

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

Modulation der spontanen sowie TGF- β -induzierten Differenzierung von
Morbus-Dupuytren-Fibroblasten zu Myofibroblasten durch Vitamin D

Dissertation

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

vorgelegt von
Torben Zader
2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Do. Or do not. There is no try.

Master Yoda

The Empire Strikes Back, Irvin Kershner, 1980, 1:09:32

Zusammenfassung

Hintergrund: Morbus Dupuytren (MD) bzw. die Dupuytren-Kontraktur ist eine fibrosierende Bindegewebserkrankung der Palmaraponeurose. Hierbei kommt es zu Verknotungen und Verkürzungen des Bindegewebes an der Handinnenfläche und als Folge zu einer eingeschränkten Streckbarkeit einzelner oder mehrerer Finger. Von zentraler Bedeutung bei der Entstehung der Erkrankung sind nach heutiger Ansicht Myofibroblasten. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass sich in früheren Erkrankungsstadien vermehrt Fibroblasten zu Myofibroblasten differenzieren. *Transforming growth factor beta* (TGF- β) ist einer der Hauptinduktoren dieser Differenzierung. Jüngere Untersuchungen haben gezeigt, dass Vitamin D über den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) den TGF- β -Signalweg zu hemmen vermag. Diese Arbeit hatte zum Ziel, eine mögliche Beeinflussung des TGF- β -Signalweges durch Vitamin D *in vitro* an Fibroblasten zu untersuchen. Außerdem von Interesse war, ob sich ein Unterschied in der Reaktion von Fibroblasten von Dupuytren-Patienten gegenüber entsprechenden Kontrollen (Fibroblasten von Karpaltunnelsyndrom-Patienten) nachweisen lässt. **Hypothesen:** Vitamin D3 (Calcitriol) führt in Fibroblasten zu einer (Teil-)Revision der TGF- β vermittelt erhöhten *alpha smooth muscle actin* (α -SMA) Expression. Zudem werden Proteine im TGF- β -Signalweg gehemmt oder hemmende Einflüsse hochreguliert. Calcitriol hemmt die Translokation von phosphorylierten SMAD-Komplexen in den Zellkern und hemmt somit die Fibroblastendifferenzierung zu Myofibroblasten. **Methoden:** Es wurden Fibroblastenzellkulturen aus intraoperativ entnommenen Gewebeproben der Palmaraponeurose von Dupuytren-Patienten gewonnen (MD-Gruppe). Als Vergleichsgruppe wurden Zellkulturen aus intraoperativ gewonnenen Proben des Retinaculum flexorum von Karpaltunnelsyndrom-Patienten herangezogen (CTS-Gruppe). Die Zellkulturen wurden für drei Tage verschiedenen Dosen von Calcitriol und/oder TGF- β ausgesetzt. Anschließend erfolgte eine semiquantitative Analyse der Expression von folgenden Proteinen der TGF- β Signalkette: VDR, SMAD4, SMAD7, pSMAD2, sowie α -SMA. Zur Analyse wurden Western Blots mit anschließender Immunfärbung angewandt. Bei weiteren Versuchen wurde das Zelllysate vor Analyse mittels eines Kits der Firma Thermo Fisher Scientific in eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion aufgetrennt. **Ergebnisse:** Unbehandelte Zellen von Dupuytren-Patienten zeigten eine signifikant höhere α -SMA Expression gegenüber solchen von Karpaltunnelsyndrom-Patienten. Von den untersuchten Zellproteinen zeigte der VDR unter Calcitriol-Einfluss eine signifikante Dynamik. Mit steigender Calcitriol-Konzentration stieg die Menge an VDR in beiden Gruppen an. Die Signalproteine SMAD4, SMAD7, pSMAD2 und α -SMA wurden in ihrem Expressionslevel nicht signifikant beeinflusst. Unter simultanem TGF- β Einfluss zeigte pSMAD2 eine signifikante Dynamik. Bei steigender Calcitriol-Konzentration konnte ein Abfall der Proteinexpression von pSMAD2 beobachtet werden, das als Signalprotein die Myofibrogenese steigert. Dieser Zusammenhang zeigte sich sowohl in der MD-, als auch in der CTS-Gruppe, war jedoch nur in der CTS-Gruppe statistisch signifikant. Das α -SMA Expressionslevel zeigte hier vor allem in der MD-Gruppe zwar ähnliche, aber keine signifikanten Tendenzen. Ein punktueller Vergleich von ausschließlich mit Calcitriol und Calcitriol+TGF- β behandelten Zellen bestätigte in beiden Gruppen, dass die Behandlung mit TGF- β zu einem Anstieg der α -SMA Expression führte, wohingegen kein Expressionsanstieg der Signalproteine (SMAD4, SMAD7, pSMAD2) nachgewiesen werden konnte. In den abschließenden Versuchen zeigte sich ein signifikanter Abfall der zytoplasmatischen SMAD4 Expression in den mit Calcitriol und TGF- β behandelten Zellen der MD-Gruppe. Weitere Dynamiken der zytoplasmatischen oder nukleären SMAD4 Expression waren nicht erkennbar. **Schlussfolgerungen:** Unbehandelte Fibroblastenzellkulturen aus Morbus Dupuytren Gewebe zeigen eine deutlich höhere α -SMA Expression gegenüber solchen der Kontrollgruppe. Als Kontrolle des Behandlungserfolgs mit Calcitriol wurde die Expression des VDR herangezogen. Hier zeigte sich statistische Evidenz für einen Effekt der Behandlung mit Calcitriol. Darüber hinaus konnten mit den gewählten Testparametern (Dauer/Menge/Sequenz der Vitamin-D-/ TGF- β -Behandlung) keine Effekte auf Signalproteine oder α -SMA-Konzentration nachgewiesen werden. Die erarbeiteten Ergebnisse zeigen, dass Vitamin D durchaus in der Lage ist, die TGF- β -induzierte Signaltransduktion zu modulieren, jedoch ohne einen signifikanten Einfluss auf die Myofibrogenese der hier untersuchten Fibroblastenzellkulturen.

Abstract

Background: Dupuytren's contracture (MD) is a fibroproliferative disease of the palmar aponeurosis. Connective tissue on the palm of the hand shrinks and forms nodules which leads to one or more fingers becoming permanently bent in a flexed position. According to today's state of knowledge, myofibroblasts play a central role in the formation of the disease. Research has repeatedly shown that in early stages of disease fibroblasts increasingly differentiate into myofibroblasts. TGF- β is one of the main drivers of this process. Recent investigations have uncovered a way for vitamin D to inhibit TGF- β signaling via the vitamin D receptor (VDR). This work aimed to study possible interactions between vitamin D and the TGF- β signaling pathway in fibroblasts *in vitro*. In addition, the question was examined if fibroblasts from Dupuytren's patients behave different than those of people without MD. **Hypotheses:** Vitamin D3 (calcitriol) leads to a (partial) reversal of the TGF- β -mediated increase in alpha smooth muscle actin (α -SMA) expression. Proteins of the TGF- β signaling pathway are either being inhibited or inhibiting factors upregulated. Calcitriol inhibits translocation of phosphorylated SMAD-complexes and thus the differentiation of fibroblasts to myofibroblasts. **Methods:** Fibroblast cell cultures were grown from explants obtained from patients undergoing surgery for Dupuytren's contracture (MD group). As controls explants of the transverse carpal ligament obtained from patients undergoing surgery for carpal tunnel syndrome were used (CTS group). The cells were exposed to different dosages of Calcitriol and/or TGF- β and subsequently subject to a semi-quantitative analysis of the following proteins of the TGF- β signaling pathway: VDR, SMAD4, SMAD7, pSMAD2, and α -SMA. For the analysis western blotting followed by immunostaining was used. Later experiments used a cell separator kit from Thermo Fischer Scientific to sort the cell lysate into a cytoplasmatic and a nuclear fraction prior to analysis. **Results:** Untreated cells from Dupuytren's patients had significantly higher α -SMA expression than those from carpal tunnel syndrome patients. Of the examined proteins VDR showed a significant change of expression level under treatment with calcitriol. Higher concentrations of calcitriol lead to a higher expression of VDR in both the MD and the CTS group. The signaling proteins SMAD4, SMAD7, pSMAD2 and α -SMA were not significantly altered in their level of expression. Under simultaneous treatment with TGF- β pSMAD2 showed a significant dynamic. Higher concentrations of calcitriol lead to a decrease in the expression the profibrotic signaling protein pSMAD2. This was observed both in the MD and the CTS group while only being statistically significant in the CTS group. α -SMA expression showed similar, despite not significant tendencies, especially in the MD group. Selective comparisons of cells treated with calcitriol alone vs. calcitriol+TGF- β confirmed TGF- β treatment leading to an increase in α -SMA expression in both groups while not showing changes in the levels of expression of signaling proteins (SMAD4, SMAD7, pSMAD2). Final experiments showed a significant decrease of cytoplasmatic SMAD4 expression in calcitriol/TGF- β co-treated cells of the MD group. Other dynamics of cytoplasmatic or nuclear SMAD4 expression were not observed. **Conclusions:** Untreated fibroblast cell cultures derived from Dupuytren's contracture tissue show a significantly higher level of α -SMA expression than the control group. Increased expression of the VDR was used as an indicator of successful calcitriol treatment. A statistically significant effect could be shown here. Beyond that no effects could be shown using the chosen parameters of the experiments (duration/amount/sequence of the vitamin D/ TGF- β treatment). The acquired results demonstrate that vitamin D is indeed capable of modulating TGF- β signaling but without significant effect on the myofibrogenesis of the fibroblast cell cultures studied here.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
1,25(OH) ₂ D ₃	Calcitriol
25(OH)D ₃	Calcidiol
α-SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i> / Varianzanalyse
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BMI	<i>body mass index</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BY, CZ, DE, DK, EE, FR, HU, IE, NL, PL, SE, UA, UK	ISO 3166-1 ALPHA-2 Länderkürzel
bzw.	beziehungsweise
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTS	Karpaltunnelsyndrom
Cu	Kupfer
Da	atomare Masseinheit Dalton
DAkkS	Deutsche Akkreditierungsstelle
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
dt.	deutsch
ED-A Fibronectin	Splice-Variante von Fibronectin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EtOH	Ethanol
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
g	Erdbeschleunigung ≈ 9,81 m/s ²
ggf.	gegebenenfalls
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> / Meerrettichperoxidase
IOM	<i>Institute of Medicine</i>
ISO	Internationale Organisation für Normung
kg	Kilogramm
l	Liter
Lot.	Chargennummer
m	Meter
M	Stoffmengenkonzentration in molar = 1 mol/l
MD	Morbus Dupuytren
mol	Stoffmenge Mol
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NDA	<i>EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RT-PCR	<i>real time polymerase chain reaction</i>
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
SACN	<i>Scientific Advisory Committee on Nutrition</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>

SEM	<i>standard error of the mean</i>
SMAD	Signalproteine des TGF- β -Signalwegs
SOP	<i>standard operating procedure</i>
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>tris-buffered saline with Tween 20</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
USA	ISO 3166-1 ALPHA-3 Länderkürzel
UVA/UVB	ultraviolettes Licht
V	Volt
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
vs.	versus
WHO	<i>World Health Organization</i>
z. B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Fibroblasten und ihre Funktion	1
1.1.1	Myofibrogenese.....	1
1.2	Morbus Dupuytren	2
1.2.1	Anatomie	2
1.2.2	Epidemiologie	3
1.2.3	Ätiologie.....	3
1.2.4	Therapie.....	3
1.3	Karpaltunnelsyndrom	4
1.4	TGF- β -Signalkaskade.....	5
1.4.1	Interaktionen durch SMAD-Proteine	6
1.5	Vitamin D.....	7
1.5.1	Synthese	7
1.5.2	Funktion	7
1.5.3	Vitamin-D-Rezeptor und Wirkmechanismus	8
1.5.4	Vitamin D und Fibrogenese	8
1.5.5	Vitamin-D-Status der Bevölkerung.....	10
1.6	Ziele der Arbeit	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Material	14
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
2.1.2	Substanzen.....	18
2.1.3	Primäre Antikörper.....	20
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Gewinnung der Patientenproben/Ethikvotum	22
2.2.2	Isolierung von Fibroblasten aus krankem Gewebe	22
2.2.3	Zellkultur.....	23
2.2.4	Zellenaussaat	23
2.2.5	Vitamin-D-Versuch.....	25
2.2.6	Bestimmung des Calcitriol-Gehalts in FCS	26
2.2.7	Probenvorbereitung	26
2.2.8	Proteinquantifizierung.....	27
2.2.9	Proteinanalyse mittels Gelelektrophorese, Western Blot und Immunfärbung	28
2.2.10	Auftrennung von Kernproteinen und zytoplasmatischen Proteinen.....	33

2.2.11	Statistische Auswertung	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Vitamin-D-Rezeptor-Expression in ruhenden MD- und CTS-Fibroblasten.....	35
3.2	Calcitriolgehalt des Zellkulturmediumbestandteils „fetales Kälberserum“	36
3.2.1	Stabilität von Calcitriol unter elektromagnetischer Bestrahlung.....	36
3.3	Homologe Regulation des Vitamin-D-Rezeptors.....	36
3.4	Aktivierung von SMAD2 unter TGF- β /Calcitriol.....	37
3.5	Expression von SMAD4 und SMAD7 unter TGF- β /Calcitriol.....	38
3.5.1	Translokation von SMAD4 in den Zellkern unter TGF- β /Calcitriol.....	39
3.5.2	Expression der Proteine GAPDH und TBP im Zytoplasma sowie im Nukleus... 40	
3.6	Vergleich der α -SMA-Proteinexpression von ruhenden und aktivierten MD- und CTS-Fibroblasten	42
3.7	Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und Einfluss von Calcitriol 42	
3.7.1	Kontrolle der Effektivität der TGF- β -Behandlung.....	44
3.8	Nutzung von GAPDH als Housekeeping-Protein	45
4	Diskussion.....	46
4.1	Diskussion der Methoden.....	46
4.1.1	Limitationen der semiquantitativen Western-Blot-Auswertung.....	46
4.1.2	Wahl der Verdünnungsreihe.....	46
4.1.3	Wahl des Versuchszeitraums.....	47
4.1.4	Verwendete Zellkultur.....	48
4.1.5	Vergleichbarkeit der Fibroblasten-Entnahmeorte	49
4.1.6	Anordnung der Proben auf dem Gel.....	49
4.2	Diskussion der Ergebnisse	49
4.2.1	Effektivität der Vitamin-D-Behandlung.....	49
4.2.2	α -SMA-Expression in Morbus Dupuytren Fibroblasten	50
4.2.3	Identifikation von Zelltypen.....	50
4.2.4	Kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse.....	51
4.3	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	53
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	55
6	Anhang	68
6.1	Standard Operating Procedures des Labors zu „Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung“ sowie „Western Blot Semi-Dry Blotting“	68

1 Einleitung

1.1 Fibroblasten und ihre Funktion

Fibroblasten bilden die häufigste Zellart in menschlichem Bindegewebe. Die Zellen sind mesenchymalen Ursprungs und verantwortlich für die Produktion und Homöostase des Großteils der extrazellulären Matrix in Gewebe (Branwood, 1963; McAnulty, 2007). Fibroblasten synthetisieren und integrieren Strukturproteine wie Kollagen und Elastin (Branwood, 1963; Lynch und Watt, 2018). Sie sind begrenzt teilungsfähige Zellen; die maximale Anzahl an Generationen scheint bei ungefähr 60 zu liegen (Abercrombie, 1978).

Fast jedes Bindegewebe steht ständig unter Ruhespannung. Myofibroblasten spielen eine wichtige Rolle bei der Etablierung dieser Gewebsspannung, unter anderem, aber nicht ausschließlich während Prozessen der Wundheilung (Tomasek *et al.*, 2002). Morphologisch kennzeichnend für Myofibroblasten ist ein kontraktiler Apparat, der Aktin-Filamente mit assoziierten kontraktile Proteinen enthält (Tomasek *et al.*, 2002). Sie enthalten demnach sowohl Elemente von Fibroblasten, als auch von glatten Muskelzellen und können aktiv kontrahieren (Rayan *et al.*, 1996; Rayan, 2007). Gewebespannung wird induziert, indem die Aktin-Myosin Filamente ATP-getrieben gegeneinander verschoben werden, woraufhin die Kraft durch einen Transmembrankomplex (teilweise als „fibronexus“ beschrieben) auf die Extrazellulärmatrix übertragen wird (Serini und Gabbiani, 1999; Li und Wang, 2011). Hierbei gilt es hervorzuheben, dass die Gewebespannung primär die Extrazellulärsubstanz und nicht die in ihr ruhenden Zellen betrifft; die Zellen sind mechanisch gegen Stress abgeschirmt. Nichtsdestotrotz beeinflussen die Extrazellulärsubstanz und ihr Umbau wiederum das Verhalten der (Myo-)Fibroblasten und anderer Zellen in der gleichen Mikroumgebung (Tomasek *et al.*, 2002; Musumeci *et al.*, 2015).

1.1.1 Myofibrogenese

Bei Gewebeschäden werden die Fibroblasten aktiviert und verändern ihren Phänotyp zum Myofibroblasten hin, um durch Proliferation, Migration und erhöhte Syntheseleistung den Defekt zu reparieren (Li und Wang, 2011; Nagalingam *et al.*, 2019). Der Wechsel des Phänotyps wird durch signifikante Änderungen der zugrundeliegenden Genexpression bewirkt (Nagalingam *et al.*, 2019). Kennzeichnend für eine abgeschlossene Konversion eines Fibroblasten zum Myofibroblasten ist das Protein *alpha smooth muscle actin* (α -SMA) (Tomasek *et al.*, 2002; Nagalingam *et al.*, 2019). Da die Phänotyp-Änderung irreversibel ist (Chen *et al.*, 2013), werden die Myofibroblasten nach erfolgter Defektreparatur im Normalfall durch Apoptose entfernt (Tomasek *et al.*, 2002). Passiert dies jedoch nicht, können persistierende Myofibroblasten zu einer überschießenden Fibrosierung führen; eine hypertrophe Narbe entsteht (Tomasek *et al.*, 2002; McAnulty, 2007; Nagalingam *et al.*, 2019).

Die Fibroblasten in einer Wunde können unterschiedlichen Ursprunges sein: a) Resident, bereits vor Verletzung im Gewebe vorhanden, b) durch Transformation epithelialer Zellen entstanden oder c) durch Einwanderung von Zellen aus dem Knochenmark, die mit dem Blutstrom zur Verletzung gelangen und sich dort zu mesenchymalen Zellen differenzieren (Wynn, 2008; Chong *et al.*, 2019).

Aktueller Gegenstand der Forschung ist die Heterogenität von Fibroblasten. Hierbei wird sowohl der Prozess des Phänotyp-Shifts von Fibroblasten (Nagalingam *et al.*, 2019), als auch die Unterschiede zwischen Fibroblasten aus unterschiedlichen Organen oder Gewebeschichten untersucht (Lynch und Watt, 2018).

1.2 Morbus Dupuytren

Morbus Dupuytren oder die Dupuytren-Kontraktur ist eine Bindegewebserkrankung der Palmaraponeurose. Sie wurde 1831 als eigene Krankheitsentität durch den Baron Guillaume Dupuytren in Anatomie, Pathologie und Therapie beschrieben und später nach ihm benannt (Dupuytren, 1831). Die früheste bekannte Erwähnung der Dupuytren-Symptomatik stammt allerdings aus dem Jahr 1614 von Felix Plater (Elliot, 1988). Hierbei kommt es zu Verknotungen und Verkürzungen des Bindegewebes an der Handinnenfläche und als Folge zu einer eingeschränkten Streckbarkeit einzelner oder mehrerer Finger, meist von Ring- und kleinem Finger (Rayan, 2007).

1.2.1 Anatomie

Die Palmarfaszie ist eine dicke bindegewebige Schicht auf der Handinnenseite zwischen der Haut und den Beugemuskeln der Hand. Sie stabilisiert die darüberliegende Haut während Bewegungen und schützt die tieferliegenden Nerven und Gefäße (siehe Abbildung 1) (Musumeci *et al.*, 2015). Die zentrale Aponeurose bildet den Kern der Dupuytren-Krankheitsaktivität (Rayan, 2007). Aus den Fasziabändern bilden sich pathologische Knoten und Stränge. Die fibrotischen Stränge verkürzen sich mit der Zeit und führen zu einer Kontraktur und Deformierung der Metacarpophalangeal- und proximalen Interphalangealgelenke (Luck, 1959; Rayan, 2007).

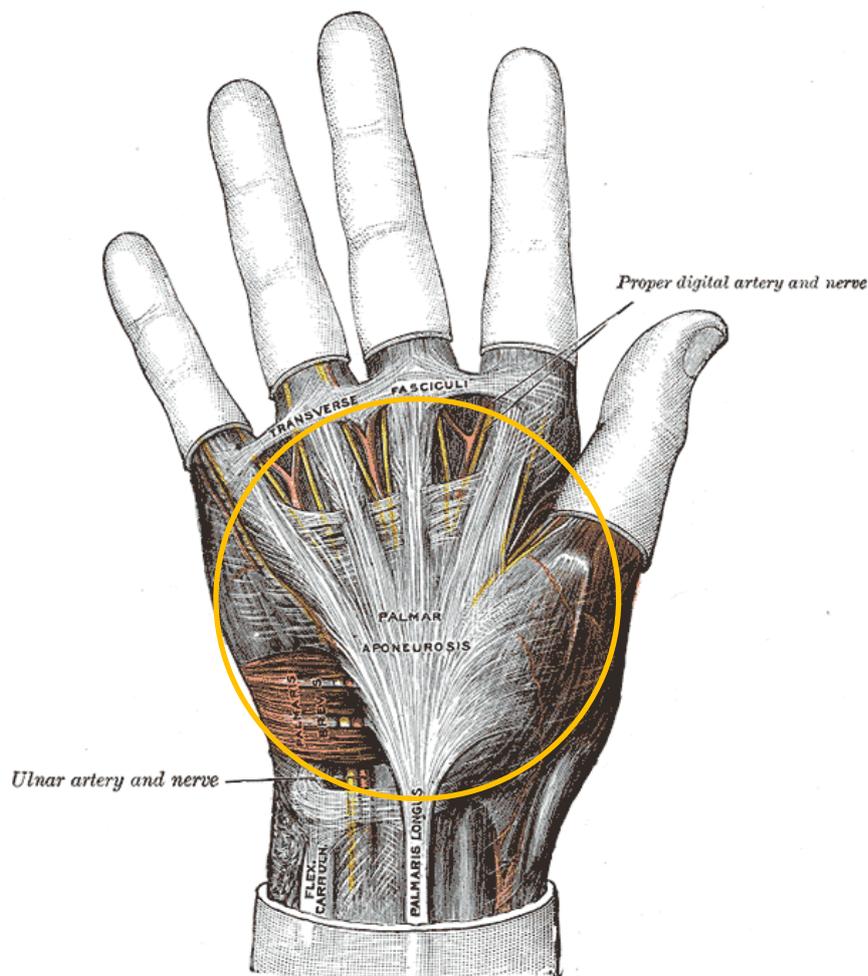


Abbildung 1 Palmaraponeurose, modifiziert aus *Anatomy of the Human Body, Twentieth Edition*, S. 460 (Gray, 1918)

1.2.2 Epidemiologie

Die Prävalenz der Erkrankung variiert stark zwischen Bevölkerungsgruppen, am stärksten scheinen Männer kaukasischer Abstammung betroffen zu sein. Die früher verbreitete Annahme, dass die Dupuytren-Kontraktur vorrangig in Nordeuropa zu finden ist (Ross, 1999), wird nach aktuellen Meta-Analysen und Studien in südlicheren Ländern so nicht mehr vertreten (Hindocha *et al.*, 2009; Lanting *et al.*, 2014). Auf Island wurden zum Beispiel Prävalenzen zwischen 19,2 % bei Männern und 4,4 % bei Frauen über 45 Jahren beschrieben. (Gudmundsson *et al.*, 2000). Auch in Südeuropa konnten Prävalenzen zwischen 31 % bei Männern und 16 % bei Frauen über 50 Jahren gemessen werden (Zavadil und Böttinger, 2005). Eine auf *self reporting* basierende Studie schätzte die Prävalenz von Morbus Dupuytren in den USA auf 7,3 % (DiBenedetti *et al.*, 2011). Die Häufigkeit der Erkrankung steigt mit dem Alter (Gudmundsson *et al.*, 2000; Zerajic und Finsen, 2004). Insgesamt ist die Prävalenz der Erkrankung sehr variabel, klare geographische Verteilungen lassen sich nur schwer abgrenzen, zumal ein Großteil der Studien in Großbritannien und den nordischen Ländern durchgeführt wurde (Hindocha *et al.*, 2009; Lanting *et al.*, 2014).

1.2.3 Ätiologie

Zur Ätiologie der Dupuytren-Kontraktur wurden im Laufe der Jahre bereits die verschiedensten Theorien aufgestellt, darunter angeborene Ursachen, kardiovaskuläre Störungen, Kollagenstoffwechselstörungen, Nervenirritationen, virale Infektion, Trauma, Tumor oder autoimmune Ursachen (Millesi, 2009). Die Ätiologie von Morbus Dupuytren ist bis heute weitgehend ungeklärt. Von zentraler Bedeutung bei der Entstehung der Erkrankung sind nach heutiger Ansicht Myofibroblasten. Myofibroblasten wurden erstmals 1972 in Dupuytren-typisch veränderten Knoten der Palmaraponeurose beschrieben (Gabbiani und Majno, 1972). Es wurde mehrfach gezeigt, dass sich in früheren Erkrankungsstadien vermehrt Fibroblasten zu Myofibroblasten differenzieren. Ein relevanter induzierender Faktor für diese Differenzierung ist anscheinend das Zytokin *Transforming growth factor β* (Desmoulière *et al.*, 1993; Rehman *et al.*, 2011; Musumeci *et al.*, 2015).

Die Erkrankung konnte korreliert werden mit erhöhtem Nüchternblutglukosewert, niedrigem Körpergewicht/BMI, Nikotinabusus, beruflicher manueller Arbeit (Gudmundsson *et al.*, 2000) und Diabetes (Zavadil und Böttinger, 2005). Eine Zwillingsstudie mit 365 betroffenen Zwillingspersonen kam zu dem Schluss, dass genetische Faktoren eine große Rolle in der Entwicklung der Erkrankung spielen (Larsen *et al.*, 2014). Verschiedene genetische Analysen zeigten mehrere Genloki und veränderte Signalwege, die mit der Erkrankung in Verbindung gebracht werden (Satish *et al.*, 2008; Dolmans *et al.*, 2011; Musumeci *et al.*, 2015; Becker *et al.*, 2016).

Rehman *et al.* haben 2011 vorgeschlagen, die Suche nach einzelnen Molekülen und Genen durch eine ganzheitliche Betrachtung der Dupuytren-Kontraktur als systemische Erkrankung abzulösen, da die bisherigen Analysen meist uninterpretiert und unschlüssig blieben (Rehman *et al.*, 2011).

1.2.4 Therapie

Therapeutisch wird ein abwartendes Verhalten empfohlen, wenn bei Diagnosestellung noch keine schweren Kontrakturen oder Funktionseinschränkungen vorliegen (Rayan, 2007; Dutta *et al.*, 2020). Eine Operation ist indiziert bei funktionsbeeinträchtigenden Kontrakturen. Am effektivsten ist die Therapie durch offene Fasziektomie (Millesi, 2009; Musumeci *et al.*, 2015). Nicht-chirurgische Therapieansätze zeigen häufig in kurzer Zeit sehr hohe Rezidivraten, sind allerdings bisher nur mit geringer Evidenz untersucht (Ball *et al.*, 2016; Mella *et al.*, 2018; Dutta *et al.*, 2020; Gil *et al.*, 2021).

Auch die chirurgische Entfernung des Kontrakturgewebes ist nahezu immer mit einem Rezidiv verbunden. Nach chirurgischer Therapie ist das rezidivfreie Intervall mit 6 - 12 Jahren (danach 70 % Rezidivrate) relativ lang (Millesi, 2009; Musumeci *et al.*, 2015).

1.3 Karpaltunnelsyndrom

Das Karpaltunnelsyndrom ist das häufigste periphere Nervenkompressionssyndrom des Menschen. Es herrscht relative Enge im Karpalkanal der Hand, der von den Handwurzelknochen und dem *Ligamentum carpi transversum* begrenzt wird (siehe Abbildung 2). Durch den Karpalkanal ziehen der *Nervus medianus* und die Fingerbeugesehen. Ödeme, eine Sehnenscheidenentzündung, hormonelle Veränderungen oder erhöhte mechanische Belastung können eine Schwellung verursachen, wodurch eine absolute Enge entsteht und die Bestandteile des Karpalkanals, darunter der *Nervus medianus*, komprimiert werden.

Dies kann zu Symptomen wie Schmerzen und Parästhesien führen, die auch in den proximalen Arm ausstrahlen können. In schwereren Fällen kann es zu einer Schwächung/Atrophie der vom *Nervus medianus* innervierten Muskulatur in der Hand kommen.

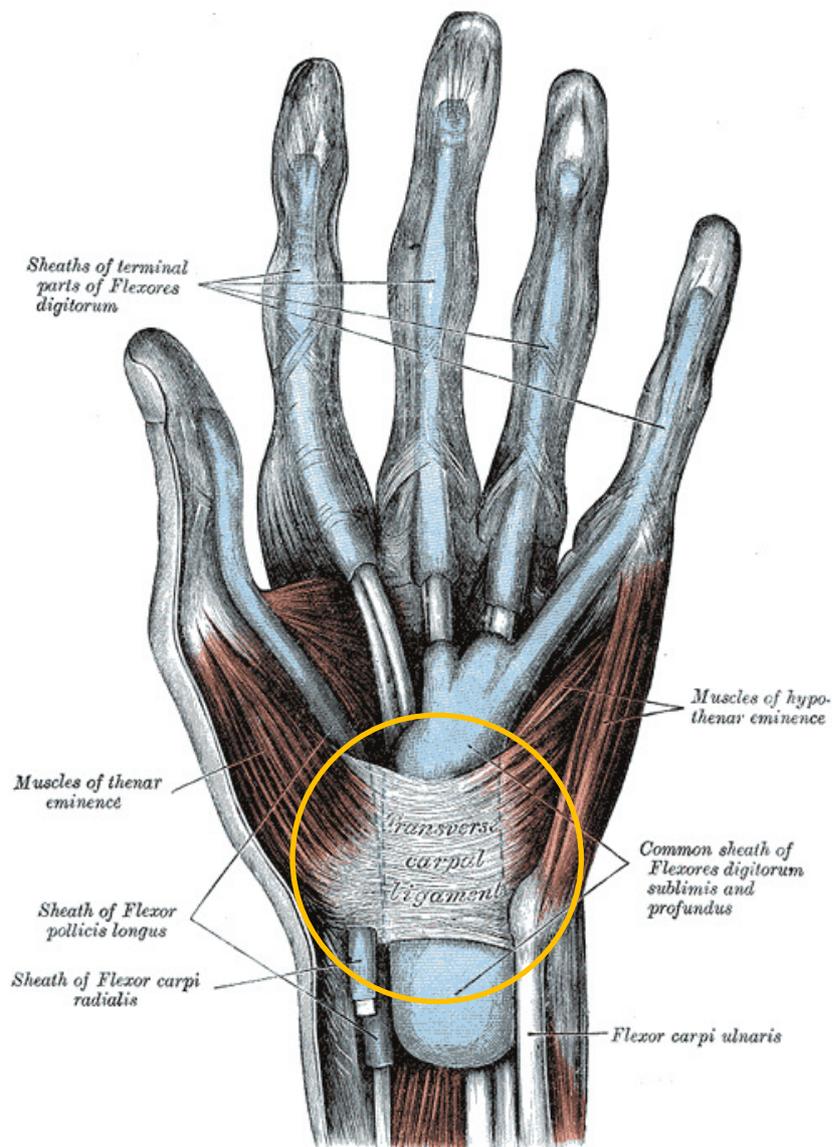


Abbildung 2 *Ligamentum carpi transversum*, modifiziert aus *Anatomy of the Human Body*, Twentieth Edition, S. 458 (Gray, 1918)

Es bestehen sowohl konservative als auch chirurgische Therapiemöglichkeiten, wobei die chirurgische Therapie bessere Langzeitergebnisse erzielt (Deutsche Gesellschaft für Handchirurgie (DGH), 2022). Eine häufige Methode ist die offene oder endoskopische Retinakulumspaltung. Während der Operation wird das *Ligamentum carpi transversum* freigelegt und teilweise oder vollständig gespalten (vgl. Kleinschmidt, 2009; Shi und MacDermid, 2011; Padua *et al.*, 2016). Bei diesem Eingriff kann – mit Zustimmung des/der Patienten/in – eine Probe der Palmarfaszie entnommen werden, welche zur Kultivierung gesunder Fibroblasten zu Vergleichszwecken genutzt wird (Satish *et al.*, 2008; Rehman *et al.*, 2011; Krassovka *et al.*, 2019).

