme, die Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und deren Inhibitoren, die *Tissue inhibitor of metalloproteases* (TIMPs) beschrieben. Den operativen Standard stellt nach wie vor die partielle Aponeurektomie dar, doch sind Rezidive nicht selten.

Ziele dieser Arbeit waren, die Genexpression im Gewebe und den Einfluss von TGF- β 1 und IL-1 β auf die kultivierten Zellen zu untersuchen. Hierbei wurde insbesondere der Fokus auf die Homöostase von MMPs und TIMPs sowie die Zytokinexpression gelegt. Weiterführend wurde der Einfluss von TGF- β 1 und IL-1 β auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten untersucht. Hierzu wurde die Gen- und Proteinexpression analysiert. Des Weiteren ist die Relevanz einer Bestrahlung mit blauem Licht von isolierten Fibroblasten untersucht worden, um einen möglicherweise neuen Therapieansatz zu finden. Die Differenzierung wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse evaluiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von TGF- β 1 und IL-1 β einen deutlichen Einfluss auf die Genexpression und insbesondere den MMP-TIMP-Haushalt hatte. Signifikante Unterschiede ergaben sich für MMP2, MMP9 und TIMP3 (nach TGF- β 1 Stimulation) und MMP3 und TIMP3 (nach IL-1 β Stimulation). Die Ausschüttung von IL-1 α oder TGF- α 1, wie z. B. nach einer Operation, können die MMP-TIMP-Homöostase beeinflussen und den Krankheitsprogress verstärken. Des Weiteren führte die Bestrahlung (40 J/cm²) der Fibroblasten mit einer Wellenlänge von 453 nm (blaues Licht) insbesondere bei TGF- α 1 stimulierten Fibroblasten zu einer deutlichen Reduktion der α -smooth muscle actin (SMA) Proteinexpression. Die Hemmung der Differenzierung von Fibroblasten durch blaues Licht könnte insbesondere zur Tertiärprophylaxe direkt im Anschluss an einen operativen Eingriff genutzt werden, da gerade hier im Rahmen der Wundheilung und Narbenbildung hohe Konzentrationen von IL-1 α und TGF- α 1 im Gewebe exprimiert werden.

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain</i>
ADAM-TS	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin motif</i>
α-SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
°C	Celsius
cm ²	Quadratzentimeter
dest.	destilliert
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Foetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethan-Sulfonat
h	<i>hour</i> (Stunde)
HRP	Meerrettichperoxidase
IL-1β	Interleukin 1β
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
J	<i>Joule</i>
MD	Morbus Dupuytren
min	<i>minute</i> (Minute)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP2	Matrix-Metalloprotease 2
MMP3	Matrix-Metalloprotease 3
MMP9	Matrix-Metalloprotease 9
NEAA	<i>Non essential amino acids</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

PFA	Paraformaldehyd
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> -Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TIMP1	<i>Tissue inhibitor of metalloprotease 1</i>
TIMP2	<i>Tissue inhibitor of metalloprotease 2</i>
TIMP3	<i>Tissue inhibitor of metalloprotease 3</i>
TIMP4	<i>Tissue inhibitor of metalloprotease 4</i>
TNF α	<i>Tumor necrosis factors alpha</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Unit</i>
w	<i>with</i> (mit)
w/o	<i>without</i> (ohne)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Die relative Genexpression von TGF- β 2 und TIMP3 im Gewebe	31
Abb. 2 Die relative Genexpression von IL-1 β , IL-6, IL-8, MMP2, MMP3, MMP9, TIMP1, TIMP2, TIMP4 und TNF α im Gewebe.....	32
Abb. 3 Das Gleichgewicht zwischen TIMPs zu MMPs im Gewebe von MD und der Kontrolle	34
Abb. 4 Die relative mRNA-Expression von IL-1 β , IL-6, IL-8, MMP3 und TIMP3 der Kontroll- und MD-Fibroblasten nach IL-1 β Stimulation.....	35
Abb. 5 Die relative mRNA-Expression von TGF- β 2, TNF α , MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 und TIMP4 der Kontroll- und MD-Fibroblasten nach IL-1 β Stimulation.....	37
Abb. 6 Die relative mRNA-Expression von IL-1 β , TGF- β 2, MMP2, MMP9, TIMP3 und TNF α der Kontroll- und MD-Fibroblasten nach TGF- β 1 Stimulation.....	39
Abb. 7 Die relative mRNA-Expression von IL-6, IL-8, MMP3, TIMP1, TIMP2 und TIMP4 der Kontroll- und MD-Fibroblasten nach TGF- β 1 Stimulation	40
Abb. 8 Die α -SMA Proteinexpression der IL-1 β oder TGF- β 1 stimulierten MD-Fibroblasten.....	42
Abb. 9 Immunhistochemische Mikroskopaufnahmen der α -SMA-Antikörperfärbungen von MD-Fibroblasten.....	43
Abb. 10 Effekte der TGF- β 1 Stimulation auf die relative Apoptoserate der MD-Fibroblasten.....	44
Abb. 11 Toxische Effekte von blauem Licht auf die MD-Fibroblasten	45
Abb. 12 Effekte von blauem Licht auf die unstimulierten oder TGF- β 1 stimulierten MD-Fibroblasten	46
Abb. 13 Ein beispielhafter Western Blot von bestrahlten und TGF- β 1 stimulierten MD-Fibroblasten	46
Abb. 14 Effekte der Bestrahlung in MD-Fibroblasten auf die Generierung von ROS.....	47

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Definition	1
1.2	Historischer Überblick	1
1.3	Epidemiologie	1
1.4	Ätiologie.....	2
1.4.1	Heredität	2
1.4.2	Stoffwechselerkrankungen	3
1.4.3	Epilepsie	3
1.4.4	Alkoholkonsum/Nikotinkonsum	3
1.4.5	Handwerkliches Arbeiten/Manuelle Traumata.....	4
1.4.6	Immunsystem/HIV	5
1.5	Anatomie.....	5
1.6	Pathogenese.....	6
1.6.1	Myofibroblasten und das α -smooth muscle actin (SMA) Protein	6
1.6.2	Die extrazelluläre Matrix (EZM).....	6
1.6.3	Matrix-Metalloproteasen und deren Inhibitoren.....	7
1.6.4	Erhöhte Expression von Zytokinen	8
1.7	Histologische Stadien.....	9
1.8	Klinik	9
1.8.1	Symptomatik und Verlauf	9
1.8.2	Therapie	10
1.8.2.1	Konservative Therapie	10
1.8.2.2	Operative Therapie	11
1.8.3	Rezidivrate.....	11
1.9	Blaues Licht als potentiell neues Therapieverfahren für den Morbus Dupuytren .	12
1.10	Ziele der Arbeit.....	14
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Materialien	15
2.1.1	Geräte.....	15
2.1.2	Material.....	16
2.1.3	Substanzen	17
2.1.4	Puffer und Lösungen	19
2.2	Patientenproben.....	22
2.3	Zellisolation und Zellkultur	22
2.4	Zellernte	22
2.5	RNA-Isolation aus dem Gewebe.....	23
2.5.1	Enzymatische Verdauung der DNA	23
2.5.2	Synthese von cDNA	24
2.5.3	Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).....	24
2.6	Stimulation der Zellen mit IL-1 α und TGF- β	25
2.7	Bestimmung der intrazellulären Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie	25
2.8	Nachweismethoden der Differenzierung	25
2.8.1	Western Blot Analyse.....	25
2.8.1.1	Proteinbestimmung	26
2.8.1.2	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	26
2.8.1.3	Western Blotting.....	27

2.8.2	Immunhistochemie	28
2.9	Blaues Licht	29
2.9.1	Toxizitätstest.....	29
2.9.2	Bestrahlung und TGF- β 1 Behandlung	29
2.9.3	Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	30
2.10	Statistische Auswertung.....	30
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Die Genexpression im Gewebe.....	31
3.1.1	Relative Genexpression von TGF- β 2 und TIMP3 im Gewebe	31
3.1.2	Relative Genexpression von IL-1 β , IL-6, IL-8, MMP2, MMP3, MMP9, TIMP1, TIMP2, TIMP4 und TNF α , im Gewebe.....	31
3.2	Das Gleichgewicht zwischen TIMPs und MMPs	34
3.3	Der Einfluss von IL-1 β auf die Genexpression der stimulierten Morbus Dupuytren (MD)-Fibroblasten	35
3.4	Der Einfluss von TGF- β 1 auf die Genexpression der stimulierten Morbus Dupuytren (MD)-Fibroblasten	38
3.5	Der Einfluss von IL-1 β oder TGF- β 1 auf die α -SMA Proteinexpression der stimulierten Morbus Dupuytren (MD)-Fibroblasten.....	42
3.6	Die Effekte der TGF- β 1 Stimulation auf die Apoptose	43
3.7	Effekte von blauem Licht.....	44
3.7.1	Toxische Effekte des blauen Lichts.....	44
3.7.2	Die Effekte der Bestrahlung von unstimulierten und TGF- β 1 stimulierten Morbus Dupuytren (MD)-Fibroblasten	45
3.7.3	Effekte der Bestrahlung in Morbus Dupuytren (MD)-Fibroblasten auf die Generierung Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	47
4	Diskussion	48
4.1	Die mRNA-Expression im Gewebe	48
4.2	Gestörtes Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs	50
4.3	Veränderte Genexpression stimulierter Fibroblasten.....	51
4.4	Erhöhte α -SMA Proteinexpression der stimulierten Fibroblasten	54
4.5	Erhöhte Apoptoserate der stimulierten Fibroblasten	54
4.6	Die Hemmung der Differenzierung von stimulierten Fibroblasten durch blaues Licht	56
4.6.1	Toxische Wirkungen von blauem Licht	56
4.6.2	Mögliche Anwendung von blauem Licht beim Morbus Dupuytren (MD)	57
4.7	Schlussfolgerungen	58
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	60

1 Einleitung

1.1 Definition

Der Morbus Dupuytren (MD) gehört zu den gutartigen superfiziellen Fibromatosen und ist eine häufige proliferative Erkrankung der Aponeurose an der Handinnenfläche (Brenner et al., 2001). Eine Knoten- und Strangbildung in der Hohlhand mit Ausstrahlung in die Finger führt häufig zu einer Beugekontraktur (Dupuytren'sche Kontraktur) der Grund- und Mittelgelenke der Finger. Meist sind der Ring- und Kleinfinger betroffen, seltener die radialeitigen Finger. Die Erkrankung zeichnet sich durch einen chronisch-progressiven Charakter aus, wobei der Fortschritt der Erkrankung unterschiedlich schnell ist. Während bei einigen Patienten über Jahre hinweg lediglich eine geringe Knotenbildung in der Hohlhand ohne jegliche Einschränkung der Fingerbeweglichkeit vorhanden ist, beklagen andere Patienten eine deutliche und schnelle Knoten- und Strangbildung innerhalb von Monaten, die zu einer nachhaltigen und signifikanten Funktionsstörung der betroffenen Finger führt. Die Ursachen und die Pathogenese des MD sind bis heute nicht vollständig geklärt.

1.2 Historischer Überblick

Erstmalig wurde die Erkrankung von Felix Platter 1647 erwähnt, der allerdings die Erkrankung auf eine Luxation der Beugesehnen zurückführte (Verheyden, 1983). Der Londoner Chirurg Henry Cline beschrieb erste Operationstechniken und Behandlungsmethoden des MD (1808) (Greve, 2002). Astley Cooper (1822) und der französische Chirurg Guillaume Dupuytren (1831) vermuteten erstmals, dass die Beugekontraktur ihren Ursprung an der Palmaraponeurose (Grabowski, 2004) hat. Guillaume Dupuytren empfahl als Therapie die Fasziotomie und führte diese auch selbst durch (1831). Seitdem wird die Erkrankung nach Guillaume Dupuytren benannt (Brenner et al., 2001).

1.3 Epidemiologie

Die Erkrankung betrifft ungefähr 2 % der Weltbevölkerung (Hueston, 1963), wobei deutliche geografische Schwankungen in der Inzidenz vorliegen. In der nördlichen Erdhalbkugel, z. B. Mittel- und Nordeuropa (McFarlane, 2002) sowie Nordamerika tritt sie

wesentlich häufiger auf als in Asien und Afrika (Mitra and Goldstein, 1994; Sladicka et al., 1996). In Norwegen und England stellt der MD eine Volkskrankheit dar. 3-5 % aller Engländer sind betroffen (Gerber et al., 2011) und 30 % der über 60-jährigen in Norwegen (Burge, 1999). In Großbritannien tritt die Erkrankung sogar nahezu bei jedem zweiten Mann über dem 65. Lebensjahr auf. Demgegenüber ist der MD bei Schwarzafrikanern eine Seltenheit (Richard-Kadio et al., 2008). In Deutschland kommt der MD bei ca. 2 Millionen Menschen vor (Brenner, Krause-Bergmann, and Van 2001).

Männer erkranken ca. sechsmal häufiger als Frauen (Shaw et al., 2007). Insgesamt sind etwa 20 % der über 60-jährigen Männer betroffen (Hueston, 1963). Angesichts der unterschiedlichen Ausprägung und des heterogenen Verlaufs der Erkrankung bedarf jedoch nicht jeder einer Therapie. Der Inzidenzgipfel liegt bei Frauen im sechsten und bei Männern im fünften Lebensjahrzehnt (Shaw et al., 2007).

1.4 Ätiologie

Bis heute sind die Ursachen des MD nicht geklärt. Allerdings gibt es gewisse Kofaktoren, die gehäuft mit dem MD auftreten und nachfolgend beschrieben werden. Ein kausaler Zusammenhang zwischen diesen Faktoren und der Pathogenese der Erkrankung konnte jedoch bisher (noch) nicht nachgewiesen werden.

1.4.1 Heredität

Eine genetische Komponente ist wahrscheinlich. Die Erkrankung weist eine starke geographische Tendenz auf, wie z. B. in Nordeuropa (McFarlane, 2002) und im Gegensatz zu Afrika und Asien liegt in Nordeuropa eine familiäre Häufung vor. So ist die Inzidenz von Familienmitgliedern bei bereits erkrankten Verwandten entsprechend erhöht (Ling, 1963; Millesi, 1965). Es wird ein autosomal dominanter Erbgang diskutiert (Burge, 1999). Darüber hinaus tritt die Erkrankung häufig an beiden Händen auf. In einer aktuellen Studie wurden klinische Daten von 736 MD-Patienten, die sich einer Operation unterzogen, evaluiert. Die Daten zeigten, dass eine positive Familienanamnese den stärksten Einfluss auf das Alter, in dem sich die Patienten einer OP unterzogen, nimmt. Becker et al. wiesen mit dieser Studie auf die Bedeutung der genetischen Disposition für die MD-Erkrankung hin (Becker et al., 2015).

1.4.2 Stoffwechselerkrankungen

Der Diabetes mellitus I und II tritt gehäuft mit dem MD zusammen auf. Einige Autoren wie z. B. Paeslack (1962) und Rhomberg (1967) beschrieben ein gemeinsames Auftreten der Krankheiten. Auch Heathcote et al. kamen zu dem Ergebnis, dass Diabetiker mit einer gehäuften Prävalenz (42 %) vom MD betroffen sind (Heathcote et al., 1981). Eine weitere Studie von Noble (1984) wies eine sichere Assoziation zwischen MD und Diabetes mellitus auf (Noble et al., 1984). Die Autoren führten den Zusammenhang darauf zurück, dass sie innerhalb einer klinischen Studie nachweisen konnten, dass 42 % der Patienten mit Diabetes mellitus auch an MD erkrankt waren.

Nicht nur erhöhte Glucose-Spiegel, sondern auch erhöhte Cholesterin- und Triglyzerinspiegel stehen in Korrelation mit MD (Sanderson et al. 1992). Degreef et al. fanden in einer Studie mit 130 Frauen heraus, dass 39 % der Patientinnen mit MD erhöhte Cholesterinwerte aufwiesen (Degreef, Steeno, and De Smet 2008).

1.4.3 Epilepsie

Schon lange besteht die These, dass MD mit Epilepsie assoziiert ist (Pojer et al., 1972). Eine erhöhte Inzidenz von Morbus Dupuytren und Epilepsie ist in verschiedenen Studien untersucht worden. Mit einer Häufigkeit der Erkrankungen gemeinsam zwischen 8 % und 57 % (Arafa et al., 1992; Hart and Hooper, 2005). Early beschrieb 1962, dass männliche Patienten mit einem fünffach höheren Risiko und weibliche Patienten, die an Epilepsie leiden, sogar mit einem elffach höheren Risiko assoziiert sind, an MD zu erkranken (Early, 1962). Die Dupuytrensche Kontraktur wurde bei 21,6 % der 524 Patienten mit Epilepsie beobachtet. Insbesondere die idiopathische Epilepsie wurde vermehrt in Verbindung mit der Dupuytrenschen Kontraktur diagnostiziert (Stuhler et al., 1977).

1.4.4 Alkoholkonsum/Nikotinkonsum

Die Korrelation zwischen der Erkrankung und einem erhöhten Alkoholkonsum, verbunden mit einer Leberzirrhose, wird in diversen Studien diskutiert (Becker et al., 2014; Burge et al., 1997; Noble et al., 1992).

Neuere Studien bestätigen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit des Auftretens von MD, verbunden mit einem Nikotinabusus (Brenner, Krause-Bergmann, and Van 2001). Bereits

in der Vergangenheit diskutieren verschiedene Studien eine Assoziation zwischen MD und Nikotinkonsum (An et al. 1988; Burge et al. 1997).

Der mikrovaskuläre Verschluss von Gefäßen könnte ein begünstigender Faktor der MD-Erkrankung sein. Rauchen ist einer der entscheidenden Faktoren für die Entwicklung der peripheren Vaskulopathie. In einer retrograden Studie explorierten An et al. das Auftreten zwischen MD-Patienten, die sich operieren ließen und Nikotin konsumieren. Bei 68,2 % der MD-Patienten wurde auch gleichzeitig Nikotinkonsum beobachtet. Auffällig war, dass 72,1 % der männlichen Patienten Nikotin konsumieren (An et al., 1988).

Burge et al. untersuchten eine klinische Fallstudie von 222 Patienten mit MD, die sich einer Operation unterzogen. Dabei fiel auf, dass insbesondere die Patienten mit einer Dupuytrenschen Kontraktur eine Operation brauchten, die Zigaretten rauchen. Der durchschnittliche Zigarettenkonsum lag bei 16,7 *pack/years* im Vergleich zu 12,0 *pack/years* der Kontrollen (Burge et al., 1997).

1.4.5 Handwerkliches Arbeiten/Manuelle Traumata

Bereits Guillaume Dupuytren (1832) mutmaßte, dass ein Zusammenhang zwischen der Krankheit und einer chronischen Traumatisierung der Palmaraponeurose existiert (Greve, 2002). Auch Skoog vermutete, dass viele kleinere Traumata zu Einrissen in der Aponeurose führen und daraufhin vermehrt Fibroblasten aktiviert werden (Skoog, 1957). Weitere Autoren gehen davon aus, dass eine vermehrte Prävalenz der Krankheit und handwerklichem Arbeiten bzw. Traumata vorliegt (Mikkelsen 1978; Bovenzi 1994; Brenner, Krause-Bergmann, and Van 2001). Sowohl die Autoren Thomas und Clark, Liss und Storck als auch Descatha et al. führen die Hypothese auf, dass besonders Männer, die viel handwerklich und an vibrierenden Geräten arbeiten, betroffen sind (Descatha et al., 2012; Liss and Stock, 1996; Thomas and Clarke, 1992). Trotz dieser Studien gilt der MD nicht als Berufskrankheit für spezifische Berufe und eine Anerkennung des MD als solche ist außerordentlich selten.

Für einen mechanischen Einfluss auf den Krankheitsprozess spricht die klinische Erfahrung, dass ein chirurgischer Eingriff an der Hand zu einer erhöhten Auftrittswahrscheinlichkeit von MD führt (Lanzettá and Morrison, 1996). So können länger unverändert vorhandene Knoten in der Hohlhand im Anschluss an eine Operation

an der gleichen Extremität deutlich an Volumen zunehmen und die Erkrankung kann schneller voranschreiten. Lanzettá und Morrison beobachteten bei 3 klinischen Fällen, dass ein chirurgisches Trauma an der Hand die MD Erkrankung auslöste. Alle Patienten entwickelten die Dupuytren'sche Kontraktur zwischen 3 Wochen und 3 Monaten nach der Operation. Die Entwicklung der Erkrankung war nur in der Hand, die zuvor operiert worden ist und nicht auf der kontralateralen Seite erkennbar (Lanzettá and Morrison, 1996).

1.4.6 Immunsystem/HIV

Bei HIV-Patienten besteht die erhöhte Wahrscheinlichkeit zusätzlich an MD zu erkranken (Bower et al., 1990). Deshalb wird die Hypothese aufgestellt, dass Veränderungen im Immunsystem die Entstehung der Krankheit begünstigen. Menzel et al. und Neumüller zeigten Veränderungen der Antikörper gegen Kollagene (Menzel et al., 1979; Neumüller et al., 1994).

1.5 Anatomie

Die Palmaraponeurose (*Aponeurosis palmaris*) besteht aus straffem Bindegewebe, das zu einer Sehnenplatte an der beugeseitigen Hand und Finger verstärkt wird (Schünke et al., 2007). Sie wird aus einem dreidimensionalen Netzwerk gebildet und zwar aus longitudinalen, transversalen und vertikalen Fasern. Sie schützt die darunter liegenden Gefäße und Nerven zum Beispiel beim Greifen von Gegenständen (Ritter, 1973). Die Aponeurose bildet die Fortsetzung der Sehne des langen Hohlhandmuskels (*Musculus palmaris longus*) und wird von den kurzen Muskeln der Hohlhand (*Musculus palmaris brevis*) gespannt (Schünke et al., 2007).

Am proximalen Ende ist die Aponeurose mit dem *Retinaculum musculorum flexorum* verbunden und zieht distal mit den longitudinalen Bindegewebsfasern den so genannten *Fibrae longitudinales* fächerförmig zu den Köpfen der *Os metacarpale 2-5* aus. Die *Fibrae transversae* strahlen von den interdigitalen Hautfalten mit ein. Die Aponeurose ist deltaförmig angelegt. (Bojsen-Moller and Schmidt, 1974; Schiebler, 2004).

1.6 Pathogenese

Im Rahmen des MD kommt es zu einer verstärkten und undifferenzierten Bildung von Gewebe der Aponeurose. Dies betrifft sowohl die zellulären als auch extrazellulären Bestandteile. Durch eine ungeordnete Bildung beider Komponenten kommt es zur Knoten- und Strangbildung. Trotz der undifferenzierten Gewebebildung handelt es sich um eine gutartige Tumorbildung. Eine Metastasierung oder maligne Entartung ist bisher nicht bekannt (Vaerst, 2013).

1.6.1 Myofibroblasten und das α -smooth muscle actin (SMA) Protein

Die Pathogenese des MD ist wesentlich gekennzeichnet durch eine verstärkte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Bereits 1972 zeigten Gabbiani und Majno, dass in den Knoten der Palmaraponeurose vermehrt Myofibroblasten nachweisbar sind (Gabbiani and Majno, 1972).

Myofibroblasten sind besonders charakteristisch für die Wundheilung (Darby et al., 2014). Sie sind gekennzeichnet durch die Fähigkeit, sich kontrahieren zu können. Zudem enthalten sie vermehrt intrazelluläre Bündel an Mikrofilamenten (Tomasek et al., 1987). Dieses spezifische Mikrofilament zeichnet sich durch eine erhöhte α -smooth muscle actin (SMA) Proteinexpression aus (Hinz, 2007). Das α -SMA Protein findet sich auch erhöht in Dupuytrenngewebe (Bisson et al., 2003; Hindman et al., 2003) und dient als Surrogatparameter für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten lässt sich *in vitro* sowohl durch *Transforming Growth Factor- α 1* (TGF- β 1) (Bisson et al., 2009) als auch TGF- β 2 (Hinz, 2007) stimulieren.

Satish et al. postulierten, dass ein hoher Anstieg des *cyclic Adenosinmonophosphat* (cAMP) Levels dazu führt, dass die TGF- β 1 induzierte Bildung der extrazellulären Matrix (EZM)-Synthese und die Myofibroblasten Differenzierung gehemmt werden (Satish et al., 2011).

1.6.2 Die extrazelluläre Matrix (EZM)

Neben der Differenzierung sind an der Pathogenese des MD Veränderungen in der Struktur und Beschaffenheit der extrazellulären Matrix (EZM) beteiligt. Es wurde ein

gestörter Aufbau der EZM im Gewebe des MD nachgewiesen. Durch eine erhöhte Zellproliferation von Fibroblasten kommt es u. a. vermehrt zur Kollagenexpression und in deren Folge zu einem veränderten Aufbau der EZM (Bazin et al., 1980). Des Weiteren ist die Expression der Glykosamine erhöht und Strukturanalysen haben ergeben, dass die Zusammensetzung der Proteine verändert ist (Kožma et al., 2007).

1.6.3 Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und deren Inhibitoren

Matrix-Metalloproteasen (MMPs) sind an den physiologischen An- und Abbauprozessen der gesunden Aponeurose beteiligt. Es existiert eine Vielzahl von MMPs. Beim Menschen sind bisher 23 MMPs bekannt (Massova et al., 1998). Mutationen in den MMP-Genen können Ursache diverser Erbkrankheiten sein, z. B. das Torg-Winchester-Syndrom, bei dem zwei Mutationen im MMP2-Gen identifiziert wurden (Zankl et al., 2007). Bei einem Defekt im MMP13-Gen kann eine Dysplasie entstehen (Kennedy et al., 2005).

Für einige MMPs wurde ihre funktionelle Bedeutung verstanden, bei anderen liegen lediglich Kenntnisse über den Aufbau, aber nicht deren Funktion vor. MMP2 und MMP9 sind Gelatinasen, also proteolytische Enzyme, die Gelatine hydrolysieren und dadurch in ihre Bestandteile (Polypeptide, Aminosäuren) zerlegen. Sie verdauen eine Anzahl an Molekülen der extrazellulären Matrix z. B. Kollagentyp IV, V und XI und Laminin (Patterson et al., 2001). Die Aktivität der MMPs wird sowohl über das α_2 -Makroglobulin und deren Inhibitoren, die *Tissue inhibitor of matrixmetalloprotease* (TIMP) reguliert (Nagase et al., 2006).

Ein gestörtes Gleichgewicht der die EZM abbauenden MMPs und deren Inhibitoren, den TIMPs wird im Rahmen der Pathogenese des MD vermutet (Ulrich et al., 2009). TIMPs können die Synthese und Ablagerung von Kollagenen beeinflussen und maßgebend die Entstehung von Fibrosen verstärken (Kassiri et al., 2009).

Eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des MD sollen MMP2 und 14 spielen. Im Gewebe wurde eine erhöhte Expression von MMP2 und 14 nachgewiesen (Wilkinson et al., 2012). Ulrich et al. erforschten, dass die Genexpression von MMP2 sowie TIMP1 und 2 signifikant im Dupuytregewebe verstärkt sind, wohingegen bei der Untersuchung von der MMP9 Genexpression keine verstärkte Expression im MD-Gewebe zu ermitteln war (Ulrich et al., 2009, 2003). Neben der Expression der MMPs und deren Inhibitoren ist das

Gleichgewicht zwischen den funktionell korrespondierenden MMPs und TIMPs von Relevanz.

1.6.4 Erhöhte Expression von Zytokinen

Es wird angenommen, dass Zytokine wesentlichen Einfluss sowohl auf die zelluläre Differenzierung als auch die Zusammensetzung der EZM in der Pathogenese des MD besitzen. Erhöhte Konzentrationen von Zytokinen, besonders eine Überexpression von TGF- β , wurden im MD-Gewebe nachgewiesen (Baird et al., 1993). TGF- β reguliert sowohl die Produktion von Matrixproteinen (Fibronectin, Kollagen, Integrine und Glykosamine) (Zhang et al., 2008; Baird et al., 1993) als auch die Inhibition von Enzymen, wie z. B. Kollagenasen, die die EZM abbauen (Blobe et al., 2000). Außerdem spielt TGF- β eine wichtige Rolle in Entzündungs- und Fibroseprozessen (Oberringer et al., 2008). Insbesondere in der Wundheilung, z. B. nach chirurgischen Eingriffen, ist eine erhöhte Konzentration von TGF- β 1 nachweisbar (Wang et al., 1997). Die erhöhte Konzentration von TGF- β 1 in Wunden und die Tatsache, dass die Stimulation von Fibroblasten mit TGF- β 1 eine verstärkte Differenzierung zu Myofibroblasten auslöst, könnte ein Grund für die erhöhte Rezidivrate und auch für das Neuauftreten bei MD-Patienten nach chirurgischen Eingriffen sein (Bisson et al., 2003). Wong und Mudera stellen allerdings die These auf, dass extrem erhöhte TGF- β 1 Konzentrationen (20-30 ng) die Differenzierung zu Myofibroblasten hemmen und so ein negativer Feedback-Mechanismus entsteht (Wong and Mudera, 2006).

Interleukin-1 α (IL-1 α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) sind Entzündungsmediatoren, die das Wachstum von Fibroblasten (Libby et al., 1985) und die Produktion von TGF- β stimulieren (Yue et al., 1994) und somit auch die Produktion von Kollagenen und anderen extrazellulären Matrixproteinen fördern. IL-1 β wird hauptsächlich von den Monozyten im Blut produziert und ist ein Entzündungsmediator. Es zählt zu den zentralen Botenstoffen und wird vermehrt als Reaktion auf äußere Einflüsse, wie z. B. auf Lipopolysacchariden in gramnegativen Bakterienwänden, oder durch andere Pyrogene produziert und ausgeschüttet. Es kann Fieber und u. a. einen Anstieg neutrophiler Granulozyten, der Akut-Phase-Proteine und Interleukin-6 auslösen. Eine Ausschüttung von IL-1 führt auch wiederum zu einem Anstieg von IL-1 (Dinarello et al., 1987). Eine Dysregulation kann zu systemischen Krankheiten wie der idiopathischen juvenilen Arthritis führen (Dinarello and van der Meer, 2013).

Sowohl IL-1 α also auch IL-1 β sollen verstärkt im MD-Gewebe exprimiert werden und somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung des MD einnehmen (Baird et al., 1993).

1.7 Histologische Stadien

Die histologische Einteilung erfolgt in 3 Stadien (Luck, 1959). In dem ersten Stadium, dem *Proliferationsstadium*, findet man knotige, vorwiegend aus zahlreichen Myofibroblasten bestehende Gewebsverdichtungen, die sehr zellreich und gut vaskularisiert sind.

Das zweite Stadium wird als *Involutionsstadium* beschrieben. In diesem Stadium nimmt der Kollagenanteil zu. Hier sind sowohl Myofibroblasten als auch Fibroblasten zu finden. Der Anteil an Myofibroblasten nimmt jedoch ab. Haut und Gewebe werden vermehrt von Kollagenfasern durchzogen. Insbesondere der Kollagenanteil von Kollagen Typ 1 nimmt in den Phasen zu (Meister et al., 1979).

Im *Residualstadium* bilden sich die Knoten zurück und es lassen sich zellarme Stränge, die von Kollagen umgeben sind, nachweisen. Myofibroblasten sind nicht mehr oder nur vereinzelt vorhanden (Gokel and Hübner, 1977).

Die histologische Stadieneinteilung korreliert nicht zwingendermaßen mit dem klinischen Befund und gibt auch nur eingeschränkt Auskunft über die aktuelle Dynamik der Erkrankung. In allen histologischen Stadien können Einschränkungen der Fingerbeweglichkeit auftreten, oder in ihrer Ausprägung zunehmen. Zudem können Mischbilder der einzelnen Stadien an einer Hand vorliegen, so dass an einem Finger ein Proliferationsstadium, an einem anderen Finger bereits das Residualstadium vorliegt.

1.8 Klinik

1.8.1 Symptomatik und Verlauf

Von den betroffenen Patienten wird in der Regel eine Knoten- oder Strangbildung in der Hohlhand mit Ausstrahlung in den 4. oder 5. Finger der Hand bemerkt (Mikkelsen, 1976). Es können aber alle Finger betroffen sein. Diese Strangbildung mit Ausstrahlung in die Finger führt in späteren Stadien zu einer funktionellen Einschränkung der Metacarpal- und proximalen Interphalangealgelenke in Abhängigkeit des Krankheitsprogresses und zur so genannten Dupuytrenschen Kontraktur. In den meisten Fällen ist weder die Knoten- noch die Strangbildung schmerzhaft.

Die Erkrankung schreitet unterschiedlich schnell voran. Der typische Verlauf erfolgt langsam in Intervallen fortschreitend über Jahre und kann in jedem Stadium auch zum Stillstand kommen. Anhand der aktuell gängigen diagnostischen Kriterien ist der Krankheitsverlauf nur sehr schwer vorhersehbar. Der Progress wird in 5 Stadien (Stadium 0-4) nach Tubiana eingeteilt (Tubiana et al., 1968). In dem Stadium 0 sind lediglich Knoten in der Hohlhand tastbar, Kontrakturen sind nicht nachweisbar. Die Stadien 1 bis 4 richten sich nach dem Grad der Gesamtkontraktur des Fingers: Stadium 1 bis 45°, Stadium 2 bis 90°, Stadium 3 bis 135° und Stadium 4 über 135° (Tubiana et al., 1968).

1.8.2 Therapie

Zur Behandlung des MD stehen konservative und operative Therapiemethoden zur Verfügung, wobei keine dieser Therapien einen kausalen Ansatz hat.

1.8.2.1 Konservative Therapie

Es gibt verschiedene konservative Therapieansätze, die sich auf unterschiedliche Theorien der Pathogenese beziehen. Zu erwähnen sind die Applikation von Vitamin E, Dimethyl-Sulfoxid (DMSO), Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und die Verwendung von Ultraschall. Insgesamt sind die Erfolge dieser Therapien von eingeschränktem Wert und haben sich im klinischen Alltag nur bedingt etabliert (Rayan, 2008). Auch die lokale Injektion von Enzymen wie Trypsin und Hyaluronidase oder Kortikosteroide (Ketchum and Donahue, 2000) sowie physiotherapeutische Anwendungen führen zu keiner dauerhaften Besserung und können den Krankheitsverlauf nicht wesentlich positiv beeinflussen.

Injektion von Kollagenase

Vor knapp zwei Jahrzehnten wurde als neue Therapiealternative die Injektion von Kollagenasen direkt in die pathologischen Areale erstmals durchgeführt (Starkweather et al., 1996). Aktuelle Studien berichten über gute Erfolgsraten und eine hohe Patientenzufriedenheit. Demnach stieg die Beweglichkeit der betroffenen Gelenke signifikant (Hurst et al., 2009). Potentielle Risiken des Verfahrens sind sekundäre Sehnenrupturen und Rezidive. Insbesondere die Sehnenruptur stellt ein bedeutendes und funktionell hochrelevantes Risiko dar. Für diese Sehnenrupturen liegen allerdings bisher lediglich Fallberichte vor (Povlsen and Singh, 2014). In kontrollierten Studien sind

Sehnenrupturen, wenn nur sehr vereinzelt beschrieben (Gaston et al., 2015). Das Risiko scheint demnach nicht so hoch. Nachteilig sind die hohen Kosten des Medikaments.

1.8.2.2 Operative Therapie

Nadelfasziotomie

Die alleinige Durchtrennung der kontrakten Fasern erfolgt bei der Aponeurotomie. Diese kann sowohl offen als auch geschlossen vollzogen werden. Bei der geschlossenen Aponeurotomie wird der Kontraktionsstrang durch in die Haut eingestochene Nadeln (*Nadelfasziotomie*) durchtrennt. Dieses Verfahren ist minimalinvasiv und mit wenigen Nebenwirkungen verbunden. Da jedoch keine Entfernung des pathologischen Gewebes erfolgt, ist die Rezidivrate bei dieser Therapie sehr hoch (van Rijssen et al., 2012). Eine Indikation hierfür besteht z. B. bei Stadien mit vornehmlicher Strangbildung oder Patienten mit ausgeprägten Kontrakturen der Fingermittelgelenke. In diesen Fällen kann im Sinne einer neoadjuvanten Therapie durch die Nadelfasziotomie die sehr starke Kontraktur gebessert und die Erfolgchancen, der im Anschluss durchgeführten offenen Aponeurektomie, gesteigert werden.

Partielle Aponeurektomie

Die *partielle Aponeurektomie* stellt den operativen Standard dar. Bei dieser Operation entfernt man das erkrankte Gewebe einschließlich einem kleinem Sicherheitssaum der umgebenden Palmaraponeurose (Freehafer and Strong, 1963). Bei der partiellen Aponeurektomie besteht die Gefahr, dass mikroskopisch erkranktes Gewebe zurückbleibt. Im Gegensatz dazu wird bei der radikalen Aponeurektomie die gesamte Aponeurose der Hohlhand und Finger entfernt, um das Rezidivrisiko zu senken. Bei der radikalen Aponeurektomie ist allerdings aufgrund der größeren Wundfläche die Komplikationsrate höher und wird selten angewandt (Khashan et al., 2011).

Nur äußerst selten wird noch die Dermatofasziektomie mit Entfernung des erkrankten Gewebes und der darüber liegenden Haut, die Athrodeuse oder in extrem fortgeschrittenen Fällen die Amputation durchgeführt (Brotherston et al. 1994).

1.8.3 Rezidivrate

Trotz adäquater Therapie ist die Rezidivrate sehr hoch. Bei der Nadelaponeurotomie liegt sie nach fünf Jahren bei 84,9 % (van Rijssen et al., 2012). Geringere Rezidivraten werden nach der partiellen Aponeurektomie erzielt. Sie liegt innerhalb von 5 Jahren nach der Operation bei etwa 20,9 % (van Rijssen et al., 2012).

Das Problem der Rezidive ist der dann vorliegende signifikant erhöhte Anspruch an die Therapie. Postoperativ entstandene Narben und Rezidivstränge können Gefäße und Nerven umwachsen und in ihrem Verlauf verändern, dies erhöht den operativen Anspruch. Mitunter sind Hauttransplantationen notwendig.

1.9 Blaues Licht als potentiell neues Therapieverfahren für den Morbus Dupuytren (MD)

Blaues Licht emittiert zwischen einer Wellenlänge von 400-500 nm. Es wird bereits therapeutisch in der Dermatologie in der Behandlung von Akne vulgaris angewendet (Omi et al., 2004) und zeigt anti-inflammatorische Eigenschaften (Shnitkind et al., 2006). Auch in der Behandlung von Keloiden kommt es zur Anwendung. Des Weiteren weist eine Studie die Inhibition des Wachstums von Hauttumoren bei Mäusen durch blaues Licht nach (Ohara et al., 2003). Weitere Studien belegen, dass blaues Licht die Wundheilung in Rattenversuchen unterstützt (Adamskaya et al., 2011). Dennoch ist blaues Licht auch assoziiert mit der Entstehung von malignen Melanomen in Tierversuchen und Photoretinitis der Augen (Okuno et al., 2002). Oh et al. demonstrierten, dass blaues Licht die Apoptose induziert und so die frühe Entstehung von Melanomzellen reduzierte (Oh et al., 2015).

Laut einer Studie weist blaues Licht wellenlängenabhängig (410, 420 nm) Toxizitäten auf, wohingegen sich bei längeren Wellenlängen (453, 480 nm) keine toxischen Effekte darstellten (Taflinski et al., 2014). Taflinski et al. untersuchten den Einfluss von blauem Licht auf die Differenzierung von dermalen humanen Fibroblasten, stimuliert durch die TGF- β 1 Gabe und fanden heraus, dass blaues Licht die Differenzierung zu Myofibroblasten inhibiert (Taflinski et al., 2014).

Der genaue Grund für den Effekt des blauen Lichts ist noch nicht ausreichend erforscht. Es wird vermutet, dass verschiedenste Photorezeptoren oder Enzyme dafür verantwortlich

sind, wie z. B. Cytochrom C Oxidase, flavin-basierte Photosensoren, Lipofuscin oder auch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) (Taflinski et al., 2014).

Mamalis et al. 2015 zeigten eine Inhibition der Proliferation von adulten humanen Hautfibroblasten durch Bestrahlung mit blauem Licht (Mamalis et al., 2015). Sie vermuten eine Assoziation zwischen blauem Licht und dem Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis. Die Autoren mutmaßen, dass blaues Licht Keloide und andere fibrotische Hauterkrankungen (Mamalis et al., 2015) therapieren kann.

Unter Berücksichtigung der aktuellen Erkenntnisse wäre die Anwendung von blauem Licht beim MD denkbar. Hierzu liegen jedoch noch keine Untersuchungen vor.

1.10 Ziele der Arbeit

Nach wie vor ist die genaue Pathogenese des Morbus Dupuytren (MD) nicht im Detail verstanden. Zwar bestehen Kenntnisse über die Ätiologie und begünstigende Faktoren wie z. B. genetische Disposition, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Alkoholabusus etc. dieser Erkrankung, deren jeweilige Bedeutung und deren gegenseitige Beeinflussung sind jedoch noch unzureichend verstanden. Einige Autoren vermuten, dass das Zytokin TGF- β eine Schlüsselrolle einnimmt, andere postulieren, dass die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und ihrer Komponenten, z. B. das Kollagen, die Entstehung der Erkrankung mitverursacht. Auch die Matrixmetalloproteasen (MMPs) und deren Inhibitoren (TIMPs) sollen für die Entstehung der Dupuytrenschen Kontraktur mitverantwortlich sein.

Den operativen Standard stellt nach wie vor die partielle Aponeurektomie dar, doch sind Rezidive nicht selten.

Folgende Zielsetzung wurde für diese Arbeit definiert. Es sollten untersucht werden:

1. Welchen Einfluss TGF- β 1 und IL-1 β auf die MMP-TIMP-Homöostase und die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten besitzen. Hierzu wurden die Fibroblasten aus dem Gewebe isoliert und mit IL-1 β über 18 Stunden oder TGF- β 1 über 120 Stunden stimuliert und anschließend die Veränderung der mRNA-Expression (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , TGF- β 2, MMP2, MMP3, MMP9, TIMP1, TIMP2, TIMP3 und TIMP4) analysiert. Als weiterer Aspekt wurde die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten mittels der Proteinexpression von α -SMA nachgewiesen. Das α -SMA Protein diente hier als Surrogatparameter für die Differenzierung.

2. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob blaues Licht als therapeutische Option die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten hemmen kann. Hierzu wurden die Fibroblasten mit TGF- β 1 stimuliert, sowohl über 72 als auch über 120 Stunden und parallel mit blauem Licht bestrahlt. Anschließend wurde die α -SMA Proteinexpression evaluiert. Ziel war es hierbei herauszufinden, ob die Bestrahlung die α -SMA Proteinexpression verringert und somit ein inhibierender Einfluss auf die Differenzierung besteht.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Abzug	Waldner
Blotter	Life Technologies™ Blotter: <u>Novex® Semi-Dry Blotter</u>
Brutschrank	Thermo Electron Corporation HERAccl® 150
Kryo-Einfriergerät	Schmidt Laborgeräte und Umweltsimulationen Cryo-Einfriergerät (Mr. Frosty)
FACS	FACSCalibur BD Biosciences
Fuge	Thermo Scientific Haraeus Pico 17 Microcentrifuge
Fuge groß	Thermo Scientific Haraeus Megafuge 16 R
Geldokumentationsanlage	BioRad GelDoc
Heizbad	Fisher Scientific drybath
Magnetrührer	IKA® RET control/t IKAMAG® safety contro
Mikroskop	Zeiss Axiovert 40
Multipipette	Eppendorf Multipipette® plus
PCR-Gerät	7300 Real Time PCR System
pH-Meter	HANNA instruments® HI 2211 Basic pH/ORP Benchtop Meter
Photometer	Eppendorf BioPhotometer plus
Pipettboy	BRAND accu-jet® pro
Pipetten	Eppendorf Research® fix 10 - 100 µl
	Eppendorf Research® fix 100 - 1000 µl
	Eppendorf Research® fix 0,5 - 10 µl
	Thermo Scientific DH09306
Taumel-Rollenmischer	RM5-V 1750
	RM5-V80 1752
Multiplattenlesegerät	Perkin Elmer VICTOR3™ V Multilabel Counter model 1420
Nanodrop	Spectrophometer ND-1000, Nandrop
Trans-Blot System	BioRad Trans-BlotR Turbo TM
Waage	KenABJ Log NoA01 Electronic Balance Typ ABJ2204 No

	WB1150494
	Ken 440-45
Werkbank	Thermo Electron Corporation HERAsafe®
Zentrifuge	Thermo Electron Corporation Heraeus Fresco 17 Centrifuge
	Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16 R
	Thermo Scientific Heraeus Pico 17 Microcentrifuge
Power Supplier	BioRad Power Pac HC
	VWR Power Source

2.1.2 Material

0,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf Safe-Lock Tubes™ 0,5 ml
1,5 ml Reaktionsgefäße	SARSTEDT Reagiergefäß 1,5 ml EASY CAP
1,5 ml Reaktionsgefäße (safety lock)	Eppendorf Safe-Lock Tubes™ 1,5 ml
12-Well Platten	GREINER 12-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates
15 ml Falcons	GREINER bio-one Art.-Nr.: 188171
2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf Safe-Lock Tubes™ 2 ml
50 ml Falcons	GREINER bio-one Art.-Nr.: 227261
6-Well Platten	CytoOne 6-well TC plate
96-Well Platten	GREINER 96-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates
Einfrierröhrchen	GREINER bio-one Cryo.s™ Einfrierröhrchen 2 ml™
Pasteurpipetten aus Glas	BRAND GmbH + CO KG Pasteurpipetten ISO 7712
Stripetten, 10 ml	Costar® 10 mL Shorty Stripette® Serological Pipets
Stripetten, 2 ml	Costar® 2 mL Shorty Stripette® Serological Pipets
Stripetten, 25 ml	Costar® 25 mL Shorty Stripette® Serological Pipets
Stripetten, 5 ml	Costar® 5 mL Shorty Stripette® Serological Pipets
Zählkammer	Neubauer Zählkammer
Zellschaber	GREINER BioOne Cell Scraper, blue, 40 cm

2.1.3 Substanzen

2-Mercaptoethanol	SIGMA-ALDRICH® 2-Mercaptoethanol M7154 for electrophoresis
4-Nitrophenol Solution, 10mM	SIGMA 4-Nitrophenol Solution, 10 mM N7660
Acrylamid	Bio-Rad 30 % Acrylamide/Bis Solutions
Aqua dest. (steril)	Aqua B. Braun, 1000 ml
anti- β -SMA AK	Abcam
Bad Stabil	neoLab-BAD Stabil®
BSA	PAA BSA Fraction V pH 7,0
CaCl ₂	SIGMA-ALDRICH® Calcium chloride dihydrate C7902
CellTiter Blue	Promega CellTiter-Blue® Cell Viability Assay
DAKO Kit	Dako REAL™ Detection System Alkaline Phosphatase / RED Rabbit / Mouse
Dispase II	ROCHE Dispase II (neutral protease grade II)
DMSO	SIGMA-ALDRICH® Dimethyl sulfoxide D2650 - Hybridoma™, sterile-filtered, BioReagent, suitable for hybridoma, $\geq 99.7\%$
Eisessig	Merck KGaA 100062 Essigsäure 96 % zur Analyse EMSURE®
Ethanol	Merck KGaA 100974 denaturiert 1 % Methylethylketon zur Analyse EMSURE®
FCS	PAA Fetal Bovine Serum Gold
GAPDH Antikörper	Dako
Hepes	SIGMA-ALDRICH® HEPES H3375 - $\geq 99.5\%$ (titration)
IL1- β	R&D Systems
Isopropanol	Merck KGaA 818766 2-Propanol EMPLURA®
Methanol	Merck KGaA 106009 Methanol, EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur
Milchpulver	Carl Roth® Milchpulver T145.2
NaCl 0,9 %	B. Braun NaCl 0,9 %-Spüllösung
NaCl ₂	VWR® Natriumchlorid ACS, ISO, Reag.Ph.Eur
PBS	Biochrom AG PBS Phosphate Buffered Saline (Dulbecco)

	PBS-Lösung mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺
Penicillin / Streptomycin	Gibco® Penicillin-Streptomycin 100X Solution (1000 units)
Ponceau S	SERVA Electrophoresis Ponceau S
Salzsäure	Salzsäure rauchend 37 % ROTIPURAN®, 37 %, p.a., ACS, ISO
SDS	VWR® Natriumdodecylsulfat (SDS) für die Molekularbiologie
Sodium Pyruvat	Gibco® Sodium Pyruvate MEM 100 mM, liquid
β-Glycerophosphat	SIGMA-ALDRICH® β-Glycerophosphate disodium salt hydrate G9422 BioUltra, ≥99.0 % (titration)
TEMED	VWR® N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) zur Analyse
TGF-β1	ImmunoTools rh TGF-beta 1
Tris	Carl Roth® TRIS PUFFERAN®, ≥99,3 %, Buffer Grade, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-Base	Merck KGaA 648310 Tris Base, Molecular Biology Grade Calbiochem®
Tris-HCl	Merck KGaA 648310648313 Tris, Hydrochloride, ULTROL® Grade Calbiochem®
Trypsin/EDTA	Biochrom AG Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %) in PBS, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺

Genspezifische Primer

IL-1 <i>forward</i>	AGGGCCAATCCCCAGCCCTTT
IL-1 <i>reverse</i>	GCCGTGGTTTCTGTCAGGCGG
IL-6 <i>forward</i>	TGTAGCCGCCCCACACAGACA
IL-6 <i>reverse</i>	CTGCCAGTGCCTCTTTGCTGC
IL-8 <i>forward</i>	GAGTGGACCACACTGCGCCA
IL-8 <i>reverse</i>	TCCACAACCCTCTGCACCCAGT
TGF-β2 <i>forward</i>	CGAGAGGAGCGACGAAGAGTA
TGF-β2 <i>reverse</i>	CACTGAGCCAGAGGGTGTGT

TNF <i>forward</i>	CGCTCTTCTGCCTGCTGCACT
TNF <i>reverse</i>	GCCTGGGCCAGAGGGCTGATT
MMP2 <i>forward</i>	AACCAGCTGGCCTAGTGATGATGT
MMP2 <i>reverse</i>	GGCAGCCATAGAAGGTGTTTCAGGT
MMP3 <i>forward</i>	TTTTGGCCCATGCCTATGCCCC
MMP3 <i>reverse</i>	ACCCAGGGAGTGGCCAATTTTCAT
MMP9 <i>forward</i>	TCAGTGCCGGAGGCGCTCAT
MMP9 <i>reverse</i>	GGTGGTGGTTGGAGGCCGTG
TIMP1 <i>forward</i>	GACCTACACTGTTGGCTGTGA
TIMP1 <i>reverse</i>	GTCCGTCCACAAGCAATGAG
TIMP2 <i>forward</i>	AGGAAGTGGACTCTGGAAACG
TIMP2 <i>reverse</i>	CCTTCTTTCCTCCAACGTCCA
TIMP3 <i>forward</i>	CTCTGTGGCCTTAAGCTGGA
TIMP3 <i>reverse</i>	ACCGATAGTTCAGCCCCTTG
TIMP4 <i>forward</i>	TGTGGTGTGAAACTAGAAGCCA
TIMP4 <i>reverse</i>	GCTCGATGTAGTTGCACAGATG
GAPDH <i>forward</i>	CCCGCTTCGCTCTCTGCTCCT
GAPDH <i>reverse</i>	TGACCAGGCGCCCAATACGAC

2.1.4 Puffer und Lösungen

Kollagenase Puffer

0,001 M CaCl

0,005 M Glucose

0,1 M HEPES

0,12 M NaCl₂

0,05 M KCl

Fibroblastenmedium

1 % PS (Penicillin/Streptomycin)

1 % Sodium Pyruvat

1 % NEAA (Non-Essential Amino acid)

1 % Hepes

10 % FCS (*foetal calf serum*)

500 ml RPMI Medium

PCR Master-Mix

Für 1 Probe

2 µl 10x RT- Puffer

2 µl 2x d-NTP (5 mM)

1 µl Oligo dT (20 µM)

0,25 µl RNase-Inhibitor

0,25 µl Omniskript RTase

4,5 µl H₂O (RNase frei)

Proteinpuffer

RIPA-Puffer nach Abcam:

50 mM Tris pH=8

150 mM NaCl

1 % NP-40

0,5 % Na-Deoxycholat

0,1 % SDS

Dem Puffer wurden vor dem Gebrauch noch Phosphataseinhibitor und Proteininhibitor zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Western Blot

Sammelgel (1 Gel):

650 µl 30 % Acrylamid

3 ml H₂O

1,25 ml 4 x Sammelgelpuffer

10 µl TEMED

25 µl 10 % APS

10 %iges Trenngel (1 Gel):

2,5 ml 30 %iges Acrylamid
3,125 ml H₂O
1,875 ml 4 x Trenngelpuffer
10 µl TEMED
25 µl 10 % APS

Laemmli- Puffer

4xTris-glycin-SDS sample buffer
252 mmol TrisHCL pH 6,8
40 % Glycerin
8 % SDS
0,01 % Bromphenol blau + 20 % Mercaptoethanol

Laufpuffer (10x)

10 x Puffer:
30,3 g Tris (pH 8,3 - 8,8) (Endkonzentration in 1 x Puffer: 25 mM)
144,2 g Glycin (Endkonzentration in 1x Puffer: 192 mM)
10 g SDS (Endkonzentration in 1x Puffer 0,1 %)
ad 1000 ml H₂O
gebrauchsfertiger Puffer
10 x Puffer 1:10 in Aqua dest.