1.4 TGF- β -Signalkaskade

Transforming growth factor β bezeichnet einen Polypeptid-Wachstumsfaktor, der die primäre Kraft hinter einer Vielzahl von fibrotischen Vorgängen darstellt, sowohl während Prozessen Wundheilung/Reparatur, als auch bei pathologischer Fibrose (Border und Noble, 1994; Massagué, 1998; Branton und Kopp, 1999; Meng *et al.*, 2016). Der Effekt von TGF- β hängt ähnlich stark von der Reaktionsbereitschaft der Zielzelle wie dem Wachstumsfaktor selbst ab (Massagué, 1998).

Die Signalübertragung findet durch Bindung an einen TGF- β -Rezeptor statt. Diese sind Transmembranrezeptoren mit Serin/Threonin-Kinase-Aktivität. Grob können zwei Gruppen von Rezeptoren unterschieden werden: Typ I und Typ II. Zur Signaltransduktion müssen der Ligand und ein Paar aus Typ-I und Typ-II-Rezeptor-Dimeren zusammengebracht werden. Ein TGF- β -Dimer bindet entweder zunächst an einen Typ-II-Rezeptor, woraufhin ein Typ-I-Rezeptor in den Komplex rekrutiert wird (sequenziell) oder gleichzeitig an einen Typ-I und einen Typ-II-Rezeptor (kooperativ), sodass sich ein Heterotetramer bildet (Clark und Coker, 1998; Massagué, 1998; Schmierer und Hill, 2007).

Als nächstes phosphoryliert die Typ-II-Rezeptor-Kinase den Typ-I Rezeptor, woraufhin Rezeptor-regulierte SMAD-Proteine (R-SMADs) rekrutiert und vom Typ-I-Rezeptor phosphoryliert werden (Clark und Coker, 1998; Massagué, 1998; Schmierer und Hill, 2007).

Der Name SMAD setzt sich zusammen aus dem Gen Mad (*mothers against decapentaplegic*) der Taufliege *Drosophila melanogaster* und dem Gen Sma (*small body size*) des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans*. Die merkwürdige Bezeichnung Mad ist eine humoristische Anspielung auf diverse Kampagnenorganisationen wie *Mothers Against Drunk Driving* (MADD) und gleichzeitig eine Beschreibung der Auswirkung einer Genmutation von Mad in der Mutterfliege, wodurch ein essenzielles Gen im Embryo ausgeschaltet wird. Als für Mad und Sma eine Assoziation mit TGF- β festgestellt wurde und sich ein homologes Protein im Menschen fand, wurde dieses SMAD genannt (Brenner, 1974; Sekelsky *et al.*, 1995; Derynck *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Savage *et al.*, 1996; *Gene of the month - Mothers Against Decapentaplegic | Interviews | Naked Scientists*, 2012).

Sofern nicht anders angegeben, ist in dieser Arbeit mit dem Begriff TGF- β immer die Isoform TGF- β 1 gemeint.

1.4.1 Interaktionen durch SMAD-Proteine

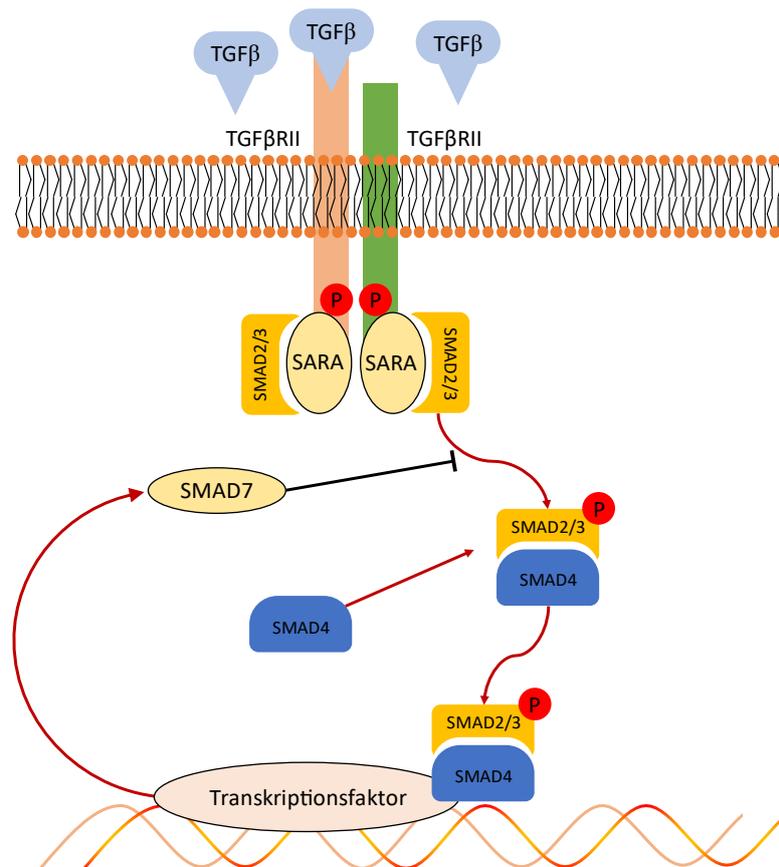


Abbildung 3 SMAD-Signalling, modifiziert nach Hu *et al.*, 2018

Die weitere Signalübertragung obliegt nun den diversen SMAD-Proteinen (siehe Abbildung 3). Hiervon lassen sich drei Gruppen unterscheiden: a) Die oben genannten Rezeptor-regulierten SMADs, die Substrate der Rezeptorkinasen darstellen (SMAD1/2/3/5/8), b) SMADs, die sich den Rezeptor-regulierten SMADs anlagern (SMAD4) und c) inhibierende SMADs, die die Funktion der anderen beiden Gruppen unterdrücken (SMAD6/7) (Nakao, Afrakhte, *et al.*, 1997; Nakao, Imamura, *et al.*, 1997; Massagué, 1998).

SMAD4, der einzige bekannte Vertreter der Gruppe b) in Wirbeltieren, bildet mit zwei phosphorylierten R-SMADs im Zytosol ein Heterotrimer, welcher in den Zellkern migriert, dort akkumuliert und gemeinsam mit anderen Cofaktoren die Transkription von Zielgenen herauf- oder herunterreguliert (Kawabata *et al.*, 1998; Schmierer und Hill, 2007; Chapnick und Liu, 2010).

Der Prozess kann durch die inhibierenden SMAD-Proteine 6 und 7 gestört werden. Als mögliche Angriffspunkte haben sich die kompetitive Bindung am Typ-I-Rezeptor, Ubiquitinierung/Abbau von Rezeptoren, Dephosphorylierung von Rezeptoren, kompetitive Hemmung durch Tarnung als SMAD4 sowie Verhinderung der Promoter-Aktivierung im Zellkern herausgestellt (Massagué, 1998; Schmierer und Hill, 2007; Heldin und Moustakas, 2012).

SMAD2 und 3 werden vom TGF-β-Rezeptor aktiviert, von SMAD7 gehemmt und führen zu profibrotischer Transkription. SMAD1, 5 und 8 hingegen werden vom verwandten BMP-Rezeptor aktiviert, hauptsächlich von SMAD6 gehemmt und inhibieren die vorgenannte Transkription, wirken also antifibrotisch (Massagué, 1998; Hu *et al.*, 2018).

1.5 Vitamin D

Vitamin D ist seit einiger Zeit das Ziel zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen und klinischer Studien (Brannon und Fleet, 2011; Unholzer *et al.*, 2017). Je nach zugrundeliegendem Grenzwert wird von einem Mangel in größeren Teilen der Bevölkerung ausgegangen. Die diskutierten gesundheitlichen Effekte einer Supplementierung sind vielfältig (Linseisen *et al.*, 2011; Unholzer *et al.*, 2017). Das Vitamin unterscheidet sich von den meisten anderen Vitaminen durch zwei Merkmale: Es kann vom Körper selbst synthetisiert werden (was seine Bezeichnung als *Vitamin* in Frage stellt) und es wirkt im Körper unter anderem als Hormon (Stamp, 1973).

1.5.1 Synthese

Durch Photolyse eines Cholesterinderivates in der Haut entsteht Prävitamin D₃. Durch spontane Umlagerung entsteht Cholecalciferol (Vitamin D₃), dieses wird in der Leber und in der Niere jeweils einmal hydroxyliert, wodurch letztlich die aktive Form 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol) entsteht (DeLuca *et al.*, 1971; DeLuca, 2004; Deutzmann, 2016a).

25-hydroxycholecalciferol = 25(OH)D ₃ = Calcidiol
1,25-dihydroxycholecalciferol = 1,25(OH) ₂ D ₃ = Calcitriol
Vitamin D = Calciferol
Vitamin D ₂ = Ergocalciferol
Vitamin D ₃ = Cholecalciferol

Tabelle 1 Abkürzungen und Synonyme zu Vitamin D nach Vidailhet *et al.* (2012) & Spiro und Buttriss (2014)

Dieser Weg synthetisiert Calcitriol ausgehend von Vitamin D₃, auch tierisches Vitamin D genannt. Daneben existiert Vitamin D₂, sogenanntes pflanzliches Vitamin D. Es leitet sich von einem anderen Steroid ab und kann vom menschlichen Körper nicht synthetisiert werden (Deutzmann, 2016a). Beide Vitamin-D-Formen lassen sich mit der Nahrung aufnehmen und aktivieren, wobei sie sich in ihrer Potenz zu unterscheiden scheinen (Houghton und Vieth, 2006; Spiro und Buttriss, 2014).

1.5.2 Funktion

Klassischerweise ist Vitamin D ein Regulator der Calcium-Homöostase sowie des Knochenstoffwechsels. Synergistisch mit Parathormon erhöht Calcitriol den Calcium-Serumspiegel durch Steigerung der Calciumabsorption im Darm, Knochendemineralisierung und gesteigerte Calciumreabsorption in der Niere (DeLuca, 2004).

Es hat sich gezeigt, dass Vitamin D darüber hinaus nicht-klassische Effekte auf viele Gewebe hat, die nichts mit dem Calciumhaushalt zu tun haben (Dusso *et al.*, 2005; Sassi *et al.*, 2018). Dazu zählen Regulierung von Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose und Immunfunktionen durch lokale extrarenale Aktivierung und autokrine/parakrine Signalübertragung (Dusso *et al.*, 2005; Höbaus *et al.*, 2013; Sassi *et al.*, 2018). Dies macht synthetische Calcitriol-Analoga mit geringem calcämischem Potenzial attraktiv für eine potenzielle Therapie von hyperproliferativen Erkrankungen, wie Morbus Dupuytren (Carlberg *et al.*, 2001; Brown und Slatopolsky, 2005).

1.5.3 Vitamin-D-Rezeptor und Wirkmechanismus

Biologisch aktiv wird Calcitriol im Körper durch Bindung an den Vitamin-D-Rezeptor (VDR). Hierbei handelt es sich um einen intrazellulären Rezeptor bzw. Kernrezeptor, der seine Wirkung als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor entfaltet (Dusso *et al.*, 2005; Deutzmann, 2016b, 2016a).

Der VDR besitzt eine hohe Affinität für Calcitriol, wobei die Bindung durch intrazelluläre Bindungsproteine moduliert werden kann. Der Rezeptor wird durch Bindung des Liganden vor einem Abbau durch das Proteasom geschützt (Dusso *et al.*, 2005).

Calcitriol diffundiert durch das Zytosol in den Zellkern und bindet dort an den Rezeptor, wobei eine zytoplasmatische Bindung mit anschließender Relokalisation auch möglich ist (Dusso *et al.*, 2005). VDR bildet daraufhin ein Heterodimer mit dem Rezeptor für 9-cis-Retinsäure (RXR). Das Calcitriol-VDR-RXR-Heterodimer wird als Hormon-Rezeptor-Komplex bezeichnet. Es interagiert mit sequenzunspezifischen Coaktivator- und Mediatorproteinen, die die Brücke zur Transkription schlagen und bindet mit hoher Affinität an spezifische DNA-Sequenzen (sogenannte *vitamin D response elements*) (Jones *et al.*, 1998; DeLuca, 2004; Christakos *et al.*, 2015; Deutzmann, 2016b).

Es ist anzumerken, dass es möglich scheint, dass die VDR-Expression durch den Prozess der Zellisolierung induziert wird. Einzelne Studien zeigten Gewebe, die *in vivo* keine VDR-Expression aufwiesen, *in vitro* jedoch schon (Bhalla *et al.*, 1987; Gascon-Barré, 2003; Ahn *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012).

1.5.4 Vitamin D und Fibrogenese

Untersuchungen haben gezeigt, dass Vitamin D über den Vitamin-D-Rezeptor gewebeabhängig syn- oder antagonistisch auf den TGF- β -Signalweg wirken kann (Yanagisawa *et al.*, 1999; Shany *et al.*, 2016). Dies ist für therapeutische Überlegungen und Prävention der Dupuytren-Kontraktur relevant, da der TGF- β -Signalweg, wie oben beschrieben, eine Rolle bei der Fibrogenese spielt (Branton und Kopp, 1999).

Mehrere Untersuchungen haben eine Interaktion des Hormon-Rezeptor Komplexes mit SMAD3 berichtet, die zu einer Inhibierung TGF- β -induzierter Prozesse führt (Ding, Liddle, *et al.*, 2013; Ding, Yu, *et al.*, 2013; Ito *et al.*, 2013; Zerr *et al.*, 2015; Shany *et al.*, 2016; Keane *et al.*, 2018; Udomsinprasert und Jittikoon, 2019). Diese Interaktion ist zudem *in vivo* beschrieben (Aschenbrenner *et al.*, 2001).

Zum Wirkmechanismus existieren zwei Beobachtungen: zum einen induziert TGF- β eine Chromatin-Umlagerung, nach der VDR an Genloki binden kann, die zuvor von SMAD3 besetzt waren. Das SMAD-Protein wird also von der DNA verdrängt und somit an der Transkription gehindert (siehe zweites Panel in Abbildung 4) (Yanagisawa *et al.*, 1999; Subramaniam *et al.*, 2001; Shany *et al.*, 2016). Die andere Beobachtung ist, dass das Calcitriol-Analogon Paricalcitol über den VDR pSMAD3 direkt binden kann und es somit für Transkriptionszwecke aus dem Verkehr zieht (siehe drittes Panel in Abbildung 4) (Ding, Liddle, *et al.*, 2013; Zerr *et al.*, 2015; Shany *et al.*, 2016). Ergänzend konnte gezeigt werden, dass eine funktionierende VDR-Signalübertragung in dermalen Fibroblasten für eine funktionierende TGF- β -Signalübertragung unabdingbar ist (Luderer *et al.*, 2013; Rieger *et al.*, 2015).

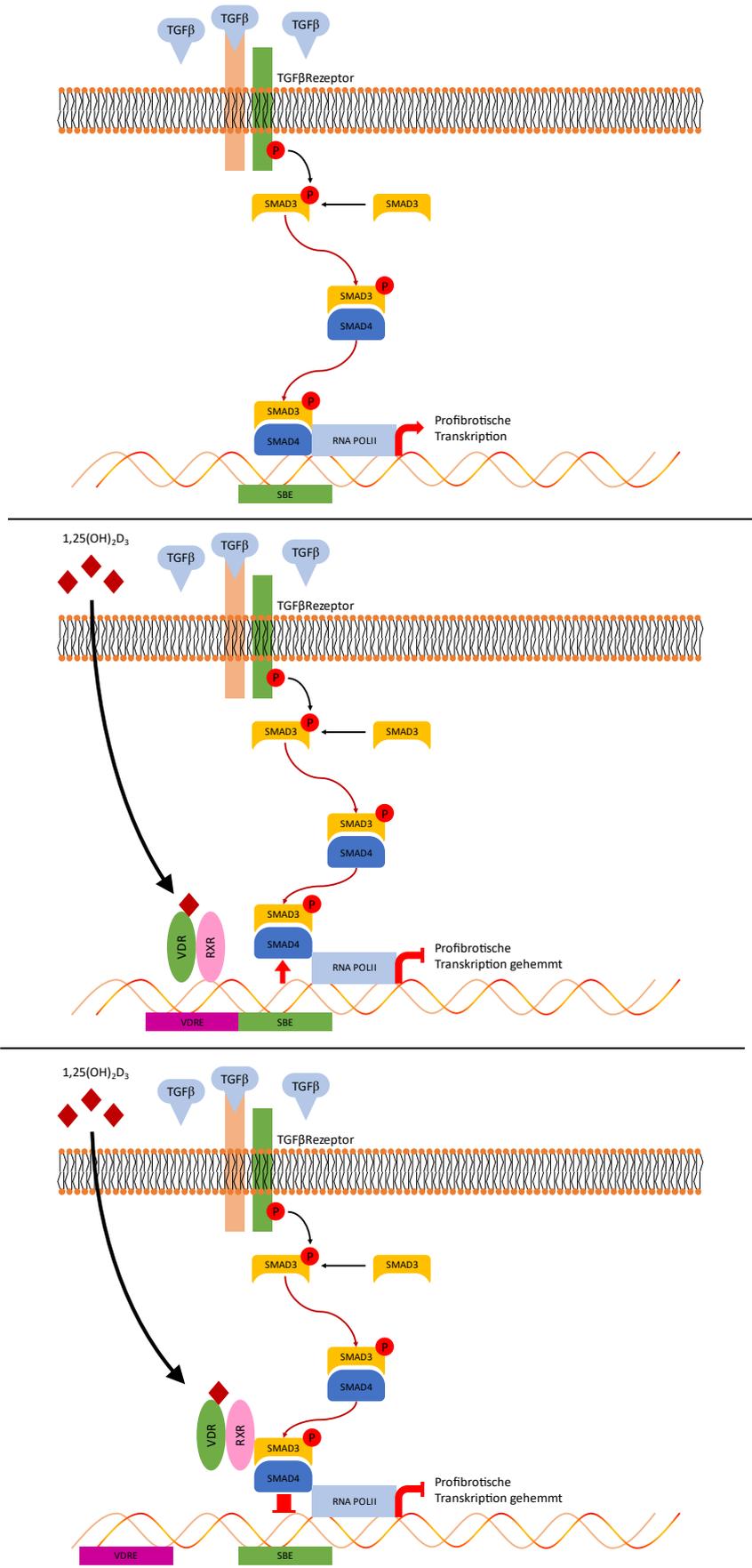


Abbildung 4 VDR-Mechanismus und Interaktion mit SMADs, modifiziert nach Shany et al. 2016, basierend auf Erkenntnissen von Ding et al. 2013a, 2013b, Sherman et al. 2014, Zerr et al. 2015

Diese Beobachtungen wurden im Kontext der Nierenfibrose (Ito *et al.*, 2013), systemischen Sklerose (Zerr *et al.*, 2015) und Leberfibrose (Ding, Yu, *et al.*, 2013) gemacht. Die Wahrscheinlichkeit einer Beteiligung von VDR an der Inhibierung von Fibrogenese wurde dadurch gestärkt, dass VDR-*knockout*-Mäuse spontan eine hepatische Fibrose entwickeln (Ding, Yu, *et al.*, 2013).

Außerdem könnte Calcitriol in der Niere antifibrotisch wirken, indem es die Expression des unter anderem SMAD-inhibierenden Hepatozyten-Wachstumsfaktors induziert (Li *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2007).

Beobachtungen zur inhibierenden Wirkung von Calcitriol auf die Myofibrogenese ohne Berücksichtigung des Wirkmechanismus konnten an Fibroblastenpopulationen aus der Lunge (Ramirez *et al.*, 2010), Keloiden (Zhang *et al.*, 2011), der Niere (Li *et al.*, 2005; Lucisano *et al.*, 2013) sowie dem Herzen (Meredith *et al.*, 2015) gemacht werden. Bei letzteren wurde auch von einer reduzierten Phosphorylierung von SMAD2 berichtet (Meredith *et al.*, 2015).

Entgegen den oben genannten Studien, die eine netto antifibrotische Wirkung von Vitamin D beschreiben, gibt es auch ein paar konträre Beobachtungen. Dermale Fibroblasten zeigten unter Behandlung mit Vitamin D und TGF- β eine erhöhte Myofibrogenese. Als mögliche Erklärung dafür wurden die im Vergleich zu anderen Studien deutlich niedrigen Dosen TGF- β angeführt (Ding *et al.*, 2016).

1.5.5 Vitamin-D-Status der Bevölkerung

Der Vitamin-D-Spiegel in der Bevölkerung wird durch mehrere Faktoren, unter anderem Exposition der Haut gegenüber Sonnenlicht und künstlicher Anreicherung von Lebensmittel mit Vitamin-Präparaten, beeinflusst. Zur Prävalenz und möglichen Verteilungsmustern von Vitamin-D-Mangel in Europa liegen unterschiedliche Studienergebnisse vor (Spiro und Buttriss, 2014).

1.5.5.1 Messung

Die Vitamin-D-Versorgung eines Patienten wird anhand des 25(OH)D₃ (Calcidiol)-Spiegels im Serum bestimmt (Calvo *et al.*, 2005; SACN (Scientific Advisory Committee on Nutrition), 2016; Unholzer *et al.*, 2017; Sassi *et al.*, 2018). Diese Speicherform des Vitamin D besitzt mit etwa 20 Tagen eine lange Halbwertszeit. Die Vorstufe Vitamin D₃ besitzt hingegen nur eine Halbwertszeit von 19 – 24 h und kann zum Beispiel bei kürzlicher Nahrungsaufnahme stark schwanken. Die aktive Form Calcitriol wiederum wird im Körper bedarfsgerecht gebildet (Unholzer *et al.*, 2017).

Ein großes Problem bei der Erfassung von Vitamin-D-Mangelzuständen in der Bevölkerung ist die Verlässlichkeit der Messmethode. In der Vergangenheit wurden Varianzen zwischen verschiedenen Messungen festgestellt, die nahe legen, dass die Wahl des Labors bestimmt, ob ein Patient als Vitamin-D-defizitär oder ausreichend versorgt eingestuft wird (Binkley *et al.*, 2004; DeLuca, 2004; Unholzer *et al.*, 2017). Es besteht sowohl Bedarf an einheitlichen Testmethoden als auch an einem neuen, verlässlicheren Parameter zur Erfassung des Vitamin-D-Status. Einige dieser alternative Parameter wie freies oder bioverfügbares Vitamin D oder die Vitamin-D-Metabolit-Ratio können vielleicht in der näheren Zukunft routinemäßig angewandt werden (Herrmann *et al.*, 2017).

1.5.5.2 Grenzwerte für Calcidiol-Spiegel

Das amerikanische *Institute of Medicine* (IOM) (heute bekannt als *National Academy of Medicine*) und die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) empfehlen eine tägliche Vitamin-D-Aufnahme von 15 μ g/Tag, das britische *Scientific Advisory Committee on Nutrition* (SACN) sowie

die WHO/FAO 10 µg/Tag, die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) wiederum 20 µg/Tag (WHO/FAO, 2004; Institute of Medicine (IOM), 2011; German Nutrition Society, 2012; EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA), 2016; SACN (Scientific Advisory Committee on Nutrition), 2016).

Es herrscht kein Konsens über den Grenzwert, ab dem von einer erstrebenswerten Vitamin-D-Versorgung gesprochen werden kann (Spiro und Buttriss, 2014; Sassi *et al.*, 2018). Der untere Grenzwert für die Vitamin-D-Versorgung (unterhalb derer von Mangel gesprochen wird) wird häufig basierend auf dem Auftreten von Symptomen der Rachitis ermittelt. So kommen Grenzwerte zwischen 25 und 30 nmol/l zustande (Spiro und Buttriss, 2014).

Aktuell zeigt sich ein inverser nicht-linearer Zusammenhang zwischen der Gesamtmortalität und Vitamin-D-Spiegeln bis zu einem gewissen Schwellenwert (Adams und Hewison, 2010; Heath *et al.*, 2019).

Für die optimale Vitamin-D-Versorgung gibt es möglicherweise einen oberen Grenzwert (noch unterhalb der Toxizität), da ungewöhnlich hohe Serumspiegel mit einer erhöhten Mortalität in Verbindung gebracht wurden. Allerdings werden für diese Beobachtung mehrere *Confounder* besprochen (Amrein *et al.*, 2014; Sassi *et al.*, 2018; Heath *et al.*, 2019).

Organisation	WHO, 2003	EFSA, 2016 (EU)	DGE, 2012 (DE)	Konsens Zentraleuropa, 2013 (PL, HU, BY, EE, CZ und UA)	Institute of Medicine, 2011 (USA)
unterer Wert (wenn vorhanden)				< 50 nmol/l “deficient”	< 30 nmol/l “deficient”
mittlerer Wert (wenn vorhanden)				50–75 nmol/l “suboptimal”	30–50 nmol/l “inadequate in some people”
Zielwert	> 50 nmol/l	> 50 nmol/l	> 50 nmol/l “optimal”	75–125 nmol/l “optimal”	> 50 nmol/l “sufficient for almost the whole population”

Tabelle 2 Vergleich von Zielwerten verschiedener Organisationen für die Calcidiol-Serumkonzentration (WHO Scientific Group on the Prevention and Management of Osteoporosis, 2003; Institute of Medicine (IOM), 2011; German Nutrition Society, 2012; Płudowski *et al.*, 2013; EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA), 2016)

1.5.5.3 Status

Im Rahmen der Nationalen Verzehrstudie II kam die DGE zu dem Ergebnis, dass über 80 % der untersuchten Deutschen die empfohlene tägliche Zufuhr nicht erreichen (Max Rubner-Institut, 2008; Unholzer *et al.*, 2017).

Der Vitamin-D-Status in Europa variiert abhängig von Breitengrad, Jahreszeit und Hautpigmentierung. Ältere Menschen haben wegen geringerer endogener Synthese und häufig geringerer Sonnenexposition (insbesondere in Seniorenheimen) ein höheres Risiko in eine Mangelsituation zu gelangen (van der Wielen *et al.*, 1995; Spiro und Buttriss, 2014). Die Mangelprävalenz ist in der Altersgruppe > 65 Jahre erhöht (Hyppönen und Power, 2007).

Einige Reviews zeigten, dass der Serumspiegel im Norden und Westen Europas durchschnittlich höher ist als im Süden und Osten (van Schoor und Lips, 2011, 2017). Dieser Gradient konnte von Hilger *et al.* nicht bestätigt werden (Hilger *et al.*, 2014). Hohe Vitamin-D-Spiegel in Schweden und Norwegen lassen sich möglicherweise durch eine hohe Einnahme von fettigem Fisch und Lebertran, hellere Haut und mehr Sonnenbaden oder der Anreicherung von Öl und Milchprodukten mit Vitamin D erklären (van Schoor und Lips, 2011, 2017; Hilger *et al.*, 2014). Die niedrigen Vitamin-D-Spiegel in Spanien, Italien und Griechenland sind möglicherweise Folge von hoher Hautpigmentierung und sonnenvermeidendem Verhalten (van Schoor und Lips, 2011, 2017). Eine andere Metastudie kommt zu dem Ergebnis, dass die Vitamin-D-Spiegel in Teilen Süd-, Mittel- und Nordeuropas zwischen 25 und 49 nmol/l liegen, während sie im Rest von Europa im Normbereich (über 50 nmol/l) liegen (siehe Abbildung 5) (Wahl *et al.*, 2012). Unabhängig von länderspezifischen Unterschieden wurden innerhalb eines Landes breitengradabhängige Vitamin D-Spiegel beobachtet (höhere Mangel-Prävalenz im Norden) (Chapuy *et al.*, 1997; Hyppönen und Power, 2007). Höhere Vitamin-D-Spiegel konnten bei Einnahme von Vitamin-D-Ergänzungsmitteln und dem Konsum von fettigem Fisch beobachtet werden (Hyppönen und Power, 2007).

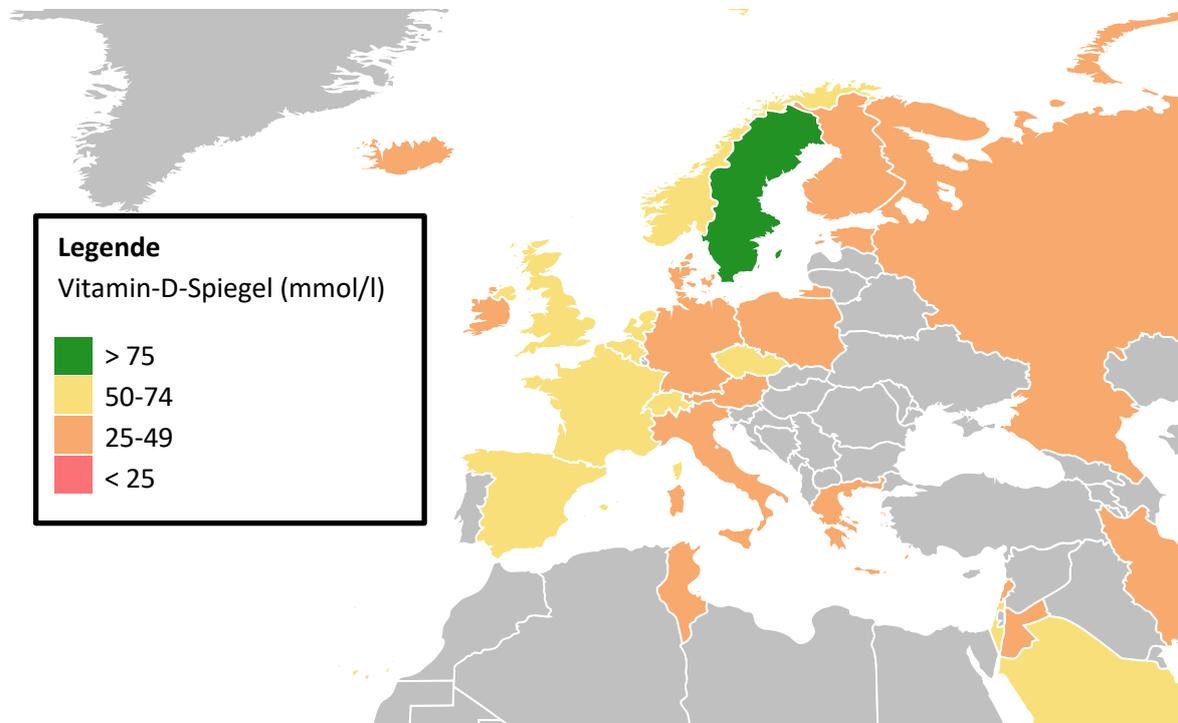


Abbildung 5 Vitamin-D-Spiegel der erwachsenen Bevölkerung in Europa nach Wahl *et al.*, 2012

Weltweit lag bei mehr als einem Drittel von 195 untersuchten Studien aus den Jahren 1990 – 2011 der mittlere Vitamin-D-Spiegel unter 50 nmol/l (Hilger *et al.*, 2014). Möglicherweise mehr als die Hälfte der Westeuropäischen Bevölkerung haben im Winter Spiegel unter 50 nmol/l (van Schoor und Lips, 2017).

1.5.5.3.1 Status in Morbus Dupuytren Patienten

Eine kürzlich veröffentlichte Studie untersuchte retrospektiv die Vitamin-D-Spiegel von 32 erkrankten Männern im Vergleich mit 64 altersangepassten gesunden Probanden (Park *et al.*, 2022). Die Autoren konnten nachweisen, dass der Vitamin-D-Serumspiegel unter den Dupuytren Patienten im Mittel signifikant niedriger lag als in der Vergleichsgruppe (48,33 nmol/l vs. 57,23 nmol/l) (Park *et al.*, 2022). Darüber zeigten Morbus Dupuytren Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (definiert

als < 50 nmol/l Serum-Calcidiol) ein signifikant höheres Streckdefizit als solche mit suffizienten Vitamin-D-Spiegeln ($72,5^\circ$ vs. 50°) (Park *et al.*, 2022).

1.6 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit untersuchte die Frage, ob sich mithilfe von Vitamin D die Myofibrogenese hemmen lässt. Hintergrund dieser Fragestellung waren o.g. Überlegungen, dass a) Vitamin D antifibrotische Eigenschaften zeigt, b) Morbus Dupuytren eine fibroproliferative Erkrankung ist und c) sich teilweise Deckungen von Regionen mit erhöhter Vitamin-D-Mangel- sowie Morbus-Dupuytren-Prävalenz erkennen lassen. Sollte an dieser Stelle ein (partieller) kausaler Zusammenhang vorliegen, wäre dies ein weiteres Argument für die Prävention von Vitamin-D-Mangel. Zudem wäre dann prinzipiell eine Therapie der frühen Dupuytren-Kontraktur mittels Calcitriol-Analoga mit geringem calcämischem Potenzial denkbar, so wie sie schon für diverse andere mit Vitamin D assoziierte Erkrankungen postuliert wurde (siehe auch 1.5.2 *Funktion*).