Tris-Glycin Transferpuffer

für 25 x Puffer:
18,2 g Tris Base (Endkonzentration in 1 x Puffer: 12 mM)
90 g Glycin (Endkonzentration in 1 x Puffer 96 mM)
500 ml H₂O

Blotting Puffer

60 ml Tris-Glycin Transferpuffer
75 ml Methanol
750 ml H₂O

2.2 Patientenproben

Die Studie wurde genehmigt von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studiennummer: 3634). Die Studie umfasste 23 Patienten mit MD, die sich einer Aponeurektomie an der Klinik für Unfall- und Handchirurgie an der Uniklinik Düsseldorf unterzogen. Gesunde Palmarfaszie von Patienten mit Karpaltunnelsyndrom diente als Kontrolle (n = 24).

2.3 Zellisolation und Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das Gewebe wurde zerkleinert und in Kollagenase Puffer (10 ml Aqua dest., 0,15g BSA und 0,02g Kollagenase Typ1) in ein steriles 50 ml Falcon gegeben.

Das Falcon wurde mit Parafilm abgeklebt und für 45-60 min bei 37 °C in das Schüttelbad gestellt. Nach 60 min wurde die Probe bei 1200 rpm bei 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das angedaute Gewebe wurde durch ein Filtersieb (100 µm) mit einem Glasstempel gedrückt. Das Zellpellet und das hinzugegebene Gewebe wurden mit 10 ml PBS resuspendiert und die Suspension wurde erneut bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Gewebe wurde mit einer Pinzette herausgenommen und in eine Petrischale überführt. Die pelletierten Zellen wurden mit Fibroblastenmedium (s. o.) resuspendiert und auch in die Petrischale gegeben. Jeden 2. Tag wurde das Medium gewechselt. Nachdem die Fibroblasten in der Petrischale konfluent (80 %) waren, sind sie geerntet worden. Die Zellen sind je nach Versuch auf 6 Well Platten bzw. 12 Well Platten ausgesät worden.

2.4 Zellernte

Die Fibroblasten wurden mit jeweils 1 ml kaltem PBS gewaschen und daraufhin mithilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die verbliebenen Zellen in den Wells wurden erneut mit 1 ml PBS aufgenommen und in das Gefäß pipettiert. Die Zellen wurden bei 1200 rpm 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt.

Bei den Proben, bei denen anschließend die Genexpression analysiert werden sollte, wurde noch 1 ml Trizol hinzugefügt und das Gefäß dann bei -80 °C eingefroren.

Für die Proteinbestimmung wurden die Zellen entsprechend ihrer Pelletgröße mit 40-60 µl *Radio-Immunoprecipitation Assay-Puffer* (RIPA) resuspendiert und bei -80 °C weggefroren.

2.5 RNA-Isolation aus dem Gewebe

Das Gewebe wurde mit dem Skalpell zerkleinert und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 1 ml Trizol (-80 °C) aufbewahrt.

Das in Trizol gelegene Gewebestück wurde mit 20 Amplitudenstößen sonifiziert, kurz stehen gelassen und dann noch mal mit 10 Stößen beschallt. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur (RT) für 5 min. Daraufhin wurde 200 µl Chloroform zugegeben und 15 sec kräftig gevortext. Die Proben wurden 3-15 min bei RT inkubiert, bis sich die Phasen deutlich voneinander trennten. Die Zentrifugation der Proben erfolgte für 15 min bei 11200 rpm (4 °C). Die farblose wässrige Phase (=RNA) wurde vorsichtig abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Übrig blieb die weiße, schmale Phase (=DNA) und die rote Phenol-Chloroform-Phase (Proteine). Zur RNA wurden 500 µl Isopropanol hinzugefügt und kräftig gevortext. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei RT inkubiert und dann für 10 min bei 11200 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet (=RNA) mit 1 ml 75 % EtOH gevortext. Die Proben wurden 7 min bei 8800 rpm und 4 °C zentrifugiert. Daraufhin wurde das EtOH abpipettiert und der Waschschrift noch einmal wiederholt. Nachdem das EtOH wiederholt abgenommen wurde, wurden die Proben kurz bei 13300 rpm zentrifugiert. Die RNA wurde ca. 5 - 10 min (RT) inkubiert, damit EtOH verdunstete, dabei durfte das Pellet nicht vollständig austrocknen.

Im Anschluss folgte die Resuspension in sterilem RNase freiem H₂O (10 µl - 50 µl je nach Pelletgröße).

2.5.1 Enzymatische Verdauung der DNA

Die enzymatische Verdauung der DNA erfolgte nach dem Protokoll Ambion „DNA-freeTM Kit“ von Applied Biosystems. Der Wärmeblock wurde auf 37 °C erwärmt. Die auf Eis gekühlten Proben wurden mit jeweils 0,1 % Volumen (1 µl) Puffer (10 x DNase Buffer) und 0,1 % Volumen (1 µl) DNase versetzt und dann für 30 min in den Thermoblock gestellt. Daraufhin wurde der Inaktivator 0,1 % Volumen pro Probe hinzugefügt und für 2

min bei RT stehen gelassen. Die Proben wurden bei 10 000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt die RNA. Der RNA Gehalt wurde mit dem NanoDrop gemessen.

2.5.2 Synthese von cDNA

Die Synthese der cDNA wurde nach dem Protokoll von Qiagen mit dem Omniscript® RT Kit (200) durchgeführt. Die Proben, die die RNA enthielten, wurden auf Eis gestellt. Es wurden jeweils 500 ng RNA und die entsprechende Menge H₂O in ein neues Gefäß überführt und gevortext. Es folgte ein Zusammenfügen von je 10 µl Probe und 10 µl des Master-Mixes in ein neues 50 µl Eppendorfgefäß. Die Proben wurden 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert. Der Master-Mix wurde wie im Material und Methodenteil beschrieben vorbereitet.

2.5.3 Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die umgeschriebenen cDNA Proben wurden verdünnt mit RNase freiem H₂O (500 ng in einem Verhältnis von 1:49).

Für jedes zu untersuchende Gen wurde aus folgenden Zusätzen ein Master-Mix hergestellt:

H ₂ O	7 µl x	Master-Mix Faktor
Primer Forward	0,75 µl x	Master-Mix Faktor
Primer Reverse	0,75 µl x	Master-Mix Faktor
Sybr Green Master	12,5 µl x	Master-Mix Faktor

Je 21 µl des Master-Mixes wurden mit jeweils 4 µl der entsprechenden Probe (bestehend aus cDNA und H₂O) versetzt und im PCR-Gerät analysiert.

Das Programm wurde gestartet. In einem ersten Schritt, der *Denaturierung*, ist die doppelsträngige DNA für 10 min auf 95 °C erhitzt worden, um so die Wasserstoffbrückenbindungen, die die DNA Stränge zusammenhalten, zu trennen.

In einem zweiten Schritt (*Primer Annealing*) wurde eine bestimmte Temperatur für 15 sec gewählt, bei diesem Schritt wird die Anlagerung der Primer an die cDNA ermöglicht. Die Temperatur ist spezifisch und abhängig von der Nukleotidabfolge der Primer.

In der letzten Phase (*Elongation*) synthetisiert die DNA-Polymerase die entsprechenden Nukleotide an die Primer. Dieser Schritt dauert ca. 60 sec bei einer Temperatur von ca. 60 °C, wobei die Dauer von der jeweiligen Länge des Transkripts abhängt.

2.6 Stimulation der Zellen mit IL-1 β und TGF- β

Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie für 18 h mit IL-1 β (500 U/ml) oder 2 ng/ml TGF- β 1 über 5 Tage stimuliert. Eine unbehandelte Kontrolle wurde mitgeführt. Die stimulierten Fibroblasten und die unbehandelte Kontrolle wurden geerntet. Die Zellpellets wurden bei -80 °C eingefroren. Es folgten die oben beschriebenen Schritte der RT-PCR.

2.7 Bestimmung der intrazellulären Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie

Sobald die Zellen konfluent waren, wurden die Fibroblasten der Kontrolle und der MD-Patienten mit und ohne TGF- β stimuliert (s.o.) und mit jeweils 2 verschiedenen Staurosporin-Konzentrationen (0,025 μ M; 0,075 μ M) für 22 h behandelt.

Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit 1 ml kaltem PBS behandelt und mit Hilfe des Zellschabers vom Boden gelöst. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die FACS Röhrchen wurden bei 1400 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Es folgte ein Zentrifugationschritt bei 1400 rpm für 5 min. Im nächsten Schritt wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen und bei 1400 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und zu den Zellen wurde 200 μ l der Propidiumiodid-Lösung (10 μ g/ml) hinzugefügt und bei RT in dunkler Umgebung für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

2.8 Nachweismethoden der Differenzierung

2.8.1 Western Blot Analyse

Um die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten zu analysieren, konnte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) die Proteine nach Größe und Ladung getrennt werden und im Anschluss wird die α -Smooth Muscle Actin (SMA) Proteinexpression im Western Blot bestimmt.

Die Zellen wurden geerntet (s.o.) und entsprechend ihrer Pelletgröße mit 40-60 µl RIPA-Puffer (Lysepuffer) resuspendiert. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C weggefroren.

2.8.1.1 Proteinbestimmung

Diese Analyse wurde mit dem PierceTM BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific (bestehend aus Biocinonsäure und 4 % Kupfersulfat) durchgeführt. Das Prinzip dieser Proteinbestimmung basiert auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch Proteine im alkalischen Milieu. Die Zellen wurden mit Ultraschall sonifiziert (hierbei werden die Zellen aufgeschlossen). Die Proben wurden in einem Verhältnis von 1:6 in PBS verdünnt und mit 200 µl des Working Reagenzes (bestehend aus Biocinonsäure und 4 % Kupfersulfat) vermischt. Um die Proteinmenge bestimmen zu können, wird ein Proteinstandard mitgeführt, der Standard wird wie die Probe angesetzt. Die Platte mit dem Standard und den Proben wurde mit einer Folie verschlossen. Dann wurden die Proben für 1 min auf dem Schüttler gemischt. Daraufhin wurden die Platten für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 562 nm mit einem PerkinElmer Victor X3 Plattenphotometer. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte anhand der Standardkurve.

2.8.1.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenn- und Sammelgel wurden wie im Material und Methodenteil beschrieben gegossen. Es wurden 12 %ige Trenngele verwendet. Die Prozentigkeit des Trenngels richtet sich nach der α -SMA Proteingröße (42 kDa). Das Trenngel wurde mit einem kleineren Sammelgel überschichtet. Je 10 µg Proteinlysate wurden zu Beginn in dem Lämmli-Puffer aufgenommen. Durch das in dem Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol werden die Disulfidbrücken reduziert und das enthaltene Natriumdodecylsulfat bildet anionische Micellen um das Protein. Die Proteinprobe wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert. Dadurch werden die Proben linearisiert und negativ geladen. Im Anschluss wurden die Proben auf Eis gestellt. Die Proben und der Proteinstandard wurden aufgetragen und zum Einlaufen der Proben in das Sammelgel wurde zuerst für 20 min eine Stromstärke von 60 mA und danach für ca. 1 h eine Stromstärke von 120 mA angelegt.

2.8.1.3 Western Blotting

Die der Größe nach aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Für jedes Gel wurden 2 Whatman Papiere und eine Nitrocellulose Membran in der Größe des entsprechenden Gels im Transferpuffer äquilibriert. Auf 1 Whatman-Papier wurde die Membran gelegt, auf die Membran das Gel platziert. Ein weiteres Whatman-Papier wurde vorsichtig auf das Gel verbracht. Dieses „Sandwich“ wurde so in die Gelkassette gelegt, dass nach Anlegung der Spannung von 25 V und 1,0 A (30 min) in einem Trans-Blot System die Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert wurden.

Die erfolgreiche Übertragung kann mittels Ponceau-S-Färbung überprüft werden. Diese färbt unspezifisch die übertragenen Proteine auf der Nitrocellulose Membran an.

Nach kurzer Inkubation der Nitrocellulose Membran mit der Ponceau-S-Gebrauchslösung wurde diese wieder abgenommen und mit Aqua dest. gewaschen, bis man die Übertragung der Proteine auf der Membran gut erkennen konnte. Die Nitrocellulose Membran wurde durch Waschen mit TBST-Puffer entfärbt.

Anschließend erfolgte das Blocking der Membran, dafür wurde diese mit einer 5%igen BSA-TBST-Lösung für 1 h bei RT inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen der Membran zu blockieren und um eine spezifische Bindung des Antikörpers an die Proteine zu ermöglichen.

Der Primärantikörper anti- α -SMA wird 1:1000 in 3 % BSA in TBST über Nacht bei 4 °C auf dem Rock'n' Roller inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST (jeweils 5 min) wurden ungebundene Antikörper entfernt. Anschließend wurde für 1 h bei RT der Sekundärantikörper auf die Membran gegeben, der mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist. Der Proteinstandard wurde mittels Zugabe eines spezifischen-Antikörpers detektiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und der gebundene Antikörper mittels Luminol detektiert.

Danach erfolgt der Nachweis des *Housekeeping*-Proteins Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Der GAPDH-Antikörper wurde 1:6000 in 3 % BSA in TBST für eine Stunde bei RT mit der Membran inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST (jeweils 5 min) wurden ungebundene Antikörper entfernt. Anschließend wurde für 1 h bei RT der Sekundärantikörper auf die Membran gegeben, der mit Meerrettichperoxidase

(HRP) konjugiert ist. Auch hierbei wurde nach der Inkubationszeit die Membran dreimal mit TBST gewaschen und der gebundene Antikörper mittels Luminol detektiert.

Mithilfe der Geldokumentationsanlage können die Bereiche auf der Nitrocellulose Membran, an welcher der Primärantikörper beziehungsweise auch der Sekundärantikörper gebunden hat, detektiert werden. Dabei wurde die Membran kurz mit Entwicklerlösung überschichtet, welche Luminol enthielt. Die HRP katalysierte die Oxidation des Luminols. Die Lumineszenz konnte unter UV-Licht detektiert werden. Mithilfe des Proteinstandards können die Proteinbanden einem Molekulargewicht zugeordnet werden. Die Membranen können lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt werden.

Bei der Auswertung wurden die Western Blots mit dem Programm Quantity One densitometrisch ausgewertet. Hierbei wurden die Werte auf das *Housekeeping*-Protein GAPDH normiert.

2.8.2 Immunhistochemie

Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden die Zellen jeweils drei und fünf Tage sowohl mit IL-1 β (500 U/ml) als auch mit TGF- β 1 (2 ng/ml) behandelt. Nach jeweils drei bzw. fünf Tagen wurde das Medium abgesaugt und mit 1 ml PBS dreimal gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 500 μ l 4 % PFA 20 min bei RT inkubiert, um diese zu fixieren. Anschließend wurde das PFA abgenommen und die Zellen wurden dreimalig mit PBS gewaschen.

Es wurden 300 μ l Triton Lösung (0,2 %) zu den Zellen hinzugefügt und 10 min bei RT stehen gelassen. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS. Das PBS wurde erneut abgesaugt und die Zellen wurden mit 4 %igem BSA Puffer (500 μ l) behandelt und anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der α -SMA-Antikörper wurde mit dem 4 %igen BSA Puffer verdünnt (1:400 Verdünnung) und 200 μ l wurden pro Well zu den Zellen zugegeben. Mit Parafilm wurde das Zellkulturgefäß verschlossen, die Zellen wurden in geschlossenen Kästen für 60 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS dreimal gewaschen.

Die weiteren Schritte wurden nach dem Herstellerprotokoll des DAKO Kits vollzogen:

Die Zellen wurden mit ca. 15 Tropfen DAKO A für 15 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden 15 Tropfen der Dako B hinzugefügt und für 15 min auf dem Objekt belassen. Anschließend wurden die Zellen erneut drei weitere Male mit PBS gewaschen und 200 µl Chromoreagenz wurde zu den Zellen gegeben, gefolgt von einer Inkubation von 20 min bei RT im Dunkeln. Nach dem Absaugen der Chromoreagenz-Lösung wurden die Zellen mit Aqua dest. gespült. Der Objektträger mit den fixierten Zellen wurde für 5 sec erst mit Hämalun, dann 5 sec mit Leitungswasser und zum Schluss in Aqua dest. geschwenkt. Die Zellen wurden nun in einer Alkoholreihe mit erst 500 µl von 70 %igem, 96 %igem, 100 %igem Ethanol entwässert und am Ende mit Xylol für jeweils 5 min inkubiert.

Mit einem Tropfen Deplex wurde das Deckgläschen mit den fixierten Zellen umgedreht auf dem Objektträger fixiert.

2.9 Blaues Licht

Alle Bestrahlungsexperimente wurden mit einer speziell von Philips Research (Aachen) hergestellten Prototyp LED (*light-emitting diode*) Lampe durchgeführt, die mit einer Wellenlänge von 453 emittiert.

2.9.1 Toxizitätstest

Die Fibroblasten wurden mit verschiedenen Dosen bestrahlt (5, 10, 20, 40, 60, 80 Joule/cm²) und mittels CellTiter-Blue (Promega, Madison, USA) wurden mögliche toxische Effekte analysiert. CellTiter-Blue (1:20) wurde mit Medium verdünnt und für 1 h bei 37 °C auf den Zellen inkubiert. Abhängig von der Zellviabilität wird Resazurin zu Resorufin reduziert. Resorufin ist ein Fluoreszenzfarbstoff. 100 µl des Überstands wurden abgenommen und die Fluoreszenzintensität mit PerkinElmer Victor X3 Plattenphotometer bestimmt.

2.9.2 Bestrahlung und TGF- β 1 Behandlung

Sowohl die Fibroblasten der MD-Patienten als auch die der Kontrollgruppe wurden entweder mit TGF- β 1 (2 ng/ml) stimuliert oder in ihrem normalen Fibroblastenmedium belassen. Von jeder Gruppe wurden Zellen entweder mit (40 Joule/cm²) bestrahlt oder zur gleichen Zeit bei RT inkubiert (Temperaturkontrolle). Während der Bestrahlungszeit wurden alle

Zellen in PBS mit Magnesium und Calcium belassen, sowohl die bestrahlten als auch die nicht-bestrahlten Zellen. Die Bestrahlung wurde täglich über drei und fünf Tage wiederholt.

Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und die α -SMA Proteinexpression wurde mittels Western Blot Analyse detektiert wie oben beschrieben.

2.9.3 Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Die Bestimmung der reaktiven Sauerstoff Spezies (reactive oxygen species, ROS) wurde unter der Verwendung von Dihydrorhodamine 123 (DHR123) durchgeführt. Die ROS oxidieren DHR123 zu seinem fluoreszierenden Derivat Rhodamine123. Nach der Bestrahlung (60 J/cm^2) wurden die Zellen für 45 min in $10 \mu\text{M}$ DHR123 Lösung mit Medium inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und die Fluoreszenz wurde $485_{\text{EX}}/535_{\text{EM}}$ im PerkinElmer Victor X3 Plattenphotometer gemessen.

2.10 Statistische Auswertung

Von den ermittelten Daten wurde ein Mittelwert errechnet und dieser wurde relativ zur Kontrolle gesetzt. Die statistischen Analysen wurden mittels gepaartem bzw. ungepaartem, zweiseitigem *t*-Test durchgeführt und die Analysen wurden in GraphPad Prism 5 ausgewertet und graphisch dargestellt. Die Darstellung der Balken zeigt in den Graphiken die Standardabweichung. Das Signifikanzlevel wurde bei $p \leq 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Die Genexpression im Gewebe

In einer ersten Versuchsreihe wurde die relative Genexpression direkt aus dem unstimulierten und unkultivierten Gewebe bestimmt.

3.1.1 Relative Genexpression von TGF- β 2 und TIMP3 im Gewebe

Die mRNA-Expression von TGF- β 2 und auch von TIMP3 war signifikant erniedrigt im Gewebe von MD-Patienten im Vergleich zu gesunder Palmaraponeurose (Abb. 1 A und B).

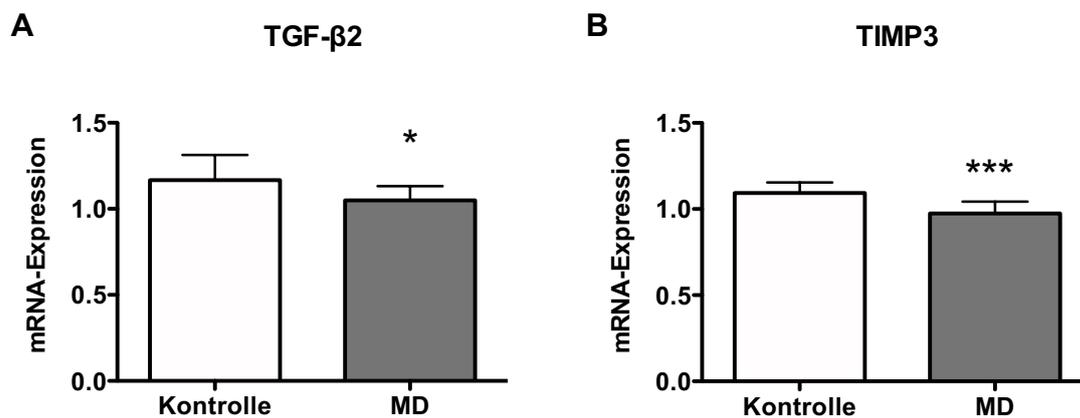
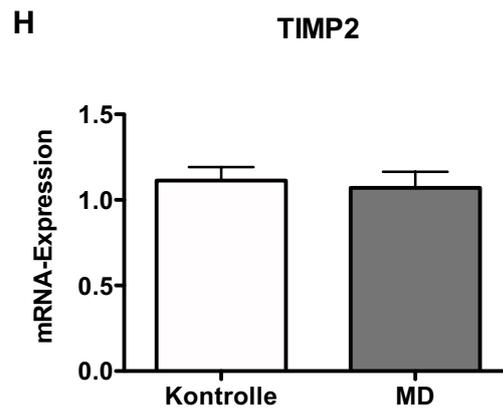
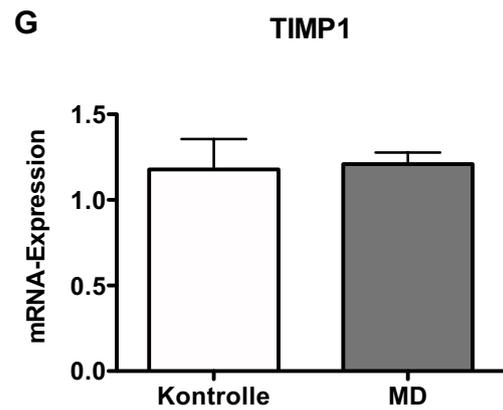
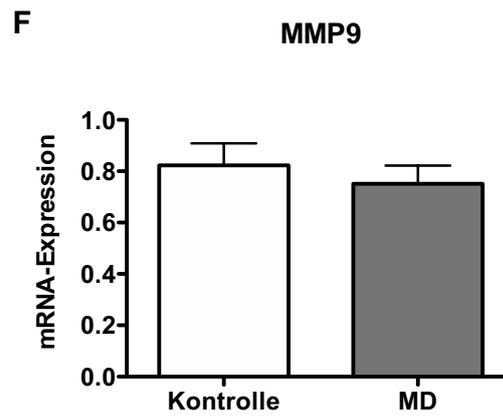
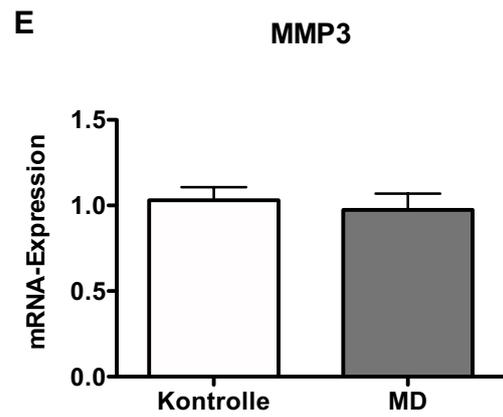
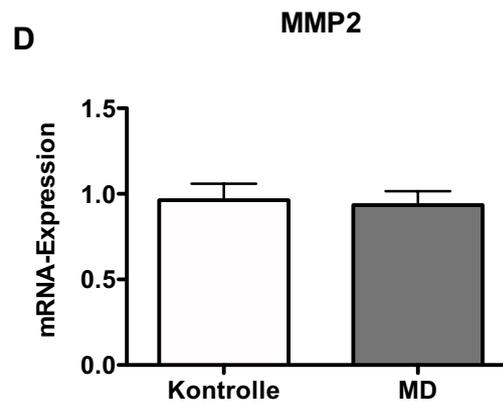
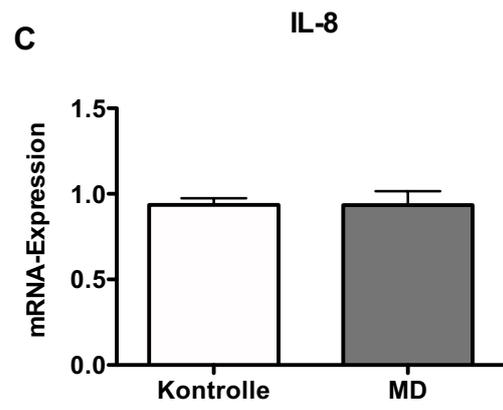
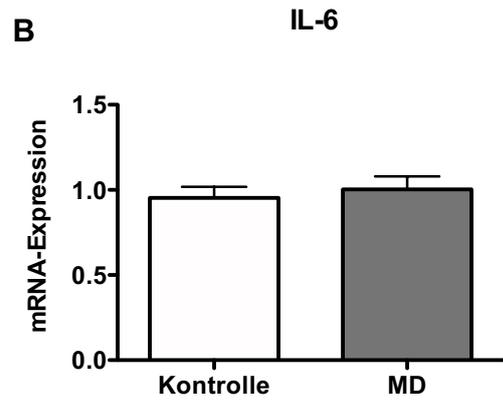
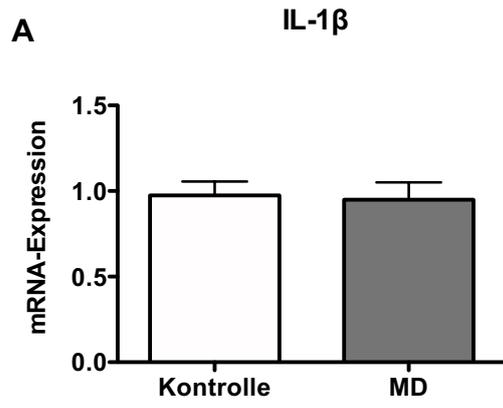


Abb. 1 Die relative Genexpression von TGF- β 2 und TIMP3 im Gewebe **A** Die mRNA-Expression von TGF- β 2 in der Palmaraponeurose (Kontrolle; n=9) und im Gewebe von Morbus Dupuytren (MD; n=12) **B** Die mRNA-Expression von TIMP3 in der Palmaraponeurose (Kontrolle; n=11) und im Gewebe von Morbus Dupuytren (MD; n=16). Die Genexpression wurde gemessen und auf das *Housekeeping*-Gen Glycerinaldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) normiert. Siehe genaue Beschreibung unter Material und Methoden.* p < 0,05; *** p < 0,0005.