Konkret wurde diese Frage anhand der relativen Expression von Proteinen des pro-fibrotischen TGF- β -Signalwegs (SMADs), des Vitamin-D-Rezeptors sowie des Markerproteins für die Konversion zum Myofibroblasten (α -SMA) untersucht.

Es wurden Experimente an Fibroblastenzellkulturen durchgeführt, welche aus humanen fibrotisch-pathologisch veränderten Dupuytren-Kontraktursträngen gewonnen wurden. Die Zellen wurden wahlweise mit Calcitriol und/oder TGF- β behandelt.

Zu untersuchen war, ob Vitamin D den TGF- β -Signalweg in Fibroblasten zu hemmen vermag, und inwiefern die Zellen an einer Differenzierung zu Myofibroblasten gehindert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Produktbezeichnung	Produzent oder Lieferant
15 ml Zentrifugenröhrchen	15 ml tubes, sterile, graduation and writing area	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
24-Well-Platte	24 well plate, cell culture treated, with lid, lid with condensation ring, sterile	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
50 ml Zentrifugenröhrchen	50 ml tubes, sterile, graduation and writing area	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
50 ml Zentrifugenröhrchen	FALCON 50 ml Polypropylene Conical Tube, 30 x 115 mm style	Corning Inc., Corning, USA
6-Well-Platte	6 well plate, cell culture treated, with lid, lid with condensation ring, sterile	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Abwurfbeutel	Vernichtungsbeutel 200 x 300 mm, PP, transparent, Stärke: 50 µm, autoklavierbar, ohne Druck	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Aluminiumständer zur kühlen Probenlagerung	Rotilabo-Alu.Rack 1.5	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Aqua ad iniectionabilia	Ampuwa Spüllösung Plastipur	Fresenius Kabi France, Sèvres, FR
Aqua destillata	Demi-Wasser	Otto Fischech GmbH & Co KG, Saarbrücken, DE
Autoklav	Laboklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, DE
Autoklav	Systec DX-90	Systec GmbH, Linden, DE
Bechergläser	DURAN Becher niedrige Form und Ausguss	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, DE
Blaulichlampe	LED-Array (453 nm)	Philips GmbH Innovative Technologies, Aachen, DE
Blotting Gerät	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Brutschrank (37 °C)	Heraeus B 6060	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Brutschrank (37 °C; 5 % CO₂)	HERACELL 150i CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Butangas	Butan CV360	Camping Gaz (Deutschland) GmbH, Hungen-Inheiden, DE
CO₂-Gas	Kohlendioxid UN 1013	Linde AG, Geschäftsbereich Linde Gas, Pullach im Isartal, DE
Deckgläser	Round cover glasses, Ø12 mm, Thickness No. 1	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Desinfektionsmittel Wärme-Bad	Thermoklar	BIOMED Labordiagnostik GmbH, Oberschleissheim, DE
Einweg-Wägeschalen	diamond weighing boats, white, antistatic	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Eismaschine	RF 0244 A	Manitowoc Ice, Manitowoc, USA
Eiswanne zur kühlen Probenlagerung	neoLab Eisbad klein aus PS, innen 210 x 140 x 80 mm	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE

Gerät	Produktbezeichnung	Produzent oder Lieferant
Elektrisches Photometer	LIGHT METER	Westfalia Werkzeugcompany GmbH & Co KG, Hagen, DE
Elektrophorese Kit	Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell, 4-gel, for 1.0 mm thick handcast gels	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Elektrophorese Spannungsquelle	PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Elektrophorese Spannungsquelle	PowerPac HC Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Ethanol (70 %) zur Desinfektion	Technisolv Ethanol 70 % (V/V) denaturated Eurodenaturant	vwr International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, FR
Ethanol (99 %)	Emsure; Ethanol absolute for analysis	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Fluoreszenzmikroskop Kamera	Zeiss AxioCam MRm	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
Fluoreszenzmikroskop Software	AxioVision V4.8.2.0	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
Folie	Microtiter Sealing Tape	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Folie	Microplate Seal, adhesive seal sheets for microplates	4titude Limited, Wotton, UK
Fusselarme Papiertücher	KIMTECH SCIENCE* Präzisionstücher weiß/klein	Kimberly-Clark Global Sales Inc., Roswell, USA
Gasflamme	Fuego SCS basic	WLD-Tec, Göttingen, DE
Gefrierschrank -20 °C	GUw 1213	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, DE
Gefrierschrank -25 °C	Labor-Gefrierschrank FROSTER-520	Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, DE
Gefrierschrank -25 °C	Labor-Gefrierschrank FROSTER-320	Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, DE
Gefrierschrank -80 °C	HERAfreeze HFU500TV	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
gläserne Pasteurpipetten	Glass Pasteur Pipettes	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Gradienten-Gel mit 4-20 % Acrylamid	Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels, 4-20 %, 15-well comb, 15 µl/well	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Handschuhe	Micro-Touch Nitra-Tex Nitrile Powder-Free Examination Gloves	Ansell GmbH, München, DE
Handschuhe	Classic Nitrile, Powder-Free, blau	Abena GmbH, Zörbig, DE
Heizblock	dry bath	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Kanüle	BD Eclipse Needle, with SmartSlip Technology, 25G x 5/8 (0,5 mm x 16 mm)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Kühlschrank 4 °C	KUw 1740	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, DE
Kühlschrank 4 °C	Labor-Kühlschrank SPEZIAL-466	Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, DE
Kühlschrank 4 °C mit Glastür	Nunc Revco Hochleistungs-Laborkühlschrank mit Glastüren	Nunc, Wiesbaden-Biebrich, DE

Gerät	Produktbezeichnung	Produzent oder Lieferant
Laborflasche	DURAN Original Laborflasche	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, DE
Magnetrührgerät	620 Standard	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Mehrfachdispenser	Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Messbecherglas	Pyrex Beakers, low form, Griffin	SciLabware Ltd., Stoke-on-Trent, UK
Messzylinder	Messzylinder, PP, Klasse B, niedere Form, erhabene Skala	VITLAB GmbH, Grossostheim, DE
Messzylinder	Borosilikatglas 3.3, niedrige Form, Klasse B	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Messzylinder	PP, durchscheinend, hohe Form, Klasse B	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Micro tube/SafeSeal tube	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Mikroskop	Axiovert 40 C	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Mikroskop zur Fluoreszenzmikroskopie	Zeiss Axioskop 40	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
Mikrotiterplatte	Microplate, 96 well, PS, F-Bottom, Clear	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhäuser, DE
Netzteil für Zeiss HBO 50 Mikroskop-Lampe	mbq 52 ac	Leistungselektronik Jena GmbH, Jena, DE
Objektträger	Objektträger, ca. 76 x 26 mm, geschnitten, Mattrand, geputzt/gebrauchsfertig	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, DE
Objektträger mit Kammersystem	Lab-Tek Chamber Slide System Glass Slide, Sterile, 16 well	Nalge Nunc International, Naperville, USA
Office-Paket	Microsoft Office 2010 Professional Plus	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Office-Paket	Microsoft Office 365 Pro Plus (Versionen 2016, 2019)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Papiertücher	tapira Plus Kosmetiktücher	GVS Großverbraucherspezialisten eG, Heidenheim, DE
Papiertücher	wepa prestige facial tissues, super soft	WEPA Professional GmbH, Arnsberg, DE
Petri-Schale	TC-Schale 100, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
pH-Meter	HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments Inc., Woonsocket, USA
Photometer	multilabel plate reader Victor3	Perkin Elmer Inc., Waltham, USA
Photometer PC	Optiplex GX620	Dell Inc., Round Rock, USA
Photometer Software	WorkOut 2.0	DAZDAQ LTD., Brighton, UK
Pipetten (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	eppendorf research/research plus/reference	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipetten (0,5-10 µl, 5-50 µl, 20-200 µl)	Finnpipette Einkanalpipetten mit variablem Volumen	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Pipetten (2-20 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl)	pipetman classic	Gilson S.A.S., Villiers-le-Bel, FR
Pipettierhilfe	accu-jet pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Pipettierhilfe	pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE

Gerät	Produktbezeichnung	Produzent oder Lieferant
Pipettierhilfe	Omega Pipettor	Argos Technologies Inc., Vernon Hills, USA
Pumpe	LABOPORT	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, DE
Quecksilber-Kurzbogenlampen ohne Reflektor	HBO 50/AC	OSRAM GmbH, München, DE
Rüttelplatte	Kleinschüttler KM-2	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, DE
schwarze Tonne	Kontaminationsabfall	MAUSER Corporate GmbH, Brühl, DE
Sicherheitswerkbank mit Abzug	TA 1500 x 900 - 900 (Laborsystem mc6)	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, DE
Sonifizierer	UP50H (Cycle 0,5; Amplitude 80 %) mit Sonotrode MS1	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, DE
Spitzen 0,5 ml, 5 ml, 10 ml	Combitips advanced steril/unsteril	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Spitzen 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	costar stripette serological pipet	Corning Inc., Corning, USA
Spitzen 5 ml	FALCON Serological Pipet	Corning Inc., Corning, USA
Spitzen 10/20 µl	10/20 µl XL Graduated Tip/Filter Tip	STARLAB GmbH, Hamburg, DE
Spitzen 1000 µl	1000 µl Graduated Tip/Filter Tip	STARLAB GmbH, Hamburg, DE
Spitzen 200 µl	200 µl Bevelled Tip/Filter Tip	STARLAB GmbH, Hamburg, DE
Spritze 20 ml	Injekt 20 ml, Luer Solo	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Spritzflasche	Nalgene belüftete Unitary LDPE-Sicherheitspritzflaschen	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Spritzflasche	Weithals-Spritzflaschen Serie 303 LDPE, rund, naturfarben, mit Gefahrgutaufdruck	KAUTEX TEXTRON GmbH & Co. KG, Bonn, DE
sterile Werkbank	Herasafe KS 18	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
sterile Werkbank	Euroflow EFA5	Clean Air Techniek bv, Woerden, NL
Sterilfilter	Millex-GS, Sterile Filter Unit with MF-Millipore MCE Membrane, 0,22 µm	Merck Millipore Ltd., Cork, IE
Taumelrollenmischer	RM 5	Ingenieurbüro CAT M.Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen, DE
Taumelrollenmischer	RM 10 W	Ingenieurbüro CAT M.Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen, DE
Thermostat für Wasserbad	Thermomix BU	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
UV-A Lampe	Sellamed 4000	Sellas med. Geräte GmbH, Gevelsberg, DE
UV-B Lampe	Ultraviolet-B TL 20 W/12 RS	Philips Lighting Holding B.V., Eindhoven, NL
Verschlussfolie	Parafilm "M"	Bemis Company Inc., Neenah, USA
Vortexer	IKA MS3 basic (3000 U/min)	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen, DE
Vortexer	Vortex mixer	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Vortexer	Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, DE
Vortexer	L46 Power Mixer	Labinco BV, Breda, NL

Gerät	Produktbezeichnung	Produzent oder Lieferant
Waage (d = 0,1 mg)	ABJ 220-4M	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE
Waage (d = 10 mg)	Adventurer Pro AV412	Ohaus Corporation, Pine Brook, USA
Wärme-Bad 37 °C	Aqualine AL 12	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG, Lauda-Königshöfen, DE
Western Blot Imaging Instrument	ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Western Blot Software	ImageLab 6.0	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Zählkammer / Hämocytometer	Neubauer, Tiefe 0,1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshöfen, DE
Zellkulturflasche	cell culture flasks, 650 ml, 175 cm ² , PS, red filter screw cap, TC, clear, sterile	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellschaber	Cell Lifter, Polyethylene, sterile	Corning Inc., Corning, USA
Zellsieb (100µm)	Cell Strainer; 100 µm Nylon	Corning Inc., Corning, USA
Zellsieb (100µm)	EASYstrainer, 100 µm, für 50 ml Röhren, gelb, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Zentrifuge	MiniSpin	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge	Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE

2.1.2 Substanzen

Substanz	Produktbezeichnung	Produzent oder Lieferant
Acrylamid	30 % Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid "Rotiphorese Gel 30"	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Albumin	Albumin Fraktion V, ≥ 98 %, pulv., für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
APS	Ammonium persulfate, for molecular biology, for electrophoresis, ≥ 98 %	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Blotting Membran	Nitrocellulose Blotting-Membran (Porengröße 0,2 µm)	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Blotting Papier	Blotting Filter Papers, 2,5 mm thickness, 7,5 cm x 8,4 cm	Invitrogen, Carlsbad, USA
Bromphenolblau	Bromphenolblau Natriumsalz für die Elektrophorese, Farbstoff zur Laufmarkierung in der Gelelektrophorese. Indikator pH 3,0-4,6	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Calcitriol (10µg)	1α,25-Dihydroxyvitamin D ₃ ; ≥ 99 % (HPLC); Lot # 107M4018V	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Calcitriol (2mg)	Calcitriol; Lot # 20942	MedChemExpress Europe, Sollentuna, SE
Dispase Typ II	Dispase II (neutral protease, grade II); from Bacillus polymyxa, lyophilizate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (1X), liquid (High Glucose)	Life Technologies Ltd., Paisley, UK

Substanz	Produktbezeichnung	Produzent oder Lieferant
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Elektroden Lagerungslösung	storage solution for pH and ORP electrodes	Hanna Instruments Inc., Woonsocket, USA
FCS	Sera Plus special processed FBS; sterile filtered (Lot No.: P170208 für Differenzierungsversuch)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
GAPDH-Antikörper	Anti-GAPDH hFAB Rhodamine Antibody	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Glycerol	Glycerin ROTIPURAN $\geq 99,5$ %, p.a., wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Glycin	Glycin PUFFERAN ≥ 99 %, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Goat anti Mouse HRP Antibody	Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
Goat anti Rabbit HRP Antibody	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
HEPES	HEPES solution, 1 M, pH 7,0-7,6, sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Kernprotein Extraktskit	NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Kollagenase Typ I	Collagenase Type I, CLS I, 355 U/mg, from Clostridium histolyticum (not sterile)	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol, for electrophoresis	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Methanol	Methanol Rotipuran $\geq 99,9$ %, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Milch	Milchpulver, blotting grade, pulv., fettarm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
NaCl	Sodium chloride	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Na-deoxycholat	Sodium deoxycholate, BioXtra, $\geq 98,0$ % (dry matter, NT)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
NaF	Sodium fluoride, ACS reagent, ≥ 99 %	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Nonidet P-40	Nonidet-P40 (NP40); Nonylphenylpolyethylene glycol; Polyethyleneglycol-p-isooctylphenyl ether; Octylphenoxy EMPROVE exp DAC	United States Biological, Salem, USA
Paraformaldehyd	Paraformaldehyde, suitable for use as excipient	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Penicillin & Streptomycin Mischung	Penicillin-Streptomycin; 10,000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, sterile filtered, for cell culture	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
pH 10 Puffer	HI 7010 pH 10,01 buffer solution $\pm 0,01$ pH @ 25 °C / 77 °F	Hanna Instruments Inc., Woonsocket, USA
pH 4 Puffer	Pufferlösung pH 4,005 $\pm 0,02$ (25 °C) ROTI CALIPURE gebrauchsfertige Pufferlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
pH 7 Puffer	Pufferlösung pH 7,00 $\pm 0,02$ (20 °C) ROTI CALIPURE gebrauchsfertige Pufferlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

Substanz	Produktbezeichnung	Produzent oder Lieferant
Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten	PhosSTOP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Ponceau S	Ponceau S, BioReagent, suitable for electrophoresis	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	cOmplete Mini, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Protein Assay Kit	Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
SDS	SDS \geq 99,5 %, Blotting-Grade	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
TEMED	TEMED 99 %, p.a., für die Elektrophorese	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
TGF-Beta	Recombinant Human TGF- β 1 (HEK293 derived)	PeproTech Inc., Rocky Hill, USA
TRIS	TRIS PUFFERAN, \geq 99,3 %, Buffer Grade	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
TRIS Base	AnalaR NORMAPUR Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS, Trometamol)	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
TRIS-HCl	TRIS-HCl 1 M Stock Solution	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Triton X-100	Triton X-100, for molecular biology	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Trypsin	Trypsin-EDTA 10X; sterile filtered	Biowest, Nuaille, FR
Tween	Tween 20 for molecular biology, viscous liquid	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Western Marker Antikörper	Roti-Mark WESTERN HRP-Konjugat, anti-WESTERN Marker Antikörper (Kaninchen)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Western Blot Gel Kit	TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 10 %	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Western Blot Substrat	Immobilon Forte Western HRP Substrate	Millipore Corporation, Billerica, USA
Western Marker Proteinleiter	Roti-Mark WESTERN Marker	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

2.1.3 Primäre Antikörper

Zielstruktur	Produktbezeichnung	Verdünnung	Inkubationslösung	Spezies	Mono-/Polyklonal	Größe der Zielstruktur	Produzent
α-SMA	Anti-alpha smooth muscle Actin antibody [1A4] (ab7817)	1:1000	5 % BSA	Mouse	Monoklonal	42 kDa	Abcam plc, Cambridge, UK
GAPDH	ANTI-GAPDH hFAB TM Rhodamine Antibody, AbD22549	1:5000	3 % BSA	Mouse	Monoklonal	37 kDa	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA

Zielstruktur	Produktbezeichnung	Verdünnung	Inkubationslösung	Spezies	Mono-/Polyklonal	Größe der Zielstruktur	Produzent
pSMAD2	Phospho-SMAD2 (Thr8) Antibody (11H10L30), ABfinity™ Rabbit Monoclonal, 700050	1:1000	5 % BSA	<i>Rabbit</i>	Monoklonal	58 kDa	Thermo Fisher Scientific Pierce Biotechnology, Rockford, USA
(pSMAD3)	Phospho-SMAD3 (Ser423, Ser425) Antibody (16H5L12), ABfinity™ Rabbit Monoclonal, 702292	1:1000	5 % BSA	<i>Rabbit</i>	Monoklonal	48 kDa	Thermo Fisher Scientific Pierce Biotechnology, Rockford, USA
(pSMAD3)	Phospho-Smad3 (Ser423/425) (C25A9) Rabbit mAb #9520	1:1000	5 % BSA	<i>Rabbit</i>	Monoklonal	52 kDa	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
(SMAD3)	Smad3 (C67H9) Rabbit mAb #9523	1:1000	5 % BSA	<i>Rabbit</i>	Monoklonal	52 kDa	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
SMAD4	SMAD4 antibody, GTX112980	1:1000	5% Milch	<i>Rabbit</i>	Polyclonal	61 kDa	GeneTex Inc., Irvine, USA
(SMAD4)	Smad4 Antikörper (B-8): sc-7966	1:500	5 % Milch	<i>Mouse</i>	Monoklonal	61 kDa	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
SMAD7	Human/Mouse/Rat Smad7 Antibody, MAB2029	1:100?	5 % BSA	<i>Mouse</i>	Monoklonal	46 kDa	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
(SMAD7)	Smad7 Antikörper (Z8-B): sc-101152	1:500	5 % BSA	<i>Mouse</i>	Monoklonal	46 kDa	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA

Zielstruktur	Produkt-bezeichnung	Verdün-nung	Inkubations-lösung	Spezies	Mono-/Polyklonal	Größe der Ziel-struktur	Produzent
TBP	TBP Antibody #8515	1:1000	5 % Milch	Rabbit	Polyklonal	35-45 kDa	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
VDR	VDR Antikörper (D-6): sc-13133	1:500	5 % Milch	Mouse	Monoklonal	48 kDa	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA

2.2 Methoden

Die Vorbereitung und Durchführung der Versuche, Zusammensetzung von Puffer und Medien sowie die Probenanalyse erfolgte soweit möglich nach laborinternen Standards (Standard Operating Procedure, kurz SOP) der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Die für die Kapitel 2.2.8 *Proteinquantifizierung* sowie 2.2.9 *Proteinanalyse mittels Gelelektrophorese, Western Blot und Immunfärbung* relevanten SOP sind im Anhang als Original beigelegt.

2.2.1 Gewinnung der Patientenproben/Ethikvotum

Die für die Herstellung der Zellkulturen benötigten Resektate wurden von Morbus Dupuytren-PatientInnen und Karpaltunnelsyndrom-PatientInnen gewonnen. Die Eingriffe erfolgten elektiv in der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Die PatientInnen oder ihre gesetzlichen Vormünder stimmten der wissenschaftlichen Verwendung des Gewebes vor der Operation zu. Dieses Vorgehen wurde unter der Studiennummer 3634 von der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit einem positiven Ethikvotum bestätigt.

2.2.2 Isolierung von Fibroblasten aus krankem Gewebe

Zunächst wurde das aus dem Operationssaal erhaltene Probenmaterial (Retinaculum flexorum und fibrotisches Kontrakturgewebe) in 1 cm² große Stücke geschnitten und jedes Stück in eine Petrischale überführt. Daraufhin wurde evtl. mitreseziertes Fettgewebe entfernt und je eine Probe in eine neue Petrischale mit Zellkulturmedium überführt. Dort wurde das Gewebe nochmals in kleinere Stücke geschnitten. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel und nach 5 – 7 Tagen wurde das Probenmaterial entfernt. (Siehe Abbildung 6)

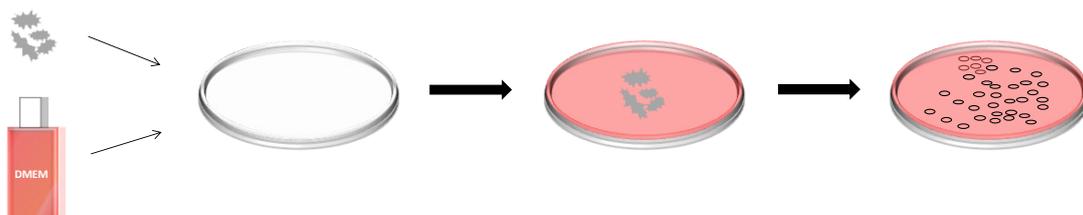


Abbildung 6 Vorgang der Fibroblasten-Isolierung

2.2.3 Zellkultur

Die Fibroblasten wurden wie oben beschrieben aus dem Primärmaterial isoliert und nach Erreichen einer ausreichenden Populationsgröße für Experimente eingesetzt. Einige Zellkulturen wurden auch zur späteren Verwendung kryokonserviert und aufgetaut. Alle Arbeiten an Zellkulturen und Zellkulturmedien wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Die Kultivierung erfolgte in 100 mm Petrischalen oder 650 ml Zellkulturflaschen. Als Nährmedium wurde DMEM unter Zusatz von 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung eingesetzt. Das Nährmedium wurde vor Verwendung stets im auf 37 °C temperierten Wasserbad aufgewärmt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert.

Zweimal wöchentlich wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, die Zellen für einige Sekunden bis Minuten mit PBS bedeckt und nach erneutem Absaugen neues aufgewärmtes Medium zu den Zellen gegeben. Im Zuge dessen wurde die Zelldichte lichtmikroskopisch abgeschätzt.

Sobald die Zellen lichtmikroskopisch den kompletten Boden bedeckten, erfolgte ein *“Splitting“* oder Passagieren der Zellpopulationen, in der Regel im Verhältnis 1:3 – 1:5. Das Medium wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen für einige Sekunden bis Minuten mit PBS bedeckt. Nach erneutem Absaugen wurden 3 – 5 ml einer Trypsin-EDTA in PBS-Lösung hinzugegeben. Trypsin spaltet Extrazellulärproteine der Fibroblasten, welche für die Zelladhäsion am Kulturgefäß verantwortlich sind. EDTA bindet Ca²⁺-Ionen und verhindert so eine Interaktion mit dem Trypsin und schwächt außerdem Zell-Zellkontakte. Um eine optimale Enzymfunktion zu gewährleisten, wurden die Zellen für 5 – 7 Minuten in den Brutschrank zurückgestellt und hinsichtlich ihrer Ablösung lichtmikroskopisch kontrolliert. Zur Unterstützung der Ablösung wurde mit der Petrischale bzw. Zellkulturflasche vorsichtig horizontal gegen die Arbeitsplatte geklopft (*Shake-off-Verfahren*). Durch Zugabe von DMEM im Verhältnis 1:1 zur Trypsin-EDTA Lösung wurde die Reaktion durch die enthaltenen Proteaseinhibitoren gestoppt, woraufhin die Zellen unter sanftem Auf- und Abpipettieren geerntet und in ein Röhrchen überführt wurden. Anschließend wurden die Zellen bei 270 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Entsprechend der Anzahl neuer Petrischalen bzw. Zellkulturflaschen wurde frisches Medium mit dem Zellpellet vermischt und auf die Kulturgefäße verteilt.

2.2.4 Zellaussaat

Zur Vorbereitung der Experimente wurden die Zellen auf 24-Well Platten verteilt. Hierbei wurde zunächst wie beim Passagieren (siehe 2.2.3 *Zellkultur*) vorgegangen, jedoch wurde das Zellpellet in 5 ml Medium gelöst und nach gründlicher Durchmischung von dieser Suspension 10 µl abgenommen. Diese Probe wurde in eine Neubauer Zählkammer, Tiefe 0,1 mm, gegeben. Daraufhin wurden 16 Quadrate von 0,0625 mm² Fläche ausgezählt. Zellen, die auf der Mitte einer Quadratbegrenzung lagen, wurden zu dem Quadrat gezählt, auf dessen unterer oder rechter Begrenzung sie lagen. Die Zellkonzentration wurde nach folgender Formel errechnet:

$$c_i \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = n_{\text{gezählt}} \cdot 10^4$$

Abbildung 7 Formel zur Berechnung der Zellkonzentration

Das Volumen zu verwendender Zellen in Lösung wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$V_{\text{zur Verwendung}} = V_{\text{Ziel}} \cdot \frac{c_{i \text{ Ziel}}}{c_{i \text{ aktuell}}}$$

Abbildung 8 Formel zur Berechnung der benötigten Lösungsmenge

Zielkonzentration waren 40.000 Zellen/Well bei 0,5 ml/Well = 80.000 Zellen/ml. Für jede 24-Well Platte wurden mindestens 12 ml Zellsuspension in der Zielkonzentration hergestellt.

In jedes Well wurden 0,5 ml der Zellsuspension pipettiert, woraufhin die Platten über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ belassen wurden. Die überschüssige Zellsuspension wurde auf neue Petrischalen zur weiteren Kultur ausplattiert oder verworfen.

Für die Versuche wurden Zellkulturen bis zur achten Passage verwendet. Die durchschnittliche Passagenummer betrug 5,83 (mittlere Abweichung 1,22) für die Morbus Dupuytren Fibroblasten und 6 (mittlere Abweichung 1) für die Karpaltunnelsyndrom Fibroblasten. Keiner der SpenderInnen mit Morbus Dupuytren war weiblich, 6 waren männlich. Bei den Karpalsyndrom-SpenderInnen war die Geschlechterverteilung 2 weiblich und 4 männlich.

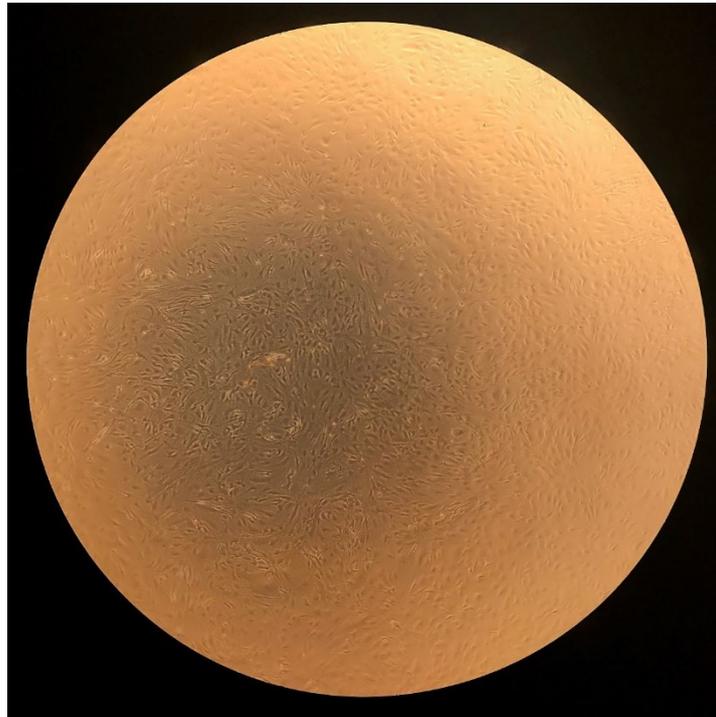


Abbildung 9 Foto der ausgesäten Zellen am ersten Tag der Behandlung (vom 20.07.2018)

2.2.5 Vitamin-D-Versuch

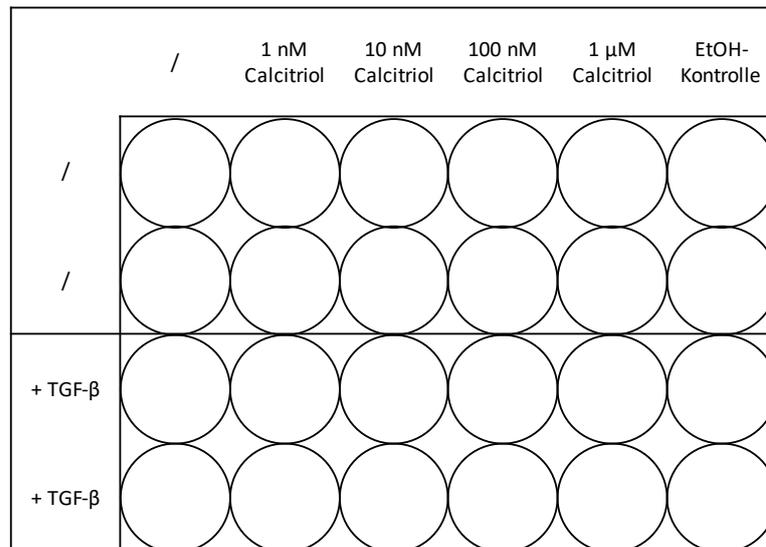


Abbildung 10 Verteilung der Populationen auf der Platte

Untersucht wurde der Einfluss von verschiedenen Konzentrationen Calcitriol sowie TGF-β über einen Zeitraum von ca. 72 Stunden. Hierzu wurde das Medium aus den 24 Wells vorsichtig abgenommen und nach dem obigen Schema (Abbildung 10) ersetzt. Jede Behandlungsart wurde in Duplets durchgeführt. Danach wurden die Platten für ca. 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ belassen.

Da signifikante Unterschiede im Vitamin D Gehalt des Kulturmediums zu vermeiden waren und FCS ein Produkt natürlichen Ursprungs ohne ausgewiesenen Vitamin D Gehalt ist, wurde das Kulturmedium zur Durchführung des Versuchs immer mit FCS der gleichen Charge hergestellt (P170208).

TGF-β wurde aus einer aliquotierten 1 µg/ml oder 500 ng/ml Stammlösung entnommen.

Calcitriol wurde vorwiegend aus einer 1 mM Stammlösung in 95 % Ethanol entnommen. Die Proben von zwei Versuchswiederholungen, welche zuvor mithilfe einer 100 µM Stammlösung durchgeführt wurden, wurden aufgrund eines vermutet hohen Materialverlustes während des Ansetzens der Stammlösung verworfen. Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen Calcitriols wurde mittels einer Verdünnungsreihe unter Verwendung von 50 ml Falcon-Röhrchen hergestellt. Da Calcitriol hoch photosensitiv ist, wurden alle Arbeiten mit Calcitriol unter lichtarmen Bedingungen und ausschließlicher Verwendung von indirektem Licht durchgeführt. Die mit dem Photometer gemessene Beleuchtungsstärke betrug unter regulären Bedingungen 90 lx und unter in Abbildung 11 beschriebenen abgedunkelten Bedingungen 550 lx.

Um einen Einfluss des Lösungsmittels Ethanol zu prüfen, wurde die maximal verwendete Dosis 95% EtOH (0,1% entsprechend Spalte 5) eingesetzt. Ein Versuchsdurchlauf/die Zellkultur einer SpenderIn der CTS-Gruppe wurde mit Calcitriol aus einer 100 µM Stammlösung behandelt. Hier wurde keine Ethanolkontrolle (= 95% EtOH) angesetzt, daher gilt für CTS EtOH-Kontrolle n = 5 gegenüber den übrigen Spalten mit n = 6.



Abbildung 11 Foto der verwendeten lichtarmen Bedingungen. Die Arbeiten wurden an der linken Werkbank mit dem Rücken zur Lichtquelle durchgeführt (siehe weißer Pfeil).

2.2.6 Bestimmung des Calcitriol-Gehalts in FCS

Für den Versuch stellte sich die Frage, ob im Zellkulturmedium bereits endogen relevante Mengen Vitamin D vorhanden sind. Außerdem galt es herauszufinden, inwieweit das Molekül unter Versuchsbedingungen und längerer UV-Bestrahlung stabil bleibt. Dem Zellkulturmedium DMEM selbst wird laut Herstellerangaben kein Calcitriol zugesetzt. Das dem Medium zugesetzte fetale Kälberserum (FCS) hingegen ist tierischen Ursprungs und enthält mit hoher Wahrscheinlichkeit eine gewisse Menge des bei fast allen Wirbeltieren vorkommenden (Holick, 1992) Vitamins D.

Zu diesem Zwecke wurden vier 6-Well-Platten mit 800 µl FCS/Well befüllt. Daraufhin wurden die Platten entweder unbehandelt unter Raumlicht gelagert oder für 10 Minuten mit UVA- (340 – 440 nm), UVB- (290 – 315 nm) oder Blaulichtlampen (453 nm) bestrahlt. Der Versuch wurde mit zwei Proben aus unterschiedlichen Chargen wiederholt.

Die Proben wurden anschließend im Zentrallabor des Universitätsklinikum Düsseldorf mittels eines ELISA-Kits der Firma Immundiagnostik auf die Calcitriol-Konzentration untersucht (Messgröße akkreditiert durch die Deutsche Akkreditierungsstelle). Alle Proben wurden doppelt eingesendet.

2.2.7 Probenvorbereitung

Am Ende eines Versuchs wurde für jede der untersuchten Behandlungen sowie jede Versuchswiederholung ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorbereitet und beschriftet. Anschließend wurden die Zellen analog zur Zellkultur (vgl. 2.2.3 Zellkultur) mittels Trypsin vom Gefäßboden gelöst und die Zellsuspension aus den zwei gleich behandelten Wells in ein

Reaktionsgefäß überführt. Diese wurden für 3 Minuten bei 11.900 g zentrifugiert. Daraufhin wurde rasch der Überstand abgesaugt, das Zellpellet mit 40 µl kühlem RIPA-Puffer resuspendiert und die Gefäße auf Eis gelagert. Bis zur Fortführung der Probenbearbeitung wurden die Gefäße dann bei -18 °C gelagert.

Bei allen nachfolgenden Nutzungen des Probenmaterials wurden die Probengefäße stets in Aluminiumständern auf Eis gelagert.

Zur weiteren Zellyse wurden alle Proben außerdem für insgesamt 10 Sekunden mittels eines Ultraschall-Laborhomogenisators (Cycle 0,5; Amplitude 80 %) behandelt.

2.2.8 Proteinquantifizierung

Um mittels Western Blot später Unterschiede in der Proteinexpression zwischen den Proben quantifizieren zu können, sollte im Vorhinein sichergestellt werden, dass von jeder nebeneinander zu untersuchenden Probe gleichmäßige Mengen Gesamtprotein verwendet werden.

Hierzu wird die Proteinkonzentration der Proben mittels eines *bicinchoninic acid assay* (BCA-Test) ermittelt. Dieser basiert auf der Reduktion von zweiwertigen Kupferionen in Kupfer(II)-sulfat zu Cu^{1+} durch die Peptidbindungen einer Proteinlösung in einer zur Proteinmenge proportionalen Menge. Das gebildete reduzierte Eisen bildet dann mit BCA einen lila-blauen Farbstoffkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm (Smith *et al.*, 1985).

Zur Konzentrationsbestimmung wurde gemäß den Herstellerangaben des Kits eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen zwischen 0,025 µg/µl und 2,0 µg/µl aus 1%iger BSA-Lösung hergestellt (siehe Tabelle 3). Als Blankokontrolle wurde PBS verwendet. Die Proben wurden im Verhältnis 1:6 mit PBS verdünnt, um im kalibrierten Bereich messen zu können.

Konzentration (µg/µl)	Probe	BSA-Standard (µl)	PBS oder RIPA (µl)
2	A	300	0
1,5	B	375	125
1,0	C	325	325
0,75	D	175 von B	175
0,5	E	325 von C	325
0,25	F	325 von E	325
0,125	G	325 von F	325
0,025	H	100 von G	400
0 = BLANK	I	0	400

Tabelle 3 Herstellung der Standardreihe

Nach Auftragen von 10 µl verdünnter Proben sowie des Standards in Duplets auf einer 96-well-Platte, wurden 200 µl des *working reagents*, bestehend aus einer BCA- und einer Kupfersulfatlösung im Verhältnis 50:1, zugegeben. Die Platte wurde daraufhin 30 Sekunden lang geschüttelt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Platte auf Raumtemperatur wurde die Absorption bei 562 nm photometrisch bestimmt. Aus den anhand der Standardkurve bestimmten Konzentrationen und der bekannten Verdünnung der Proben wurde die Proteinkonzentration in den Proben berechnet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Yellow	Red	White	White	White							
B	Yellow	Red	White	White	White							
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
F	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
G	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
H	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36

Abbildung 12 Belegung der 96-well Platten zur Proteinkonzentrationsbestimmung.

Gelb: Leerkontrolle = PBS, Rot: Standardkonzentrationen, Grün: Untersuchte Proben, Weiß: ungenutzt

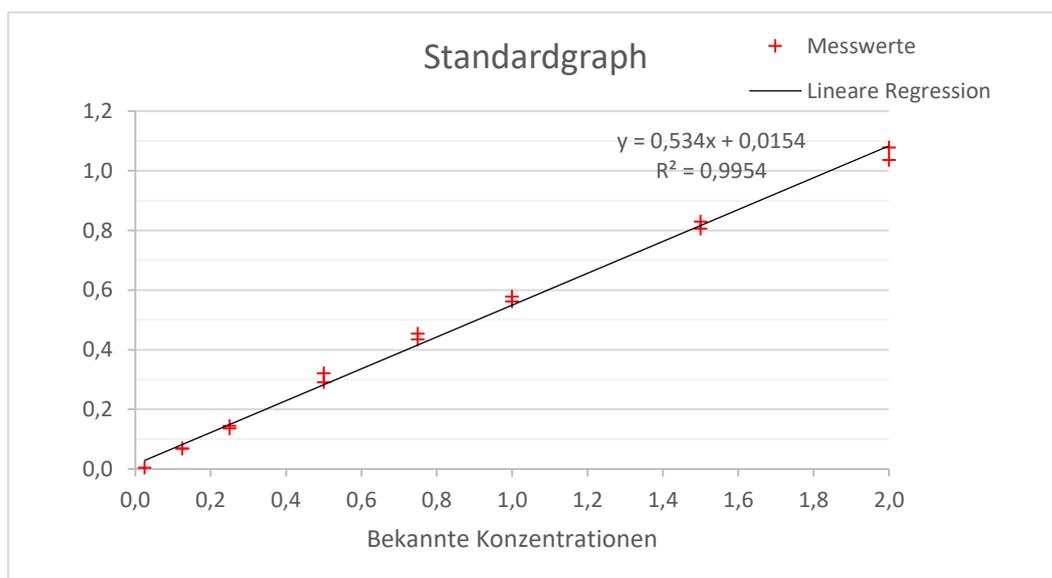


Abbildung 13 Berechnungsbeispiel der Berechnung einer Standardkurve (Daten vom 25.9.2018)

2.2.9 Proteinanalyse mittels Gelelektrophorese, Western Blot und Immunfärbung

Der Western Blot ist eine Methode zur semiquantitativen Analyse einzelner Proteine in einer Probe. Aus dem Vorhandensein von Proteinen sowie dem direkten Vergleich der Proteinmenge zwischen mehreren Proben lassen sich Rückschlüsse auf Regulationsprozesse auf der Proteinebene in den Zellen schließen.

Die Auftrennung der Proteine in den Proben erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese. Aus dem Polyacrylamid Gel wurden die Proben anschließend in Western Blot-Technik auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. Auf der Nitrocellulose Membran können die Proteine dann mit verschiedenen Färbetechniken nachgewiesen werden.

2.2.9.1 SDS-PAGE

Mittels der *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide*-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine anhand ihrer Masse getrennt werden. Bei dem Verfahren werden die zuvor denaturierten Proteine proportional zu ihrer Masse elektrisch „beladen“. Proportional zur Ladung wandern diese Proteine dann verschieden schnell entlang der angelegten Spannung durch das Trenngel.

Die Gele wurden anhand der Herstellerangaben mittels des *TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit* hergestellt (Abmessungen 10 x 8 x 0,1 cm mit 10 oder 15 Wells) und anschließend bis zu ihrer Verwendung im Glasrahmen maximal 2 Wochen in wässriger Umgebung bei +4 °C gelagert. Nachdem Gele mit Polyacrylamid-Konzentrationen von 10 % und 12 % verglichen wurden, entschied man sich hauptsächlich 10%ige Polyacrylamid-Gele zu nutzen, da diese im untersuchten Proteingrößenbereich (37 – 61 kDa) eine höhere Ortsauflösung bieten und somit Bandenüberschneidungen effektiver minimieren (siehe Abbildung 14). Die Gele enthalten eine Trihalo-Verbindung, welche kovalent an die Aminosäure Tryptophan bindet. Unter UV-Einstrahlung lässt sich an dieser Verbindung eine Reaktion hervorrufen, nach der die modifizierten Tryptophan-Reste nun fluoreszieren. Das Fluoreszenzsignal lässt sich daraufhin mit einer Digitalkamera detektieren und quantifizieren (Ladner *et al.*, 2004; Colella *et al.*, 2012).

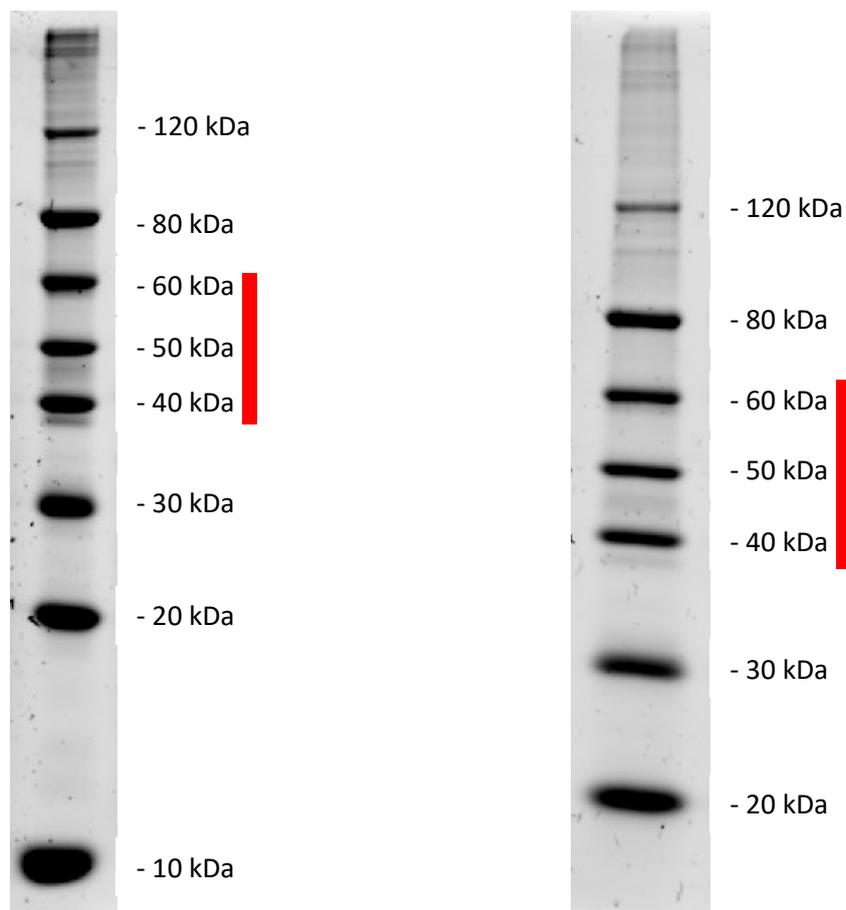


Abbildung 14 Vergleich der Größenverteilung bei 12%igen (links) und 10%igen (rechts) Gelen. Der untersuchte Proteingrößenbereich ist rot markiert.

Zur Denaturierung der Proben wurde ein Probenvolumen entsprechend 10 µg Gesamtprotein auf 12 µl mit Aqua dest. aufgefüllt, im Verhältnis 1:4 mit Bromphenolblau-haltigem Tris-Glycin-Puffer versetzt und anschließend für 5 Minuten bei 95 °C im Trockenbad erhitzt. Anschließend wurden die Proben im Vortexmischer geschüttelt und für wenige Sekunden bei 17.000 g abzentrifugiert.

Nach Vorbereitung der Proben wurden die Gele im Glasrahmen in die Laufkammer gestellt, welche mit Laufpuffer gefüllt wurde. Die Proben wurden daraufhin in die Taschen des Gels gegeben, woraufhin eine Spannung von 60 V für ca. 20 Minuten angelegt wurde. Hierbei wandern die Proteine durch das Sammelgel und werden an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel abgebremst, da das Sammelgel feinporiger ist und größere Spannungen zum Transport der Proteine benötigt. Hat das in den Proben enthaltene Bromphenolblau eine Laufmittelfront an der Gelgrenze gebildet, wurde davon ausgegangen, dass sich die aufgetragenen Proteine an der Gelgrenze gesammelt haben und die Spannung wurde zur Auftrennung auf 130 V erhöht. Die Proteine durchliefen das Gel für etwa 1 Stunde. Sobald die farbige Bande, als Repräsentant von ca. 10 kDa schweren Proteinen, auslief, wurde das Gel aus der Kammer genommen.

Zur Quantifizierung des Gesamtproteingehalts im Gel wurde das Gel nun im Imager mittels UV-Licht aktiviert und fotografiert. Das Gesamtsignal in einer Bande diente später zur Normierung der Proteinexpression.

2.2.9.2 Membrantransfer

Anschließend wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierzu wurde das Gel in folgender Anordnung in eine Western Blot Apparatur gegeben:

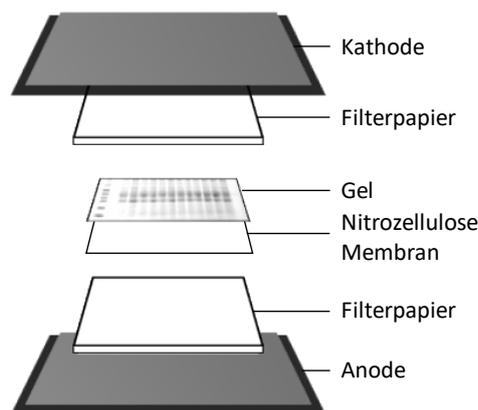


Abbildung 15 Schematischer Aufbau des Membrantransfers

Die Papiere wurden zuvor im Transferpuffer angefeuchtet und anschließend im fertigen Aufbau unter leichtem Druck entwässert.

Gebloftet wurde für 20 Minuten bei 25 V.

Am Schluss wurde der Transfer-Erfolg überprüft, indem die Membran mithilfe der oben genannten StainFree-Technik fotografiert wurde.

2.2.9.3 Blocking der Membran

Nach dem Proteintransfer sind noch viele Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran für Proteine frei. Zufällige Bindungen in kontaminierten Lösungen sowie die direkte Bindung von Zielantikörpern an die Membran können die Analyse in späteren Schritten stören. Deshalb wurden die Membranen vor der Weiterverarbeitung mit unspezifischen Proteinen gesättigt.

Vor der Weiterverwendung der Membranen wurden diese in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 10 ml Blockingreagenz (5% BSA in TBS-T Lösung) für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einen

Taumelrollmischer gegeben. So wurde sichergestellt, dass die Membranen mit unspezifischen Proteinen gesättigt sind und keine weiteren Proteine mehr aufnehmen können.

Dem Blockingreagenz wurde der für Serin/Threonin und saure Phosphatasen spezifische Phosphataseinhibitor Natriumfluorid in der Konzentration 50 mM zugesetzt, da die Blockingreagenzen BSA und Milch Phosphatasen beinhalten können, was die Detektion der phosphorylierter Proteine pSMAD2 und pSMAD3 erschweren würde.

2.2.9.4 Antikörperdetektion

Zum Nachweis und zur Quantifizierung spezifischer Proteine auf dem Blot wurde anschließend die Flüssigkeit verworfen und 5 ml frisches Blockingreagenz (variiert je nach dem zu untersuchenden Protein) zugesetzt. Diesem wurde gemäß der Übersichtstabelle 2.1.3 die adäquate Menge Antikörperlösung hinzugefügt. Zur Ermittlung der korrekten Antikörperkonzentration wurden zuvor mehrere Western Blots mit variierenden Proben- und Antikörperkonzentrationen durchgeführt.

Die Falcon-Röhrchen wurden über Nacht bei 4 °C auf einen Taumelrollenmischer gegeben. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung entweder verworfen oder zur späteren Wiederverwendung bei -18 °C eingefroren und die Membranen drei Mal für jeweils 5 Minuten durch Zugabe von 10 ml *Tris-buffered saline with Tween20* (TBS-T) auf einem Taumelrollenmischer gewaschen.

Daraufhin wurde den Röhrchen ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper im Verhältnis 1:1000 sowie der spezifisch zur in Abbildung 14 gezeigten Standardproteinleiter gehörige Antikörper im Verhältnis 1:4000 zugesetzt (in 5 ml TBS-T).

Nach Inkubation auf einem Taumelrollenmischer bei Raumtemperatur für eine Stunde wurde die Flüssigkeit verworfen und die Membranen wie oben beschrieben drei Mal mit TBS-T gewaschen.

Zur Detektion der gebundenen Sekundärantikörper wurden die Membranen mit ca. 1 ml HRP-Substrat beträufelt, bis die gesamte Membran gleichmäßig mit der Flüssigkeit bedeckt war. Anschließend wurden die Membranen in den *Imager* gelegt, mit Frischhaltefolie bedeckt und mittels einer kleinen Walze von Bläschen zwischen Membran und Glas befreit.

Belichtet wurde mittels einer kumulativen Belichtungsreihe von meist 2 – 240 Sekunden.

Für den Hauptteil der Analysen wurden die oben genannten Schritte je Probe zwei Mal durchgeführt, sodass am Ende zwei Membranen vorlagen. Diese wurden mit unterschiedlichen Antikörpern beladen, um mehrere Proteine ähnlicher Größe, dessen Banden sich auf einer Membran überschneiden würden, mittels eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers zu untersuchen. In der Sequenz wurden zunächst die schwächere Banden hervorrufenden Antikörper inkubiert und analysiert, um einen Bindungsverlust der gering konzentriert vorliegenden Proteine durch nachfolgende Waschungschritte gering zu halten.

Membran A	Membran B	Membran Kern/Zytoplasma
Anti-pSMAD2	Anti-SMAD4	Anti-SMAD4
Anti-SMAD7	Anti-VDR	Anti-TBP
Anti-GAPD	Anti- α -SMA	Anti-GAPDH
	Anti-GAPDH	

Tabelle 4 Liste der pro Membran analysierte Proteine

2.2.9.5 Quantitative Auswertung der Banden

Die Bildanalyse erfolgte unter Zuhilfenahme des von Bio-Rad bereitgestellten Programms ImageLab 6.0. Es wurden die Fotos der spezifisch markierten Membranen gleichzeitig mit den Fotos der Gesamtproteinfärbung des entsprechenden Gels in das Programm importiert.

Zur Quantifizierung der spezifischen Proteinmenge wurde die Intensität der einzelnen Banden auf der Membran gemessen. Hierzu wurde zunächst ein Foto ausgewählt, das im Bereich der Banden keine Überbelichtung und gleichzeitig ein ausreichendes Signal der schwächsten Banden einer Membran bot (siehe Abbildung 16). Daraufhin wurden manuell die Spuren markiert und innerhalb einer Spur die zu untersuchenden Banden. Die Identifizierung der gesuchten Banden erfolgte anhand einer Einordnung der Proteingröße auf der Proteinleiter. Bei der Quantifizierung des Signals wurde keine automatische Hintergrundsubtraktion angewandt, um die Datenbasis für die Bildanalyse nicht ungleichmäßig zu verändern.

Zur Normalisierung der Werte in den einzelnen Spuren wurde der Gesamtproteingehalt einer Spur herangezogen, wie zuvor in der Literatur beschrieben (siehe Abbildung 17) (Gürtler *et al.*, 2013).

Die Gesamtproteinmenge wurde über Markierung der gesamten Spuren in der Gelaufnahme ermittelt, wodurch die eben ermittelten Intensitätswerte für Schwankungen der pipettierten Probenmenge korrigiert werden konnten.

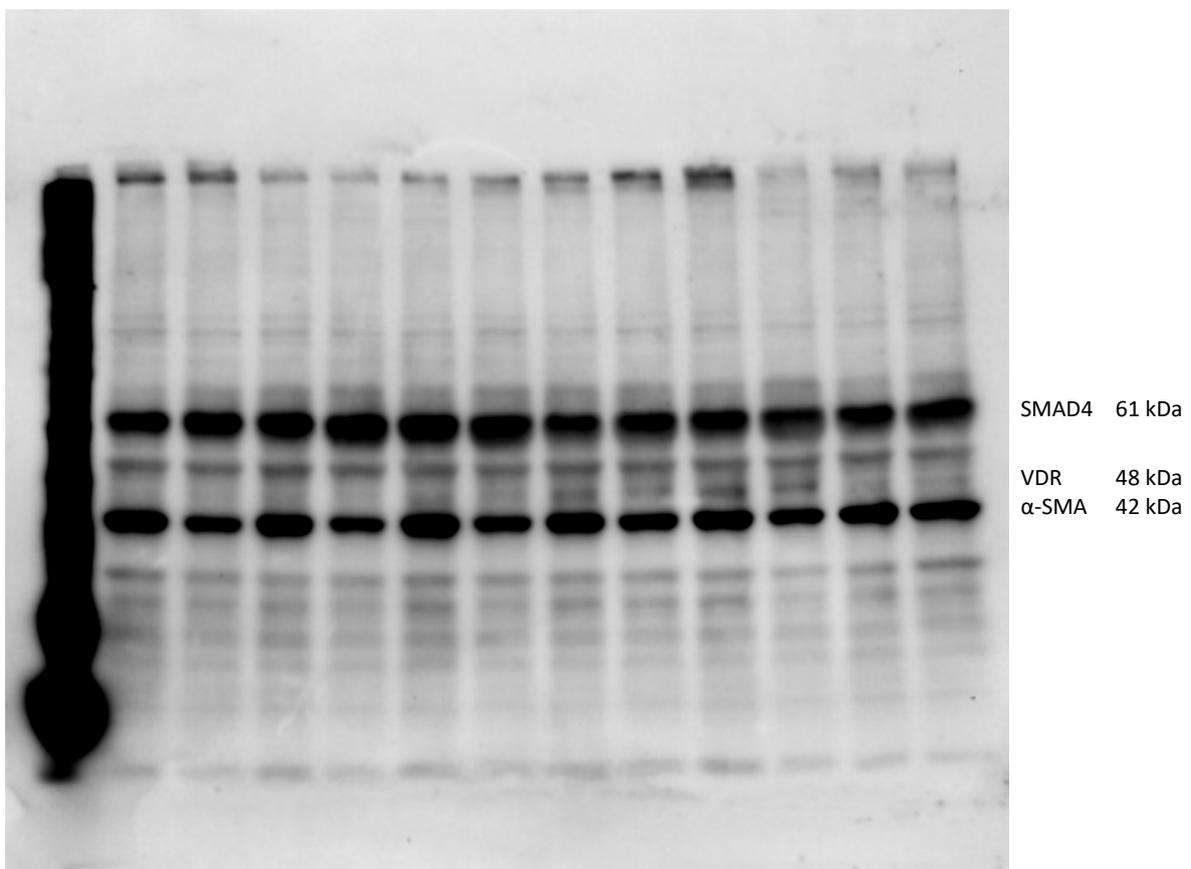


Abbildung 16 Foto einer Western-Blot-Membran mit mittels eines HRP-gekoppelten Antikörpers dargestellten Banden von SMAD4, VDR und α-SMA. Die Belichtung wurde für eine Analyse des VDR optimiert. (Bild vom 11.09.2018)

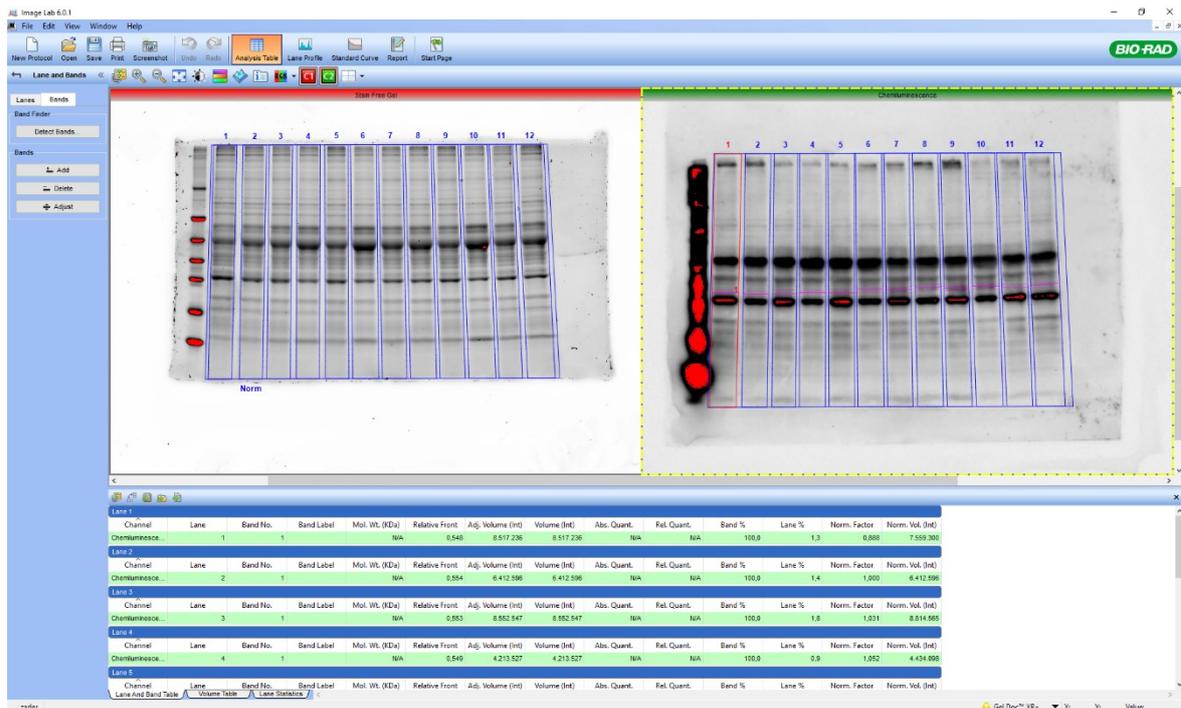


Abbildung 17 Screenshot der mittels ImageLab durchgeführten Analyse. Links ist die Gesamtproteinfärbung, rechts die spezifische Bandendarstellung zu sehen.

2.2.10 Auftrennung von Kernproteinen und zytoplasmatischen Proteinen

Um die Translokation von zytoplasmatischen Proteinen in den Zellkern zu untersuchen, wurde der Versuch (vgl. 2.2.5 *Vitamin-D-Versuch*) in vereinfachter Form wiederholt und die Zellernte in ein zytoplasmatisches und ein nukleäres Extrakt getrennt.

Bei der Wiederholung des Versuchs wurden lediglich die Gruppen unbehandelt („-“), TGF- β , TGF- β + 1 μ M Calcitriol und TGF- β + Ethanolkontrolle untersucht, da die vorherigen Untersuchungen in den dazwischenliegenden Gruppen keine nennenswerte Dynamik zeigten.

Mittels des *Thermo Scientific NE-PER Nuclear and Cytoplasmatic Extraction Kit* wurden die Proteine nach Herstellerangaben anhand ihrer Lokalisation in den Zellkompartimenten aufgetrennt. Das Kit basiert auf stufenweiser Zellyse und Isolierung der Proteinfractionen durch Zentrifugation. Laut Herstellerangaben beträgt die Kontamination zwischen der zytoplasmatischen und nukleären Fraktion generell weniger als 10 %. (Thermo Fisher Scientific Inc., 2003) Um dies zu kontrollieren wurde im Vorhinein eine Probe mithilfe des Kits aufgetrennt und anschließend die Expression von GAPDH als vorwiegend zytoplasmatisches Protein und TBP als vorwiegend nukleäres Protein in den beiden Fraktionen analysiert (*Cell atlas - TBP - The Human Protein Atlas*, ohne Datum; *Cell atlas - GAPDH - The Human Protein Atlas*, ohne Datum).

Zusätzlich wurden diese Proteine auch bei allen nachfolgenden Western Blots mit quantifiziert, um den Erfolg des Auftrennungsverfahrens zu kontrollieren.

2.2.11 Statistische Auswertung

Da die erhobenen Rohwerte der quantitativen Auswertung der Western Blots aufgrund von verschiedenen äußeren Faktoren (z. B. Verteilung und Inkubationszeit der Entwicklerlösung auf dem Papier, Intensität der stärksten Bande, gewählte Belichtungsdauer) stark variieren können, wurden diese mittels zwei verschiedener Verfahren vergleichbar gemacht. Entweder wurden alle Werte eines

Versuchsdurchlaufs relativ zu der CTS-Kontrollgruppe betrachtet („Normierung auf 1“) oder es wurden Differenzen der Werte zum Mittelwert aller Kontrollen gebildet („ Δ -Methode“).

Die Archivierung sowie die statistische Analyse der umgewandelten Daten erfolgte mittels der Statistiksoftware GraphPad Prism 5.0. Die Stichproben wurden mithilfe des Kolmogorov-Smirnow-Tests auf Normalverteilung untersucht. Die Überprüfung der Nullhypothese erfolgte im Falle einer Normalverteilung mittels One-Way-ANOVA, Two-Way-ANOVA oder gepaartem t-test. Zur Testung zweier nicht normalverteilter Stichproben wurde der Wilcoxon Vorzeichen Rang-Test angewendet. Zur Testung wurde das Signifikanzniveau zuvor auf $p \leq 0,05$ festgelegt. p -Werte von $\leq 0,05$ wurden mit einem Stern, p -Werte $\leq 0,005$ mit zwei Sternen und p -Werte $\leq 0,0005$ mit drei Sternen gekennzeichnet.

Zur Unterstützung der Datenauswertung wurde ein Beratungstermin am 14. Januar 2019 im statistischen Beratungsbüro des UKD bei Dr. rer. medic. Edna-Clarisse Cieslik vom hiesigen Institut für Systemische Neurowissenschaften in Anspruch genommen. Außerdem wurde der Kurs „Wissenschaftliche Bildverarbeitung und Analyse“ am 3. und 4. März 2020 der Medical Research School Düsseldorf unter Leitung von Dr. Jan Brocher besucht.

2.2.11.1 Nullhypothesen

1. Calcitriol modifiziert die TGF- β vermittelte Erhöhung der α -SMA Expression in Fibroblasten nicht.
2. Proteine im TGF- β -Signalweg bleiben unter TGF- β /Calcitriol-Kobehandlung unbeeinflusst.
3. Calcitriol verändert die Translokation von aktivierten SMAD-Komplexen in den Zellkern nicht.
4. Die Fibroblastendifferenzierung zu Myofibroblasten wird von Calcitriol nicht modifiziert.
5. Es finden sich keine Unterschiede zwischen Fibroblastenzellkulturen aus Morbus Dupuytren-Gewebe oder Karpaltunnelsyndrom-Gewebe.

3 Ergebnisse

3.1 Vitamin-D-Rezeptor-Expression in ruhenden MD- und CTS-Fibroblasten

Vor Beginn der Experimente wurde anhand von überschüssigem Probenmaterial von anderen Untersuchungen im hiesigen Labor die Fragestellung untersucht, ob ruhende Morbus Dupuytren Fibroblasten und ruhende Karpaltunnelsyndrom Fibroblasten unterschiedlich stark den Vitamin-D-Rezeptor exprimieren. Als Probenmaterial lagen Ganzzelllysate vor. Zur Analyse wurden Proteinkonzentrationsmessung und Proteinanalyse mittels Western Blot durchgeführt.

Wie in Abbildung 18 ersichtlich, zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der VDR-Expression zwischen Zellen aus MD- und CTS-Gewebe. In Reaktion auf diese Ergebnisse wurde der Fokus weiterer Untersuchungen auf den TGF- β -Signalweg und seine Beeinflussbarkeit durch Vitamin-D-Behandlung gelegt.