3.1.2 Relative Genexpression von IL-1 β , IL6, IL-8, TNF α , MMP2, MMP3, MMP9, TIMP1, TIMP2 und TIMP4 im Gewebe

Demgegenüber wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen für die Parameter IL-1 β , IL6, IL-8, MMP2, MMP3, MMP9, TIMP1, TIMP2, TIMP4 und TNF α nachgewiesen (Abb. 2 A bis 2 J). Eine signifikante Veränderung der Expression von MMPs konnte insgesamt nicht festgestellt werden, wobei man eine Tendenz erkennen kann. Im MD-Gewebe war die Expression von MMP2, 3 und 9 erniedrigt.



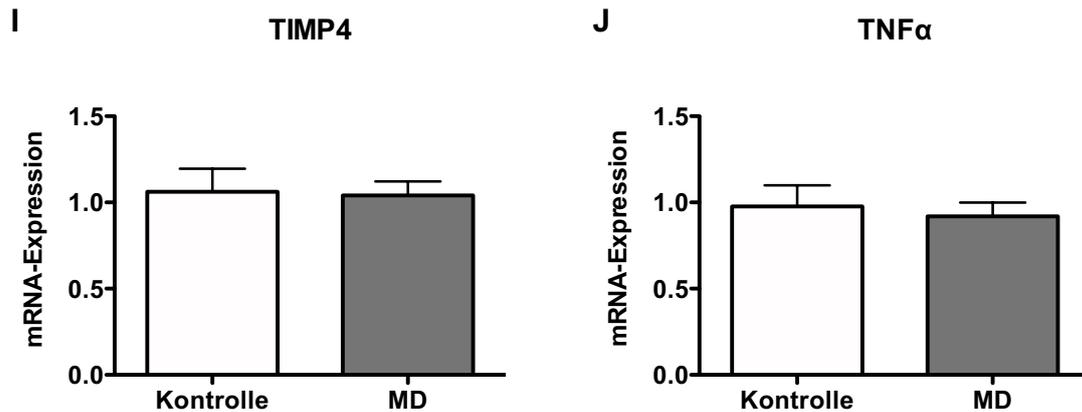


Abb. 2 Die relative Genexpression von IL-1 β , IL-6, IL-8, MMP2, MMP3, MMP9, TIMP1, TIMP2, TIMP4 und TNF α im Gewebe. **A** Die mRNA-Expression von IL-1 β im Gewebe von der Kontrolle (n=5) und MD (n=17) **B** Die mRNA-Expression von IL-6 im Kontrollgewebe (n=7) und im Gewebe von MD (n=13). **C** Die mRNA-Expression von IL-8 im Gewebe von der Kontrolle (n=8) und MD (n=14) **D** Die mRNA-Expression von MMP2 im Kontrollgewebe (n=8) und im Gewebe von MD (n=10). **E** Die Expression von MMP3 im Gewebe von der Kontrolle (n=10) und MD (n=10) **F** Die mRNA-Expression von MMP9 im Kontrollgewebe (n=7) und im Gewebe von MD (n=8). **G** Die Expression von TIMP1 im Gewebe von der Kontrolle (n=11) und MD (n=16) **H** Die mRNA-Expression von TIMP2 im Kontrollgewebe (n=11) und im Gewebe von MD (n=16). **I** Die mRNA-Expression von TIMP4 im Gewebe von der Kontrolle (n=11) und MD (n=15) **J** Die mRNA-Expression von TNF α im Kontrollgewebe (n=6) und im Gewebe von MD (n=14). Die Genexpression wurde gemessen und auf das *Housekeeping*-Gen Glycerinaldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) normiert. * p < 0,05; *** p < 0,0005.

3.2 Das Gleichgewicht zwischen TIMPs und MMPs

Für die Homöostase der extrazellulären Matrix ist ein Gleichgewicht zwischen den MMPs und deren Inhibitoren, den TIMPs, notwendig. In einer weiterführenden Analyse wurde daher das Verhältnis von MMPs und TIMPs ermittelt. Das Gleichgewicht in der Genexpression von TIMP1 zu MMP3 und TIMP1 zu MMP9 ergab eine signifikante Erhöhung im Gewebe des MD im Vergleich zum Kontrollgewebe (Abb. 3 A und B). Abb. 3 C und D demonstrieren das Verhältnis von TIMP3 zu MMP2 und MMP3. Dies war im MD-Gewebe signifikant reduziert im Gegensatz zum Verhältnis von TIMP3 zu MMP2 und TIMP3 zu MMP3 im Kontrollgewebe (Abb. 3 C und D).

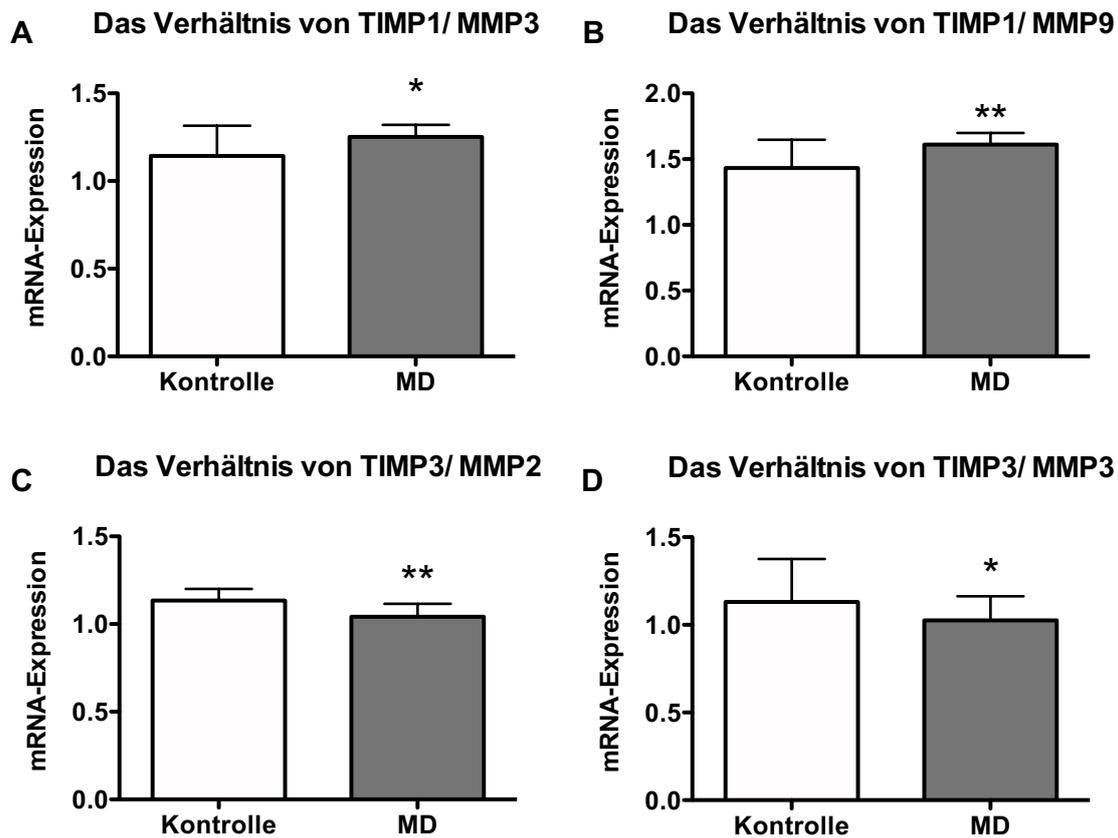
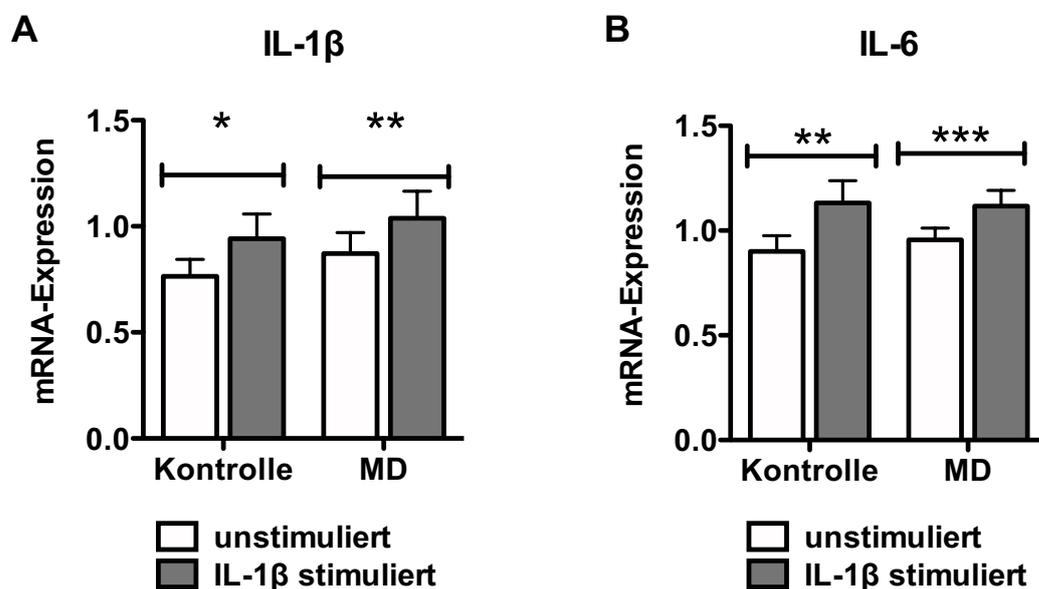


Abb. 3 Das Gleichgewicht zwischen TIMPs zu MMPs im Gewebe von MD und der Kontrolle. **A** Das Verhältnis von TIMP1 zu MMP3 im Gewebe von der Kontrolle (n=11) und MD (n=16) **B** Das Verhältnis von TIMP1 zu MMP9 im Kontroll- (n=11) und MD-Gewebe (n=16). **C** Das Verhältnis von TIMP3 zu MMP2 im Gewebe der Kontrolle (n=10) und MD (n=16). **D** Das Verhältnis von TIMP3 zu MMP3 im Kontroll- (n=10) und MD-Gewebe (n=16). Die Genexpression wurde gemessen und auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH normiert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

3.3 Der Einfluss von IL-1 β auf die Genexpression der stimulierten Morbus Dupuytren (MD)-Fibroblasten

Zwar konnte im MD-Gewebe keine veränderte mRNA-Expression von IL-1 β in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, jedoch ist IL-1 β ein inflammatorisches Zytokin, dem eine Bedeutung in der Pathogenese des MD zugeschrieben wird (Baird et al., 1993). In einer zweiten Versuchsreihe sollte daher bestimmt werden, welchen Einfluss die Stimulation mit IL-1 β (über 18 h) auf isolierte Fibroblasten besitzt. Hierzu wurden Fibroblasten isoliert und die Genexpression nachfolgender Parameter beim MD bestimmt. Die Genexpression von IL-1 β , IL-6, IL-8 und MMP3 wies einen signifikanten Anstieg nach IL-1 β Stimulation in den MD-Fibroblasten und den Kontrollfibroblasten im Vergleich zu den unstimulierten Fibroblasten auf (Abb. 4 A, B, C, D). Des Weiteren erzeugte die Stimulation mit IL-1 β eine signifikante Reduktion der TIMP3 Expression in MD-Fibroblasten (Abb. 4 E).



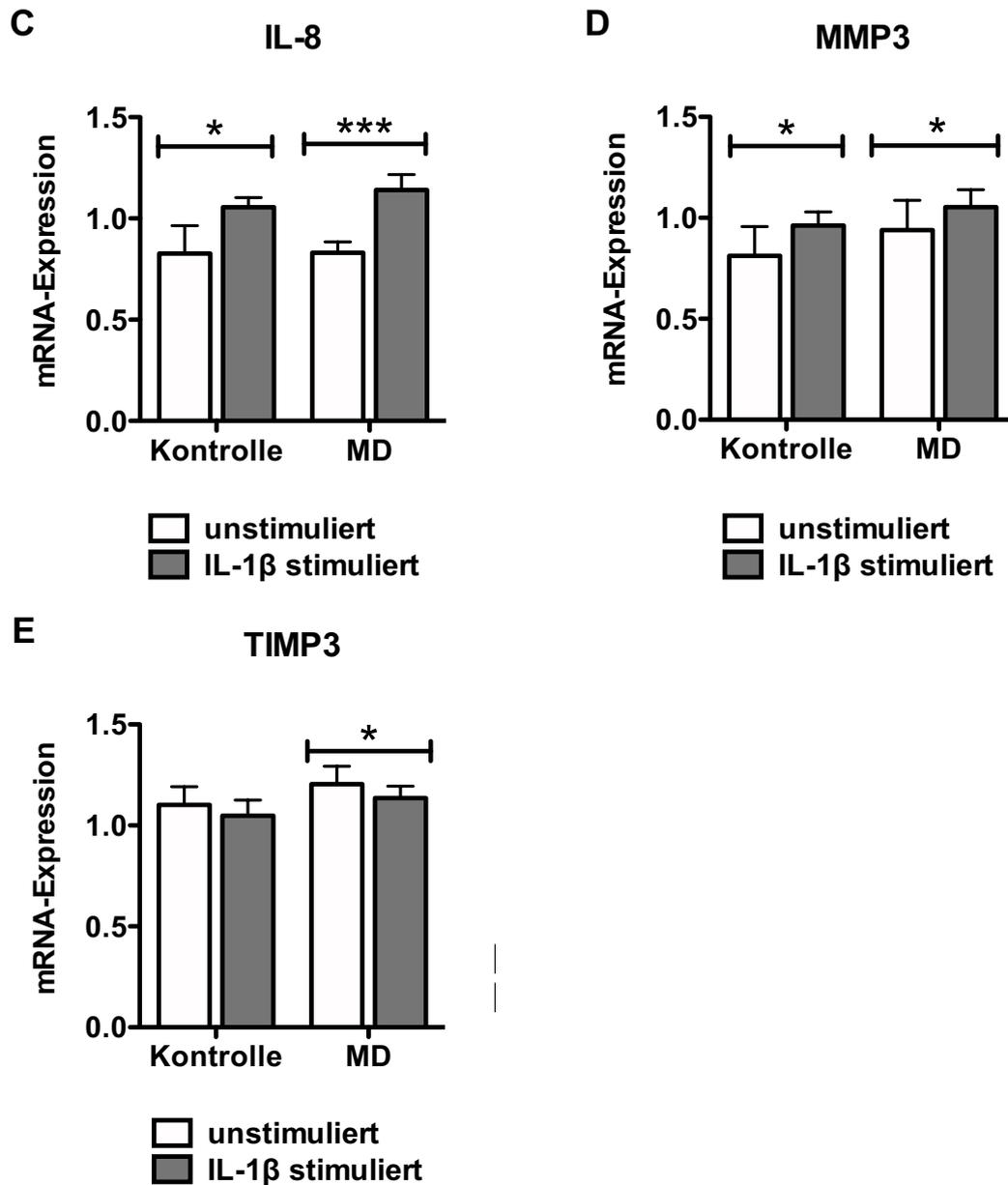
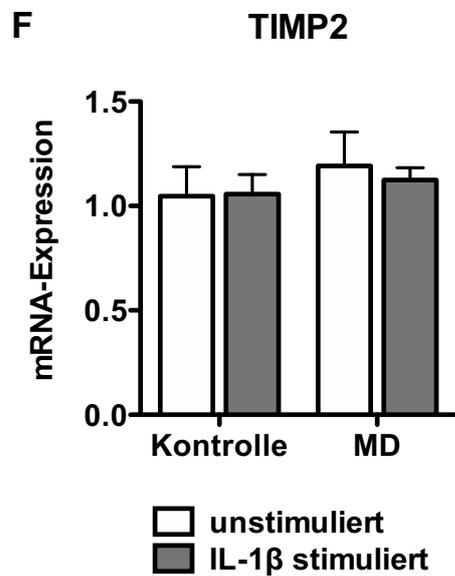
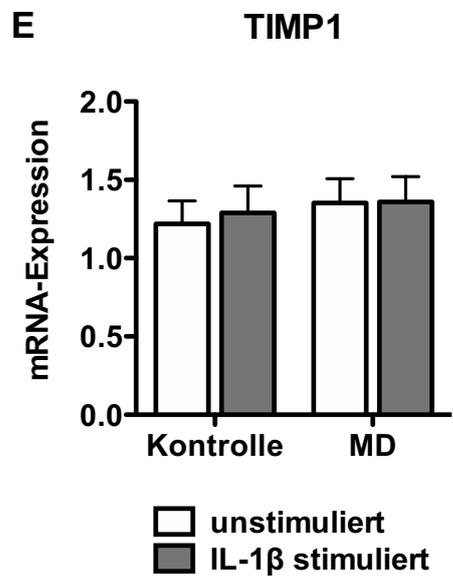
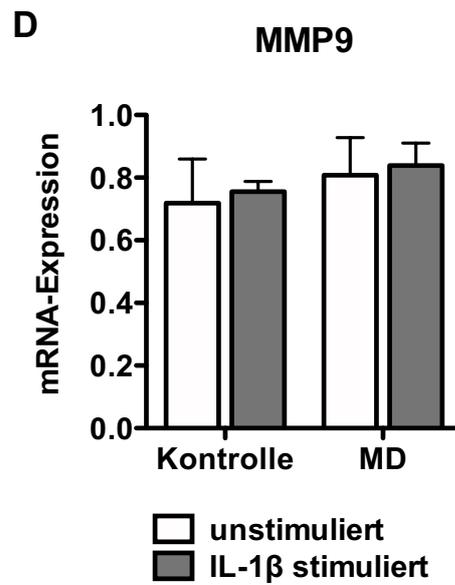
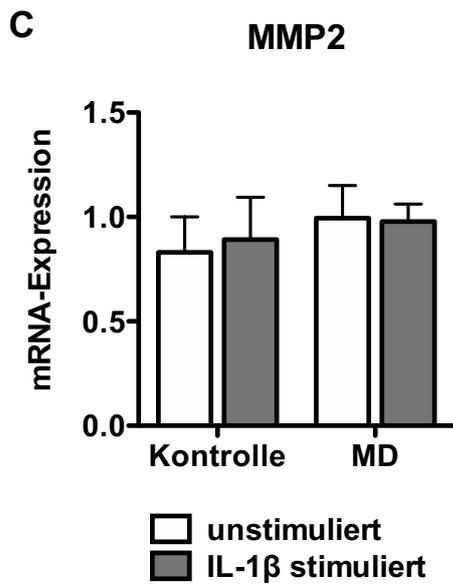
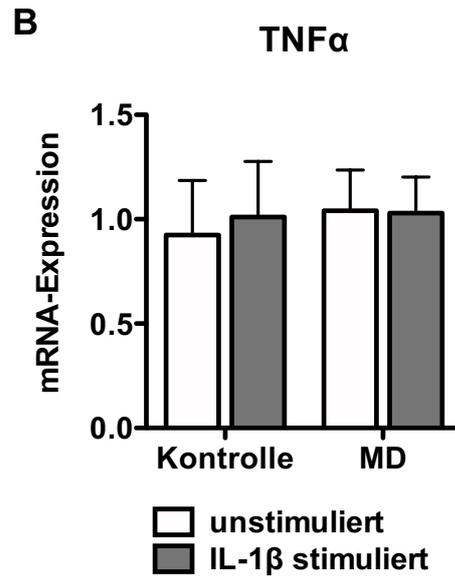
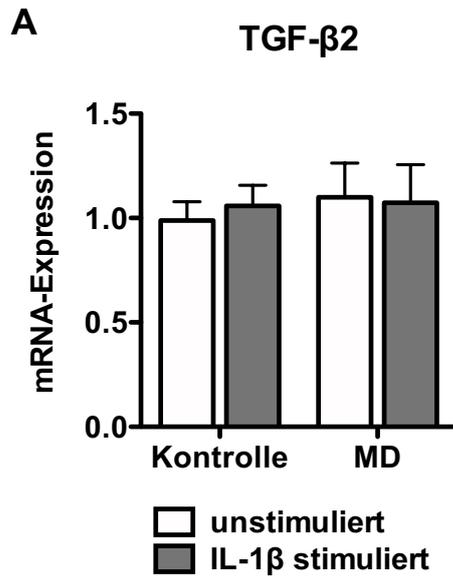


Abb. 4 Die relative mRNA-Expression von IL-1 β , IL-6, IL-8, MMP3 und TIMP3 der Kontroll- und MD-Fibroblasten nach IL-1 β Stimulation. **A** IL-1 β Genexpression von unstimulierten und IL-1 β stimulierten Kontrollfibroblasten (Kontrolle; n=5) und MD-Fibroblasten (MD; n=9) **B** IL-6 Genexpression von unstimulierten und stimulierten Kontrollfibroblasten (Kontrolle; n=5) und MD-Fibroblasten (MD; n=12) **C** IL-8 Genexpression von unstimulierten und stimulierten Kontrollfibroblasten (Kontrolle; n=6) und MD-Fibroblasten (MD; n=11) **D** MMP3 Genexpression von unstimulierten und stimulierten Kontrollfibroblasten (Kontrolle; n=5) und MD-Fibroblasten (MD; n=10). **E** TIMP3 Genexpression von unstimulierten und stimulierten Kontrollfibroblasten (Kontrolle; n=5) und MD-Fibroblasten (MD; n=9) **A-E** Die Expression wurde gemessen und auf GAPDH normiert. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0005$.

Die Abbildung 5 visualisiert die Genexpression von TGF- β 2, TNF α , MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 und TIMP4 unter der Gabe von IL-1 β . Durch die IL-1 β Stimulation ließen sich keine Veränderungen in der mRNA-Expression beobachten (Abb. 5 A-G).