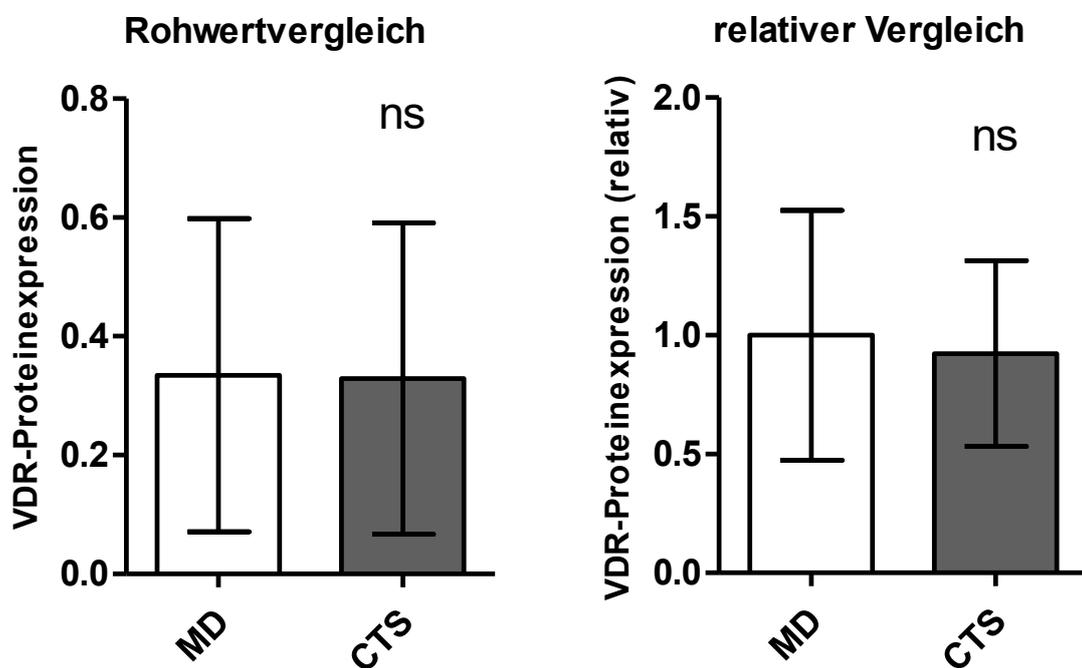


Abbildung 18 Vitamin-D-Rezeptor-Proteinexpression von unbehandelten Morbus Dupuytren (MD) und Karpaltunnelsyndrom (CTS) Fibroblasten aus Zellkulturen. Analyse durchgeführt auf zwei Western Blot Gelen mit abwechselnder MD/CTS-Beladung. Links werden die densitometrischen Rohwerte verglichen, rechts wurden die Werte auf den durchschnittlichen Wert der MD-Gruppe auf dem jeweiligen Gel normiert. ns: $p > 0,05$ im t-test. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung. $n = 9$

3.2 Calcitriolgehalt des Zellkulturmediumbestandteils „fetales Kälberserum“

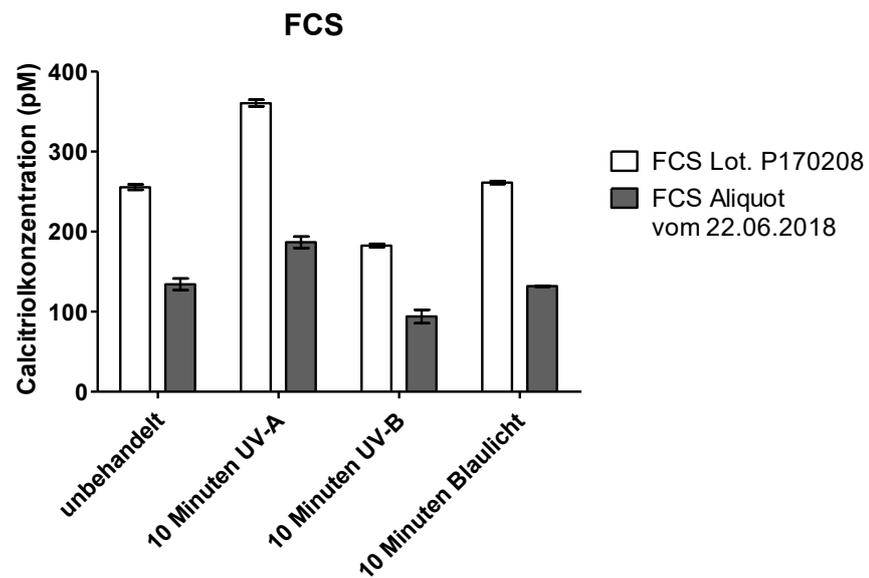


Abbildung 19 Calcitriol-Konzentration in zwei verschiedenen Chargen fetalem Kälberserum (FCS). Analyse mittels ELISA. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler der jeweils zweifach analysierten einzelnen Probe.

Abbildung 19 zeigt, dass sich der endogene Calcitriolgehalt von FCS leicht oberhalb bzw. im oberen Grenzwert von physiologischen Serum-Konzentrationen beim Menschen (65-169 pmol/l) (*Blutuntersuchungen: Normalwerte - Anhänge - MSD Manual Profi-Ausgabe, 2020*) bewegt. Berücksichtigt man, dass FCS 10 Vol% Lösung des fertigen Zellkulturmedium ausmacht und dass DMEM kein Calcitriol enthält, so ist der endogene Calcitriol-Gehalt des Zellkulturmediums durch das FCS maximal 0,3 nM. Dies ist im Vergleich mit den eingesetzten Calcitriol-Konzentrationen zwischen 1 und 1000 nM vernachlässigbar. Trotzdem wurde sicherheitshalber für die nachfolgenden Untersuchungen ausschließlich die Charge *P170208* verwendet (siehe auch 2.2.5 *Vitamin-D-Versuch*).

3.2.1 Stabilität von Calcitriol unter elektromagnetischer Bestrahlung

Die Abbildung zeigt auch, dass die Konzentration von Calcitriol in FCS unter Einstrahlung von UV-B-Licht um beinahe 30 % abnahm. Blaues Licht (453 nm) ließ die Calcitriol-Konzentration unverändert. Unter UV-A Einstrahlung kam es zu einer Zunahme der Calcitriol-Konzentration. Dies lässt sich dadurch erklären, dass während der Einstrahlung überdurchschnittlich viel Wasser aus dem Probenmaterial verdampfte. Tatsächlich war die eingesandte Probenmenge makroskopisch erkennbar geringer als bei den übrigen Gruppen.

3.3 Homologe Regulation des Vitamin-D-Rezeptors

Aus der Abbildung 20 geht hervor, dass mit steigender Calcitriol-Konzentration die Expression von Vitamin-D-Rezeptorproteinen in den Zellen angestiegen ist, sowohl bei MD-, als auch bei CTS-Fibroblasten. Die Zunahme der VDR-Expression war kontinuierlich zu beobachten bis zur eingesetzten Maximalkonzentration von 1 μ M Calcitriol. Demgegenüber stieg die VDR-Expression nicht durch die reine Zugabe von Ethanol, dem Trägerstoff des eingesetzten Calcitriols (Ethanolgehalt entspricht der Behandlung mit 1 μ M Calcitriol). Die gemessenen Effekte zeigten im Vergleich mit der Kontrolle und der Ethanolkontrolle sowohl in der MD-, als auch in der CTS-Gruppe statistische Signifikanz.

Diese Effekte hoben sich bei gleichzeitiger Behandlung mit TGF- β auf. Hier war keine signifikante Veränderung der VDR-Expression erkennbar.

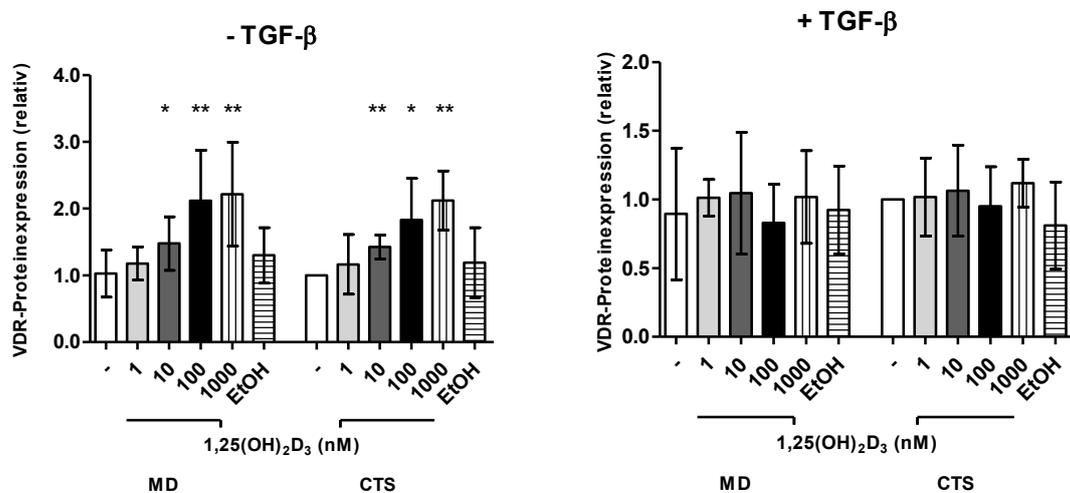


Abbildung 20 Relative Proteinexpression des VDR in Ganzzelllysaten von MD- und CTS-Fibroblasten. 1,25(OH)₂D₃: Zugabe von Calcitriol zum Zellkulturmedium, Konzentrationsangaben beziehen sich auf das fertige Medium. Werte normiert auf den Kontrollwert in der Karpaltunnelsyndrom-Gruppe (CTS – = 1). Linker Graph: ohne Zugabe von TGF- β . Rechter Graph: unter Zugabe von 2 ng/mL TGF- β . Vergleiche jeweils innerhalb MD bzw. CTS mit der Blanko-Gruppe (weißer Balken). *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,005$; ***: $p \leq 0,0005$. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. $n = 6$ (CTS EtOH: $n = 5$)

3.4 Aktivierung von SMAD2 unter TGF- β /Calcitriol

Wie in Abbildung 21 ersichtlich, konnte bei reiner Zugabe von Calcitriol zum Zellkulturmedium weder in der MD- noch in der CTS-Gruppe eine signifikante Dynamik beobachtet werden.

Unter simultaner Behandlung mit Calcitriol und TGF- β konnte eine Reduktion phosphoryliert (= aktiviert) vorliegender SMAD2-Proteine beobachtet werden. Dieser Zusammenhang zeigte sich sowohl in der MD-, als auch in der CTS-Gruppe. In der CTS-Gruppe war dieser Effekt im Vergleich mit der Kontrolle bei Behandlung mit 1, 10 und 100 nM Calcitriol statistisch signifikant. Um in dem Fall einen verzerrenden Fehler durch die Normierung der CTS-Kontrolle auf 1 (alle Werte gleich) auszuschließen, wurde die entsprechende Analyse nochmals mit der statistischen Δ -Methode durchgeführt (Abbildung 22). Hier bestätigten sich die zuvor beobachteten Effekte. Die pSMAD2-Expression von CTS-Zellen war bei 1, 10 und 100 nM Calcitriol-Behandlung statistisch signifikant geringer als ohne Calcitriol.

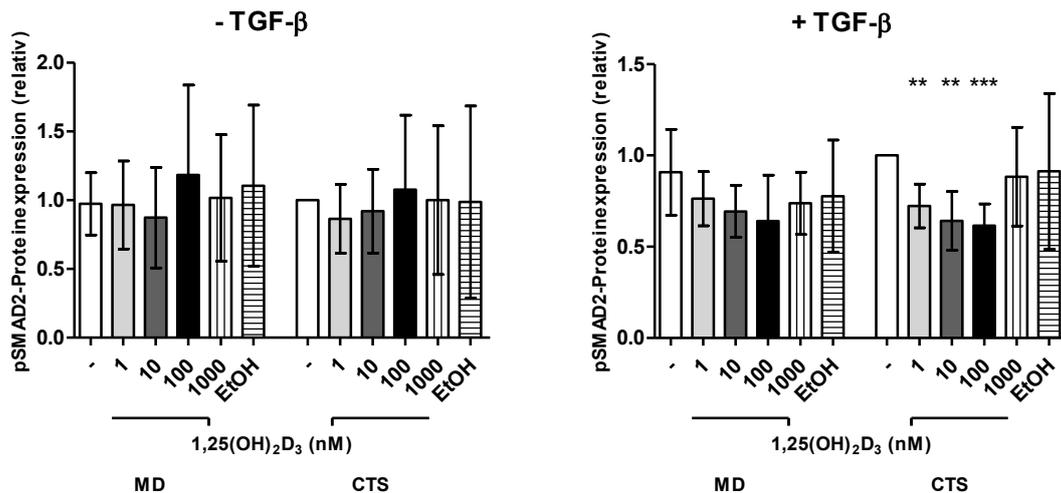


Abbildung 21 Relative Proteinexpression von phosphoryliertem (= aktiviertem) SMAD2 in Ganzzelllysaten von MD- und CTS-Fibroblasten. 1,25(OH)₂D₃: Zugabe von Calcitriol zum Zellkulturmedium, Konzentrationsangaben beziehen sich auf das fertige Medium. Werte normiert auf den Kontrollwert in der Karpaltunnelsyndrom-Gruppe (CTS – = 1). Linker Graph: ohne Zugabe von TGF-β. Rechter Graph: unter Zugabe von 2 ng/mL TGF-β. Vergleiche jeweils innerhalb MD bzw. CTS mit der Blanko-Gruppe (weißer Balken). *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,005; ***: p ≤ 0,0005. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. n = 6 (CTS EtOH: n = 5)

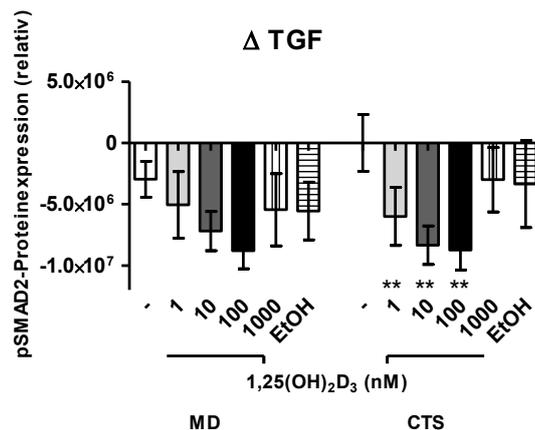


Abbildung 22 Relative Proteinexpression von phosphoryliertem (= aktiviertem) SMAD2 in Ganzzelllysaten von MD- und CTS-Fibroblasten. 1,25(OH)₂D₃: Zugabe von Calcitriol zum Zellkulturmedium, Konzentrationsangaben beziehen sich auf das fertige Medium. Werte mittels „Δ-Methode“ normiert auf den Kontrollwert in der Karpaltunnelsyndrom-Gruppe (CTS – = 0). Vergleiche jeweils innerhalb MD bzw. CTS mit der Blanko-Gruppe (weißer Balken). *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,005; ***: p ≤ 0,0005. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. n = 6 (CTS EtOH: n = 5)

3.5 Expression von SMAD4 und SMAD7 unter TGF-β/Calcitriol

Abbildung 23 zeigt, dass die Expression des Co-SMAD-Proteins SMAD4 bei Behandlung mit Calcitriol stark schwankt. Die Standardabweichung war in der MD-Gruppe ohne TGF-β verglichen mit den übrigen SMAD4-Werten relativ groß. Bei 100 nM Calcitriol bestand eine signifikante Abweichung zur Ethanolkontrolle, jedoch nicht zur unbehandelten Kontrolle.

Bei gleichzeitiger Behandlung mit TGF-β war in der CTS- und MD-Gruppe keine Dynamik erkennbar.

Ebenso wies die Expression des inhibitorischen SMAD-Proteins SMAD7 keine klare Dynamik auf. Bei gleichzeitiger Behandlung mit TGF-β ließ sich in der MD-Gruppe initial ein leichter Abfall der

SMAD7-Expression beobachten, der mit steigender Calcitriol-Konzentration wieder zurückging. Hier wies der 100 nM-Wert eine signifikante Abweichung zur Ethanolkontrolle auf, jedoch nicht zur unbehandelten Kontrolle.

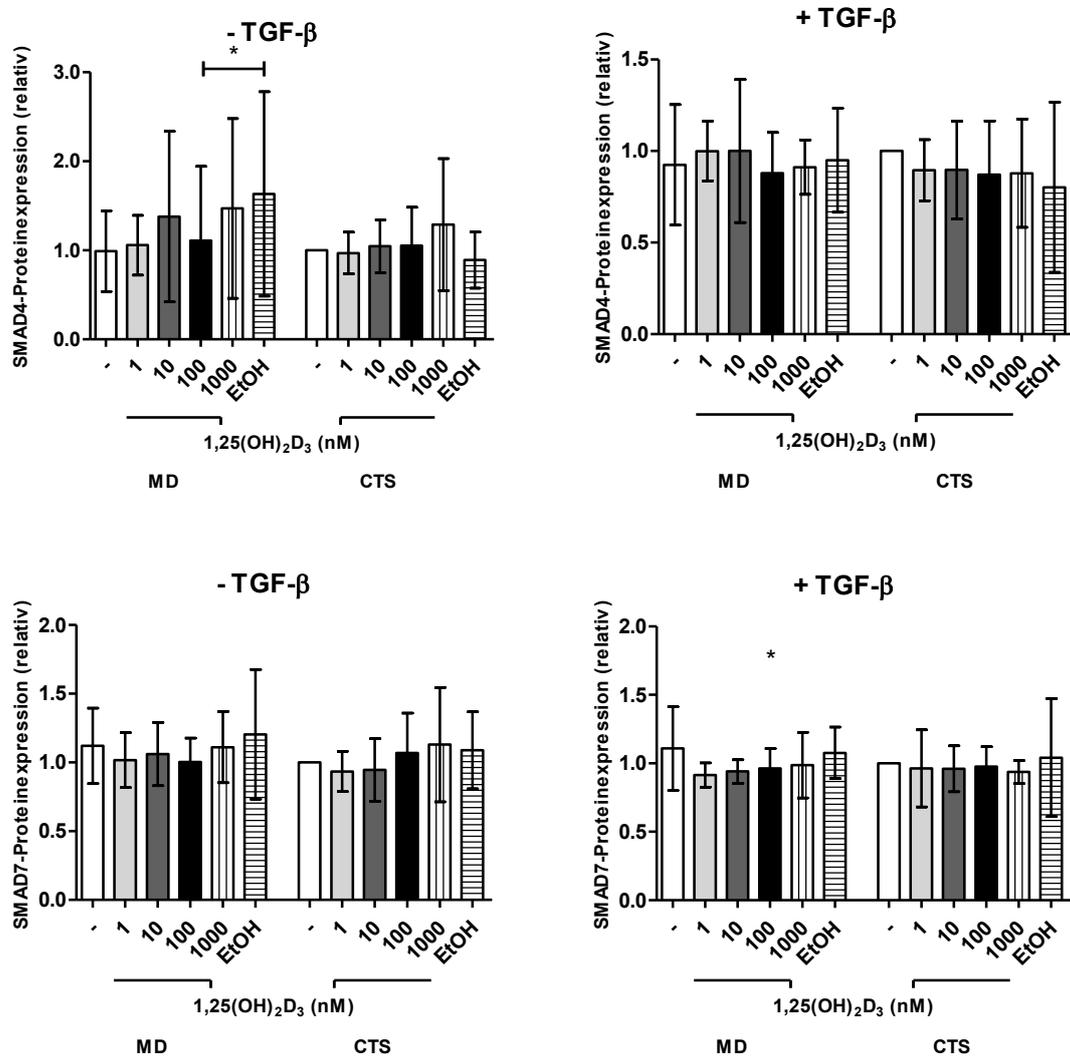


Abbildung 23 Relative Proteinexpression von SMAD4 und SMAD7 in Ganzzelllysaten von MD- und CTS-Fibroblasten. 1,25(OH)₂D₃: Zugabe von Calcitriol zum Zellkulturmedium, Konzentrationsangaben beziehen sich auf das fertige Medium. Werte normiert auf den Kontrollwert in der Karpaltunnelsyndrom-Gruppe (CTS = 0). Linke Graphen: ohne Zugabe von TGF-β. Rechte Graphen: unter Zugabe von 2 ng/mL TGF-β. Vergleiche jeweils innerhalb MD bzw. CTS mit der Blanko-Gruppe (weißer Balken) bzw. wo gekennzeichnet mit der Ethanolkontrolle. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,005$; ***: $p \leq 0,0005$. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. $n = 6$ (CTS EtOH: $n = 5$)

3.5.1 Translokation von SMAD4 in den Zellkern unter TGF-β/Calcitriol

Aufgrund der unerwarteten Ergebnisse in 3.5 Expression von SMAD4 und SMAD7 unter TGF-β/Calcitriol wurde beschlossen, zusätzlich Untersuchungen hinsichtlich der Translokation von SMAD4 zwischen Zellkern und Zytoplasma (vgl. 1.4.1 Interaktionen durch SMAD-Proteine) anzustellen.

Hierzu wurden für die MD- und CTS-Gruppe jeweils vier Zellkulturen bebrütet und nach dem im Graphen erkennbaren Schema behandelt, um anschließend das Zellmaterial in eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion zu trennen und getrennt mittels Western Blot zu analysieren.

Bei Zugabe von TGF- β konnte keine signifikante Abweichung der nukleären oder zytoplasmatischen SMAD4-Expression beobachtet werden. Unter Hinzugabe von 1 μ M Calcitriol konnte in allen Gruppen und Fraktionen eine Reduktion der SMAD4-Expression beobachtet werden (Abbildung 24). Dies war am stärksten und statistisch signifikant in der zytoplasmatischen Fraktion der MD-Zellen. Die Ethanolkontrolle zeigte in allen Fällen wieder einen Anstieg der SMAD4-Expression (in der CTS-Gruppe über das Ausgangsniveau, in der MD-Gruppe unter das Ausgangsniveau).

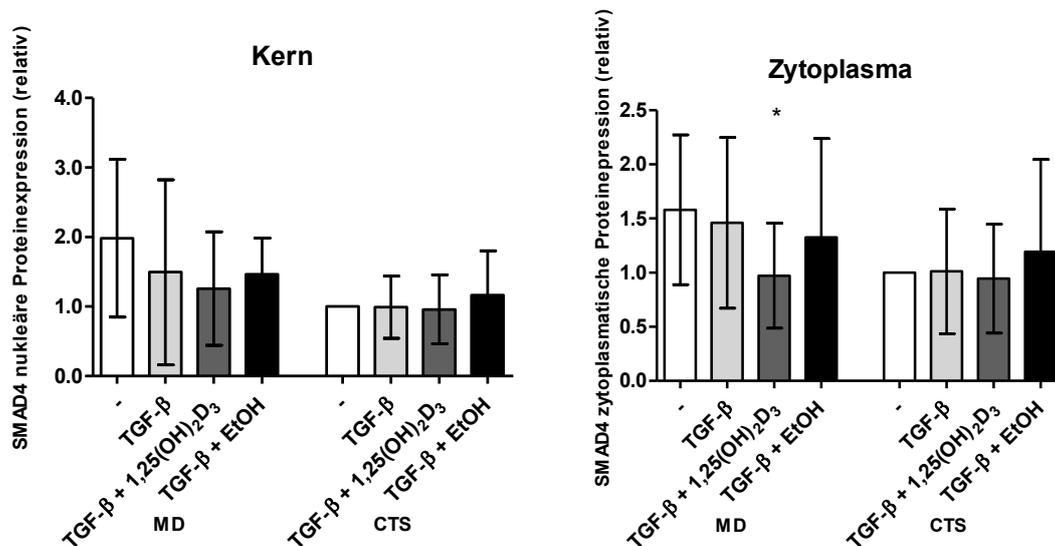


Abbildung 24 Relative Proteinexpression von SMAD4 in nukleären und zytoplasmatischen Zelllysaten von MD- und CTS-Fibroblasten. 1,25(OH) $_2$ D $_3$: Zugabe von Calcitriol zum Zellkulturmedium, Konzentrationsangaben beziehen sich auf das fertige Medium. Werte normiert auf den Kontrollwert in der Karpaltunnelsyndrom-Gruppe (CTS = 1). TGF- β : unter Zugabe von 2 ng/mL TGF- β . 1,25(OH) $_2$ D $_3$: unter Zugabe von 1 μ M Calcitriol. Vergleiche jeweils innerhalb MD bzw. CTS mit der Blanko-Gruppe (weißer Balken). *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,005$; ***: $p \leq 0,0005$. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. $n = 4$

3.5.2 Expression der Proteine GAPDH und TBP im Zytoplasma sowie im Nukleus

Die Bestimmung der GAPDH- und TBP-Expression in fraktionierten Zelllysaten diente der Qualitätssicherung des Auftrennungsprozesses (vgl. Abbildung 25 und 2.2.10 Auftrennung von Kernproteinen und zytoplasmatischen Proteinen).

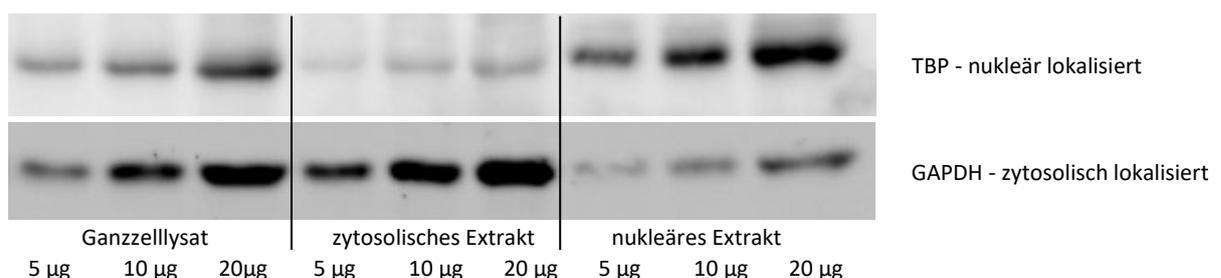


Abbildung 25 Nachweis der Trennung der verschiedenen Kompartimente (Bilder vom 03. und 04.10.2018)

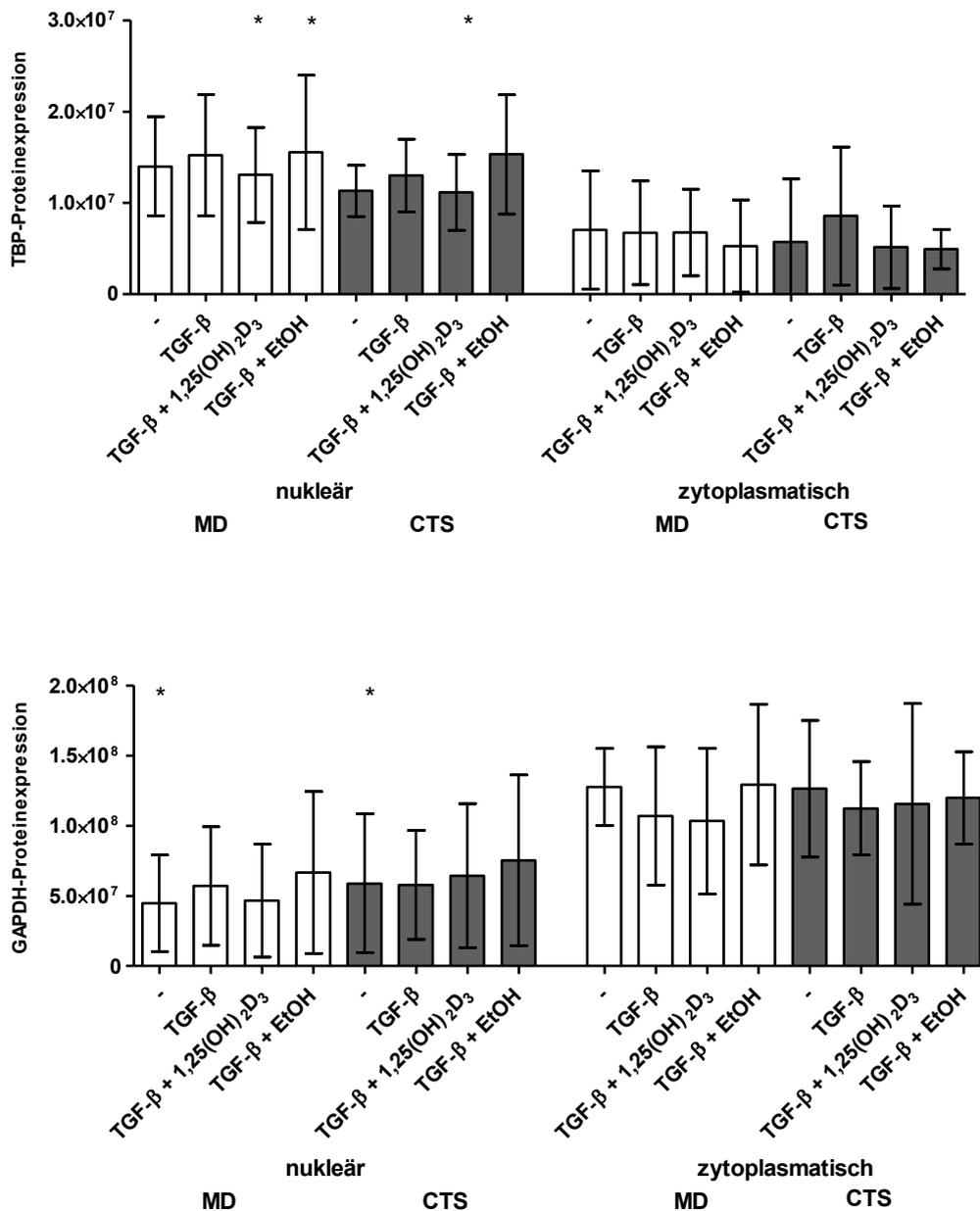


Abbildung 26 Relative Proteinexpression von TBP und GAPDH in nukleären und zytoplasmatischen Zelllysaten von MD- und CTS-Fibroblasten. TGF-β: unter Zugabe von 2 ng/mL TGF-β. 1,25(OH)₂D₃: unter Zugabe von 1 μM Calcitriol. Vergleiche jeweils zwischen entsprechender Gruppe nukleär/zytoplasmatisch. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,005$; ***: $p \leq 0,0005$. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. $n = 4$

Die Abbildung 26 zeigt, dass das Zellprotein TBP durchschnittlich im nukleären Zellextrakt in allen Gruppen höher konzentriert vorlag als im zytoplasmatischen Extrakt. Das Protein GAPDH hingegen lag in allen untersuchten Proben durchschnittlich niedriger konzentriert im nukleären als im zytoplasmatischen Extrakt vor. Einige Vergleiche zeigten im Vergleich nukleär/zytoplasmatisch auch eine Signifikanz durch einen positiven t-Test.

3.6 Vergleich der α -SMA-Proteinexpression von ruhenden und aktivierten MD- und CTS-Fibroblasten

Ruhende Fibroblasten, welche aus Morbus Dupuytren Gewebe gewonnen wurden, exprimierten in erheblich höherem Maße α -SMA als ihre aus Karpaltunnelsyndrom Gewebe gewonnenen Gegenstücke. Die Varianz ist in der MD-Gruppe insgesamt sehr hoch (SD +- 2,5). Dieser Unterschied zeigt sich auch, wenn man die densitometrischen Rohwerte der α -SMA-Messung vergleicht (siehe Abbildung 27).

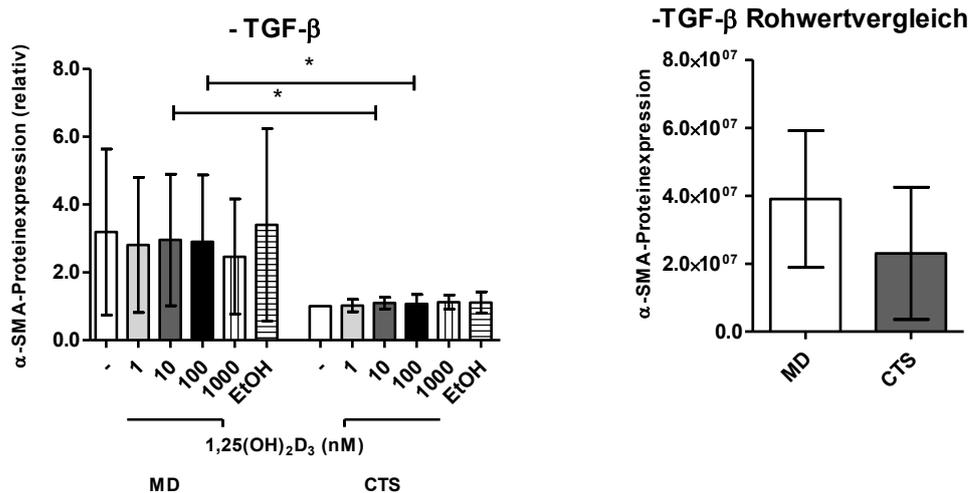


Abbildung 27 Relative Proteinexpression von α -SMA in Ganzzelllysaten von MD- und CTS-Fibroblasten. 1,25(OH)₂D₃: Zugabe von Calcitriol zum Zellkulturmedium, Konzentrationsangaben beziehen sich auf das fertige Medium. Linker Graph: Werte normiert auf den Kontrollwert in der Karpaltunnelsyndrom-Gruppe (CTS = 1). Rechter Graph: Vergleich der densitometrischen Rohwerte. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,005$; ***: $p \leq 0,0005$. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. $n = 6$ (CTS EtOH: $n = 5$)

3.7 Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und Einfluss von Calcitriol

Ruhende MD-Fibroblasten exprimierten in erheblich höherem Maße α -SMA als CTS-Fibroblasten (siehe auch 3.6). Zur besseren Lesbarkeit der Dynamik der CTS-Zellen sind in Abbildung 28 die Graphen unten nochmals aufgetragen, jedoch ohne eine quantitative Vergleichbarkeit zwischen MD und CTS.