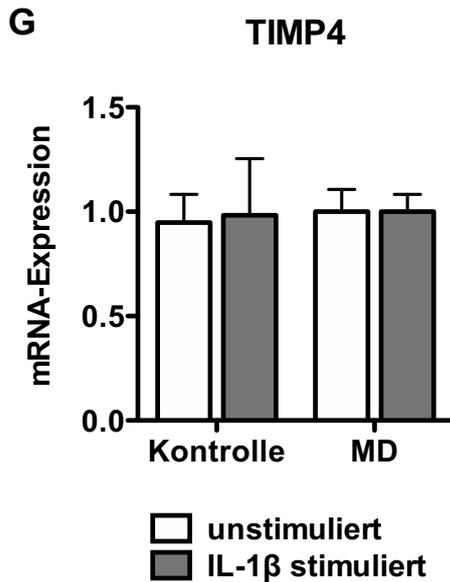
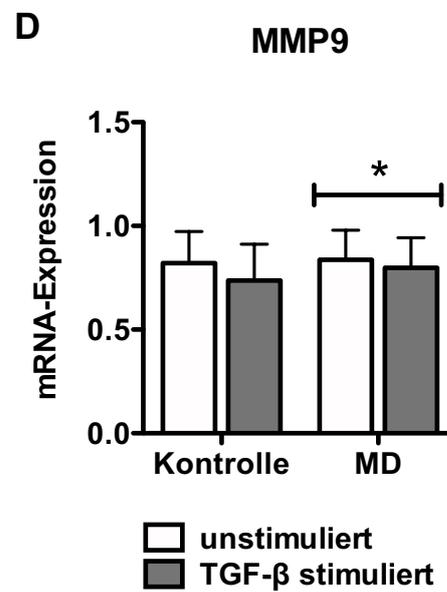
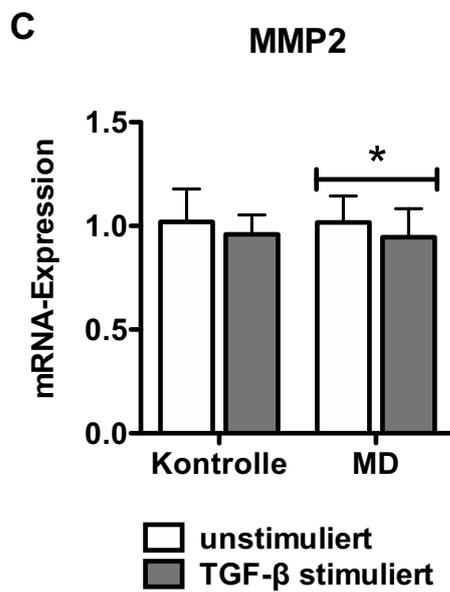
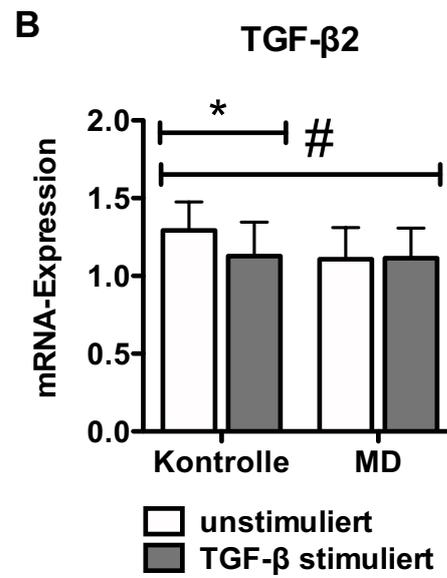
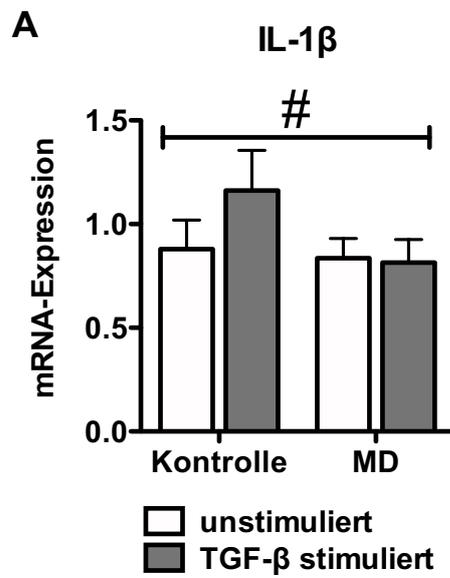


Abb. 5 Die relative mRNA-Expression von TGF- β 2, TNF α , MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 und TIMP4 der Kontroll- und MD-Fibroblasten nach IL-1 β Stimulation. **A** TGF- β 2 Genexpression von unstimulierten und stimulierten Kontrollfibroblasten (Kontrolle; n=5) und MD-Fibroblasten (MD; n=13) **B** TNF α mRNA-Expression von unstimulierten und stimulierten Kontrollfibroblasten (Kontrolle; n=5) und MD-Fibroblasten (MD; n=8) **C** MMP2 Genexpression von unstimulierten und stimulierten Kontrollfibroblasten (Kontrolle; n=5) und MD-Fibroblasten (MD; n=7) **D** MMP9 Expression von unstimulierten und stimulierten Kontrollfibroblasten (Kontrolle; n=5) und MD-Fibroblasten (MD; n=9). **E** TIMP1 Genexpression von unstimulierten und stimulierten Kontrollfibroblasten (Kontrolle; n=6) und MD-Fibroblasten (MD; n=10). **F** TIMP2 Genexpression von unstimulierten und stimulierten Kontrollfibroblasten (Kontrolle; n=5) und MD-Fibroblasten (MD; n=9). **G** TIMP4 Expression von unstimulierten und stimulierten Kontrollfibroblasten (Kontrolle; n=5) und MD-Fibroblasten (MD; n=10). **A-G** Die mRNA-Expression wurde gemessen und auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH normiert.

3.4 Der Einfluss von TGF- β 1 auf die Genexpression der stimulierten Mobus Dupuytren (MD)-Fibroblasten

Eine verstärkte Expression von TGF- β (Baird et al., 1993) sowie der Spleißvariante TGF- β 2 (Baird et al., 1993; Zhang et al., 2008) wird im MD-Gewebe angenommen, wohingegen wir eine erniedrigte TGF- β 2 Genexpression feststellten. Dass TGF- β eine gestörte Regulation zeigt und eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielt, ist unumstritten. Der Einfluss von TGF- β 1 auf den MMP-Haushalt beim MD hingegen ist noch nicht bekannt. Daher wurde in der folgenden Versuchsreihe der Einfluss einer Stimulation (120 h) von isolierten Fibroblasten mit TGF- β 1 auf die Parameter IL-1 β , IL6, IL-8, TGF- β 2, TNF α , MMP2, MMP3, MMP9, TIMP1, TIMP2 TIMP3 und TIMP4 untersucht. Die Kontrollfibroblasten zeigten eine signifikante Änderung der mRNA-Expression auf die TGF- β 1 Stimulation im Vergleich zu den MD-Fibroblasten (Abb. 6 A, B). Die Genexpression von TGF- β 2 in Kontrollfibroblasten war nach der TGF- β 1 Stimulation verstärkt herunterreguliert (Abb. 6 B). MD-Fibroblasten wiesen eine signifikante Reduktion in der MMP2, MMP9 und TNF α

Genexpression nach der Stimulation mit TGF- β 1 auf (Abb. 6 C, D, F), während die TIMP3 Expression durch TGF- β 1 Gabe signifikant anstieg (Abb. 6 E).



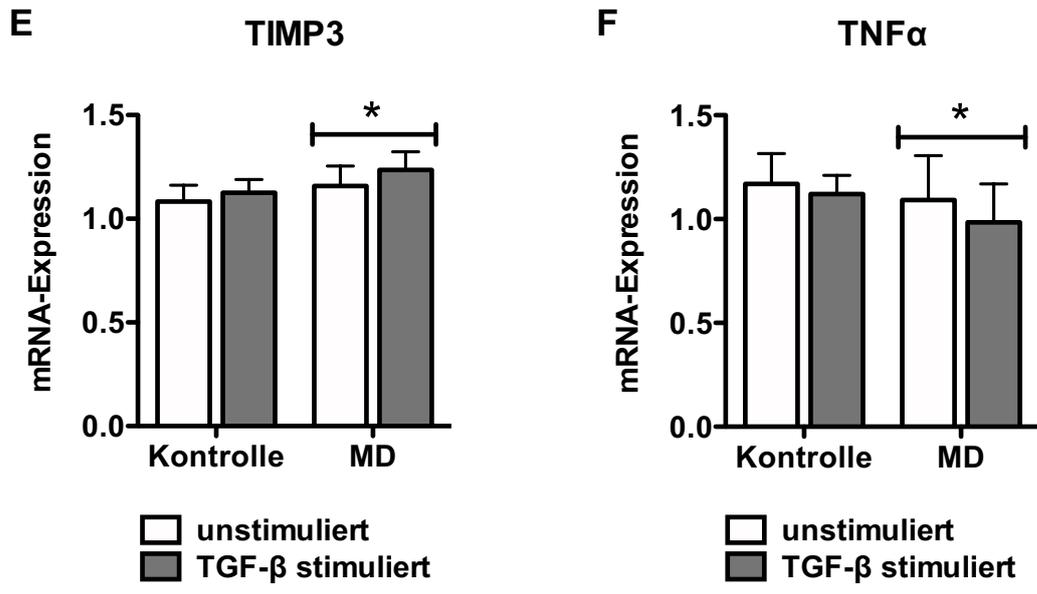
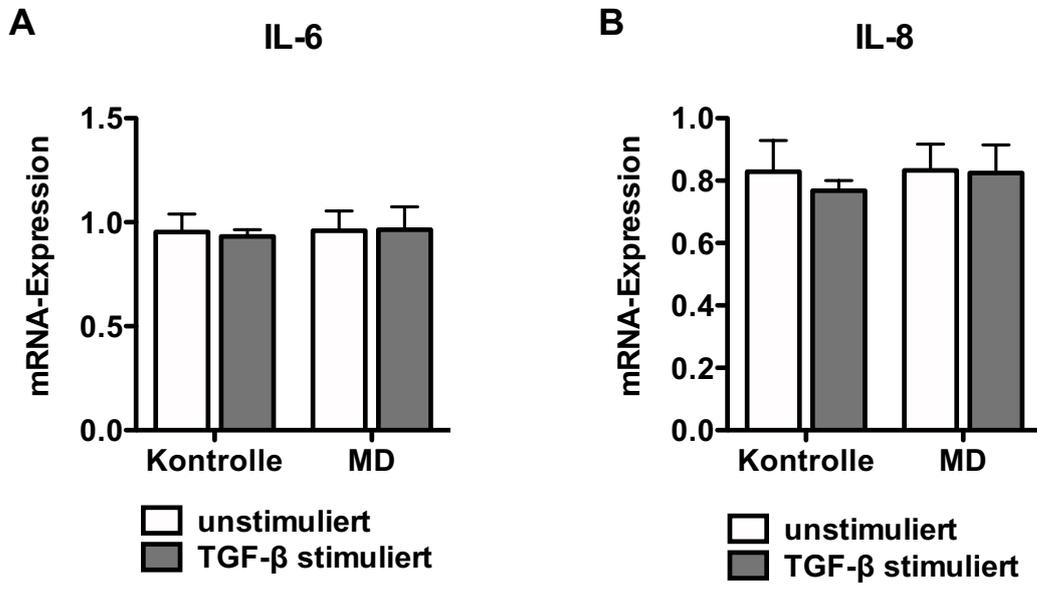


Abb. 6 Die relative mRNA-Expression von IL-1 β , TGF- β 2, MMP2, MMP9, TIMP3 und TNF α der Kontroll- und MD-Fibroblasten nach TGF- β 1 Stimulation. **A** IL-1 β Genexpression von unstimulierten und stimulierten Fibroblasten der Kontrolle (Kontrolle; n=6) und MD (MD; n=8) **B** TGF- β 2 Expression von unstimulierten und stimulierten Fibroblasten der Kontrolle (Kontrolle; n=6) und MD (MD; n=12) **C** MMP2 Genexpression von unstimulierten und stimulierten Fibroblasten der Kontrolle (Kontrolle; n=5) und MD (MD; n=9) **D** MMP9 Expression von unstimulierten und stimulierten Fibroblasten der Kontrolle (Kontrolle; n=6) und MD (MD; n=10) **E** TIMP3 Genexpression von unstimulierten und stimulierten Fibroblasten der Kontrolle (Kontrolle; n=7) und MD (MD; n=10) **F** TNF α Expression von unstimulierten und stimulierten Fibroblasten der Kontrolle (Kontrolle; n=6) und MD (MD; n=9). Die Genexpression wurde gemessen und auf GAPDH normiert. *p \leq 0,05; # p \leq 0,05 zeigt den signifikanten Unterschied der Differenz zwischen den stimulierten und unstimulierten MD-Fibroblasten bzw. den Kontrollfibroblasten.

Durch die Gabe von TGF- β 1 ließ sich keine signifikante Änderung in der Genexpression von IL-6, IL-8, MMP3, TIMP1, TIMP2 und TIMP4 nachweisen. Dies war weder bei den Fibroblasten der Kontrolle noch der Fibroblasten des MD der Fall (Abb. 7 A-F).



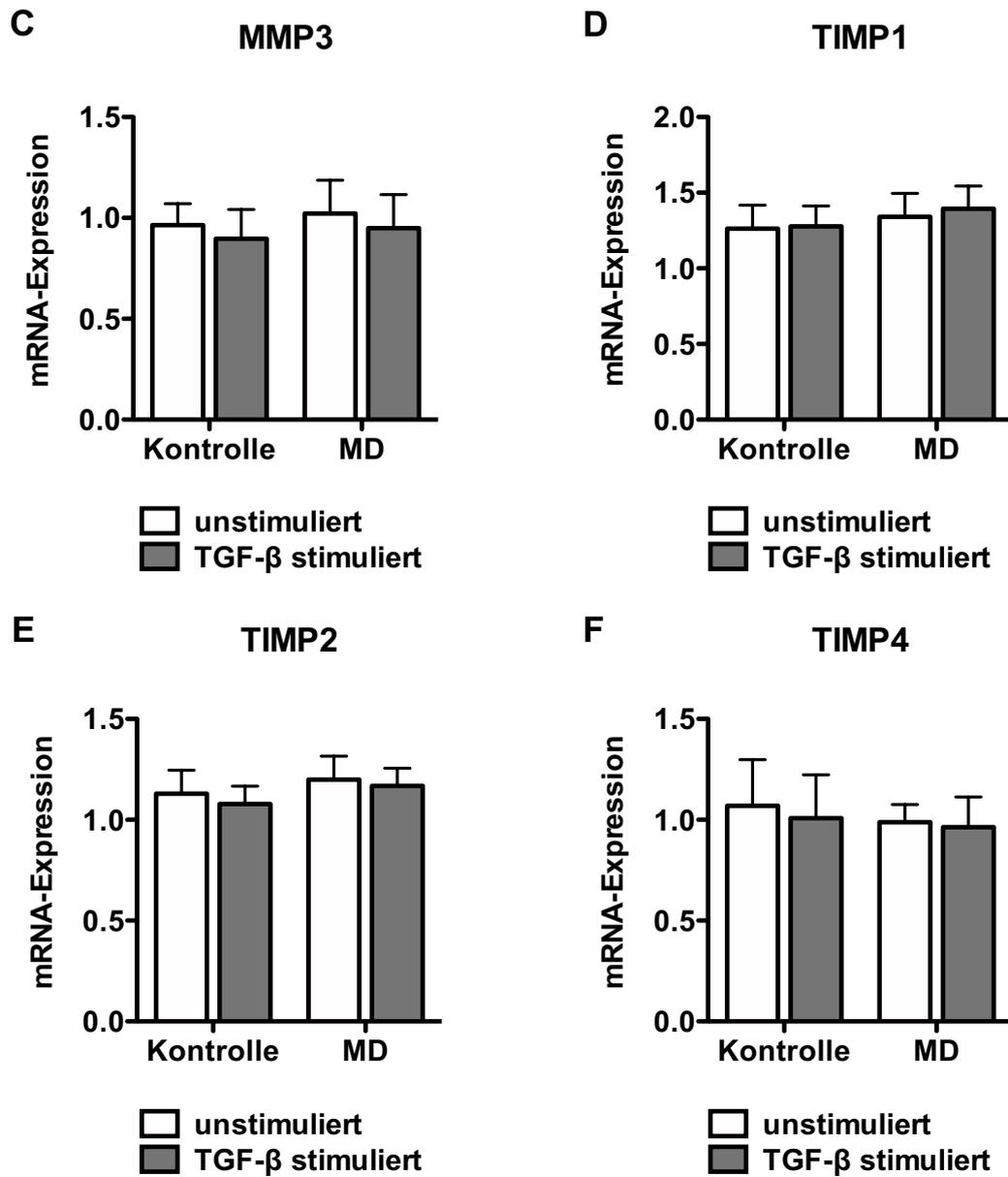


Abb. 7 Die relative mRNA-Expression von IL-6, IL-8, MMP3, TIMP1, TIMP2 und TIMP4 der Kontroll- und MD-Fibroblasten nach TGF- β 1 Stimulation. **A** IL-6 Genexpression von unstimulierten und stimulierten Fibroblasten der Kontrolle (n=6) und MD (n=13) **B** IL-8 Expression von unstimulierten und stimulierten Fibroblasten der Kontrolle (n=4) und MD (n=12) **C** MMP3 Genexpression von unstimulierten und stimulierten Fibroblasten der Kontrolle (n=6) und MD (n=9) **D** TIMP1 Expression von unstimulierten und stimulierten Fibroblasten der Kontrolle (n=7) und MD (n=10) **E** TIMP2 Genexpression von unstimulierten und stimulierten Fibroblasten der Kontrolle (n=6) und MD (n=10) **F** TIMP4 Genexpression von unstimulierten und stimulierten Fibroblasten der Kontrolle (n=7) und MD (n=10). Die Genexpression wurde gemessen und auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH normiert.

3.5 Der Einfluss von IL-1 β oder TGF- β 1 auf die α -SMA Proteinexpression der stimulierten Morbus Dupuytren (MD)-Fibroblasten

Das Protein α -SMA ist an der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten beteiligt (Bisson et al., 2003; Hindman et al., 2003; Satish et al., 2011) und kann als Surrogatparameter für den Differenzierungsgrad im Rahmen des MD genutzt werden. In dieser Versuchsreihe wurden Fibroblasten isoliert, mit IL-1 β oder TGF- β 1 stimuliert und die Proteinexpression von α -SMA mittels Western Blot bestimmt. Zudem erfolgte eine visuelle Darstellung der Expression von α -SMA mithilfe der Immunhistologie.

Die Stimulation von Kontrollfibroblasten mit IL-1 β führte zu einem signifikanten Anstieg der α -SMA Proteinexpression nach 72 h. Die IL-1 β Behandlung der MD-Fibroblasten nach 72 h bewirkte ebenfalls eine stärkere, im Vergleich zu den Kontrollen noch höhere α -SMA Proteinexpression, die allerdings von 72 h verglichen mit 120 h abnimmt (Abb. 8 A). Die Stimulation mit TGF- β 1 demonstriert eine deutliche Erhöhung der α -SMA Proteinexpression von MD- und Kontrollfibroblasten nach 120 h (Abb. 8 B).

Als weiterführenden Nachweis der deutlichen Effekte der Stimulation mit TGF- β 1 ist beispielhaft in Abb. 9 die α -SMA Expression immunhistochemisch dargestellt. Ein vergleichbares Ergebnis ergab sich nach Stimulation mit IL-1 β (nicht dargestellt).

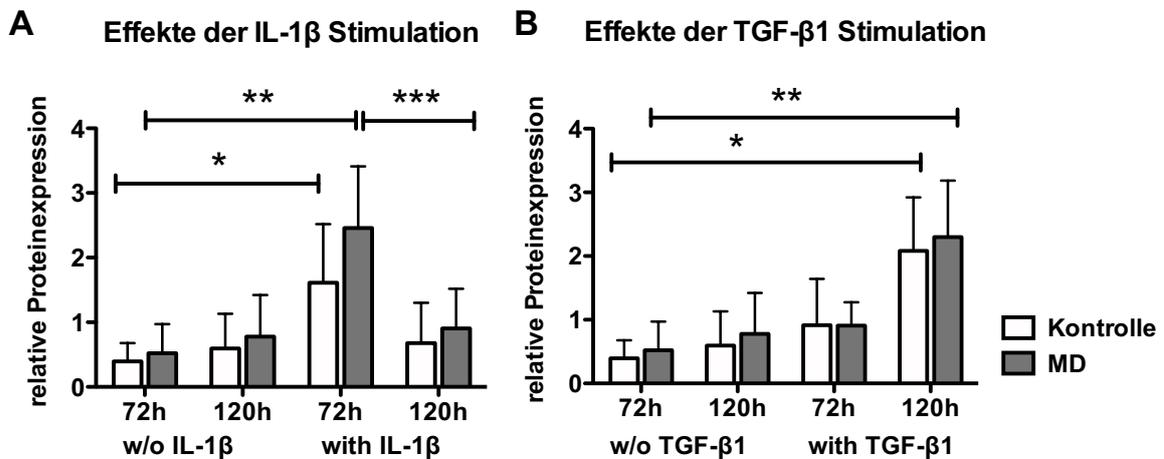


Abb. 8 Die α -SMA Proteinexpression der IL-1 β oder TGF- β 1 stimulierten MD-Fibroblasten. **A** Die Proteinexpression von IL-1 β stimulierten Kontroll- (w/o 72h n=6; w/o 120h n=6; with 72h n=4; with 120h n=5) und MD-Fibroblasten (w/o 72h und 120h n=8; with 72h und 120h n=7). **B** Die Proteinexpression von TGF- β 1 stimulierten Fibroblasten der Kontrolle (w/o 72h und 120h n=6; with 72h n=5; with 120h n=6) und MD (w/o 72h und 120h n=8; with 72h n=7; with 120h n=6). Die Proteinexpression wurde gemessen und mit Hilfe von GAPDH normiert. * p \leq 0,05; ** p \leq 0,005; *** p \leq 0,0005.

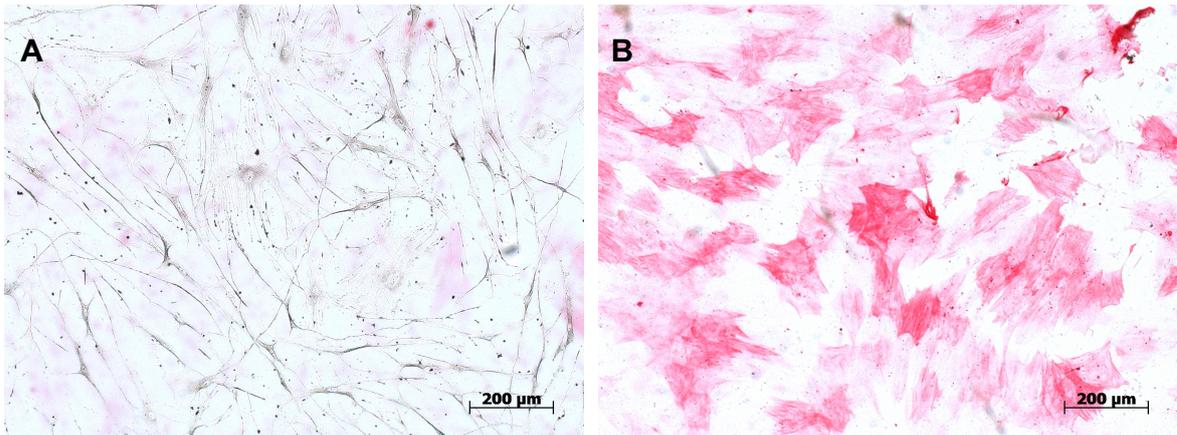


Abb. 9 Immunhistochemische Mikroskopaufnahmen der α -SMA-Antikörperfärbungen von MD-Fibroblasten. **A** Unstimulierte MD-Fibroblasten gefärbt mit einem anti- α -SMA Antikörper **B** TGF- β 1 stimulierte (120 h) MD-Fibroblasten, die mit einem immunhistochemischen anti- α -SMA Antikörper gefärbt wurden. Der Messbalken repräsentiert 200 μ m.

3.6 Die Effekte der TGF- β 1 Stimulation auf die Apoptose

Bei einer Vielzahl von Erkrankungen ist die gestörte Apoptose von pathophysiologischer Bedeutung. Neben einer nachgewiesenen verstärkten Sensibilität gegenüber der Stimulation mit IL-1 β bzw. TGF- β 1 wäre eine Dysregulation der Apoptose beim MD denkbar. Daher wurde die Apoptoserate der isolierten Fibroblasten mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Staurosporin ist ein Proteinkinaseinhibitor, der den intrinsischen Apoptose-Signalweg aktiviert. Es konnte gezeigt werden, dass MD-Fibroblasten mit einer höheren Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten reagieren. Besonders TGF- β 1 stimulierte MD-Fibroblasten, die mit einer Konzentration von 0,075 μ M behandelt worden sind, wiesen einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten vor.

Apoptose Auswertung

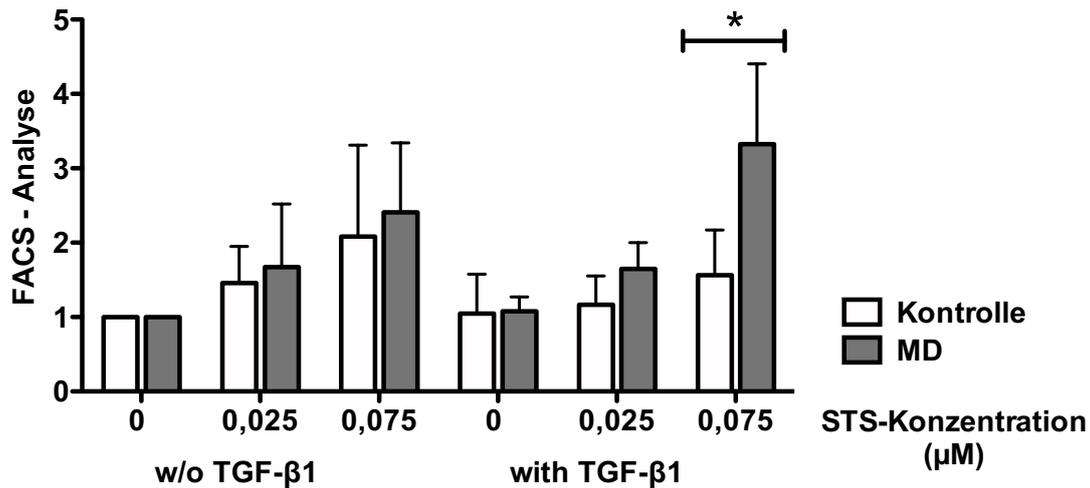


Abb. 10 Effekte der TGF-β1 Stimulation auf die relative Apoptoserate der MD-Fibroblasten. Die Kontrollfibroblasten (ohne TGF-β1 Gabe und 0,025 μM oder 0,075 μM STS Konzentration n=8; mit TGF-β1 und 0,025 μM oder 0,075 μM STS Konzentration n=6) verglichen mit MD-Fibroblasten (ohne TGF-β1 Gabe und 0,025 oder 0,075 μM STS Konzentration n=7; mit TGF-β1 Gabe und 0,025 μM oder 0,075 μM STS Konzentration n=4) wurden mit 0,025 μM und 0,075 μM Staurosporin (STS) behandelt. Die Daten der Analyse wurden normiert zu den unstimulierten Kontrollfibroblasten. * $p \leq 0,05$.

3.7 Effekte von blauem Licht

Blaues Licht hemmt die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten (Taflinski et al., 2014). In der Dermatologie zur Behandlung von Acne vulgaris gibt es bereits eine klinische Anwendung (Omi et al., 2004). Die therapeutischen Effekte sind daher auch für den MD denkbar und sollten hier weiterführend getestet werden.

3.7.1 Toxische Effekte von blauem Licht

In einem ersten Schritt sollte eine etwaige Toxizität von blauem Licht auf Fibroblasten der Hohlhand untersucht werden. Hierzu wurden Fibroblasten isoliert und mit unterschiedlicher Intensität bestrahlt. Die Bestrahlungsintensität lag zwischen 0 und 80 J/cm² über einen Zeitraum von 5 bis zu 64 min Bestrahlungszeit. Die Zellviabilität wurde nach 24 h analysiert. Die Zellviabilität (relative Zellzunahme) der bestrahlten Kontrollfibroblasten (mit Ausnahme von 20 J/cm²) war signifikant reduziert im Vergleich zu der nicht bestrahlten Kontrolle. Nur die Bestrahlung von 80 J/cm² ließ eine signifikante Abnahme der Zellviabilität der MD-Fibroblasten erkennen (Abb. 11). Es konnte gezeigt werden, dass eine Anwendung von bis zu 60 J/cm² keine relevante toxische Dosis für die Fibroblasten darstellt.

Toxische Effekte von blauem Licht

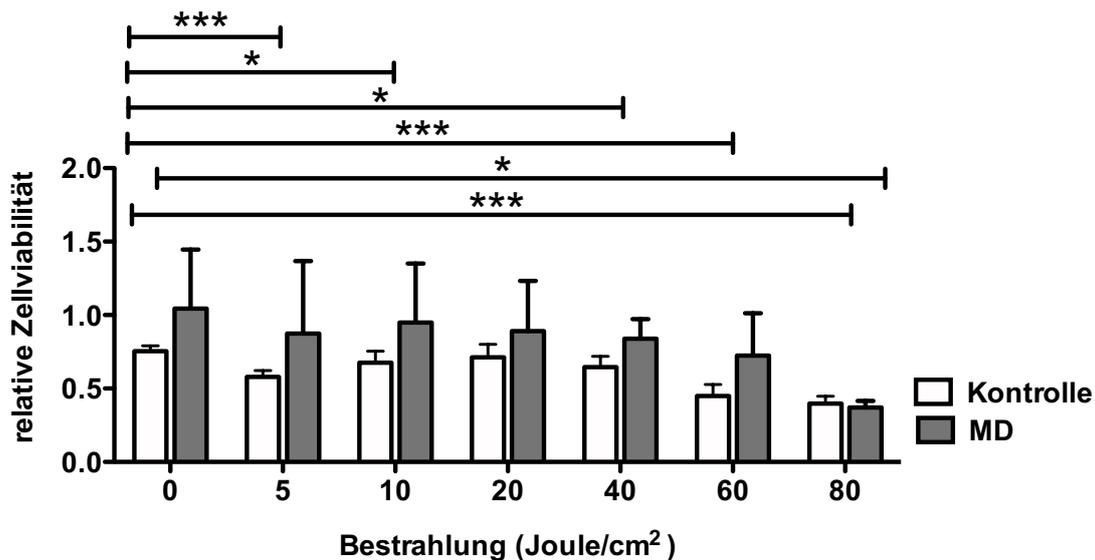


Abb. 11 Toxische Effekte von blauem Licht auf die MD-Fibroblasten. Das Verhältnis der relativen Zellviabilität der bestrahlten MD-Fibroblasten und der Kontrolle nach 24 h. Die Fibroblasten von MD (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 Joule/cm² n=6; 80 Joule/cm² n=3) und die Fibroblasten der Kontrolle (n=5) wurden mit verschiedenen Dosen bestrahlt (5, 10, 20, 40, 60, 80 Joule/cm²) und die Zellviabilität vor und 24 Stunden nach der Bestrahlung gemessen. $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,0005$.

3.7.2 Die Effekte der Bestrahlung auf unstimulierte und TGF- β 1 stimulierte Morbus Dupuytren (MD)-Fibroblasten

In einem nächsten Schritt wurden die Effekte der Bestrahlung von blauem Licht auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten untersucht. Als Surrogatparameter diente α -SMA. Angesichts der pathophysiologischen Bedeutung von TGF- β 1 innerhalb der Pathogenese des MD und bereits durchgeführter Studien an dermalen Hautfibroblasten sollte zudem der Einfluss der blauen Lichttherapie auf die Stimulation mit TGF- β 1 und in Folge dessen auf die Differenzierung untersucht werden. Isolierte Fibroblasten wurden über 72 h bestrahlt und anschließend die α -SMA Proteinexpression mittels Western Blot bestimmt. Überraschenderweise bewirkte die Bestrahlung ohne TGF- β 1 Gabe keinen signifikanten Effekt auf die α -SMA Proteinexpression der Kontroll- und MD-Fibroblasten (Abb. 12 A und 12 C). Im Gegensatz dazu hat die Behandlung mit TGF- β 1 über 72 h und gleichzeitiger Bestrahlung (40 J/cm²) die α -SMA Proteinexpression der MD-Fibroblasten reduziert (Abb. 12 B). Dieser Effekt war noch stärker nach 120 h Inkubationszeit mit TGF- β 1 und Bestrahlung, hier zeigten auch die Kontrollfibroblasten eine reduzierte α -SMA Proteinexpression (Abb. 12 D).

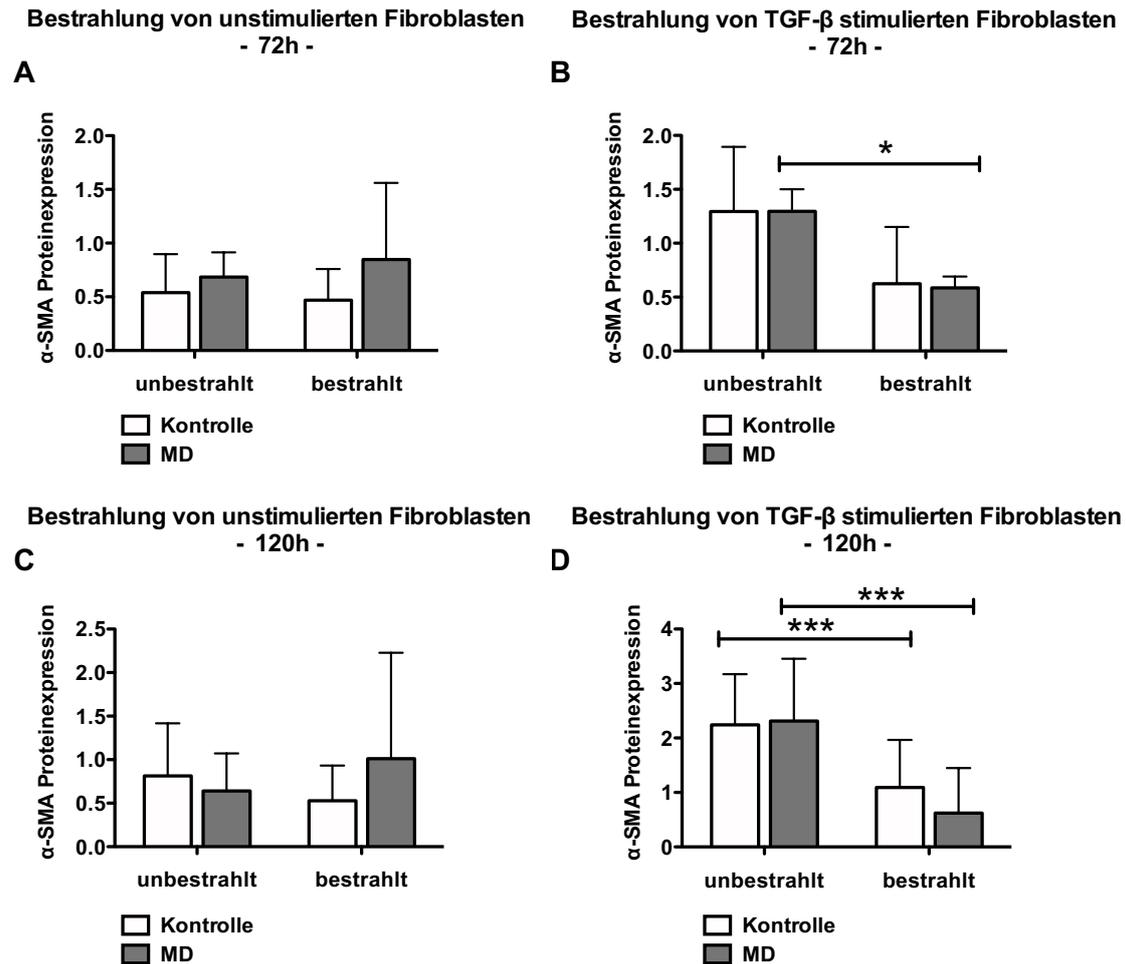


Abb. 12 Effekte von blauem Licht auf die unstimulierten oder TGF- β 1 stimulierten MD-Fibroblasten. Dargestellt ist die relative α -SMA Proteinexpression von unstimulierten oder TGF- β 1 stimulierten und bestrahlten (40 J/cm^2) Kontrollfibroblasten im Vergleich zu MD-Fibroblasten. **A** Die α -SMA Proteinexpression von unstimulierten (72 h) und bestrahlten Fibroblasten der Kontrolle (n=8) und MD (n=7) **B** Die α -SMA Proteinexpression von TGF- β 1 stimulierten (72 h) und bestrahlten Fibroblasten der Kontrolle (n=8) und MD (n=7). **C** Die α -SMA Proteinexpression von unstimulierten (120 h) und bestrahlten Fibroblasten der Kontrolle (n=8) und MD (n=6-7). **D** Die α -SMA Proteinexpression von TGF- β 1 stimulierten (120 h) und bestrahlten Fibroblasten der Kontrolle (n=8) und MD (n=6-7). Die Proteinexpression wurde gemessen und zum *Housekeeping*-Protein GAPDH normiert. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,0005$.

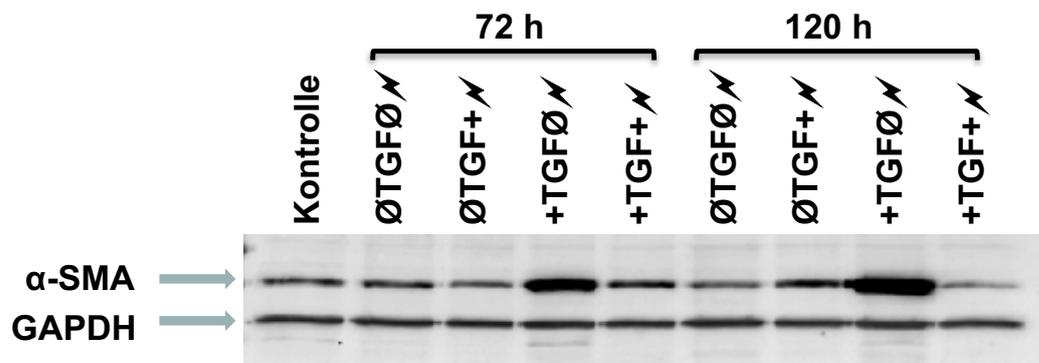


Abb. 13 Ein beispielhafter Western Blot der bestrahlten und TGF- β 1 stimulierten MD-Fibroblasten. Der Blot zeigt die α -SMA Expression von MD-Fibroblasten mit TGF- β 1 Stimulation (+TGF), ohne Stimulation (\emptyset TGF), mit und ohne Bestrahlung (\emptyset oder +) entweder über 72 h oder 120 h. Die α -SMA Expression wurde gemessen und zu GAPDH normiert.

3.7.3 Effekte der Bestrahlung in Morbus Dupuytren (MD)-Fibroblasten auf die Generierung Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

ROS steht für reaktive Sauerstoffspezies, die bei oxidativem Stress und unterschiedlichen Erkrankungen, sowie der Abwehr von bakteriellen Infektionen eine pathophysiologische Rolle spielen. Dazu zählt u. a. das Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

Der genaue Mechanismus, der die Wirkung von blauem Licht erklärt, ist noch nicht hinreichend erforscht. Da die ROS für die Effekte von blauem Licht mitverantwortlich sein könnten, wurde die ROS Generierung, die durch blaues Licht entstehen könnte, gemessen. Dies wurde mit Hilfe von 123Dihydrorhodamine getestet, da dies durch ROS zu Rhodamin 123 oxidiert wird. Die absolute ROS Menge stieg in Fibroblasten nach der Bestrahlung an. Sowohl bestrahlte als auch nicht bestrahlte Fibroblasten des MD generierten immer mehr ROS, im Vergleich zu den bestrahlten und nicht bestrahlten Kontrollfibroblasten. (Abb. 14). Die Quantität der ROS nahm kontinuierlich über 24 h zu. Nichtsdestotrotz war die ROS Generation von den bestrahlten Kontrollfibroblasten signifikant stärker nach 24 h verglichen mit den bestrahlten Kontrollfibroblasten nach ½ h, 1 h und 2 h. Die bestrahlten Kontrollfibroblasten zeigten einen signifikanten Anstieg nach 24 h im Gegensatz zu den nicht bestrahlten Kontrollfibroblasten.

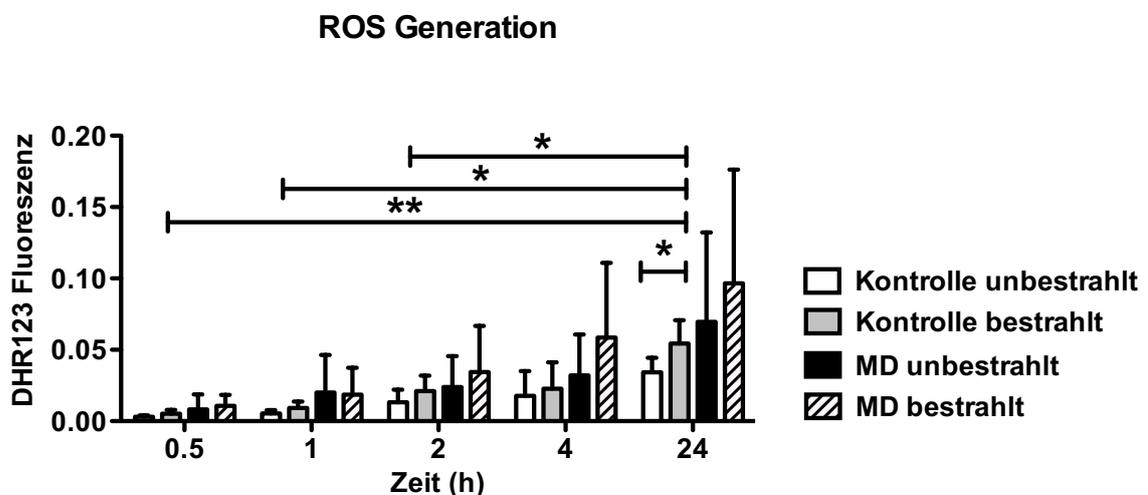


Abb. 14 Effekte der Bestrahlung in MD-Fibroblasten auf die Generierung von ROS. Dargestellt ist die ROS Generation von bestrahlten und nicht bestrahlten Kontrollfibroblasten im Vergleich zu MD-Fibroblasten. Die Messungen der bestrahlten (60 Joule/cm^2) oder nicht bestrahlten Kontrollfibroblasten ($n=5$) im Vergleich zu MD-Fibroblasten ($n=5$) sind nach ½ h, 2 h, 4 h und 24 h durchgeführt worden. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$.

4 Diskussion

Wesentlich an der Pathogenese des MD beteiligt ist zum einen eine verstärkte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und zum anderen eine unverhältnismäßige Produktion und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM). Beide Anteile unterliegen Einflüssen durch unterschiedliche Parameter, wobei insbesondere den Zytokinen TGF- β und IL-1 β sowie den Matrix-Metalloproteasen eine besondere Rolle zugeschrieben wird.

Ziel dieser Arbeit war es zum einen die Genexpression im Gewebe und den Einfluss von TGF- β 1 und IL-1 β auf die zelluläre Differenzierung sowie die MMP-TIMP-Homöostase und einige Zytokine zu untersuchen als auch einen möglichen therapeutischen Ansatz durch die Bestrahlung mit blauem Licht zu finden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl TGF- β 1 als auch IL-1 β einen Einfluss auf die Genexpression von MMPs und deren Inhibitoren isolierter Fibroblasten beim MD haben. Es konnte evaluiert werden, dass das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs im Gewebe von MD-Patienten gestört ist. Die Ergebnisse visualisieren, dass die Stimulation sowohl mit IL-1 β als auch mit TGF- β 1 Einfluss auf die mRNA-Expression und insbesondere auf die TIMP-MMP-Homöostase nimmt. Weiterhin konnten wir im Einklang mit der Literatur eruieren, dass erhöhte TGF- β 1 Konzentrationen die α -SMA Proteinexpression erhöhen und damit die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten verstärken. Wurde mit Staurosporin die Apoptose induziert, konnte eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate in mit TGF- β 1 stimulierten MD-Fibroblasten beobachtet werden. Zudem wurde gezeigt, dass blaues Licht eine mögliche Therapieoption beim MD darstellen könnte. Hier wurde eine Reduktion der Differenzierung vor allem der TGF- β 1 stimulierten Fibroblasten auffällig.

4.1 Die mRNA-Expression im Gewebe

Im Gewebe wurde eine signifikant erniedrigte Genexpression von TGF- β 2 und TIMP3 nachgewiesen (siehe Abb. 1). Für die anderen MMPs und TIMPs wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (siehe Abb. 2). Dies war insofern überraschend, als das TGF- β eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des MD zugeschrieben wird und andere Studien

eine erhöhte TGF- β 2 Genexpression aufzeigen konnten (Zhang et al., 2008). Ein möglicher Grund hierfür wäre, dass in der vorliegenden Arbeit keine Unterscheidung zwischen Knoten und Strängen vorgenommen wurde. Denn besonders in Knoten von pathologischem Gewebe des MD wurde eine erhöhte Expression von TGF- β 2 beschrieben (Baird et al., 1993; Wong and Mudera, 2006). Wahrscheinlicher ist allerdings, dass eine Heterogenität der Proben in Bezug auf das histologische Stadium im Progress der Erkrankung vorlag. Denn insbesondere im Proliferationsstadium, das sich durch ein schnelles Fortschreiten der Erkrankung kennzeichnet, wird angenommen, dass dies unter dem Einfluss lokaler Mediatoren stattfindet. Hier sind TGF- β und Periostin zu nennen (Khashan et al., 2011; Vi et al., 2009). Von TGF- β sind bis jetzt drei Spleißvarianten identifiziert: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF-3. TGF- β 1 ist intrazellulär in Myofibroblasten in jedem Stadium der Erkrankung zu finden. TGF- β 2, der in der hier vorliegenden Arbeit bestimmte Mediator, ist in erster Linie in der Proliferations- und Involutionsphase erhöht exprimiert (Badalamente et al., 1996). In fortführenden Untersuchungen an größeren Kollektiven wäre eine Unterscheidung zwischen den histologischen Stadien denkbar. Diese erfolgte in der vorliegenden Arbeit nicht.

Weiterführend sind Risikofaktoren und Sekundärerkrankungen (wie z. B. Rauchen, Alkoholabusus oder Diabetes mellitus) beschrieben worden, die den Krankheitsverlauf beeinflussen. Es ist noch immer nicht geklärt, inwieweit diese Faktoren, den Krankheitsverlauf verstärken oder vielleicht sogar auslösen. Deswegen hat eine Studie bewusst nur Patientenmaterial ausgewählt, bei denen keine dieser begünstigenden Faktoren oder Sekundärerkrankungen vorlagen (Docheva et al., 2012). TGF- β wird vermehrt bei Entzündungs- und Fibroseprozessen ausgeschüttet (Oberringer et al., 2008), aber erhöhte TGF- β Level liegen z. B. auch bei Rauchern im Gegenzug zu Nichtrauchern vor (Ryder et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte im MD-Gewebe für TIMP3 eine verminderte Expression nachgewiesen werden (siehe Abb. 1). Dies passt insofern in den Kontext, da ein gestörter MMP und TIMP Haushalt bereits in der Literatur beschrieben wurde (Ulrich et al., 2009). Für TIMP3 konnte auch in anderen Arbeiten eine verminderte Genexpression im Gewebe aufgezeigt werden (Kang et al., 2014). Auch andere Studien vermuten, dass TIMP3 eine wichtige Rolle in der Entstehung von Fibrosen einnimmt (Fan et al., 2014). Kassiri et al. mutmaßen, dass ein Gleichgewicht zwischen TIMPs und MMPs das Fließgleichgewicht in der EZM ermöglicht. Von den 4 TIMPs ist TIMP3 besonders in der EZM verbunden und hat eine deutliche Protease-Inhibition, die sich über die ADAMs (*a disin-*

tegrin and metalloproteinase domain) und ADAM-TS (*a disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin motif*) erstreckt. Das sind Proteasen, die die Bioaktivität von vielen Wachstumsfaktoren und Zytokinen kontrollieren. Kassiri et al. konnten zeigen, dass ein TIMP3 Verlust die interstitielle Nephritis und Entstehung von Fibrosen fördert (Kassiri et al., 2009).

Als Schlüsselmetalloproteinasen in der Pathogenese des MD werden in den Arbeiten von Wilkinson et al. und Ulrich et al. erhöhte MMP2 Genexpressionen beschrieben (Ulrich et al., 2009; Wilkinson et al., 2012), wobei in der Untersuchung von Wilkinson et al. nur das Verhältnis von vier Spendern untersucht wird. Anhand der hier durchgeführten Arbeit konnte keine verstärkte Expression nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund wäre, dass die RNA direkt aus dem unkultivierten Gewebe isoliert wurde. In der Arbeit von Wilkinson hingegen erfolgte hingegen die Bestimmung der Genexpression aus den isolierten Fibroblasten, die sich bereits in Kultur befanden (Wilkinson et al., 2012).

Des Weiteren könnte ein Grund für die unterschiedlichen Beobachtungen sein, dass in der vorliegenden Arbeit keine Unterscheidung zwischen Knoten und Strängen vorgenommen wurde. Eine Studie hat die Genexpression von MMP2 analysiert, wobei hier Knoten und Stränge separat untersucht wurden. Die Studie zeigte, dass die MMP2 Genexpression in Knoten wesentlich höher als in Strängen war (Ulrich et al., 2009).

Wie erwartet zeigten unsere Ergebnisse eine tendenziell reduzierte Genexpression der MMPs (MMP2, MMP3 und MMP9). Diese MMPs sind u. a. für den Abbau der EZM verantwortlich. Erniedrigte MMP3 Expressionslevel im MD-Gewebe sind bereits in der Literatur beschrieben worden (Rehman et al., 2008). MMP3 kann MMP1 aktivieren und es baut die Kollagentypen II, III, IV, und IX ab. Eine Dysfunktion kann zu Fibrosen führen.

Sowohl bisherige Untersuchungen (Ulrich et al., 2009) als auch unsere Ergebnisse lassen keine veränderte Genexpression von MMP9 beobachten (siehe Abb. 2 F).

4.2 Gestörtes Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs

In der Literatur wird ein verändertes Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs beim MD vermutet (Ulrich et al., 2009). Insbesondere wird ein Ungleichgewicht von MMPs zu TIMPs zugunsten der TIMPs angenommen. Die daraus resultierende Hemmung des Abbaus der Komponenten der EZM könnte die Krankheitsprogression (Ulrich et al., 2003)

erklären. Einige Autoren sehen in der Hemmung von TIMPs sogar einen therapeutischen Ansatz (Picardo and Khan, 2012). Eine Option stellt hierbei Relaxin, ein *Insulin-like growth factor* Hormon dar. Relaxin kann die Expression von MMPs fördern und die von TIMPs hemmen (Unemori et al., 1996). Die Erfahrungen hierzu beziehen sich allerdings auf Fibrosen anderer Genese und nicht auf den MD.

Eine Veränderung des Gleichgewichts von MMPs und TIMPs wurde auch in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesen (siehe Abb. 3). Die Genexpression von TIMP1 zu MMP3 und MMP9 als auch die Genexpression von TIMP3 zu MMP2 und MMP3 war signifikant verändert. Das Gleichgewicht war allerdings von TIMP1 zu MMP3 und 9 zugunsten der TIMPs und für TIMP3 zu MMP2 und 3 zugunsten der MMPs verschoben. Während die Verschiebung zugunsten der TIMPs im Einklang mit der Literatur steht, würde die Verschiebung zugunsten der MMPs nicht als Ursache für ein Fortschreiten der Erkrankung des MD sprechen. Ein MMP Übergewicht ermöglicht eher einen Abbau von Kollagen. Eine Erhöhung von MMP2 wie in der Literatur beschrieben (Ulrich et al., 2009; Wilkinson et al., 2012), könnte allerdings ein Symptom der Erkrankung darstellen, indem dies ein Versuch der Zellen ist, das Kollagen abzubauen und dem Kollagenüberschuss entgegenzuwirken.