Die Behandlung mit Calcitriol allein führte nicht zu einer signifikanten Änderung der α -SMA-Expression, weder in der MD- noch in der CTS-Gruppe.

Unter Einfluss von TGF- β löste sich der Unterschied zwischen Zellkulturen aus Morbus Dupuytren- und Karpaltunnelsyndromgewebe auf. Beide Gruppen ähnelten sich stark in Bezug auf die α -SMA-Expression. Innerhalb der Calcitriol-Verdünnungsreihe fiel allgemein ein Abfall der α -SMA-Konzentration auf, am stärksten bei 100 nM in der MD-Gruppe. Der Effekt nahm in der Ethanolkontrolle nicht signifikant ab, in der MD-Gruppe bestand allerdings eine rückläufige Tendenz.

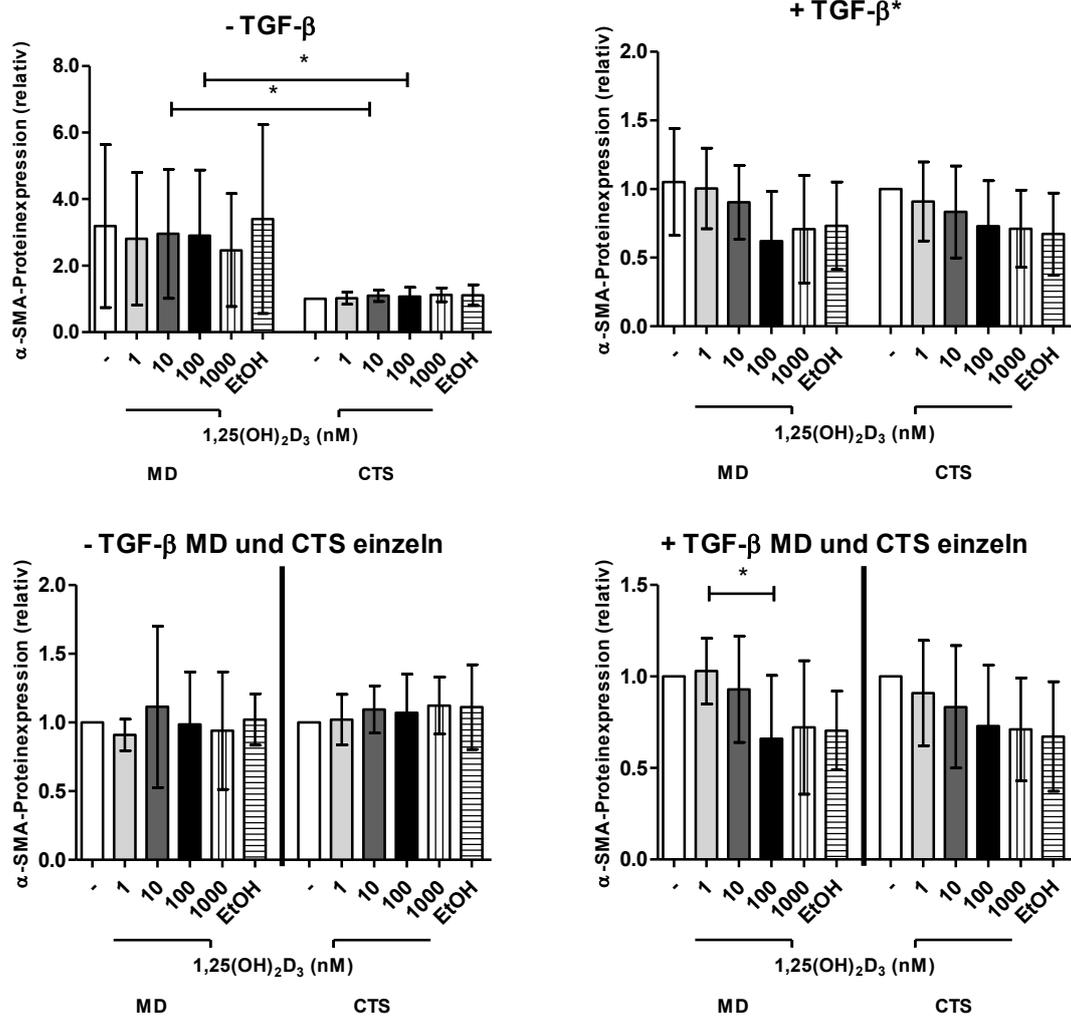


Abbildung 28 Relative Proteinexpression von α -SMA in Ganzzelllysaten von MD- und CTS-Fibroblasten. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: Zugabe von Calcitriol zum Zellkulturmedium, Konzentrationsangaben beziehen sich auf das fertige Medium. Werte normiert auf den Kontrollwert in der Karpaltunnelsyndrom-Gruppe (CTS = 1) (oben) bzw. jeweils auf den Kontrollwert der MD- und CTS-Gruppe (unten). Anmerkung: In den TGF- β -Graphen wurde in der MD-Gruppe ein Extremwert entfernt, weil er stark von den übrigen Proben in Hinblick auf die α -SMA Expression nach oben abwich (ca. 1.400% des übrigen Durchschnitts von MD -). Linke Graphen: ohne Zugabe von TGF- β . Rechte Graphen: unter Zugabe von 2 ng/mL TGF- β . *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,005$; ***: $p \leq 0,0005$. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. $n = 6$ (CTS EtOH: $n = 5$)

3.7.1 Kontrolle der Effektivität der TGF- β -Behandlung

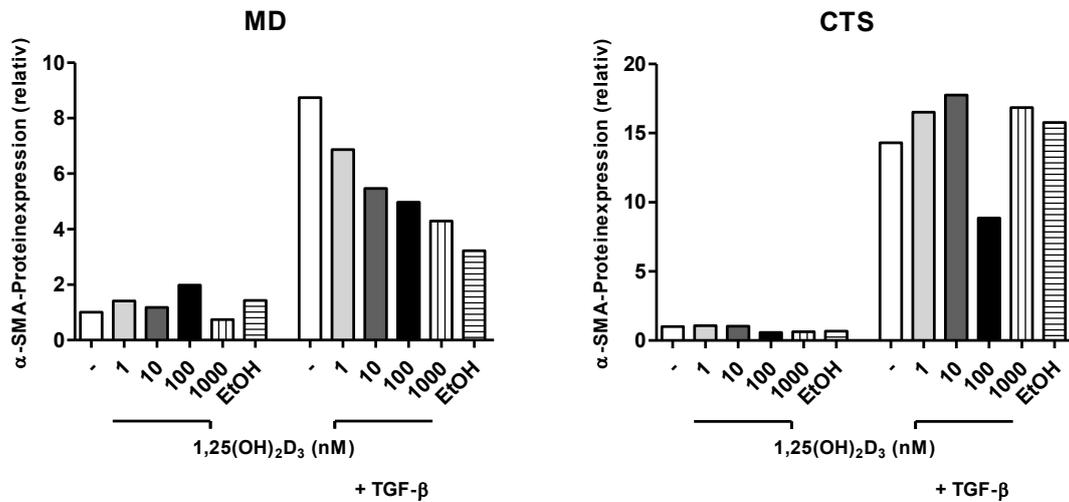


Abbildung 29 Relative Proteinexpression von α -SMA in Ganzzelllysaten von MD- und CTS-Fibroblasten. 1,25(OH)₂D₃: Zugabe von Calcitriol zum Zellkulturmedium, Konzentrationsangaben beziehen sich auf das fertige Medium. Werte normiert auf den Kontrollwert (- ohne TGF- β = 1). TGF- β : unter Zugabe von 2ng/mL TGF- β . n = 1

In einer gesonderten Analyse wurde jeweils eine MD- und CTS-Probe verwendet, um die Effektivität der TGF- β -Behandlung zu bestätigen (Abbildung 29). Hier stieg die α -SMA-Expression in den Zellen in allen Calcitriol-Behandlungsdosierungen um ein Vielfaches an. Für die analog zur restlichen Analyse untersuchten Zellproteine konnte orientierend bei n = 1 keine derart starke Dynamik beobachtet werden.

3.8 Nutzung von GAPDH als Housekeeping-Protein

Das Zellprotein GAPDH wird häufig als Referenzprotein bei der Durchführung von Western Blot Analysen verwendet. In dieser Arbeit wurde nach eingehender Sichtung der Literatur allerdings eine Totalproteinmessung als Referenz gewählt (siehe 4.1.1). Zur Qualitätssicherung wurde die GAPDH-Expression relativ zum Gesamtproteingehalt einer Zelle mitbestimmt. Gemäß der Nutzung von GAPDH als Referenzprotein, sollten die Konzentrationswerte unabhängig von der Behandlung sein. Die gemessenen Werte lagen insgesamt nah beieinander (bei Normierung auf CTS –) mit einer Standardabweichung von durchschnittlich $\pm 0,18$ (siehe Abbildung 30).

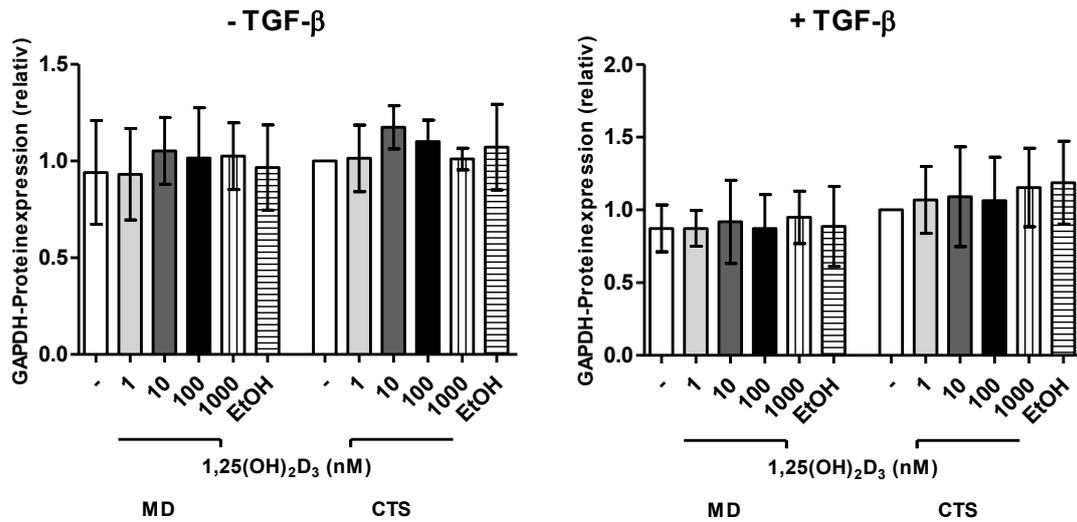


Abbildung 30 Relative Proteinexpression von GAPDH in Ganzzelllysaten von MD- und CTS-Fibroblasten. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: Zugabe von Calcitriol zum Zellkulturmedium, Konzentrationsangaben beziehen sich auf das fertige Medium. Werte normiert auf den Kontrollwert in der Karpaltunnelsyndrom-Gruppe (CTS – = 0). Linke Graphen: ohne Zugabe von TGF-β. Rechte Graphen: unter Zugabe von 2 ng/mL TGF-β. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,005$; ***: $p \leq 0,0005$. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. $n = 6$ (CTS EtOH: $n = 5$)

4 Diskussion

Die Frage, ob eine Vitamin D-Einnahme den Ausbruch von bestimmten Erkrankungen verzögern, deren Verlauf abmildern oder sie sogar heilen kann, treibt die Wissenschaft seit dem Anfang des 21. Jahrhunderts um. Zwischen der Verhinderung kardiovaskulärer Ereignisse und der Prävention von Winterdepression reiht sich die hier betrachtete Fragestellung nach antisklerotischen Eigenschaften von Vitamin D ein.

In dieser Arbeit wurden mehrere Aspekte des Zellstoffwechsels nebeneinander untersucht. Von der Autoregulation der Rezeptorproteine über verschiedene Signalproteine, bis hin zur Expression des Muskelproteins α -SMA, das womöglich eine abgeschlossene Fibrogenese anzeigt. Im Folgenden werden zunächst die verwendeten Methoden und daraufhin die erzielten Ergebnisse im Kontext des aktuellen wissenschaftlichen Standes reflektiert.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Limitationen der semiquantitativen Western-Blot-Auswertung

Der Western Blot ist in erster Linie eine qualitative Methode zum Nachweis spezifischer Proteine (Alegria-Schaffer *et al.*, 2009). Jedoch besteht im Detektionsbereich ein linearer Zusammenhang zwischen der Signalintensität und der gegebenen Menge eines Proteins, sodass Unterschiede in der Menge eines Proteins auf einem Blot sich in gleichem Maße in den Signalintensitäten widerspiegeln (Alegria-Schaffer *et al.*, 2009). Allerdings gibt es sehr viele Fallstricke bei der semiquantitativen Auswertung von Western Blots, die auch in den vielen Schritten dieser Analyse begründet sind. Bevor ein Zielprotein sichtbar wird, müssen die lysierten Zellen unter anderem Gesamtproteinquantifiziert, ggf. denaturiert, mit einem Farbstoff versetzt, auf eine Membran übertragen, mehrmals mit proteinhaltigen Lösungen in Kontakt gebracht, mehrmals mit Waschlösungen bearbeitet, auf eine *“loading control“* untersucht und schließlich mit Primär-, ggf. Sekundär-Antikörpern und einer Entwicklerlösung überzogen werden. Wenn auf einer Membran mehrere Proteine untersucht werden ggf. sogar mehrmals. So viele Schritte bieten an vielen Stellen Potential für Fehler, die sich unter Umständen auch addieren können. Gorr und Vogel haben in einem Review viele Gefahren zusammengefasst mit Empfehlungen, wie man diese minimieren kann (Gorr und Vogel, 2015). Das Problem der *“loading control“* wurde in der vorliegenden Arbeit dadurch adressiert, dass anstelle von GAPDH als sogenanntes *“housekeeping protein“* eine Gesamtproteinnormierung durchgeführt wurde. Somit konnten Fehler, die durch Schwankungen in der GAPDH-Expression entstehen, ausgeschlossen werden (Gürtler *et al.*, 2013). Zusätzlich (aus Interesse und zur Absicherung) wurde jedoch immer die GAPDH-Expression mitbestimmt. In den erhaltenen Daten zeigt sich bei Normierung der Expression auf den Gesamtproteingehalt über alle Behandlungsgruppen hinweg eine durchschnittliche Standardabweichung von fast 20 %, die den Schluss nahelegt, dass zwischen den beiden Normierungsmethoden ein beträchtlicher Unterschied besteht. Aufgrund von ähnlichen Beobachtungen wird in der Literatur seit einigen Jahren die Gesamtproteinnormierung bevorzugt (Gilda und Gomes, 2013; Gürtler *et al.*, 2013; Moritz, 2017).

4.1.2 Wahl der Verdünnungsreihe

Die Vitamin-D-Verdünnungsreihe wurde in Anlehnung an Arbeiten von Li *et al.*, Ramirez *et al.* und Zhu *et al.* gewählt, um einerseits die Dosis des optimalen Ansprechens auf Vitamin D zu erfassen und andererseits Aussagen bezüglich einer Wirkung von annähernd physiologischen Konzentrationen von Calcitriol treffen zu können. Diese drei Autoren nutzten eine Verdünnungsreihe

von 1 μM bis 1 pM Calcitriol, 1 μM bis 1 nM, bzw. 100 bis 10 nM Calcitriol (Li *et al.*, 2005; Ramirez *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2021). Weiterhin wurde die Verwendung von festen Konzentrationen von 10 nM (Zhang *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2013), 100 nM (Zhang *et al.*, 2011; F. Li *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2019) und 1 μM Calcitriol beschrieben (Meredith *et al.*, 2015).

Als TGF- β -Konzentration wurde 2 ng/ml festgelegt von positiven laborinternen Erfahrungen in der Effektivität der Auslösung fibrotischer Vorgänge bei Anwendung an Morbus-Dupuytren- und Karpaltunnelsyndrom-Fibroblasten-Zellkulturen und weil dieser Wert zwischen den bisher publizierten Konzentrationen zwischen 1 und 10 ng/ml lag (siehe Tabelle 5).

4.1.3 Wahl des Versuchszeitraums

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellkulturen gleichzeitig mit TGF- β und/oder Calcitriol für einen Zeitraum von 72 Stunden behandelt. Vergleichbare Arbeiten haben meist Zeiträume von 48 h (Li *et al.*, 2005; Meredith *et al.*, 2015; N. Li *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2021), vereinzelt auch 96 h (Zerr *et al.*, 2015) angesetzt. Zwei Autoren entschieden sich für einen sequenziellen Ansatz, bei dem zunächst Calcitriol und dann für vier bzw. fünf Tage TGF- β appliziert wurde (Ramirez *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Der hier gewählte Ansatz lag damit methodisch zwischen den bisher publizierten.

Publikation	Zellen	untersuchte Proteine*	TGF- β (ng/ml)	Calcitriol (nM)	Dauer	Sequenz	N
Li <i>et al.</i> 2005	Nieren-fibroblasten (NRK-49F)	α -SMA	1	1-1000	24/48 h	gleichzeitig	3
Ramirez <i>et al.</i> 2010	Lungen-fibroblasten (C57BL/6)	α -SMA	10	0,001-1000	1 h	anschließend bis 5 d TGF- β	3
Zhang <i>et al.</i> 2011	Keloid-Fibroblasten	α -SMA	10	100	1 h	Anschließend 4 d TGF- β	3
Ito <i>et al.</i> 2013	murine Nieren-fibroblasten (TCMK-1)	(p)SMAD2/3, VDR, α -SMA	5	10	8 h	gleichzeitig	3
Li <i>et al.</i> 2015	humane Lungen-fibroblasten (MRC5)	α -SMA	10	100	48 h	gleichzeitig	≥ 3
Meredith <i>et al.</i> 2015	humane adulte Ventrikel-fibroblasten (HCF-av)	pSMAD2, α -SMA	10	1000	24/48 h	gleichzeitig	5
Zerr <i>et al.</i> 2015	dermale Fibroblasten von SSc Patienten, Gesunden und VDR ^{-/-} -Mäusen mit dermalen Fibrose (C57BL/6)	VDR, SMAD7 (mRNA)	10	40 ng/ml Paricalcitol	bis 96 h	gleichzeitig	4/6
Ding <i>et al.</i> 2016	humane dermale Fibroblasten	α -SMA	2	100	48 h	gleichzeitig	3

Publikation	Zellen	untersuchte Proteine*	TGF- β (ng/ml)	Calcitriol (nM)	Dauer	Sequenz	N
Xu et al. 2019	humane bronchiale Fibroblasten (HBF)	pSMAD2/3, SMAD7, VDR, α -SMA	5	100	48 h	gleichzeitig	3
Zhu et al. 2021	humane Lungen-fibroblasten (HPF)	(p)SMAD3, α -SMA	10	10-100	48 h	gleichzeitig	≥ 3

*aufgeführt sind nur Proteine des SMAD-Signalweges, die auch in dieser Arbeit betrachtet wurden

Tabelle 5 Methodik ähnlicher Untersuchungen

4.1.4 Verwendete Zellkultur

In dieser Arbeit wurden primäre Zellkulturen verwendet, um eine hohe externe Validität durch die Mittelung von mehreren Spendern mit der gleichen Erkrankung zu erreichen. Jedoch erwächst genau hieraus das Problem hoher interindividueller Unterschiede, da für die Spezifizierung der Kulturen nur drei Informationen zur Verfügung standen: Das Spendendatum, die Gewebeherkunft und das Geschlecht des/der SpenderIn (letztere Information blieb in dieser Arbeit unberücksichtigt). Angaben zum Alter der SpenderInnen, Vitamin-D-Serumspiegel, Vitamin-Supplementation, Vorerkrankungen (siehe auch 4.1.5), Voroperationen oder auch Vorbehandlung der jeweiligen Erkrankung mit konservativen oder chirurgischen Methoden wurden nicht erfasst. Zu diesen Methoden zählen unter anderem: Ruhigstellung/Schienung, Ergotherapie, lokale oder systemische Glucocorticoid-Therapie, Einsatz von nichtsteroidalen Antirheumatika, Vitamin E, Strahlentherapie, Injektion von Kollagenase oder diverse Formen der Fasziotomie (*Karpaltunnelsyndrom - AMBOSS*, ohne Datum; *Morbus Dupuytren - AMBOSS*, ohne Datum; Shaw *et al.*, 2007; Ball *et al.*, 2016; Mella *et al.*, 2018; Grazina *et al.*, 2019; Dutta *et al.*, 2020; Gil *et al.*, 2021; Deutsche Gesellschaft für Handchirurgie (DGH), 2022). Bei jeder dieser Vortherapien ist eine Beeinflussung der isolierten Fibroblasten in Form von verändertem Zellstoffwechsel oder verminderter oder erhöhter Proliferationsrate und damit der Ergebnisse dieser Arbeit denkbar.

Auffallend ist, dass von den zehn hier betrachteten vergleichbaren Arbeiten lediglich drei humanes Spendermaterial verwenden (Zhang *et al.*, 2011; Zerr *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2016). Alle anderen greifen auf kommerziell verfügbare Zellkulturen oder Mausstämme zurück, die zwar verglichen mit dem hier verwendeten Material eine deutlich höhere Konsistenz aufweisen, jedoch die Krankheiten, die mit ihnen untersucht werden sollen, lediglich nachbilden. Insofern kann die Verwendung von kommerziell verfügbaren Zellen/Tieren die interne Validität einer Untersuchung erhöhen, die Verwendung von humanem Spendermaterial jedoch zu einer höheren externen Validität führen. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung 2018 waren keine kommerziellen Kulturen aus Morbus-Dupuytren-Fibrosträngen erhältlich.

Angaben zur Passagezahl der verwendeten Zellkulturen haben lediglich Meredith *et al.*, Ramirez *et al.* und Zhang *et al.* gemacht. Die Kulturen befanden sich zum Zeitpunkt der Experimente in der 3. – 7., 2. – 10., bzw. 4. – 6. Passage (Ramirez *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Meredith *et al.*, 2015). Dies ist relevant, da nicht immortalisierte Zellkulturen zum einen den Mechanismen der Seneszenz unterliegen und zum anderen mit zunehmender *in-vitro*-Passage ihre Eigenschaften in Bezug auf Oberfläche, Proliferation oder Metabolismus ändern (Stanulis-Praeger, 1987; Rubin, 1997). Die hier durchgeführten Experimente lagen mit einer mittleren Passagezahl von 5,83 (MD) bzw. 6 (CTS) somit in der Spannweite der ähnlichen publizierten Versuche.

4.1.5 Vergleichbarkeit der Fibroblasten-Entnahmeorte

Verglichen wurden in dieser Arbeit immer wieder Fibroblasten-Zellkulturen von Morbus Dupuytren-Gewebe mit solchen von Gewebe von Karpaltunnelsyndrom-PatientInnen. Auch wenn durch dieses Matching eine hohe anatomische Nähe und Gewebeähnlichkeit erreicht werden sollte, so handelte es sich trotzdem um zwei verschiedene Ursprungsgewebe, die hier verglichen wurden. Die Palmaraponeurose ist mit ihrer anatomischen Lage in der Handinnenfläche häufiger Verformungen und Kompression ausgesetzt, als das geschützt gelegene Ligamentum carpi ulnaris. Hieraus können sich unterschiedliche Ausgangsvoraussetzungen für die entnommenen Fibroblasten ergeben. Eine weitere Überlegung ist, dass Karpaltunnelsyndrom-PatientInnen gleichzeitig an Morbus Dupuytren erkrankt sein können und, gemäß der Annahme, dass in der Palmaraponeurose krankhaft veränderte Fibroblasten auch am Ligamentum carpi ulnare verändert sind, sich dementsprechend nicht als Kontrollgruppe eignen. Tatsächlich gibt es in der Literatur einige Artikel zu therapeutischen Überlegungen von der gleichzeitigen Behandlung beider Erkrankungen, zudem sind beide mit Diabetes mellitus assoziiert (Wroblewski, 1973; Nissenbaum und Kleinert, 1980; Rayan, 2007; Ramchurn *et al.*, 2009; Lilly und Stern, 2010; Padua *et al.*, 2016; Buller *et al.*, 2018; Loewenstein *et al.*, 2018; Gutefeldt *et al.*, 2019).

4.1.6 Anordnung der Proben auf dem Gel

Ein systematischer Fehler könnte vorliegen, da die Proben stets in der gleichen Reihenfolge auf das Gel und dementsprechend auch auf die Membran aufgetragen wurden. In der Reihenfolge wurde zwar absichtlich eine abwechselnde Beladung mit MD und CTS berücksichtigt, um eine systematische Ungleichbehandlung im Sinne einer Rechts-Links-Verteilung der beiden Gruppen zu verhindern, allerdings wurden die Proben stets mit steigender Calcitriol-Konzentration von links nach rechts aufgetragen.

Dies könnte bei allen nachfolgenden Schritten (Membran-Transfer, Waschen, Antikörper-Inkubation, Auftragen der Entwickler-Lösung) einen systematischen Fehler eingeführt haben, da die relative Position der Proben zueinander stets stabil blieb. Eine vollständige Randomisierung der Probenreihenfolge für jedes Gel hätte die Möglichkeit solch eines Fehlers verhindern können, hätte allerdings auch das Verfahren der Datenanalyse um einen Schritt verkompliziert.

Zudem war die gesonderte Analyse der Blots getrennt nach „mit und ohne TGF- β behandelt“ rückblickend vielleicht ungünstig gewählt, da einerseits für die steigende Vitamin-D-Konzentration bei ausbleibender TGF- β -Behandlung keine Hypothese definiert war und andererseits hierdurch der Effekt der TGF- β -Behandlung nicht kontinuierlich überwacht werden konnte. Die oben diskutierten vergleichbaren Arbeiten präferierten meist eine Versuchsanordnung nach dem Schema: unbehandelte Kontrolle, TGF- β , TGF- β + Calcitriol in steigender Konzentration mit abschließender Trägerlösungskontrolle.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Effektivität der Vitamin-D-Behandlung

Costa, Hirst und Feldman zeigten 1985 erstmals *in vitro* u.a. an Hautfibroblasten, dass der Vitamin-D-Rezeptor homolog hoch reguliert wird. Dieses Verhalten konnte 1986 von Costa und Feldman *in vivo* an Ratten bestätigt werden und wurde seitdem vielfach in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben (Costa *et al.*, 1985; Costa und Feldman, 1986; Strom *et al.*, 1989; Naveh-Many *et al.*, 1990; Healy *et al.*, 2003, 2005; Zella *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2018). Durch Untersuchung der VDR-

Expression (Zhang *et al.*, 2011; F. Li *et al.*, 2015) oder -Funktion (Ramirez *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Meredith *et al.*, 2015) unter Calcitriol wurden in vergleichbaren Arbeiten die Effektivität der Vitamin-D-Behandlung überprüft. Die beobachtete Dynamik bei 3.3 zeigt, dass die Zellkulturen auf die Behandlung mit Vitamin D reagiert haben. Die Expression des Vitamin-D-Rezeptors wurde dosisabhängig hochreguliert, wie man es als Initialreaktion auf eine Stimulation erwarten würde. Somit lässt sich sagen, dass die Distribution und Applikation von Vitamin D in den Experimenten erfolgreich verliefen.

4.2.2 α -SMA-Expression in Morbus Dupuytren Fibroblasten

Auffallend ist, dass MD-Fibroblasten ohne TGF- β -Behandlung durchgehend eine höhere α -SMA-Expression aufwiesen als die Zellen der CTS-Vergleichsgruppe (vgl. 3.6). Unter Behandlung mit TGF- β glichen sich die Expressionsmuster der beiden Zellarten weitgehend einander an (vgl. 3.7). Dies bestätigte sich auch beim Vergleich von TGF- β - und nicht-TGF- β -behandelten Fibroblasten. Während die relative Expression bei MD-Fibroblasten um den Faktor 3-9 anstieg, war es bei den CTS-Fibroblasten ein Faktor von 10-18 (vgl. 3.7.1). Auch Karkampouna *et al.* beobachteten die höhere Expression von α -SMA (Protein und ACTA2-mRNA) von MD-Fibroblasten verglichen mit einer CTS-Vergleichsgruppe (Karkampouna *et al.*, 2014).

Sieht man α -SMA als definitiven Marker für die Konversion eines Fibroblasten zum Myofibroblasten an (diskutiert in 4.2.3), würde das bedeuten, dass die MD-Zellkultur deutlich mehr Myofibroblasten als die CTS-Zellkultur enthält. Aufgrund der Verwendung von Zellkulturen mit einer mittleren Passagezahl von 5,83 (MD) bzw. 6 (CTS), ist davon auszugehen, dass diese Myofibroblasten nicht ausschließlich direkt dem Entnahmegewebe entstammen, sondern zumindest teilweise durch Zellteilung entstanden sind. Ob Myofibroblasten proliferieren können oder selbst wachstumsbeschränkt sind, ist in der Wissenschaft wenig besprochen. Vaughan *et al.* demonstrierten mithilfe von Fluoreszenz-Färbung proliferierender Zellen, dass in Zellkulturen aus Morbus Dupuytren Gewebe neben den Fibroblasten auch Myofibroblasten proliferieren, wenn auch in geringerem Maße (Vaughan *et al.*, 2014). Nimmt man an, dass dies auch in den MD-Zellkulturen ablief, könnten diese entweder von Beginn an einen höheren Anteil an Myofibroblasten enthalten haben (der sich bei geringerer Proliferationsrate mit jeder Passage verringern sollte) oder in der Zellkultur herrschte eine Mikroumgebung, die eine ständige reversible Umwandlung zwischen den beiden Phänotypen begünstigte. Um letzterem vorzubeugen, wurde bei der Kultivierung ein standardisiertes Medium eingesetzt, welches regelmäßig gewechselt wurde. Myofibroblasten galten früher als terminal differenziert (Hinz *et al.*, 2019; Pakshir *et al.*, 2020). Mittlerweile wurde jedoch mehrfach demonstriert, dass die Zellen ihre kontraktile Eigenschaften wieder verlieren können (Kisseleva *et al.*, 2012; Jun und Lau, 2018; Hinz *et al.*, 2019; Horowitz und Thannickal, 2019; Pakshir *et al.*, 2020). Daher besteht aktuell eine Diskussion über deren Verbleib im Gewebe. Während der Auflösung einer Fibrose (z. B. nach Wegfallen eines profibrotischen Stimulus oder als Abschluss der Wundheilung) kommen vier Wege in Frage: Apoptose, Seneszenz, Entdifferenzierung und Reprogrammierung (Jun und Lau, 2018).

4.2.3 Identifikation von Zelltypen

Hinzu kommt, dass bei der Identifikation von Zellen als Myofibroblasten Vorsicht geboten ist. Eyden führt in einer Arbeit an, dass die Differenzierung von Zellen zu Myofibroblasten mehrere Ursprünge haben kann und zu einem Spektrum verschiedener α -SMA exprimierender und nicht-exprimierender Zellen führen kann (Eyden, 2008). Ihm zufolge wurde der Begriff Myofibroblast aus Bequemlichkeit immer häufiger für jegliche α -SMA exprimierende spindelförmige Zellen verwendet, ohne notwendige Analysen der Zellstruktur z. B. mittels Elektronenmikroskopie durchzuführen (Eyden,

2008). Hinz *et al.* beschreiben im Abschnitt „*Myofibroblast definition – or the Lack Thereof*“, dass der Begriff für eine sehr heterogene Gruppe an Zellen verwendet wird (Hinz *et al.*, 2019). Allerdings beziehen sich diese Bedenken vorrangig auf immunhistochemische Analysen vielfältigen Gewebes. Setzt man eine ordnungsgemäße Gewinnung und Kultivierung der Fibroblasten voraus, wie durch Verwendung eindeutigen Gewebes und Protokollen sichergestellt wurde, sollte eine Verwechslung der Zellen mit glatten Muskelzellen, Endothel etc. sehr unwahrscheinlich werden.

4.2.4 Kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse

Der methodische Aufbau der Arbeit orientierte sich an vergleichbaren Versuchen, die zuvor an Nieren-, Lungen-, Ventrikel-, Keloid- und dermalen Fibroblasten, humanen oder murinen, gesunden oder pathologischen Ursprungs durchgeführt wurden (siehe auch 4.1.2, 4.1.3 & 4.1.4) (Li *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006; Ramirez *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2013; F. Li *et al.*, 2015; Meredith *et al.*, 2015; Zerr *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2019). Die Menge, Dauer und der Zeitpunkt variieren, aber in allen Fällen wurden die Zellen mit TGF- β und Vitamin D (oder Analoga) behandelt und anschließend auf Veränderungen in der Expression von Proteinen der TGF- β -Signaltransduktionskette untersucht. Die Analyse der exprimierten Proteine erfolgte meist per Western Blot.