Ein möglicher Grund für die gegensätzlichen Verschiebungen der Verhältnisse wäre die Vielfältigkeit der MMPs und TIMPs. Es sind insgesamt 23 MMPs und 4 TIMPs beschrieben. Nicht für jede liegen Kenntnisse über die funktionelle Bedeutung vor. Zwar bestehen zwischen den TIMPs 1-3 strukturelle Überschneidungen, die funktionelle Rolle im Sinne einer Hemmung oder Aktivierung variiert jedoch *in vivo*. Eine spezifische funktionelle Korrespondenz zwischen einzelnen MMPs und TIMPs ist nicht beschrieben. Insgesamt konnte anhand der vorliegenden Arbeit eine veränderte Balance zwischen einzelnen MMPs und TIMPs nachgewiesen werden. Grundsätzlich ist eine Verschiebung zugunsten der TIMPs anzunehmen, die auch mitverantwortlich für die Veränderungen der extrazellulären Matrix sein könnten.

4.3 Veränderte Genexpression stimulierter Fibroblasten

Sowohl IL-1 α als auch TGF- β 1 besitzen deutliche Einflüsse auf die Expression von MMPs und TIMPs in Fibroblasten. In der vorliegenden Arbeit wurde auch der Einfluss von

TGF- β 1 und IL-1 α auf die mRNA-Expression der MMPs und TIMPs kultivierter Fibroblasten des MD bestimmt.

Die Stimulation mit IL-1 α bewirkte zum einen eine erhöhte Genexpression inflammatorischer Zytokine (IL-1 α , IL-6, IL-8), zum anderen aber auch auf den MMP und TIMP Haushalt (MMP3 und TIMP3). Als Folge einer Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 α war eine erhöhte MMP3 und eine erniedrigte TIMP3 Genexpression sowohl in den Kontrollfibroblasten als auch den MD-Fibroblasten nachweisbar (siehe Abb. 4). Die verminderte Expression von TIMP3 in kultivierten Zellen steht im Einklang mit der verminderten TIMP3 Genexpression im Gewebe. Die veränderte TIMP3 Expression der isolierten Fibroblasten ist von besonderem Interesse. Die ADAMTSs (*a disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin motif*) sind eine Untergruppe der MMPs. Die ADAMTs sind Proteoglykane und Peptidasen, wobei von den insgesamt 19 ADAMTS die Funktion nicht immer bekannt ist (Porter et al., 2005). TIMP2, 3 und 4 sind potentielle Inhibitoren der ADAMTS. Insbesondere TIMP3 ist ein Inhibitor von ADAMTS-4 und -5 (Kashiwagi et al., 2001). Inwiefern diese Inhibition jedoch zu einer Beschleunigung des Krankheitsprogresses beiträgt bzw. nicht beiträgt kann noch nicht beantwortet werden. Die wahrscheinlich vielseitigen - und schichtigen Funktionen der TIMPs und deren Einfluss auf die unterschiedlichen MMPs und ADAMTS sind noch nicht hinreichend bekannt. Die mitunter gegensätzlichen Veränderungen in der mRNA-Expression stimulierter Fibroblasten bei noch unzureichender Bekanntheit der Funktion einzelner MMPs und TIMPs weist auf den hohen Anspruch an die Interpretation hin. Die signifikante Veränderung der Expression von Genen in Kontrollfibroblasten oder Fibroblasten des MD nach der Stimulation stellt jedoch die Komplexität und Anfälligkeit des Gleichgewichts der EZM bei der MD Erkrankung heraus.

IL-1 β ist ein Entzündungsmediator und stimuliert die Proliferation von Fibroblasten und die Ausschüttung von TGF- β und dadurch auch die Produktion von Kollagen und anderen extrazellulären Matrixproteinen. IL-1 β wird als Reaktion des Immunsystems z. B. auf Lipopolysaccharide aus Bakterienwänden oder andere Pyrogene produziert und ausgeschüttet. Zudem kann es auch im Rahmen inflammatorischer Prozesse zu einer systemischen Ausschüttung von IL-1 β kommen. Die alleinige Ausschüttung von IL-1 β könnte somit die Induktion eines Wachstumsschubs einer verstärkten Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten erklären. Der lokale Einfluss einer erhöhten IL-1 β

Konzentration auf den MMP Haushalt konnte anhand dieser Arbeit gezeigt werden. Da Untersuchungen zeigen, dass z. B. Rauchen die Konzentrationen von inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 α und auch TGF- β erhöht (Ryder et al., 2002; Wu et al., 2014), könnte dies eine möglicher Ursache sein, warum Nikotinabusus den Krankheitsverlauf des MD begünstigen könnte. Wie in unserer Arbeit belegt, verursachen erhöhte IL-1 α Spiegel ein Ungleichgewicht der MMP-TIMP-Homöostase, dies führt zu einem gestörten Gleichgewicht der EZM. Dieses könnte ein Hinweis darauf sein, dass die extrinsischen Kofaktoren nicht ein Auslöser der Erkrankung sind, sondern ein Verstärker des Krankheitsprogresses.

Die Bedeutung von TGF- β 1 für die Pathogenese des MD wird für wesentlich eingeschätzt. In der vorliegenden Arbeit konnte ein deutlicher Einfluss von TGF- β 1 auf die Genexpression sowohl der Zytokine (IL-1 α , TGF- β) als auch auf die der MMPs und TIMPs (MMP2, MMP9 und TIMP3) gezeigt werden. Die Kontrollfibroblasten reagierten mit einer erhöhten IL-1 α Genexpression auf die TGF- β 1 Stimulation, wohingegen die MD-Fibroblasten keinen Anstieg der Genexpression zeigten (siehe Abb. 6). Dies könnte bedeuten, dass die MD-Fibroblasten an hohe TGF- β 1 Konzentrationen adaptiert sind und deshalb keine Entzündungsreaktion des Immunsystems ausgelöst wird.

Die Stimulation von TGF- β 1 führte zu einer signifikant verminderten Expression von MMP2 und MMP9. Diese verminderte Expression könnte mit dem verminderten Abbau von Kollagenen in der Hohlhand assoziiert sein.

Die Stimulation mit TGF- β 1 führte zudem zu einer erniedrigten Genexpression von MMP3 (siehe Abb. 6). Die Protease MMP3 ist auch an dem Abbau der EZM beteiligt. Zum einen kann es MMP1 aktivieren, was zu einem Abbau der Kollagentypen II, III, IV, und IX führt. Zum anderen soll eine Dysfunktion von MMP3 zu Fibrosen führen. Forrester et al. spekulieren, dass niedrige Level von aktivierten MMP1 Proteinen die Akkumulation von Kollagen I, II, und III in der EZM bewirken und die Proteasen nicht fähig sind, diese abzubauen (Forrester et al., 2013). Dies ist ein möglicher Ansatzpunkt, warum gerade nach Operationen die Rezidivrate erhöht ist. Erhöhte Konzentrationen von TGF- β 1 wurden u. a. vermehrt in Wunden nach chirurgischen Eingriffen nachgewiesen. Bisherige Studien zeigten eine erhöhte Expression von sowohl TGF- β (Baird et al., 1993; Zhang et al., 2008) als auch von dem inflammatorischen Zytokin IL-1 α .

Unsere Ergebnisse zeigen den Einfluss von sowohl TGF- β als auch von IL-1 β auf inflammatorische Zytokine als auch die MMP-TIMP-Homöostase in MD-Fibroblasten. Über eine grundsätzliche Ausschüttung von IL-1 β und oder TGF- β unabhängig von der MD Erkrankung können diese Zytokine den MMP und TIMP Haushalt verändern und die Progression der Erkrankung somit verstärken.

4.4 Erhöhte α -SMA Proteinexpression von stimulierten Fibroblasten

Im nächsten Schritt haben wir die Differenzierung mittels α -SMA Proteinexpression der Fibroblasten zu Myofibroblasten untersucht (siehe Abb. 8). Einige Studien haben bereits eine verstärkte Differenzierung mittels TGF- β 1 Stimulation (Bisson et al., 2009) oder auch TGF- β 2 (Hinz, 2007) beschrieben, dies konnten unsere Ergebnisse bestätigen. Denn es konnte gezeigt werden, dass besonders die MD-Fibroblasten durch TGF- β 1 Gabe zu Myofibroblasten differenzieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Stimulation mit IL-1 β eine verstärkte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten induzieren, gemessen an dem Surrogatparameter, der α -SMA Proteinexpression (siehe Abb. 8 A). Einerseits wurde in der Literatur eine Inhibition der Differenzierung durch die Stimulation mit IL-1 β beschrieben (Pittet et al., 1994; Shephard et al., 2004), andererseits konnte in einer jüngeren Studie gezeigt werden, dass in der Lunge eine verstärkte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten durch die Stimulation mit IL-1 β ausgelöst werden konnte (Jin et al., 2011).

Verjee et al. beschreiben, dass die Knoten in der Größe und in Abhängigkeit von der Lokalisierung am proximalen Interphalangealgelenk variieren. 2/3 der Stränge bestehen aus Knoten und diese sind zellreich und beinhalten besonders viele α -SMA positive Zellen. Die Stränge, die mit Kollagenfasern verbunden sind und keine Knoten beinhalteten, waren signifikant verstärkt an Fingerkontrakturen beteiligt. Die Autoren vermuten, dass die Zellen sich in knotigen Strängen kontrahieren und sich das in den Komponenten der EZM niederschlägt. Diese EZM ist umgebaut in eine verkürzte Struktur und daraus entwickelt sich die Dupuytren'sche Kontraktur (Verjee et al., 2009).

4.5 Erhöhte Apoptoserate der stimulierten Fibroblasten

Die Beteiligung einer gestörten Apoptose an zahlreichen Erkrankungen ist mittlerweile

bekannt. Dazu zählen neurodegenerative Krankheiten wie die der Morbus Parkinson (Mochizuki et al., 1997) ebenso wie AIDS und die degenerative Arthritis (Brill et al., 1999). Auch kann die Mutation in Apoptose regulierenden Genen oder eine Überexpression an Genen, die die Apoptose hemmen, die Entstehung von Tumoren induzieren.

In der vorliegenden Untersuchung wurde festgestellt, dass MD-Fibroblasten mit einer höheren intrinsischen Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten reagierten. Besonders TGF- β 1 stimulierte MD-Fibroblasten, die mit einer Konzentration von 0,075 μ M STS behandelt worden sind, wiesen einen starken Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten auf (siehe Abb. 10).

In der Literatur wird bereits ein Ungleichgewicht zwischen der Zellproliferation und dem programmiertem Zelltod vermutet (Jemec et al., 1999). Inflammatorische Zellen produzieren Wachstumsfaktoren, die nicht nur in der Wundheilung, sondern auch im MD-Gewebe gefunden worden sind (Baird et al., 1993). Fitzgerald et al. verglichen bereits Wundheilungsgewebe mit dem von MD-Patienten (Fitzgerald et al., 1999), sie konnten einen Mangel an Zytokinen und inflammatorischen Zellen beobachten. Dies wird erreicht ohne Gewebszerstörung oder Entstehung einer Entzündung. Dieser Mechanismus ist noch nicht vollständig verstanden, aber Hinweise deuten auf den programmierten Zelltod, die Apoptose, hin (Savill et al., 1989). Meek et al. vermuten, dass eine reduzierte Apoptoserate der inflammatorischen Zellen innerhalb des MD-Gewebes mit einer Proliferation der Myofibroblasten assoziiert ist (Meek et al., 2002). Viele Faktoren sind an der Zellapoptose beteiligt. Die von Baird et al. im MD-Gewebe nachgewiesenen Zytokine TGF- β 1, IL-1 und TNF α (Baird et al., 1993) besitzen antiapoptotische Wirkung und genau diese Wachstumsfaktoren (TGF- β 1, IL-1 und TNF α) sind extrem wirksam darin, inflammatorische Zellen zu rekrutieren und deren Zelltod zu verhindern (Maier et al., 1996; Meek et al., 2002). TNF α kann zudem die extrinsische Apoptose auslösen. In der vorliegenden Arbeit zeigten unsere Ergebnisse jedoch eine signifikant erniedrigte TGF- β 2 Genexpression sowie tendenziell erniedrigte mRNA-Expressionen von IL-1 β und TNF α im MD-Gewebe.

Aufgrund von der Zellproliferation der MD-Fibroblasten, wäre eine fehlende Apoptose (Wilutzky et al., 1998) denkbar gewesen. Anhand der vorliegenden Arbeit wurde allerdings der intrinsische Weg der Apoptose durch die STS-Behandlung untersucht. Diese Ergebnisse deuten möglicherweise eine zusätzliche Therapieoption des MD durch Indukti-

on der intrinsischen Apoptose an. Um eine ganzheitliche Aussage in Bezug auf die Bedeutung der Apoptose von Fibroblasten beim MD zu treffen, sollte auch die extrinsisch induzierbare Apoptose untersucht werden.

4.6 Die Hemmung der Differenzierung von stimulierten Fibroblasten durch blaues Licht

4.6.1 Toxische Wirkungen von blauem Licht

Effekte von blauem Licht wurden unter anderem in Rattenversuchen untersucht, wobei sich zeigte, dass blaues Licht die Wundheilung unterstützt (Adamskaya et al., 2011). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Differenzierung von MD-Fibroblasten zu Myofibroblasten deutlich reduziert werden kann, bei einer Bestrahlung von 30 J/cm^2 (420 nm) (Taflinski et al., 2014). Nachteilig wären mögliche toxische Effekte der Bestrahlung mit blauem Licht in Fibroblasten. Mögliche toxische Effekte wären zelluläre Dysfunktion sowie die Entwicklung von malignen Melanomen oder Verletzungen der Netzhaut wie z. B. die Photoretinitis (Okuno et al., 2002).

Das Risiko toxischer Wirkung ist wellenlängenabhängig. Wellenlängen von 410, 420 nm sind toxisch, wohingegen längere Wellenlängen keine Toxizitäten zeigten (Taflinski et al., 2014). Im Einklang mit der Literatur stellten wir fest, dass mit Steigerung der Dosis auch das Risiko der Toxizität steigt. Bei der Anwendung von 40 J/cm^2 konnten keine toxischen Effekte ermittelt werden (siehe Abb. 11).

Auf der Basis der gezeigten Ergebnisse wäre eine Anwendung des blauen Lichts (ab 5 J/cm^2) in einem nicht toxischen Bereich möglich. Für eine sichere Anwendung spricht auch, dass blaues Licht bereits in der Therapie von Akne vulgaris (Omi et al., 2004) und der Behandlung von Keloiden eingesetzt wird. Die Patienten mit Akne vulgaris wurden achtmal über 4 Wochen mit blauem Licht (420 nm) für jeweils 15 min bestrahlt. Bei 64,7 % der Patienten verbesserten sich die Aknewunden.

Der Wirkmechanismus von blauem Licht ist noch ungeklärt. In der Literatur sind bereits erhöhte Hypoxanthinwerte in MD-Gewebe beschrieben (Murrell et al., 1987). Die Expression von Hypoxanthin kann durch Hypoxie induziert werden und wird von der Hypoxanthinoxidase unter Abgabe freier Sauerstoffradikale abgebaut. Diese freien Sauerstoffradikale erzeugen die Proliferation von perivaskulären Zellen, was zur Gefäß-

verengung führt. Eine Gefäßverengung wurde auch histologisch nachgewiesen (Comtet et al., 1985). Durch die Gefäßverengung entsteht im Umkehrschluss wiederum erneut Hypoxie im Gewebe. Aus diesem Grunde untersuchten wir die ROS Generation. Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass sowohl bestrahlte als auch nicht bestrahlte Fibroblasten des MD immer die höchste absolute ROS Generation erreichten im Vergleich zu den bestrahlten und nicht bestrahlten Kontrollfibroblasten (siehe Abb. 14). Dies würde wieder die These der begünstigenden Kofaktoren stützen. Die Kofaktoren (Rauchen, Diabetes, Alkoholabusus etc.) forcieren die Entstehung einer Mikroangiopathie und somit die Hypoxie. Des Weiteren wird die Proliferation von Fibroblasten und Kollagenproduktion verstärkt und somit wird die Entwicklung einer Fibrose begünstigt (Shih and Bayat, 2010).

Es wurde erwartet, dass durch die Bestrahlung von blauem Licht die ROS Generation bei den MD-Fibroblasten abgenommen hätte. Es könnte sein, dass es zu einem Feedbackmechanismus kommt. Die molekularbiologische Wirkungsweise konnte nicht vollständig aufgeklärt werden, dennoch konnten wir zeigen, dass die ROS Generation in MD-Fibroblasten höher ist als in Kontrollfibroblasten und durch die Bestrahlung zunimmt. In jedem Fall ist anzunehmen, dass die absolute ROS Generation durch die Bestrahlung zunimmt.

4.6.2 Mögliche Anwendung von blauem Licht beim Morbus Dupuytren (MD)

Grundsätzlich wäre eine Anwendung von blauem Licht zur Sekundär- oder Tertiärprävention des MD denkbar. Eine Primärprophylaxe wäre lediglich bei Patienten mit einer signifikanten familiären Prädisposition denkbar.

Die Sekundärprävention wäre bereits im Stadium 1 und 2 nach Tubiana noch vor einem operativen Eingriff möglich. Ziel der Behandlung in diesen Fällen wäre es, den Progress der Erkrankung zu hemmen bzw. aufzuhalten. Hauptziele der Behandlung könnten die Fingerbeweglichkeit und klinisch manifeste Knoten-/Strangbildung sein. Erfolgsversprechend wäre hierbei, eine Bestrahlung in einem histologisch frühen Stadium z. B. dem Proliferationsstadium einzusetzen, bei dem noch überwiegend Fibroblasten bzw. Myofibroblasten vorhanden sind. Das Problem hierbei ist allerdings, dass die Aktivität der Erkrankung und die Differenzierungsaktivität schwer abzuschätzen ist, da das Stadium nach Tubiana nicht mit dem histologischen Stadium übereinstimmt. Ein Einsatz des blauen Lichts in den späten klinischen und histologischen Stadien ist weniger zielführend. Eine Bestrahlung im Involutionsstadium verspricht keine Effekte. Ebenso ist eine Verbesserung

der Fingerbeweglichkeit bei einer bereits langjährig bestehenden hochgradigen Beugekontraktur in den Mittelgelenken der Finger nicht mehr zu erwarten.

In der vorliegenden Arbeit wurden wesentliche positive Effekte vor allem deutlich bei TGF- β 1 stimulierten Fibroblasten (siehe Abb. 12) deutlich. Der Einsatz von blauem Licht insbesondere zur Tertiärprophylaxe wäre direkt im Anschluss an einen operativen Eingriff möglich. Unmittelbar nach einem chirurgischen Eingriff liegen hohe Konzentrationen von IL-1 β und TGF- β vor (Wang et al., 1997), daher ist besonders hier ein therapeutischer Nutzen zu erwarten.

In der vorliegenden Arbeit wurden isolierte Fibroblasten über einen Zeitraum von 72 h bzw. 120 h bestrahlt. *In vivo* sind über sinnvolle Zeiten noch keine Untersuchungen durchgeführt worden. Im Rahmen eines *in vivo* Versuchs ist zudem zu berücksichtigen, dass die *in vitro* Effekte auf die Fibroblasten nicht zwingendermaßen auf die *in vivo* zu übertragen sind. Die Wirkung auf Fibroblasten, die unterhalb der Haut und des Fettgewebes in der Hohlhand liegen, ist nicht bekannt. Vorteilhaft beim MD ist allerdings, dass die Abschwächung gering ausfallen dürfte, da die Erkrankung unmittelbar unter der Haut stattfindet.

Bei einer etwaigen Therapie des MD mit blauem Licht sollte jedoch bedacht werden, dass nach Beendigung einer Therapie das Rezidivrisiko wieder ansteigt. Unter Umständen wäre eine lebenslange Bestrahlung nötig.

4.7 Schlussfolgerungen

Das Ziel dieser Arbeit sollte sein, den Einfluss von TGF- β 1 und IL-1 β auf die TIMP-MMP-Homöostase und auf inflammatorische Zytokine zu untersuchen, sowie die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Zudem wurden erste Bestrahlungsversuche der MD-Fibroblasten mit blauem Licht durchgeführt, um so vielleicht einen neuen nicht-invasiven Therapieansatz zu finden.

Die Zusammensetzung der EZM ist verändert und es wird ein gestörtes Gleichgewicht der die EZM abbauenden MMPs und deren Inhibitoren, den TIMPs, im Rahmen der Pathogenese vermutet (Ulrich et al., 2009). Unsere Untersuchungen zeigten eine signifikant erniedrigte mRNA-Expression von TIMP3. Erniedrigte TIMP3-Level führen als Gegenspieler der MMPs zu vermindertem Abbau der EZM und so könnten Fibrosen entstehen.

Eine veränderte Regulation von TGF- β im MD-Gewebe ist in der Literatur beschrieben worden (Zhang et al., 2008). Es wird angenommen, dass TGF- β eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des MD einnimmt. Unsere Ergebnisse zeigen eine verminderte mRNA-Expression von TGF- β 2 im MD-Gewebe. Hier wären weitere Untersuchungen der anderen Spleißvarianten von TGF- β nötig und eine strengere Unterscheidung des zu untersuchenden Materials, z. B. nach Knoten und Strängen oder auch des histologischen Stadiums.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Annahmen der Literatur, dass die TGF- β Stimulation zu einer erhöhten α -SMA Proteinexpression und somit verstärkter Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten führt (Bisson et al., 2009). Die verstärkte Differenzierung zu Myofibroblasten durch die TGF- β Stimulation könnte ein Grund sein, dass eine gesteigerte Rezidivrate nach Operationen besteht. Durch den Wundheilungsprozess liegen erhöhte Konzentrationen von TGF- β im Gewebe vor und diese führen zu einer verstärkten Differenzierung zu Myofibroblasten.

Eine verminderte Apoptoserate wird in der Literatur vermutet (Wilutzky et al., 1998). Andere Autoren nehmen an, dass eine reduzierte Apoptose der inflammatorischen Zellen zur Proliferation der Myofibroblasten führt (Meek et al., 2002). Unsere Ergebnisse zeigten, dass durch die TGF- β 1 Gabe eine erhöhte intrinsische Apoptoserate (Staurosporin-Konzentration von 0,075 μ M) induziert werden konnte. Durch diese Ergebnisse bietet sich ein neuer Ansatz für die Entwicklung weiterer Versuche und möglicherweise alternativer Therapieansätze an.

Die Bestrahlung mit blauem Licht von TGF- β 1 stimulierten Fibroblasten führte zu einer verminderten Differenzierung der MD- und Kontrollfibroblasten. Dies sind erste Ergebnisse, die auf eine nicht-invasive Tertiärprophylaxe hindeuten. Die *in vitro* Ergebnisse sind nicht zwangsläufig auf die *in vivo* Ergebnisse zu übertragen und es sind weiterführende Versuche notwendig, um auch hier eine ganzheitlich Aussage auf eventuelle Spätfolgen der Bestrahlung zu treffen.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adamskaya, N., Dungal, P., Mittermayr, R., Hartinger, J., Feichtinger, G., Wassermann, K., Redl, H., van Griensven, M., **2011**. Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats. *Injury* 42, 917–921.
- An, H.S., Southworth, S.R., Jackson, W.T., Russ, B., **1988**. Cigarette smoking and Dupuytren's contracture of the hand. *J. Hand Surg.* 13, 872–874.
- Arafa, M., Noble, J., Royle, S.G., Trail, I.A., Allen, J., **1992**. Dupuytren's and epilepsy revisited. *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 17, 221–224.
- Badalamente, M.A., Sampson, S.P., Hurst, L.C., Dowd, A., Miyasaka, K., **1996**. The role of transforming growth factor beta in Dupuytren's disease. *J. Hand Surg.* 21, 210–215.
- Baird, K.S., Crossan, J.F., Ralston, S.H., **1993**. Abnormal growth factor and cytokine expression in Dupuytren's contracture. *J. Clin. Pathol.* 46, 425–428.
- Bazin, S., Le Lous, M., Duance, V.C., Sims, T.J., Bailey, A.J., Gabbiani, G., D'Andiran, G., Pizzolato, G., Browski, A., Nicoletis, C., Delaunay, A., **1980**. Biochemistry and histology of the connective tissue of Dupuytren's disease lesions. *Eur. J. Clin. Invest.* 10, 9–16.
- Becker, K., Tinschert, S., Lienert, A., Bleuler, P.E., Staub, F., Meinel, A., Rößler, J., Wach, W., Hoffmann, R., Kühnel, F., Damert, H.-G., Nick, H.-E., Spicher, R., Lenze, W., Langer, M., Nürnberg, P., Hennies, H.C., **2015**. The importance of genetic susceptibility in Dupuytren's disease. *Clin. Genet.* 87, 483–487.
- Becker, K., Tinschert, S., Lienert, A., Bleuler, P.E., Staub, F., Meinel, A., Rößler, J., Wach, W., Hoffmann, R., Kühnel, F., Damert, H.-G., Nick, H.-E., Spicher, R., Lenze, W., Langer, M., Nürnberg, P., Hennies, H.C., **2014**. The importance of genetic susceptibility in Dupuytren's disease. *Clin. Genet.*
- Bisson, M.A., Beckett, K.S., McGrouther, D.A., Grobbelaar, A.O., Mudera, V., **2009**. Transforming growth factor-beta1 stimulation enhances Dupuytren's fibroblast contraction in response to uniaxial mechanical load within a 3-dimensional collagen gel. *J. Hand Surg.* 34, 1102–1110.
- Bisson, M.A., McGrouther, D.A., Mudera, V., Grobbelaar, A.O., **2003**. The different characteristics of Dupuytren's disease fibroblasts derived from either nodule or cord: expression of alpha-smooth muscle actin and the response to stimulation by TGF-beta1. *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 28, 351–356.
- Blobe, G.C., Schiemann, W.P., Lodish, H.F., **2000**. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* 342, 1350–1358.
- Bojsen-Moller, F., Schmidt, L., **1974**. The palmar aponeurosis and the central spaces of the hand. *J. Anat.* 117, 55–68.
- Bovenzi, M., **1994**. Hand-arm vibration syndrome and dose-response relation for vibration induced white finger among quarry drillers and stonecarvers. Italian Study Group on Physical Hazards in the Stone Industry. *Occup. Environ. Med.* 51, 603–611.
- Bower, M., Nelson, M., Gazzard, B.G., **1990**. Dupuytren's contractures in patients infected with HIV. *BMJ* 300, 164–165.
- Brenner, P., Krause-Bergmann, A., Van, V.H., **2001**. [Dupuytren contracture in North Germany. Epidemiological study of 500 cases]. *Unfallchirurg* 104, 303–311.
- Brill, A., Torchinsky, A., Carp, H., Toder, V., **1999**. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *J. Assist. Reprod. Genet.* 16, 512–519.
- Brotherston, T.M., Balakrishnan, C., Milner, R.H., Brown, H.G., **1994**. Long term follow-up of dermofasciectomy for Dupuytren's contracture. *Br. J. Plast. Surg.* 47, 440–443.
- Burge, P., **1999**. Genetics of Dupuytren's disease. *Hand Clin.* 15, 63–71.
- Burge, P., Hoy, G., Regan, P., Milne, R., **1997**. Smoking, alcohol and the risk of Dupuy-

tren's contracture. *J. Bone Joint Surg. Br.* 79, 206–210.