In acht dieser Arbeiten konnte die von TGF- β hervorgerufene erhöhte α -SMA-Expression durch Vitamin D teilweise inhibiert werden (Li *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006; Ramirez *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2013; F. Li *et al.*, 2015; Meredith *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2019). Lediglich Ding *et al.* berichteten von einer synergistischen Wirkung von TGF- β und Calcitriol auf die TGF- β Signaltransduktion (Ding *et al.*, 2016). Die Autoren führten diese Beobachtung möglicherweise auf die geringe Konzentration von TGF- β zurück und postulierten eine dichotome Wirkung von TGF- β und Vitamin D, die von den Umgebungsbedingungen (physiologische oder überschießende Wundheilung) abhängt (Ding *et al.*, 2016). Es ist anzumerken, dass Ding *et al.* mit humanem Material gearbeitet haben und anders als bei den übrigen Arbeiten keine Quantifizierung des α -SMA-Proteins vorgenommen, sondern lediglich die Anzahl der α -SMA-positiven Zellen an der Gesamtpopulation gemessen wurde. Insgesamt weichen die Parameter von Ding *et al.* stark von den übrigen Studien ab. In der vorliegenden Arbeit konnte nicht nachgewiesen werden, dass Calcitriol die TGF- β -getriggerte α -SMA-Proteinexpression signifikant beeinflusst, wobei eine negative U-förmige Tendenz mit einer ca. 60 %igen relativen Expression bei 100 nM Calcitriol als Indiz für einen Prozess, der vielleicht bei größerer Wiederholungszahl demaskierbar ist, gewertet werden kann. TGF- β allein führte zu einer Angleichung des α -SMA-Expressionsniveaus der in Ruhe unterschiedlichen MD und CTS-Populationen (siehe 3.7 & 3.7.1), was auf einen gesättigten Vorgang innerhalb der Zellen hindeutet.

Bei den R-SMAD-Signalproteinen ergab sich ein gemischtes Bild. Bezüglich des Expressionslevels und der Translokation in den Zellkern fanden Ito *et al.* keine Dynamik von SMAD2 und 3 sowie pSMAD2 und 3 (Ito *et al.*, 2013) unter TGF- β /Calcitriol-Kobehandlung. Meredith *et al.*, Xu *et al.* und Zhu *et al.* berichteten hingegen von einer Reduktion der pSMAD2-Expression bzw. pSMAD3-Expression und des pSMAD3/SMAD3-Verhältnisses (Meredith *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2021). Aschenbrenner *et al.* konnten eine SMAD3-Expressionsreduktion *in vivo* nachweisen (Aschenbrenner *et al.*, 2001). Analog zu Meredith *et al.* konnte in dieser Arbeit für die CTS-Gruppe eine signifikante dosisabhängige Reduktion der pSMAD2-Expression gezeigt werden (siehe 3.4). Dass diese Tendenz auch in der MD-Gruppe sichtbar, jedoch nicht signifikant war, lässt sich unter Umständen auf eine stärkere Inhomogenität innerhalb der MD-Gruppe zurückführen, auf die die in beinahe allen untersuchten Proteinen größere Standardabweichung verglichen mit der CTS-Gruppe hinweisen.

Zu SMAD7 konnten zwei Arbeiten an gesunden humanen dermalen Fibroblasten identifiziert werden, in denen die Genexpression durch mRNA-Quantifizierung untersucht wurde. Dabei beschrieben Ding et al. einen SMAD7-mRNA-Anstieg bei Behandlung mit 2 ng/ml TGF- β und 100 nM Calcitriol (Ding *et al.*, 2016). Zerr et al. hingegen berichten von einer erniedrigten SMAD7-mRNA-Menge bei Behandlung mit 10 ng/ml TGF- β und 40 ng/ml Paricalcitol (Zerr *et al.*, 2015). Xu et al. berichteten von einer erhöhten SMAD7-Protein-Expression in bronchialen Fibroblasten unter 5 ng/ml TGF- β und 100 nM Calcitriol (Xu *et al.*, 2019). Weder positive noch negative Dynamiken des SMAD7-Proteins konnten in dieser Arbeit bestätigt werden.

SMAD4 wurde im Zusammenhang mit Vitamin D in der Literatur nur wenig betrachtet. Ito et al. behandelten “*Transformed C3H Mouse Kidney-1*“-Zellen mit 5 ng/ml TGF- β und 0,001 bis 10 nM Calcitriol und konnten keine Veränderung des SMAD4-Levels beobachten (Ito *et al.*, 2013). Das SMAD4-Level blieb in weiteren Publikationen von Behandlungen unbeeinflusst, während sich das von anderen SMADs veränderte (Mori *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2013). Aufgrund der Funktion von SMAD4 als Ko-SMAD wurde auch die Translokation des Proteins vom Zytosol in den Nukleus bei TGF- β -Behandlung betrachtet (Mori *et al.*, 2000, 2003). In dieser Arbeit konnte weder in Ganzzelllysaten noch in den Experimenten, bei denen die Proteine nach Lokalisation im Zytoplasma oder Zellkern getrennt wurden, eine eindeutige Beeinflussung der SMAD4-Proteinexpression durch TGF- β und/oder Vitamin D gezeigt werden. Mit Blick auf die hier erzielten Kern/Zytoplasma-Ergebnisse ist anzumerken, dass die Überprüfung des Fraktionierungserfolgs nicht die vom Hersteller des Fraktionierungskits versprochenen hohen Aufteilungsraten zeigte. Zwar war das nukleäre Protein TBP durchgehend im nukleären Extrakt stärker konzentriert und das zytoplasmatische Protein GAPDH durchgehend im zytoplasmatischen, jedoch lassen die Daten vermuten, dass die gegenseitige Kontaminierung der Proben (zytosolische Probe mit nukleären Proteinen und andersherum) oberhalb der vom Hersteller spezifizierten 10 % lag.

Publikation	Zellen	Inhibition des TGF- β -Effekts	Anmerkungen
Li et al. 2005	Nierenfibroblasten (NRK-49F)	α -SMA +	
Ramirez et al. 2010	Lungenfibroblasten (C57BL/6)	α -SMA +	
Zhang et al. 2011	Keloid-Fibroblasten	α -SMA +	
Ito et al. 2013	murine Nierenfibroblasten (TCMK-1)	α -SMA + (p)SMAD2/3 -	Direkte Bindung von VDR an SMAD3 nachgewiesen
Li et al. 2015	humane Lungenfibroblasten (MRC5)	α -SMA +	
Meredith et al. 2015	humane adulte Ventrikel-fibroblasten (HCF-av)	α -SMA + pSMAD2 +	
Zerr et al. 2015	dermale Fibroblasten von SSc Patienten, Gesunden und VDR-/-Mäusen mit dermalen Fibrose (C57BL/6)	SMAD7 + (mRNA)	VDR wurde mit zunehmender TGF- β -Behandlungsdauer weniger exprimiert. Bindung von VDR an pSMAD3 nachgewiesen.
Ding et al. 2016	humane dermale Fibroblasten	Synergistischer Effekt: Anstieg des Anteils α -SMA exprimierender Zellen	weniger TGF- β , anderer untersuchter Parameter
Xu et al. 2019	humane bronchiale Fibroblasten (HBF)	α -SMA + pSMAD3 + SMAD7 +	

Publikation	Zellen	Inhibition des TGF- β -Effekts	Anmerkungen
Zhu et al. 2021	humane Lungenfibroblasten (HPF)	α -SMA + pSMAD3 + pSMAD3/SMAD3 Verhältnis +	

Tabelle 6 Ergebnisse ähnlicher Untersuchungen

Mit Blick auf zuvor veröffentlichte Arbeiten zu diesem Thema muss auch ein Einfluss des Publikationsbias in Betracht gezogen werden, wonach die einsehbare Datenlage aufgrund bevorzugter Veröffentlichung positiver Ergebnisse verzerrt wird (Sterling, 1959). Es kann also sein, dass schon öfter versucht wurde die oben diskutierten Ergebnisse mit neuen Versuchsparametern zu replizieren, jedoch negative Ergebnisse dieser Versuche seltener veröffentlicht und damit für diese Diskussion nicht einsehbar waren.

Zusammenfassend lassen sich aus den erarbeiteten limitierenden Faktoren dieser Arbeit folgende Empfehlungen zur Durchführung von weiteren Untersuchungen ableiten: Erfassung zusätzlicher Spendermerkmale der Gewebeproben wie Alter, Krankheitsausprägung, Voroperationen, Vorbehandlung oder Vitamin-D-Serumspiegel; Variation der Vitamin-D-Behandlungsdauer; randomisierte Anordnung der Proben auf dem Western Blot; Vergleich von Experimenten mit und ohne TGF- β auf dem gleichen Western Blot; Ergänzung der Proteinquantifizierung per Immunoblot z. B. durch eine mRNA RT-PCR oder ELISA; Durchführung aller Analysen mindestens in Duplets und Mittelung der Werte; hohe Wiederholungszahl der Versuche bzw. Stichprobengröße.

4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Mit großem Interesse wurden in den letzten Jahren die Daten der ersten großangelegten randomisierten prospektiven Outcome-Studien zu Vitamin-D-Wirkungen abseits des Knochenstoffwechsels erwartet. Die Ergebnisse waren allerdings weitgehend negativ:

2018 zeigte die VITAL-Studie keine Reduktion der Auftrittswahrscheinlichkeit von Malignomen oder kardiovaskulären Ereignissen nach einer täglichen Einnahme von 2.000 IE Vitamin D₃ über zwei Jahre (Manson *et al.*, 2019). Anzumerken ist, dass hier die Vitamin-D-Serumspiegel nicht flächendeckend erhoben wurden und unter den analysierten Probanden (65,5 % der Studienteilnehmer) der Vitamin-D-Spiegel bereits zu Studienbeginn im Mittel bei 77 nmol/l, also nach allgemeinem Konsens im optimalen Zielbereich lag (Manson *et al.*, 2019). Die Substudien VITAL-DKD und VITAL-Rhythm untersuchten die Nierenfunktion von Typ II Diabetes-Patienten sowie das neue Auftreten von Vorhofflimmern unter Supplementation und konnten auch hier keine positiven Effekte nachweisen (De Boer *et al.*, 2019; Albert *et al.*, 2021). In der J-DAVID-Studie konnte die Behandlung mit Calcidiol über 4 Jahre das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen bei DialysepatientInnen mit niedrigem Parathormon nicht signifikant senken (The J-DAVID Investigators, 2018). Die D2d-Studie untersuchte das Auftreten von Diabetes Mellitus bei Risikogruppen mit Prädiabetes unter Einnahme von 4.000 IE Vitamin D₃ und konnte nach 2,5 Jahren keine Risikoreduktion feststellen (Pittas *et al.*, 2019). Der Ausgangs-Vitamin-D-Spiegel lag auch hier mit 69,9 nmol/l im Mittel bereits im Zielbereich und auch Probanden der Placebogruppe durften bis zu 1.000 IE Vitamin D₃ außerhalb der Studie einnehmen (Pittas *et al.*, 2019). Eine Meta-Analyse, die Daten von 83.000 PatientInnen ausgewertet hat, von denen je ca. die Hälfte randomisiert kontrolliert eine Vitamin-D-Therapie über mindestens ein Jahr erhielt, konnte ebenfalls keine Risikoreduktion eines schweren kardiovaskulären Ereignisses feststellen (Barbarawi *et al.*, 2019). In einer weiteren randomisiert kontrollierten Studie erhielten Patienten mit nachgewiesenem Vitamin-D-Mangel (Calcidiol-Serumspiegel), die auf eine Intensivstation aufgenommen wurden, einmalig

540.000 IE Vitamin D₃ oder Placebo. Auch hier konnte kein positiver Effekt auf das 90-Tage-Überleben nachgewiesen werden (The National Heart Lung and Blood Institute PETAL Clinical Trials Network, 2019). In einem ähnlichen Ansatz erhielten 120 PatientInnen mit moderater bis schwerer COVID-19-Erkrankung randomisiert kontrolliert einmalig 200.000 IE Vitamin D₃. Es konnte kein Effekt auf den klinischen Verlauf oder die Dauer der Erkrankung nachgewiesen werden. Der Ausgangs-Vitamin-D-Wert lag bei dieser Studie bereits knapp im Zielbereich (Murai *et al.*, 2021). Die DO-HEALTH Studie untersuchte drei Jahre lang die Vitamin D₃-Einnahme von täglich 2.000 IE bei gesunden über 70-Jährigen und konnte keinen positiven Effekt auf Blutdruck, kognitive Funktion, Frakturen oder Infekte nachweisen (Bischoff-Ferrari *et al.*, 2020).

Klinische Evidenz für die Supplementation von Vitamin D besteht aktuell weiterhin weitestgehend nur zur Osteoporose-Prophylaxe und -Therapie (Linseisen *et al.*, 2011).

Diese Erkenntnisse mögen zunächst ernüchternd erscheinen und die Begeisterung für die Forschung an Vitamin-D-Supplementierung nach mehreren positiven Signalen aus der Grundlagenforschung (Abdel-Rahman *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021) und Beobachtungsstudien (Karhapää *et al.*, 2010; Brøndum-Jacobsen *et al.*, 2012; Kunutsor *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2013) dämpfen. Jedoch bestehen einige Schwächen in den vorliegenden Studien und Lücken, die durch weitergehende Untersuchungen gefüllt werden müssen. Zum einen besteht kein Konsens über die zu supplementierende Menge Vitamin D, zum anderen haben viele dieser Studienteilnehmer mit bereits als ausreichend angesehenen Vitamin-D-Serumspiegeln nicht ausgeschlossen, also eine Supplementierung unabhängig von einem bestehenden Mangel untersucht, was den lateinischen Ursprung dieses Wortes, *supplere*, dt. nachfüllen/ersetzen (Langenscheidt Online Latein Wörterbuch, ohne Datum) gewissermaßen *ad absurdum* führt.

Fibrosierungen sind für eine Reihe weiterer Erkrankungen wie die diabetische Nephropathie oder die Leberzirrhose ein relevanter pathogenetischer Faktor. Humane Morbus-Dupuytren-Fibroblasten lassen sich leicht als Nebenprodukt im Rahmen von therapeutischen Operationen isolieren und eignen sich deshalb gut als Material für weitere *in vitro* Fibrosierungsstudien.

Zusammenfassend konnte zwar nicht nachgewiesen werden, dass Morbus Dupuytren-Zellen sich *in vitro* „heilen“ lassen, jedoch beeinflusste Calcitriol tendenziell die Expression einiger Signalproteine. Die Verwendung von relativ wenigen humanen Spenderzellen erschwerte die Observanz von Effekten niedriger Stärke. Weitergehende Versuche mit einer größeren Wiederholung sowie angepassten Versuchsparametern könnten zum Nachweis eines inhibitorischen Vitamin-D-Effekts in Morbus-Dupuytren-Fibroblasten beitragen. Vor dem Hintergrund einer hohen Prävalenz (vgl. 1.2.2) und hoher Rezidivraten aktueller Therapieansätze (vgl. 1.2.4) von Morbus Dupuytren sind weitere Erkenntnisgewinne auf diesem Feld von großer klinischer Relevanz.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abdel-Rahman, N. *et al.* (2019) „Vitamin D3 abates BDL-induced cholestasis and fibrosis in rats via regulating Hedgehog pathway“, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 380, S. 114697. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2019.114697>.
- Abercrombie, M. (1978) „Fibroblasts“, *Journal of Clinical Pathology*, 31(Suppl 12), S. 1–6. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1136/jcp.31.Suppl_12.1.
- Adams, J.S. und Hewison, M. (2010) „Update in Vitamin D“, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(2), S. 471–478. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1773>.
- Ahn, Y.B. *et al.* (2007) „Changes in gene expression in beta cells after islet isolation and transplantation using laser-capture microdissection.“, *Diabetologia*, 50(2), S. 334–342. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0536-5>.
- Albert, C.M. *et al.* (2021) „Effect of Marine Omega-3 Fatty Acid and Vitamin D Supplementation on Incident Atrial Fibrillation: A Randomized Clinical Trial“, *JAMA*, 325(11), S. 1061–1073. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1001/JAMA.2021.1489>.
- Alegria-Schaffer, A., Lodge, A. und Vattem, K. (2009) „Chapter 33 Performing and Optimizing Western Blots with an Emphasis on Chemiluminescent Detection“, *Methods in Enzymology*, 463(C), S. 573–599. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63033-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63033-0).
- Amrein, K. *et al.* (2014) „Evidence for a U-Shaped Relationship Between Prehospital Vitamin D Status and Mortality: A Cohort Study“, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(4), S. 1461–1469. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3481>.
- Aschenbrenner, J.K. *et al.* (2001) „1,25-(OH)₂D₃ alters the transforming growth factor β signaling pathway in renal tissue“, *Journal of Surgical Research*, 100(2), S. 171–175. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1006/jsre.2001.6221>.
- Ball, C. *et al.* (2016) „Systematic review of non-surgical treatments for early dupuytren’s disease“, *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17(1), S. 1–17. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/S12891-016-1200-Y/TABLES/4>.
- Barbarawi, M. *et al.* (2019) „Vitamin D Supplementation and Cardiovascular Disease Risks in More Than 83 000 Individuals in 21 Randomized Clinical Trials: A Meta-analysis“, *JAMA Cardiology*, 4(8), S. 765–776. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1001/JAMACARDIO.2019.1870>.
- Becker, K. *et al.* (2016) „Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies and Network Analysis-Based Integration with Gene Expression Data Identify New Suggestive Loci and Unravel a Wnt-Centric Network Associated with Dupuytren’s Disease“, *PLOS ONE*, 11(7), S. e0158101. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158101>.
- Bhalla, A.K., Wojno, W.C. und Goldring, M.B. (1987) „Human articular chondrocytes acquire 1,25-(OH)₂ vitamin D-3 receptors in culture“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 931(1), S. 26–32. Verfügbar unter: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-4889\(87\)90046-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-4889(87)90046-2).
- Binkley, N. *et al.* (2004) „Assay Variation Confounds the Diagnosis of Hypovitaminosis D: A Call for Standardization“, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(7), S. 3152–3157. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031979>.
- Bischoff-Ferrari, H.A. *et al.* (2020) „Effect of Vitamin D Supplementation, Omega-3 Fatty Acid Supplementation, or a Strength-Training Exercise Program on Clinical Outcomes in Older Adults:

The DO-HEALTH Randomized Clinical Trial“, *JAMA*, 324(18), S. 1855–1868. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1001/JAMA.2020.16909>.

Blutuntersuchungen: Normalwerte - Anhänge - MSD Manual Profi-Ausgabe (2020). Verfügbar unter: <https://www.msdmanuals.com/de-de/profi/anhänge/normalwerte-in-der-labor Diagnostik/blutuntersuchungen-normalwerte> (Zugegriffen: 24. Oktober 2020).

De Boer, I.H. *et al.* (2019) „Effect of Vitamin D and Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Kidney Function in Patients With Type 2 Diabetes: A Randomized Clinical Trial“, *JAMA*, 322(19), S. 1899–1909. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1001/JAMA.2019.17380>.

Border, W.A. und Noble, N.A. (1994) „Transforming Growth Factor β in Tissue Fibrosis“, *New England Journal of Medicine*, 331(19), S. 1286–1292. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1056/NEJM199411103311907>.

Brannon, P.M. und Fleet, J.C. (2011) „Vitamin D“, *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*. 2011/06/28, 2(4), S. 365–367. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3945/an.111.000620>.

Branton, M.H. und Kopp, J.B. (1999) „TGF- β and fibrosis“, *Microbes and Infection*, 1(15), S. 1349–1365. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(99\)00250-6](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(99)00250-6).

Branwood, A.W. (1963) „The Fibroblast“, *International Review of Connective Tissue Research*, 1, S. 1–28. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4831-6755-8.50006-1>.

Brenner, S. (1974) „The genetics of *Caenorhabditis elegans*“, *Genetics*, 77(1), S. 71–94. Verfügbar unter: <http://www.genetics.org/content/77/1/71.abstract>.

Brøndum-Jacobsen, P. *et al.* (2012) „25-hydroxyvitamin D levels and risk of ischemic heart disease, myocardial infarction, and early death: Population-based study and meta-analyses of 18 and 17 studies“, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(11), S. 2794–2802. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.248039>.

Brown, A.J. und Slatopolsky, E.A. (2005) „Chapter 82 - Mechanisms for the Selective Actions of Vitamin D Analogs“, in D. Feldman (ed.) *Vitamin D (Second Edition)*. Burlington: Academic Press, S. 1449–1469. Verfügbar unter: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012252687-9/50086-3>.

Buller, M. *et al.* (2018) „The Incidence of Complex Regional Pain Syndrome in Simultaneous Surgical Treatment of Carpal Tunnel Syndrome and Dupuytren Contracture“, *Hand*, 13(4), S. 391–394. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1177/1558944717718345>.

Calvo, M.S., Whiting, S.J. und Barton, C.N. (2005) „Vitamin D Intake: A Global Perspective of Current Status“, *The Journal of Nutrition*, 135(2), S. 310–316. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/jn/135.2.310>.

Carlberg, C. *et al.* (2001) „Central role of VDR conformations for understanding selective actions of vitamin D3 analogues“, *Steroids*, 66(3), S. 213–221. Verfügbar unter: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(00\)00150-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0039-128X(00)00150-1).

Cell atlas - GAPDH - The Human Protein Atlas (ohne Datum). Verfügbar unter: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000111640-GAPDH/cell> (Zugegriffen: 29. März 2022).

Cell atlas - TBP - The Human Protein Atlas (ohne Datum). Verfügbar unter: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000112592-TBP/cell> (Zugegriffen: 29. März 2022).

Chapnick, D.A. und Liu, X. (2010) „Analysis of ligand-dependent nuclear accumulation of Smads in TGF-beta signaling“, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 647, S. 95–111. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-738-9_5.

- Chapuy, M.C. *et al.* (1997) „Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population“, *Osteoporosis International*, 7(5), S. 439–443. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s001980050030>.
- Chen, T.C., Chang, S.W. und Wang, T.Y. (2013) „Moxifloxacin modifies corneal fibroblast-to-myofibroblast differentiation.“, *British journal of pharmacology*, 168(6), S. 1341–54. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/bph.12015>.
- Chong, S.G. *et al.* (2019) „Fibrocytes and fibroblasts—Where are we now“, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 116, S. 105595. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2019.105595>.
- Christakos, S. *et al.* (2015) „Vitamin D: Metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects“, *Physiological Reviews*, 96(1), S. 365–408. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015>.
- Clark, D.A. und Coker, R. (1998) „Molecules in focus Transforming growth factor-beta (TGF-β)“, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30(3), S. 293–298. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00128-3](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00128-3).
- Colella, A.D. *et al.* (2012) „Comparison of Stain-Free gels with traditional immunoblot loading control methodology“, *Analytical Biochemistry*, 430(2), S. 108–110. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.08.015>.
- Costa, E.M. und Feldman, D. (1986) „Homologous up-regulation of the 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ receptor in rats“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 137(2), S. 742–747. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(86\)91141-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(86)91141-1).
- Costa, E.M., Hirst, M.A. und Feldman, D. (1985) „Regulation of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Receptors by Vitamin D Analogs in Cultured Mammalian Cells“, *Endocrinology*, 117(5), S. 2203–2210. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1210/ENDO-117-5-2203>.
- DeLuca, H.F. *et al.* (1971) „Isolation and identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine“, *Biochemistry*, 10(14), S. 2799–2804. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1021/bi00790a023>.
- DeLuca, H.F. (2004) „Overview of general physiologic features and functions of vitamin D.“, *The American journal of clinical nutrition*. Oxford University Press, S. 1689S-1696S. Verfügbar unter: <https://doi.org/80/6/1689S> [pii].
- Derynck, R. *et al.* (1996) „Nomenclature: Vertebrate Mediators of TGFβ Family Signals“, *Cell*, 87(2), S. 173. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81335-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81335-5).
- Desmoulière, A. *et al.* (1993) „Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts“, *Journal of Cell Biology*, 122(1), S. 103–111. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1083/jcb.122.1.103>.
- Deutsche Gesellschaft für Handchirurgie (DGH) (2022) *S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Karpaltunnelsyndroms, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)*. Verfügbar unter: <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/005-003> (Zugegriffen: 16. November 2022).
- Deutzmann, R. (2016a) „Calciferole“, in J. Rassow *et al.* (eds) *Duale Reihe Biochemie*. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1055/b-003-129341>.
- Deutzmann, R. (2016b) „Intrazelluläre Rezeptoren (Kernrezeptoren)“, in J. Rassow *et al.* (eds) *Duale Reihe Biochemie*. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1055/b-003-129341>.

- DiBenedetti, D.B. *et al.* (2011) „Prevalence, incidence, and treatments of Dupuytren’s disease in the United States: Results from a population-based study“, *HAND*, 6(2), S. 149–158. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s11552-010-9306-4>.
- Ding, J. *et al.* (2016) „Synergistic effect of vitamin D and low concentration of transforming growth factor beta 1, a potential role in dermal wound healing“, *Burns*, 42(6), S. 1277–1286. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/J.BURNS.2016.03.009>.
- Ding, N., Yu, R.T., *et al.* (2013) „A Vitamin D Receptor/SMAD Genomic Circuit Gates Hepatic Fibrotic Response“, *Cell*, 153(3), S. 601–613. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.03.028>.
- Ding, N., Liddle, C., *et al.* (2013) „Hepatic actions of vitamin D receptor ligands: a sunshine option for chronic liver disease?“, *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 6(6), S. 597–599. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1586/17512433.2013.841078>.
- Dolmans, G.H. *et al.* (2011) „Wnt Signaling and Dupuytren’s Disease“, *New England Journal of Medicine*, 365(4), S. 307–317. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1101029>.
- Dupuytren, G. (1831) „De la rétraction des doigts par suite d’une affection de l’aponeurose palmaire“, *Journal Universel et Hebdomadaire de Médecine et de Chirurgie Pratiques et des Institutions Médicales*, 25, S. 349–365.
- Dusso, A.S., Brown, A.J. und Slatopolsky, E. (2005) „Vitamin D“, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 289(1), S. F8–F28. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00336.2004>.
- Dutta, A. *et al.* (2020) „Dupuytren’s Contracture – Current Concepts“, *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 11(4), S. 590–596. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2020.03.026>.
- EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA) (2016) „Dietary reference values for vitamin D“, *EFSA Journal*, 14(10), S. e04547. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4547>.
- Elliot, D. (1988) „The Early History of Contracture of the Palmar Fascia: Part 1: The origin of the disease: the curse of the MacCrimmons: the hand of benediction: Cline’s contracture“, *Journal of Hand Surgery*, 13(3), S. 246–253. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1016/0266-7681_88_90078-2.
- Eyden, B. (2008) „The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine“, *Journal of cellular and molecular medicine*. 2007/12/22, 12(1), S. 22–37. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00213.x>.
- Gabbiani, G. und Majno, G. (1972) „Dupuytren’s contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study.“, *American Journal of Pathology*, 66(1), S. 131–146.
- Gascon-Barré, M. (2003) „The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells“, *Hepatology*, 37(5), S. 1034–1042. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50176>.
- Gene of the month - Mothers Against Decapentaplegic | Interviews | Naked Scientists* (2012) *The Naked Scientists*. Verfügbar unter: <https://www.thenakedscientists.com/articles/interviews/gene-month-mothers-against-decapentaplegic> (Zugegriffen: 29. April 2020).
- German Nutrition Society (2012) „New Reference Values for Vitamin D“, *Annals of Nutrition and Metabolism*, 60(4), S. 241–246. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1159/000337547>.
- Gil, J.A., Hresko, A.M. und Akelman, E. (2021) „Current Concepts in the Management of

- Dupuytren Disease of the Hand“, *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 29(11), S. 462–469. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-20-00190>.
- Gilda, J.E. und Gomes, A. V. (2013) „Stain-Free total protein staining is a superior loading control to b-actin for Western blots“, *Analytical Biochemistry*, 440(2), S. 186–188. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.05.027>.
- Gorr, T.A. und Vogel, J. (2015) „Western blotting revisited: Critical perusal of underappreciated technical issues“, *PROTEOMICS – Clinical Applications*, 9(3–4), S. 396–405. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/PRCA.201400118>.
- Gray, H. (1918) *Anatomy of the Human Body*. 20. edn. Herausgegeben von W.H. Lewis. Philadelphia / New York City: Lea & Febiger. Verfügbar unter: <https://www.bartleby.com/107/126.html>.
- Grazina, R. et al. (2019) „Dupuytren’s disease: where do we stand?“, *EFORT Open Reviews*, 4(2), S. 63–69. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1302/2058-5241.4.180021>.
- Gudmundsson, K.G. et al. (2000) „Epidemiology of Dupuytren’s disease: Clinical, serological, and social assessment. The Reykjavik Study“, *Journal of Clinical Epidemiology*, 53(3), S. 291–296. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S0895-4356\(99\)00145-6](https://doi.org/10.1016/S0895-4356(99)00145-6).
- Gürtler, A. et al. (2013) „Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis“, *Analytical Biochemistry*, 433(2), S. 105–111. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.010>.
- Gutefeldt, K. et al. (2019) „Upper extremity impairments in type 1 diabetes with long duration; common problems with great impact on daily life“, *Disability and rehabilitation*, 41(6), S. 633–640. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1080/09638288.2017.1397202>.
- Healy, K.D. et al. (2003) „Regulation of the murine renal vitamin D receptor by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and calcium“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(17), S. 9733–9737. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1073/PNAS.1633774100>.
- Healy, K.D., Frahm, M.A. und DeLuca, H.F. (2005) „1,25-Dihydroxyvitamin D₃ up-regulates the renal vitamin D receptor through indirect gene activation and receptor stabilization“, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433(2), S. 466–473. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2004.10.001>.
- Heath, A. et al. (2019) „Vitamin D Status and Mortality: A Systematic Review of Observational Studies“, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(3), S. 383. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/ijerph16030383>.
- Heldin, C.H. und Moustakas, A. (2012) „Role of Smads in TGFβ signaling“, *Cell and Tissue Research*, 347(1), S. 21–36. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1190-x>.
- Herrmann, M. et al. (2017) „Assessment of vitamin D status – a changing landscape“, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 55(1), S. 3–26. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0264>.
- Hilger, J. et al. (2014) „A systematic review of vitamin D status in populations worldwide“, *British Journal of Nutrition*, 111(1), S. 23–45. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1017/S0007114513001840>.
- Hindocha, S., McGrouther, D.A. und Bayat, A. (2009) „Epidemiological evaluation of Dupuytren’s disease incidence and prevalence rates in relation to etiology.“, *HAND*, 4(3), S. 256–69. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s11552-008-9160-9>.
- Hinz, B., McCulloch, C.A. und Coelho, N.M. (2019) „Mechanical regulation of myofibroblast

phenoconversion and collagen contraction“, *Experimental Cell Research*, 379(1), S. 119–128. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2019.03.027>.

Höbaus, J. *et al.* (2013) „Role of calcium, vitamin D, and the extrarenal vitamin D hydroxylases in carcinogenesis“, *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 13(1), S. 20–35. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23094918>.

Holick, M.F. (1992) „Evolutionary Biology and Pathology of Vitamin D“, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 38, S. 79–83. Verfügbar unter: https://doi.org/10.3177/jnsv.38.Special_79.

Horowitz, J.C. und Thannickal, V.J. (2019) „Mechanisms for the resolution of organ fibrosis“, *Physiology*, 34(1), S. 43–55. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00033.2018/ASSET/IMAGES/LARGE/PHY0011904540003.JPEG>.

Houghton, L.A. und Vieth, R. (2006) „The case against ergocalciferol (vitamin D₂) as a vitamin supplement“, *American Journal of Clinical Nutrition*. Oxford University Press, S. 694–697. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.4.694>.

Hu, H.H. *et al.* (2018) „New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis“, *Chemico-Biological Interactions*. Elsevier Ireland Ltd, S. 76–83. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.008>.

Hyppönen, E. und Power, C. (2007) „Hypovitaminosis D in British adults at age 45 y: Nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors“, *American Journal of Clinical Nutrition*, 85(3), S. 860–868. Verfügbar unter: <https://doi.org/85/3/860> [pii].

Institute of Medicine (IOM) (2011) *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. Herausgegeben von A.C. Ross *et al.* Washington, DC: The National Academies Press. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.17226/13050>.

Ito, I. *et al.* (2013) „A nonclassical vitamin D receptor pathway suppresses renal fibrosis.“, *The Journal of clinical investigation*, 123(11), S. 4579–94. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1172/JCI67804>.