Colville, J., **1983**. Dupuytren's contracture-the role of fasciotomy. *The Hand* 15, 162–166.

Comtet, J.J., Bourne-Branchu, B., Herzberg, G., Bertrand, H.G., Loire, R., **1985**. Lesions of digital arteries in Dupuytren's disease. A study of twelve cases. *Ann. Chir. Main Organe Off. Sociétés Chir. Main* 4, 226–232.

Darby, I.A., Laverdet, B., Bonté, F., Desmoulière, A., **2014**. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 7, 301–311.

Descatha, A., Bodin, J., Ha, C., Goubault, P., Lebreton, M., Chastang, J.F., Imbernon, E., Leclerc, A., Goldberg, M., Roquelaure, Y., **2012**. Heavy manual work, exposure to vibration and Dupuytren's disease? Results of a surveillance program for musculoskeletal disorders. *Occup. Environ. Med.* 69, 296–299.

Dinarello, C.A., Ikejima, T., Warner, S.J., Orencole, S.F., Lonemann, G., Cannon, J.G., Libby, P., **1987**. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 139, 1902–1910.

Dinarello, C.A., van der Meer, J.W.M., **2013**. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin. Immunol.* 25, 469–484.

Docheva, D., Vaerst, B., Deiler, S., Giunta, R.E., Schieker, M., Volkmer, E., **2012**. [Alterations of cell phenotype in Dupuytren's disease-an in vitro analysis]. *Handchir. Mikrochir. Plast. Chir. Organ Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft Für Handchir. Organ Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft Für Mikrochir. Peripher. Nerven Gefäße Organ Ver. Dtsch. Plast. Chir.* 44, 59–66.

Early, P.F., **1962**. Population studies in Dupuytren's contracture. *J Bone Joint Surg Br* 44-B(3): 602-613.

Fan, D., Takawale, A., Basu, R., Patel, V., Lee, J., Kandalam, V., Wang, X., Oudit, G.Y., Kassiri, Z., **2014**. Differential role of TIMP2 and TIMP3 in cardiac hypertrophy, fibrosis, and diastolic dysfunction. *Cardiovasc. Res.* 103, 268–280.

Fitzgerald, A.M., Kirkpatrick, J.J., Naylor, I.L., **1999**. Dupuytren's disease. The way forward? *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 24, 395–399.

Forrester, H.B., Temple-Smith, P., Ham, S., de Kretser, D., Southwick, G., Sprung, C.N., **2013**. Genome-wide analysis using exon arrays demonstrates an important role for expression of extra-cellular matrix, fibrotic control and tissue remodelling genes in Dupuytren's disease. *PloS One* 8, e59056.

Freehafer, A.A., Strong, J.M., **1963**. THE TREATMENT OF DUPUYTREN'S CONTRACTURE BY PARTIAL FASCIECTOMY. *J. Bone Joint Surg. Am.* 45, 1207–1216.

Gabbiani, G., Majno, G., **1972**. Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. *Am. J. Pathol.* 66, 131–146.

Gaston, R.G., Larsen, S.E., Pess, G.M., Coleman, S., Dean, B., Cohen, B.M., Kaufman, G.J., Tursi, J.P., Hurst, L.C., **2015**. The Efficacy and Safety of Concurrent Collagenase Clostridium Histolyticum Injections for 2 Dupuytren Contractures in the Same Hand: a Prospective, Multicenter Study. *J. Hand Surg.*

Gerber, R.A., Perry, R., Thompson, R., Bainbridge, C., **2011**. Dupuytren's contracture: a retrospective database analysis to assess clinical management and costs in England. *BMC Musculoskelet. Disord.* 12, 73.

Gokel, J.M., Hübner, G., **1977**. Occurrence of myofibroblasts in the different phases of morbus Dupuytren (Dupuytren's contracture). *Beitr. Zur Pathol.* 161, 166–175.

Grabowski, P., **2004**. Morbus Dupuytren. Münster.

Greve, C.S., **2002**. Biochemische Untersuchungen extrazellulärer Matrixkomponenten beim Morbus Dupuytren. Lübeck.

- Hart, M.G., Hooper, G., **2005**. Clinical associations of Dupuytren's disease. *Postgrad. Med. J.* 81, 425–428.
- Heathcote, J.G., Cohen, H., Noble, J., **1981**. Dupuytren's disease and diabetes mellitus. *Lancet* 1, 1420.
- Hindman, H.B., Marty-Roix, R., Tang, J.B., Jupiter, J.B., Simmons, B.P., Spector, M., **2003**. Regulation of expression of alpha-smooth muscle actin in cells of Dupuytren's contracture. *J. Bone Joint Surg. Br.* 85, 448–455.
- Hinz, B., **2007**. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J. Invest. Dermatol.* 127, 526–537.
- Hueston, J.T., **1963**. Recurrent Dupuytren's contracture. *Plast. Reconstr. Surg.* 31, 66–69.
- Hurst, L.C., Badalamente, M.A., Hentz, V.R., Hotchkiss, R.N., Kaplan, F.T.D., Meals, R.A., Smith, T.M., Rodzvilla, J., CORD I Study Group, **2009**. Injectable collagenase clostridium histolyticum for Dupuytren's contracture. *N. Engl. J. Med.* 361, 968–979.
- Jemec, B., Grobelaar, A.O., Wilson, G.D., Smith, P.J., Sanders, R., McGrouther, D.A., **1999**. Is Dupuytren's disease caused by an imbalance between proliferation and cell death? *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 24, 511–514.
- Jin, L.-T., Zhang, H., Li, C.-C., Zhang, W.-X., Lin, L., **2011**. [Effects of lentinan on interleukin-1 β -induced transdifferentiation of human embryonic lung fibroblasts to myofibroblasts]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi Chin. J. Contemp. Pediatr.* 13, 331–335.
- Kang, Y.-M., Choi, Y.-R., Yun, C.-O., Park, J.-O., Suk, K.-S., Kim, H.-S., Park, M.-S., Lee, B.-H., Lee, H.-M., Moon, S.-H., **2014**. Down-regulation of collagen synthesis and matrix metalloproteinase expression in myofibroblasts from Dupuytren nodule using adenovirus-mediated relaxin gene therapy. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 32, 515–523.
- Kashiwagi, M., Tortorella, M., Nagase, H., Brew, K., **2001**. TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *J. Biol. Chem.* 276, 12501–12504.
- Kassiri, Z., Oudit, G.Y., Kandalam, V., Awad, A., Wang, X., Ziou, X., Maeda, N., Herzenberg, A.M., Scholey, J.W., **2009**. Loss of TIMP3 enhances interstitial nephritis and fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20, 1223–1235.
- Kennedy, A.M., Inada, M., Krane, S.M., Christie, P.T., Harding, B., López-Otín, C., Sánchez, L.M., Pannett, A.A.J., Dearlove, A., Hartley, C., Byrne, M.H., Reed, A.A.C., Nesbit, M.A., Whyte, M.P., Thakker, R.V., **2005**. MMP13 mutation causes spondyloepimetaphyseal dysplasia, Missouri type (SEMD(MO)). *J. Clin. Invest.* 115, 2832–2842.
- Ketchum, L.D., Donahue, T.K., **2000**. The injection of nodules of Dupuytren's disease with triamcinolone acetonide. *J. Hand Surg.* 25, 1157–1162.
- Khashan, M., Smitham, P.J., Khan, W.S., Goddard, N.J., **2011**. Dupuytren's Disease: Review of the Current Literature. *Open Orthop. J.* 5 Suppl 2, 283–288.
- Koźma, E.M., Głowacki, A., Olczyk, K., Ciecierska, M., **2007**. Dermatan sulfate remodeling associated with advanced Dupuytren's contracture. *Acta Biochim. Pol.* 54, 821–830.
- Lanzettá, M., Morrison, W.A., **1996**. Dupuytren's disease occurring after a surgical injury to the hand. *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 21, 481–483.
- Libby, P., Wyler, D.J., Janicka, M.W., Dinarello, C.A., **1985**. Differential effects of human interleukin-1 on growth of human fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Dallas Tex* 5, 186–191.
- Ling, R.S., **1963**. THE GENETIC FACTOR IN DUPUYTREN'S DISEASE. *J. Bone Joint Surg. Br.* 45, 709–718.
- Liss, G.M., Stock, S.R., **1996**. Can Dupuytren's contracture be work-related?: review of the evidence. *Am. J. Ind. Med.* 29, 521–532.
- Luck, J.V., **1959**. Dupuytren's contracture; a new concept of the pathogenesis correlated

with surgical management. *J. Bone Joint Surg. Am.* 41-A, 635–664.

Maier, J.A., Morelli, D., Ménard, S., Colnaghi, M.I., Balsari, A., **1996**. Tumor-necrosis-factor-induced fibroblast growth factor-1 acts as a survival factor in a transformed endothelial cell line. *Am. J. Pathol.* 149, 945–952.

Mamalis, A., Garcha, M., Jagdeo, J., **2015**. Light emitting diode-generated blue light modulates fibrosis characteristics: Fibroblast proliferation, migration speed, and reactive oxygen species generation. *Lasers Surg. Med.* 47, 210–215.

Massova, I., Kotra, L.P., Fridman, R., Mobashery, S., **1998**. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 12, 1075–1095.

McFarlane, R.M., **2002**. On the origin and spread of Dupuytren’s disease. *J. Hand Surg.* 27, 385–390.

Meek, R.M.D., McLellan, S., Reilly, J., Crossan, J.F., **2002**. The effect of steroids on Dupuytren’s disease: role of programmed cell death. *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 27, 270–273.

Meister, P., Gokel, J.M., Remberger, K., **1979**. Palmar fibromatosis-“Dupuytren’s contracture”. A comparison of light electron and immunofluorescence microscopic findings. *Pathol. Res. Pract.* 164, 402–412.

Menzel, E.J., Piza, H., Zielinski, C., Endler, A.T., Steffen, C., Millesi, H., **1979**. Collagen types and anticollagen-antibodies in Dupuytren’s disease. *The Hand* 11, 243–248.

Mikkelsen, O.A., **1978**. Dupuytren’s disease-the influence of occupation and previous hand injuries. *The Hand* 10, 1–8.

Mikkelsen, O.A., **1976**. Dupuytren’s disease-a study of the pattern of distribution and stage of contracture in the hand. *The Hand* 8, 265–271.

Millesi, H., **1965**. [On the pathogenesis and therapy of Dupuytren’s contracture. (A study based on more than 500 cases)]. *Ergeb. Chir. Orthop.* 47, 51–101.

Mitra, A., Goldstein, R.Y., **1994**. Dupuytren’s contracture in the black population: a review. *Ann. Plast. Surg.* 32, 619–622.

Mochizuki, H., Mori, H., Mizuno, Y., **1997**. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *J. Neural Transm. Suppl.* 50, 125–140.

Murrell, G.A., Francis, M.J., Bromley, L., **1987**. Free radicals and Dupuytren’s contracture. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed* 295, 1373–1375.

Nagase, H., Visse, R., Murphy, G., **2006**. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 69, 562–573.

Neumüller, J., Menzel, J., Millesi, H., **1994**. Prevalence of HLA-DR3 and autoantibodies to connective tissue components in Dupuytren’s contracture. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 71, 142–148.

Noble, J., Arafa, M., Royle, S.G., McGeorge, G., Crank, S., **1992**. The association between alcohol, hepatic pathology and Dupuytren’s disease. *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 17, 71–74.

Noble, J., Heathcote, J.G., Cohen, H., **1984**. Diabetes mellitus in the aetiology of Dupuytren’s disease. *J. Bone Joint Surg. Br.* 66, 322–325.

Oberringer, M., Meins, C., Bubel, M., Pohlemann, T., **2008**. In vitro wounding: effects of hypoxia and transforming growth factor beta1 on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model. *J. Mol. Histol.* 39, 37–47.

Ohara, M., Kawashima, Y., Kitajima, S., Mitsuoka, C., Watanabe, H., **2003**. Blue light inhibits the growth of skin tumors in the v-Ha-ras transgenic mouse. *Cancer Sci.* 94, 205–209.

Oh, P.-S., Na, K.S., Hwang, H., Jeong, H.-S., Lim, S., Sohn, M.-H., Jeong, H.-J., **2015**. Effect of blue light emitting diodes on melanoma cells: involvement of apoptotic signaling. *J. Photochem. Photobiol. B* 142, 197–203.

- Okuno, T., Saito, H., Ojima, J., **2002**. Evaluation of blue-light hazards from various light sources. *Dev. Ophthalmol.* 35, 104–112.
- Omi, T., Bjerring, P., Sato, S., Kawana, S., Hankins, R.W., Honda, M., **2004**. 420 nm intense continuous light therapy for acne. *J. Cosmet. Laser Ther. Off. Publ. Eur. Soc. Laser Dermatol.* 6, 156–162.
- Patterson, M.L., Atkinson, S.J., Knäuper, V., Murphy, G., **2001**. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett.* 503, 158–162.
- Picardo, N.E., Khan, W.S., **2012**. Advances in the understanding of the aetiology of Dupuytren's disease. *Surg. J. R. Coll. Surg. Edinb. Irel.* 10, 151–158.
- Pittet, B., Rubbia-Brandt, L., Desmoulière, A., Sappino, A.P., Roggero, P., Guerret, S., Grimaud, J.A., Lacher, R., Montandon, D., Gabbiani, G., **1994**. Effect of gamma-interferon on the clinical and biologic evolution of hypertrophic scars and Dupuytren's disease: an open pilot study. *Plast. Reconstr. Surg.* 93, 1224–1235.
- Pojer, J., Radivojevic, M., Williams, T.F., **1972**. Dupuytren's disease. Its association with abnormal liver function in alcoholism and epilepsy. *Arch. Intern. Med.* 129, 561–566.
- Porter, S., Clark, I.M., Kevorkian, L., Edwards, D.R., **2005**. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem. J.* 386, 15–27.
- Povlsen, B., Singh, S., **2014**. Acute double flexor tendon ruptures following injection of collagenase clostridium histolyticum (Xiapex) for Dupuytren's contracture. *BMJ Case Rep.* 2014.
- Rayan, G.M., **2008**. Nonoperative treatment of Dupuytren's disease. *J. Hand Surg.* 33, 1208–1210.
- Rehman, S., Salway, F., Stanley, J.K., Ollier, W.E.R., Day, P., Bayat, A., **2008**. Molecular phenotypic descriptors of Dupuytren's disease defined using informatics analysis of the transcriptome. *J. Hand Surg.* 33, 359–372.
- Richard-Kadio, M., Yeo, S., Kossoko, H., Allah, C.-K., Assi-Dje Bi Dje, V., **2008**. [Dupuytren's contracture. A report of three cases in Black Africans]. *Chir. Main* 27, 40–42.
- Ritter, M.A., **1973**. The anatomy and function of the palmar fascia. *The Hand* 5, 263–267.
- Ryder, M.I., Saghizadeh, M., Ding, Y., Nguyen, N., Soskolne, A., **2002**. Effects of tobacco smoke on the secretion of interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta from peripheral blood mononuclear cells. *Oral Microbiol. Immunol.* 17, 331–336.
- Satish, L., Gallo, P.H., Baratz, M.E., Johnson, S., Kathju, S., **2011**. Reversal of TGF-beta1 stimulation of alpha-smooth muscle actin and extracellular matrix components by cyclic AMP in Dupuytren's - derived fibroblasts. *BMC Musculoskelet. Disord.* 12, 113.
- Savill, J.S., Wyllie, A.H., Henson, J.E., Walport, M.J., Henson, P.M., Haslett, C., **1989**. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* 83, 865–875.
- Schiebler, T.H., **2004**. *Anatomie*, 9. Auflage. ed. Springer, Würzburg.
- Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., Wesker, K., **2007**. *Prometheus, LernAtlas der Anatomie, Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*, 2. Auflage. ed. Thieme, Stuttgart.
- Shaw, R.B., Chong, A.K.S., Zhang, A., Hentz, V.R., Chang, J., **2007**. Dupuytren's disease: history, diagnosis, and treatment. *Plast. Reconstr. Surg.* 120, 44e–54e.
- Shephard, P., Hinz, B., Smola-Hess, S., Meister, J.-J., Krieg, T., Smola, H., **2004**. Dissecting the roles of endothelin, TGF-beta and GM-CSF on myofibroblast differentiation by keratinocytes. *Thromb. Haemost.* 92, 262–274.
- Shih, B., Bayat, A., **2010**. Scientific understanding and clinical management of Dupuytren disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6, 715–726.

Shnitkind, E., Yaping, E., Geen, S., Shalita, A.R., Lee, W.-L., **2006**. Anti-inflammatory properties of narrow-band blue light. *J. Drugs Dermatol.* JDD 5, 605–610.

Skoog, T., **1957**. Dupuytren's contracture. *Postgrad. Med.* 21, 91–99.

Sladicka, M.S., Benfanti, P., Raab, M., Becton, J., **1996**. Dupuytren's contracture in the black population: a case report and review of the literature. *J. Hand Surg.* 21, 898–899.

Starkweather, K.D., Lattuga, S., Hurst, L.C., Badalamente, M.A., Guilak, F., Sampson, S.P., Dowd, A., Wisch, D., **1996**. Collagenase in the treatment of Dupuytren's disease: an in vitro study. *J. Hand Surg.* 21, 490–495.

Stuhler, T., Stankovic, P., Ritter, G., Schmulder, E., **1977**. [Epilepsy and Dupuytren's contracture—a syntropy of 2 diseases?]. *Handchirurgie* 9, 219–223.

Taflinski, L., Demir, E., Kauczok, J., Fuchs, P.C., Born, M., Suschek, C.V., Opländer, C., **2014**. Blue light inhibits transforming growth factor- β 1-induced myofibroblast differentiation of human dermal fibroblasts. *Exp. Dermatol.* 23, 240–246.

Thomas, P.R., Clarke, D., **1992**. Vibration white finger and Dupuytren's contracture: are they related? *Occup. Med. Oxf. Engl.* 42, 155–158.

Tomasek, J.J., Schultz, R.J., Haaksma, C.J., **1987**. Extracellular matrix-cytoskeletal connections at the surface of the specialized contractile fibroblast (myofibroblast) in Dupuytren disease. *J. Bone Joint Surg. Am.* 69, 1400–1407.

Tubiana, R., Michon, J., Thomine, J.M., **1968**. Scheme for the assessment of deformities in Dupuytren's disease. *Surg. Clin. North Am.* 48, 979–984.

Ulrich, D., Hrynyschyn, K., Pallua, N., **2003**. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in sera and tissue of patients with Dupuytren's disease. *Plast. Reconstr. Surg.* 112, 1279–1286.

Ulrich, D., Ulrich, F., Piatkowski, A., Pallua, N., **2009**. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in cords and nodules of patients with Dupuytren's disease. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 129, 1453–1459.

Unemori, E.N., Pickford, L.B., Salles, A.L., Piercy, C.E., Grove, B.H., Erikson, M.E., Amento, E.P., **1996**. Relaxin induces an extracellular matrix-degrading phenotype in human lung fibroblasts in vitro and inhibits lung fibrosis in a murine model in vivo. *J. Clin. Invest.* 98, 2739–2745.

Vaerst, B.A.V., **2013**. Neue molekulare Charakteristika von Zellisolaten aus Dupuytren-Gewebe. Hamburg.

Van Rijssen, A.L., ter Linden, H., Werker, P.M.N., **2012**. Five-year results of a randomized clinical trial on treatment in Dupuytren's disease: percutaneous needle fasciotomy versus limited fasciectomy. *Plast. Reconstr. Surg.* 129, 469–477.

Verheyden, C.N., **1983**. The history of Dupuytren's contracture. *Clin. Plast. Surg.* 10, 619–625.

Verjee, L.S., Midwood, K., Davidson, D., Essex, D., Sandison, A., Nanchahal, J., **2009**. Myofibroblast distribution in Dupuytren's cords: correlation with digital contracture. *J. Hand Surg.* 34, 1785–1794.

Vi, L., Feng, L., Zhu, R.D., Wu, Y., Satish, L., Gan, B.S., O'Gorman, D.B., **2009**. Periostrin differentially induces proliferation, contraction and apoptosis of primary Dupuytren's disease and adjacent palmar fascia cells. *Exp. Cell Res.* 315, 3574–3586.

Wang, X., Niu, X., Cheng, D., **1997**. [TGF-beta 1 gene expression in the healing process of skin wound in rat]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi Chin. J. Reparative Reconstr. Surg.* 11, 257–260.

Wilkinson, J.M., Davidson, R.K., Swingler, T.E., Jones, E.R., Corps, A.N., Johnston, P., Riley, G.P., Chojnowski, A.J., Clark, I.M., **2012**. MMP-14 and MMP-2 are key metalloproteases in Dupuytren's disease fibroblast-mediated contraction. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 897–905.

- Wilutzky, B., Berndt, A., Katenkamp, D., Koshmehl, H., **1998**. Programmed cell death in nodular palmar fibromatosis (Morbus Dupuytren). *Histol. Histopathol.* 13, 67–72.
- Wong, M., Mudera, V., **2006**. Feedback inhibition of high TGF-beta1 concentrations on myofibroblast induction and contraction by Dupuytren's fibroblasts. *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 31, 473–483.
- Wu, L., Zhou, Y., Zhou, Z., Liu, Y., Bai, Y., Xing, X., Wang, X., **2014**. Nicotine induces the production of IL-1 β and IL-8 via the α 7 nAChR/NF- κ B pathway in human periodontal ligament cells: an in vitro study. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 34, 423–431.
- Yue, T.L., Wang, X.K., Olson, B., Feuerstein, G., **1994**. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) induces transforming growth factor-beta, (TGF-beta 1) production by rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 1186–1192.
- Zankl, A., Pachman, L., Poznanski, A., Bonafé, L., Wang, F., Shusterman, Y., Fishman, D.A., Superti-Furga, A., **2007**. Torg syndrome is caused by inactivating mutations in MMP2 and is allelic to NAO and Winchester syndrome. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 22, 329–333.
- Zhang, A.Y., Fong, K.D., Pham, H., Nacamuli, R.P., Longaker, M.T., Chang, J., **2008**. Gene expression analysis of Dupuytren's disease: the role of TGF-beta2. *J. Hand Surg. Eur. Vol.* 33, 783–790.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Tim Lögters für die bereitwillige Übernahme der Betreuung meiner Arbeit sowie die Bereitstellung des spannenden und interessanten Themas an der Uniklinik der Unfall- und Handchirurgie Düsseldorf bedanken. Des Weiteren für seine permanente Ansprechbarkeit, trotz der alltäglichen Praxis als stellvertretender Klinikleiter, seine stets aufbauenden Worte, seine konstruktiven Ratschläge und die Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Vera Grotheer für die intensive wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit. Für die unermüdliche Unterstützung bei auftretenden Problemen in der Durchführung der experimentellen Arbeit und für die vielen Forschungsideen, die sie in diese Arbeit mit hineingebracht hat sowie die Hilfe bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Ich danke dem ganzen Team des Labors der Unfall- und Handchirurgie für die gute Zusammenarbeit und stets angenehme Atmosphäre. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Suschek danke ich für die Möglichkeit die Experimente in den Institutslaboratorien durchzuführen und die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau M. Sc. Benita Sahlender bedanken, die mich fachlich und auch persönlich jederzeit unterstützt hat und mit der die Arbeit im Labor eine große Freude gemacht hat.

Ein großer Dank gilt den technischen Assistentinnen, Frau Samira Segrouchni und Jutta Schneider für die Einarbeitung in die Laborarbeit, die vielen Tipps und Tricks im Labor sowie die kleinen Hilfen zwischendurch. Auch danke ich der Diplom Biologin Julia Krassovka sehr für die Einarbeitung und Hinweise zur Durchführung der Bestrahlungsversuche.

Ich danke meinem Freund Georg Wagner, der mich in anstrengenden Zeiten immer wieder ermutigt hat weiter zu arbeiten und für sein Verständnis für die vielen Abende und Wochenenden sowie Urlaube, die ich im Labor oder mit Recherchen und Schreiben verbracht habe, um diese Arbeit vollenden zu können.

Zu guter Letzt gebührt ein grenzenloser Dank meinen Eltern, die mich in allen Phasen meines Lebens mit Liebe, Geduld und ihrem Tun jederzeit unterstützt haben und mir das Medizinstudium sowie insbesondere diese Doktorarbeit erst ermöglichten.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 27.07.2016

Annika Borgschulze