Jones, G., Strugnell, S.A. und DeLuca, H.F. (1998) „Current Understanding of the Molecular Actions of Vitamin D“, *Physiological Reviews*, 78(4), S. 1193–1231. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.4.1193>.

Jun, J. Il und Lau, L.F. (2018) „Resolution of organ fibrosis“, *The Journal of Clinical Investigation*, 128(1), S. 97–107. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1172/JCI93563>.

Karhapää, P. *et al.* (2010) „Diverse associations of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D with dyslipidaemias“, *Journal of Internal Medicine*, 268(6), S. 604–610. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/J.1365-2796.2010.02279.X>.

Karkampouna, S. *et al.* (2014) „Novel Ex Vivo Culture Method for the Study of Dupuytren’s Disease: Effects of TGF β Type 1 Receptor Modulation by Antisense Oligonucleotides“, *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 3, S. e142. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/mtna.2013.69>.

Karpaltunnelsyndrom - AMBOSS (ohne Datum). Verfügbar unter: <https://next.amboss.com/de/article/sR0tof?q=karpaltunnelsyndrom#Zceb1b417127398181815f37cc45fca9d> (Zugegriffen: 16. November 2022).

Kawabata, M. *et al.* (1998) „Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors“, *EMBO Journal*, 17(14), S. 4056–4065. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/emboj/17.14.4056>.

- Keane, J. *et al.* (2018) „Vitamin D and the Liver—Correlation or Cause?“, *Nutrients*, 10(4), S. 496. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/nu10040496>.
- Kisseleva, T. *et al.* (2012) „Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(24), S. 9448–9453. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1073/PNAS.1201840109/SUPPL_FILE/SAPP.PDF.
- Kleinschmidt, L. (2009) „Kompressionssyndrome peripherer Nerven“, in A. Berger und R. Hierner (eds) *Plastische Chirurgie: Band IV: Extremitäten: Extremitäten*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, S. 162–166.
- Krassovka, J. *et al.* (2019) „Blue light irradiation and its beneficial effect on Dupuytren’s fibroblasts.“, *PloS one*, 14(1), S. e0209833. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209833>.
- Kunutsor, S.K., Apekey, T.A. und Steur, M. (2013) „Vitamin D and risk of future hypertension: Meta-analysis of 283,537 participants“, *European Journal of Epidemiology*, 28(3), S. 205–221. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/S10654-013-9790-2/TABLES/4>.
- Ladner, C.L. *et al.* (2004) „Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining“, *Analytical Biochemistry*, 326(1), S. 13–20. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.047>.
- Langenscheidt Online Latein Wörterbuch* (ohne Datum). Verfügbar unter: <https://de.langenscheidt.com/latein-deutsch/supplere> (Zugegriffen: 30. März 2022).
- Lanting, R. *et al.* (2014) „A Systematic Review and Meta-Analysis on the Prevalence of Dupuytren Disease in the General Population of Western Countries“, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 133(3), S. 593–603. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000438455.37604.0f>.
- Larsen, S. *et al.* (2014) „Genetic and environmental influences in Dupuytren’s disease: A study of 30,330 Danish twin pairs“, *Journal of Hand Surgery (European Volume)*, 40(2), S. 171–176. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1177/1753193414535720>.
- Lee, S.M. *et al.* (2018) „The impact of VDR expression and regulation in vivo“, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 177, S. 36–45. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.06.002>.
- Li, B. und Wang, J.H.C. (2011) „Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement“, *Journal of Tissue Viability*, 20(4), S. 108–120. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2009.11.004>.
- Li, F. *et al.* (2015) „1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 prevents the differentiation of human lung fibroblasts via microRNA-27b targeting the vitamin D receptor.“, *International journal of molecular medicine*, 36(4), S. 967–74. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2318>.
- Li, N. *et al.* (2015) „Uighur medicine abnormal savda munzip (ASMq) suppresses expression of collagen and TGF- β 1 with concomitant induce Smad7 in human hypertrophic scar fibroblasts.“, *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(6), S. 8551–60. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26309506> (Zugegriffen: 24. Juli 2018).
- Li, Y. *et al.* (2005) „1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits renal interstitial myofibroblast activation by inducing hepatocyte growth factor expression“, *Kidney International*, 68(4), S. 1500–1510. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/J.1523-1755.2005.00562.X>.
- Lilly, S.I. und Stern, P.J. (2010) „Simultaneous Carpal Tunnel Release and Dupuytren’s Fasciectomy“, *The Journal of Hand Surgery*, 35(5), S. 754–759. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/J.JHSA.2010.02.023>.

- Linseisen, J. *et al.* (2011) *Stellungnahme Vitamin D und Prävention ausgewählter chronischer Krankheiten*.
- Liu, F. *et al.* (1996) „A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator“, *Nature*, 381(6583), S. 620–623. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/381620a0>.
- Loewenstein, S.N., Duquette, S.P. und Adkinson, J.M. (2018) „Combined carpal tunnel release and palmar fasciectomy for Dupuytren’s contracture does not increase the risk for complex regional pain syndrome“, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 142(5), S. 1251–1257. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000004838>.
- Lucisano, S. *et al.* (2013) „New insights on the role of vitamin D in the progression of renal damage“, *Kidney & blood pressure research*, 37(6), S. 667–78. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1159/000355747>.
- Luck, J.V. (1959) „Dupuytren’s Contracture: A New Concept of the Pathogenesis Correlated with Surgical Management“, *Journal of Bone and Joint Surgery*, 41(4). Verfügbar unter: https://journals.lww.com/jbjsjournal/Fulltext/1959/41040/Dupuytren_s_Contracture__A_New_Concept_of_the.8.aspx.
- Luderer, H.F. *et al.* (2013) „Ligand-Dependent Actions of the Vitamin D Receptor Are Required for Activation of TGF- β Signaling during the Inflammatory Response to Cutaneous Injury“, *Endocrinology*, 154(1), S. 16–24. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1210/en.2012-1579>.
- Lynch, M.D. und Watt, F.M. (2018) „Fibroblast heterogeneity: implications for human disease“, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, S. 26–35. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1172/JCI93555>.
- Manson, J.E. *et al.* (2019) „Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease“, *New England Journal of Medicine*, 380(1), S. 33–44. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1056/NEJMOA1809944/SUPPL_FILE/NEJMOA1809944_DATA-SHARING.PDF.
- Massagué, J. (1998) „TGF- β SIGNAL TRANSDUCTION“, *Annu. Rev. Biochem*, 67(1), S. 753–91. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.753>.
- Max Rubner-Institut (2008) „Nationale Verzehrsstudie II. Ergebnisbericht Teil 2. Die bundesweite Befragung zur Ernährung“, *Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel* [Preprint]. Verfügbar unter: https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/_Ernaehrung/NVS_ErgebnisberichtTeil2.html.
- McAnulty, R.J. (2007) „Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease“, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Pergamon, S. 666–671. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.11.005>.
- Mella, J.R., Guo, L. und Hung, V. (2018) „Dupuytren’s Contracture: An Evidence Based Review“, *Annals of plastic surgery*, 81(6S Suppl 1), S. S97–S101. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000001607>.
- Meng, X., Nikolic-Paterson, D.J. und Lan, H.Y. (2016) „TGF- β : the master regulator of fibrosis“, *Nature Reviews Nephrology*, 12(6), S. 325–338. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.48>.
- Meredith, A. *et al.* (2015) „1,25 Dihydroxyvitamin D3 Inhibits TGF β 1-Mediated Primary Human Cardiac Myofibroblast Activation“, *PloS one*, 10(6), S. e0128655. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128655>.
- Millesi, H. (2009) „Dupuytren-Kontraktur“, in A. Berger und R. Hierner (eds) *Plastische Chirurgie: Band IV: Extremitäten: Extremitäten*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, S. 83–112.

- Morbus Dupuytren - AMBOSS* (ohne Datum). Verfügbar unter: <https://next.amboss.com/de/article/hQ0cDf?q=dupuytren-kontraktur#Ze696e0cc040ce16c40a06946fb646ab6> (Zugegriffen: 16. November 2022).
- Mori, Y., Chen, S.-J. und Varga, J. (2003) „Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts“, *Arthritis & Rheumatism*, 48(7), S. 1964–1978. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/art.11157>.
- Mori, Y., Chen, S.J. und Varga, J. (2000) „Modulation of endogenous Smad expression in normal skin fibroblasts by transforming growth factor- β “, *Experimental Cell Research*, 258(2), S. 374–383. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4930>.
- Moritz, C.P. (2017) „Tubulin or Not Tubulin: Heading Toward Total Protein Staining as Loading Control in Western Blots“, *PROTEOMICS*, 17(20), S. 1600189. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/PMIC.201600189>.
- Murai, I.H. *et al.* (2021) „Effect of a Single High Dose of Vitamin D3 on Hospital Length of Stay in Patients With Moderate to Severe COVID-19: A Randomized Clinical Trial“, *JAMA*, 325(11), S. 1053–1060. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1001/JAMA.2020.26848>.
- Musumeci, M. *et al.* (2015) „Dupuytren’s disease therapy: targeting the vicious cycle of myofibroblasts?“, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 19(12), S. 1677–1687. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1068758>.
- Nagalingam, R.S., Al-Hattab, D.S. und Czubryt, M.P. (2019) „What’s in a name? On fibroblast phenotype and nomenclature“, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. Canadian Science Publishing, S. 493–497. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1139/cjpp-2018-0555>.
- Nakao, A., Afrakhte, M., *et al.* (1997) „Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling.“, *Nature*, 389(October), S. 631–635. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/39369>.
- Nakao, A., Imamura, T., *et al.* (1997) „TGF- β receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4.“, *The EMBO Journal*, 16(17), S. 5353. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/16.17.5353>.
- Naveh-Many, T. *et al.* (1990) „Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the parathyroid in vivo.“, *The Journal of Clinical Investigation*, 86(6), S. 1968–1975. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1172/JCI114931>.
- Nissenbaum, M. und Kleinert, H.E. (1980) „Treatment considerations in carpal tunnel syndrome with coexistent Dupuytren’s disease“, *The Journal of Hand Surgery*, 5(6), S. 544–547. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S0363-5023\(80\)80102-X](https://doi.org/10.1016/S0363-5023(80)80102-X).
- Padua, L. *et al.* (2016) „Carpal tunnel syndrome: clinical features, diagnosis, and management“, *The Lancet Neurology*, 15(12), S. 1273–1284. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30231-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30231-9).
- Pakshir, P. *et al.* (2020) „The myofibroblast at a glance“, *Journal of Cell Science*, 133(13), S. jcs227900. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1242/jcs.227900>.
- Park, J.W. *et al.* (2022) „Vitamin D status in Dupuytren’s disease: Association with clinical status and vitamin D receptor expression“, *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* [Preprint]. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/J.BJPS.2022.01.012>.
- Pittas, A.G. *et al.* (2019) „Vitamin D Supplementation and Prevention of Type 2 Diabetes“, *New England Journal of Medicine*, 381(6), S. 520–530. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1056/NEJMOA1900906/SUPPL_FILE/NEJMOA1900906_DATA-SHARING.PDF.

- Phudowski, P. *et al.* (2013) „Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe — recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency“, *Endokrynologia Polska*, 64(4), S. 319–327. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.5603/EP.2013.0012>.
- Ramchurn, N. *et al.* (2009) „Upper limb musculoskeletal abnormalities and poor metabolic control in diabetes“, *European Journal of Internal Medicine*, 20(7), S. 718–721. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/J.EJIM.2009.08.001>.
- Ramirez, A.M. *et al.* (2010) „Vitamin D inhibition of pro-fibrotic effects of transforming growth factor β 1 in lung fibroblasts and epithelial cells“, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 118(3), S. 142–150. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2009.11.004>.
- Rayan, G.M. (2007) „Dupuytren disease: Anatomy, pathology, presentation, and treatment“, *Journal of Bone and Joint Surgery*, 89(1), S. 190–198. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.2106/00004623-200701000-00026>.
- Rayan, G.M., Parizi, M. und Tomasek, J.J. (1996) „Pharmacologic regulation of Dupuytren’s fibroblast contraction in vitro“, *The Journal of Hand Surgery*, 21(6), S. 1065–1070. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S0363-5023\(96\)80317-0](https://doi.org/10.1016/S0363-5023(96)80317-0).
- Rehman, S. *et al.* (2011) „Dupuytren’s: a systems biology disease“, *Arthritis Research & Therapy*, 13(5), S. 238. Verfügbar unter: <https://doi.org/ar3438> [pii]r10.1186/ar3438.
- Rieger, S. *et al.* (2015) „The role of nuclear hormone receptors in cutaneous wound repair“, *Cell Biochemistry and Function*, 33(1), S. 1–13. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/cbf.3086>.
- Ross, D.C. (1999) „Epidemiology of Dupuytren’s disease“, *Hand clinics*, 15(1), S. 53–62, vi. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10050242>.
- Rubin, H. (1997) „Cell aging in vivo and in vitro“, *Mechanisms of Ageing and Development*, 98(1), S. 1–35. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(97\)00067-5](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(97)00067-5).
- SACN (Scientific Advisory Committee on Nutrition) (2016) „Vitamin D and Health“. Verfügbar unter: <https://www.gov.uk/government/publications/sacn-vitamin-d-and-health-report>.
- Sassi, F., Tamone, C. und D’Amelio, P. (2018) „Vitamin D: Nutrient, Hormone, and Immunomodulator“, *Nutrients*, 10(11), S. 1656. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/nu10111656>.
- Satish, L. *et al.* (2008) „Identification of differentially expressed genes in fibroblasts derived from patients with Dupuytren’s Contracture.“, *BMC medical genomics*, 1, S. 10. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/1755-8794-1-10>.
- Savage, C. *et al.* (1996) „Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(2), S. 790–794. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.2.790>.
- Schmierer, B. und Hill, C.S. (2007) „TGF β -SMAD signal transduction: Molecular specificity and functional flexibility“, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, S. 970–982. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nrm2297>.
- van Schoor, N. und Lips, P. (2017) „Global Overview of Vitamin D Status“, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 46(4), S. 845–870. Verfügbar unter: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecl.2017.07.002>.
- van Schoor, N.M. und Lips, P. (2011) „Worldwide vitamin D status“, *Best Practice & Research*

Clinical Endocrinology & Metabolism, 25(4), S. 671–680. Verfügbar unter: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.beem.2011.06.007>.

Sekelsky, J.J. *et al.* (1995) „Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*.“, *Genetics*, 139(3), S. 1347. Verfügbar unter: <http://www.genetics.org/content/139/3/1347.abstract>.

Serini, G. und Gabbiani, G. (1999) „Mechanisms of Myofibroblast Activity and Phenotypic Modulation“, *Experimental Cell Research*, 250(2), S. 273–283. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1006/EXCR.1999.4543>.

Shany, S., Sigal-Batikoff, I. und Lamprecht, S. (2016) „Vitamin D and Myofibroblasts in Fibrosis and Cancer: At Cross-purposes with TGF- β /SMAD Signaling“, *Anticancer Research*, 36(12), S. 6225–6234. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.21873/anticancer.11216>.

Shaw, R.B. *et al.* (2007) „Dupuytren’s disease: History, diagnosis, and treatment“, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 120(3). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1097/01.PRS.0000278455.63546.03>.

Shi, Q. und MacDermid, J.C. (2011) „Is surgical intervention more effective than non-surgical treatment for carpal tunnel syndrome? a systematic review“, *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 6(1), S. 17. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/1749-799X-6-17>.

Smith, P.K. *et al.* (1985) „Measurement of protein using bicinchoninic acid“, *Analytical Biochemistry*, 150(1), S. 76–85. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).

Song, Y. *et al.* (2013) „Blood 25-Hydroxy Vitamin D Levels and Incident Type 2 Diabetes: A meta-analysis of prospective studies“, *Diabetes Care*, 36(5), S. 1422–1428. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.2337/DC12-0962>.

Spiro, A. und Buttriss, J.L. (2014) „Vitamin D: An overview of vitamin D status and intake in Europe“, *Nutrition Bulletin*. Wiley-Blackwell, S. 322–350. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/nbu.12108>.

Stamp, T.C.B. (1973) „Vitamin D metabolism. Recent advances“, *Archives of Disease in Childhood*, 48(1), S. 2–7. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4346640> (Zugegriffen: 7. Mai 2018).

Stanulis-Praeger, B.M. (1987) „Cellular Senescence revisited: a review“, *Mechanisms of Ageing and Development*, 38(1), S. 1–48. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(87\)90109-6](https://doi.org/10.1016/0047-6374(87)90109-6).

Sterling, T.D. (1959) „Publication Decisions and Their Possible Effects on Inferences Drawn from Tests of Significance--Or Vice Versa“, *Journal of the American Statistical Association*, 54(285), S. 30. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.2307/2282137>.

Strom, M. *et al.* (1989) „1,25-Dihydroxyvitamin D₃ up-regulates the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in vivo.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(24), S. 9770–3. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.9770>.

Subramaniam, N. *et al.* (2001) „Cross-talk between 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and Transforming Growth Factor- β Signaling Requires Binding of VDR and Smad3 Proteins to Their Cognate DNA Recognition Elements *“, *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), S. 15741–15746. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1074/JBC.M011033200>.

Tan, X., Li, Y. und Liu, Y. (2007) „Therapeutic role and potential mechanisms of active Vitamin D in renal interstitial fibrosis“, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 103(3–5), S. 491–496. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.11.011>.

The J-DAVID Investigators (2018) „Effect of Oral Alfacalcidol on Clinical Outcomes in Patients

Without Secondary Hyperparathyroidism Receiving Maintenance Hemodialysis: The J-DAVID Randomized Clinical Trial“, *JAMA*, 320(22), S. 2325–2334. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1001/JAMA.2018.17749>.

The National Heart Lung and Blood Institute PETAL Clinical Trials Network (2019) „Early High-Dose Vitamin D 3 for Critically Ill, Vitamin D-Deficient Patients“, *New England Journal of Medicine*, 381(26), S. 2529–2540. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1056/NEJMOA1911124/SUPPL_FILE/NEJMOA1911124_DATA-SHARING.PDF.

Thermo Fisher Scientific Inc. (2003) „NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents“.

Tomasek, J.J. *et al.* (2002) „Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling“, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, S. 349–363. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nrm809>.

Udomsinprasert, W. und Jittikoon, J. (2019) „Vitamin D and liver fibrosis: Molecular mechanisms and clinical studies“, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS, S. 1351–1360. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.140>.

Unholzer, S., Rothmund, A. und Haen, E. (2017) „Alleskönner Vitamin D?“, *Der Nervenarzt*, 88(5), S. 489–494. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00115-016-0278-7>.

Vaughan, M.B. *et al.* (2014) „A new bioassay identifies proliferation ratios of fibroblasts and myofibroblasts“, *Cell Biology International*, 38(8), S. 981–986. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/CBIN.10289>.

Vidailhet, M. *et al.* (2012) „Vitamin D: Still a topical matter in children and adolescents. A position paper by the Committee on Nutrition of the French Society of Paediatrics“, *Archives de Pédiatrie*, 19(3), S. 316–328. Verfügbar unter: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arcped.2011.12.015>.

Wahl, D.A. *et al.* (2012) „A global representation of vitamin D status in healthy populations“, *Archives of Osteoporosis*, 7(1), S. 155–172. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s11657-012-0093-0>.

Wang, F. *et al.* (2021) „High-dose vitamin D3 supplementation ameliorates renal fibrosis by vitamin D receptor activation and inhibiting TGF- β 1/Smad3 signaling pathway in 5/6 nephrectomized rats“, *European Journal of Pharmacology*, 907, S. 174271. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2021.174271>.

Wang, Y., Zhu, J. und DeLuca, H.F. (2012) „Where is the vitamin D receptor?“, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 523(1), S. 123–133. Verfügbar unter: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.001>.

WHO/FAO (2004) „Vitamin and mineral requirements in human nutrition Second edition“. World Health Organization, S. 341. Verfügbar unter: <https://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241546123/en/#.Xr6jLZLVW-M.mendeley> (Zugegriffen: 15. Mai 2020).

WHO Scientific Group on the Prevention and Management of Osteoporosis (2003) „Prevention and management of osteoporosis : report of a WHO scientific group“. Geneva: World Health Organization (WHO technical report series ; 921). Verfügbar unter: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42841>.

van der Wielen, R.P.J. *et al.* (1995) „Serum vitamin D concentrations among elderly people in Europe“, *The Lancet*, 346(8969), S. 207–210. Verfügbar unter: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)91266-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)91266-5).

Wroblewski, B.M. (1973) „Carpal tunnel decompression and Dupuytren’s Contracture.

(Preliminary report“, *The Hand*, 5(1), S. 69–70. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/0072-968X\(73\)90014-4](https://doi.org/10.1016/0072-968X(73)90014-4).

Wynn, T. (2008) „Cellular and molecular mechanisms of fibrosis“, *The Journal of Pathology*, 214(2), S. 199–210. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/path.2277>.

Xu, Y., Qian, J. und Yu, Z. (2019) „Budesonide up-regulates vitamin D receptor expression in human bronchial fibroblasts and enhances the inhibitory effect of calcitriol on airway remodeling“, *Allergologia et Immunopathologia*, 47(6), S. 585–590. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/J.ALLER.2019.05.001>.

Yanagisawa, J. *et al.* (1999) „Convergence of transforming growth factor- β and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators“, *Science*, 283(5406), S. 1317–1321. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.283.5406.1317/ASSET/75CE3FD7-8E77-4077-B461-B4175F135F8C/ASSETS/GRAPHIC/SE079727504A.JPEG>.

Zavadil, J. und Böttinger, E.P. (2005) „TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions“, *Oncogene*. Nature Publishing Group, S. 5764–5774. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208927>.

Zella, L.A. *et al.* (2006) „Enhancers located within two introns of the vitamin D receptor gene mediate transcriptional autoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃“, *Molecular Endocrinology*, 20(6), S. 1231–1247. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1210/me.2006-0015>.

Zerajic, D. und Finsen, V. (2004) „Dupuytren’s disease in Bosnia and Herzegovina. An epidemiological study“, *BMC Musculoskeletal Disorders*, 5, S. 10. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/1471-2474-5-10>.

Zerr, P. *et al.* (2015) „Vitamin D receptor regulates TGF- β signalling in systemic sclerosis“, *Annals of the rheumatic diseases*, 74(3), S. e20. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204378>.

Zhang, G.Y. *et al.* (2011) „Vitamin D: a novel therapeutic approach for keloid, an in vitro analysis“, *British Journal of Dermatology*, 164(4), S. 729–737. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.10130.x>.

Zhou, Y., Liu, Y. und Tan, J. (2006) „Is 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells in vitro?“, *Chinese medical journal*, 119(15), S. 1278–86. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16919187>.

Zhu, W. *et al.* (2021) „Vitamin D₃ alleviates pulmonary fibrosis by regulating the MAPK pathway via targeting PSAT1 expression in vivo and in vitro“, *International Immunopharmacology*, 101, S. 108212. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2021.108212>.

6 Anhang

6.1 Standard Operating Procedures des Labors zu „Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung“ sowie „Western Blot Semi-Dry Blotting“

(Version von Mai bzw. April 2020 inhaltsgleich mit der zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung gültigen Version)

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.05.20

Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

1. Zweck und Geltungsbereich:

How the BCA Protein Assay Detects Protein:

The BCA Protein Assay combines the well-known reduction of Cu^{2+} to Cu^{1+} by protein in an alkaline medium with the highly sensitive and selective colorimetric detection of the cuprous cation (Cu^{1+}) by bicinchoninic acid. The **first step is the chelation of copper with protein in an alkaline environment to form a light blue complex**. In this reaction, known as the biuret reaction, peptides containing three or more amino acid residues form a colored chelate complex with cupric ions in an alkaline environment containing sodium potassium tartrate.

In the second step of the color development reaction, bicinchoninic acid (BCA) reacts with the reduced (cuprous) cation that was formed in step one. The intense purple-colored reaction product results from the chelation of two molecules of BCA with one cuprous ion. **The BCA/copper complex is water-soluble and exhibits a strong linear absorbance at 562 nm** with increasing protein concentrations. The BCA reagent is approximately 100 times more sensitive (lower limit of detection) than the pale blue color of the first reaction

2. Definitionen / Begriffe:

3. benötigte Geräte:

Gerät / Hersteller	Geräte-Nr.
Ultraschallgerät UP50H mit Sonotrode MS1, Welabo	Nicht nötig
Ultra-Turrax, Welabo	Nicht nötig
Victor 3, Perkin Elmer	Nicht nötig

4. benötigte Materialien:

Beschreibung / Hersteller	Material / Bestell-Nr.
Dulbecco's PBS w/o Mg/ Ca / Biochrom	L1825
Sodium dodecylsulfate (SDS), Sigma	L-3771
Nonidet-P40, Biomol	N3500
Na-deoxycholat, Roth	3484.1
Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo	23225
Complete, Mini, Roche	11 836 153 001
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5ml	0030.120.086
96-F-Mikrotiterplatten	

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.05.20 Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

5. benötigte Lösungen:

RIPA-Puffer nach Abcam (Lagerung bei 4°C unbegrenzt):

50 mM Tris pH = 8
150 mM NaCl
1 % NP-40
0,5 % Na-deoxycholat
0,1 % SDS

RIPA+Complete

1 Tablette Complete, Mini in 10 ml RIPA lösen (bei sehr starker Proteaseaktivität 1 Tab./7 ml RIPA). Aliquots a 1 ml machen und diese bei -20°C lagern (12 Wochen!!)

6. Durchführung:

6.1 Proteinisolation

A. Zellen:

Zellpellet in RIPA+Complete kann für längere Zeit bei -80°C aufbewahrt werden.
Zur Zell-Lyse stark vortexen,, anschließend Probe sonifizieren (2 x 30 sec)
(10 Stöße).

B. Gewebe:

Gewebestück in RIPA+Complete homogenisieren, anschließend mehrmals sonifizieren, Zellrümer für 10 min bei 10 000 rpm und 4°C abzentrifugieren und Überstand in ein neues Eppi sammeln.

6.2 Herstellung des BSA Standards

Jede Ampulle enthält 1 ml BSA Standard in einer Konz. von 2 mg/ml.

Sensitivität beträgt **125-2000 µg/ml = 0,125-2 µg/µl** (zum Vergleich: der Dc Protein Assay Kit von BioRad hat eine Sensitivität von 0,2-1,5 µg/µl).

Standard in saubere Eppis ansetzen und Reste bei -20°C aufbewahren.
Kennzeichnung:

In was ist Standard angesetzt?

Wer hat angesetzt?

Wann wurde angesetzt?

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.05.20

Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

Konzentration (µg/µl)	Probe	BSA-Standard (µl)	PBS oder RIPA (µl)
2	A	300	0
1,5	B	375	125
1,0	C	325	325
0,75	D	175 von B	175
0,5	E	325 von C	325
0,25	F	325 von E	325
0,125	G	325 von F	325
0,025	H	100 von G	400
0 = BLANK	I	0	400

6.3 Herstellung des BCA Working Reagent (WR)

Volumen des WR nach folgender Formel bestimmen:

$$(\# \text{ standard} + \# \text{ Proben}) \times (\# \text{ Anzahl Replikate}) \times (\text{Volumen WR pro Probe} = 200 \mu\text{l}) = \text{Volumen WR}$$

Beispiel mit 3 Proben:

$(9 + 3) \times 2 \times 200 \mu\text{l} = 4,8 \text{ ml WR}$ benötigt (immer etwas mehr ansetzen als man für den Ansatz braucht!)

WR ansetzen: 50 Teile Reagent A + 1 Teil Reagent B (**50:1, Reagent A:B**). Für das obere Beispiel: 5 ml A + 100 µl B. WR ist stabil für mehrere Tage wenn es geschlossen bei RT aufbewahrt wird.

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.05.20 **Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung**

6.3 Microplate Assay Protocol

- Proben werden 1:6 mit PBS verdünnt, dicke Zellpellets werden / können auch bis 1:20 verdünnt. (4µl Probe und 20µl PBS =1:6) mixen!!!
- Je 10 µl Standard bzw. Probe in eine 96well Platte pipettieren (Duplets!)
- 200 µl WR zusetzen und Platte auf dem Schüttler für 30 sec platzieren
- Platte mit einem Deckel / Folie schließen und 30 min bei 37°C (Brutschrank) inkubieren
- Platte auf RT abkühlen
- Absorption bei **562 nm** (Inkubationszeit kann bis auf 2 h verlängert werden). Die Absorption kann generell bei einer Wellenlänge von 540-590 nm gemessen werden.

7. Änderungsdienst:

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.04.2020 Western Blot Semi-Dry Blotting

1. Zweck und Geltungsbereich:

Diese Arbeitsanweisung regelt die Abläufe für den elektrophoretischen Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran und anschließende Detektion unter Verwendung von mono- und/oder polyklonaler Antikörper.

2. Definitionen / Begriffe:

TBS:	Tris-gepufferte Salzlösung
RT:	Raumtemperatur
SDS:	Natriumdodecylsulfat
APS:	Ammoniumpersulfat
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
AK:	Antikörper

3. benötigte Geräte:

Gerät / Hersteller	Geräte-Nr.
Mini-PROTEAN Tetra Cell / BioRad	Nicht nötig
BioRad Turbo Blot	Nicht nötig
PowerPac HC Power Supply / BioRad	Nicht nötig
Schüttler	

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.04.2020 Western Blot Semi-Dry Blotting

4. benötigte Materialien:

Beschreibung / Hersteller	Material / Bestell-Nr.
Glasplatten (0,75 mm), BioRad	165-3329
Casting Stands, BioRad	165-3303
Casting Frames, BioRad	165-3304
Filterpapier 2,5 mm, Invitrogen	LC2010
Nitrocellulose-Membran (0,2 µm), VWR	39-1010
Falconröhrchen	
Tris HCl, Calbiochem	648317
Tris Base, Calbiochem	648310
30 % Acrylamide/Bis Solution 37,5:1, BioRad	161-0158
Glycin, Roth	3908.2
APS, Sigma	A-3678
TEMED, Roth	2367.3
PonceauS, Serva	33427
Methanol, Merck	1.06009.2511
SDS, VWR	444464T
Mercaptoethanol, Sigma	M7154
Glycerol, Roth	3783.1
Bromphenolblau, Roth	A512.1
Tween 20, Sigma	P5927
Roti-Mark Western Set, Roth	0947.1
BSA, Roth	
Milchpulver, Roth	T145.2
ECL Western Blotting Substrate, Pierce (Thermo)	32209

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.04.2020 Western Blot Semi-Dry Blotting

5. Durchführung:

5.1 Lösungen & Puffer

Laufpuffer (Elphopuffer) (kein pH einstellen!!)

1 x Puffer	für 10 x Puffer
25 mM Tris, pH 8,3-8,8	30,3 g
192 mM Glycin	144,2 g
0,1 % SDS	10 g
	ad 1000 ml H ₂ O

Tris-Glycine Transferpuffer (kein pH einstellen) - 6 Monate bei RT haltbar!

1 x Puffer	für 25 x Puffer
12 mM Tris-Base	18,2 g
96 mM Glycin	90 g
	ad 500 ml H ₂ O

Blotting-Puffer (2 x Tris-Glycine Transferpuffer)

	<u>Für 2 Minigele</u>	<u>Für 4 Minigele</u>
25 x Transferpuffer	40 ml	60 ml
Methanol	50 ml	75 ml
H ₂ O	ad 500 ml	ad 750 ml

4 x Trenngelpuffer

1,5 M Tris 91 g (**pH 8,8**)
0,4 % SDS 2 g SDS
 ad 500 ml H₂O

4 x Sammelgelpuffer

0,5 M Tris 6,05 g (**pH 6,8**)
0,4 % SDS 0,4 g SDS
 ad 100 ml H₂O

Ponceau S (dunkel bei RT aufbewahren, kann mehrmals verwendet werden)

0,1 % Ponceau

3 % Trichloressigsäure

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.04.2020 Western Blot Semi-Dry Blotting

5.2 Giessen von SDS-Polyacrylamidgelen

Glasplatten mit 70 % EtOH reinigen und die Gelgiessapparatur zusammenbauen

Abbildung, die das
Zusammensetzen der
Gelgiessapparatur zeigt,
aus Urheberrechtsgründen
entfernt

Abbildung, die die
zusammengesetzte
Apparatur zeigt, aus
Urheberrechtsgründen
entfernt

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.04.2020 Western Blot Semi-Dry Blotting

Die folgenden Tabellen enthalten Mengenangaben für die Zusammensetzung der SDS-Gele

Mengenangaben 1 Trenngel

	%	30% Acrylamid (ml)	H2O (ml)
>250kDa	5	1,25	4,375
250-120 kDa	7,5	1,875	3,75
120-40 kDa	10	2,5	3,125
40-15 kDa	12	3	2,625
<20 kDa	15	3,75	1,875

Mengenangaben 2 Trenngele

%	30% Acrylamid (ml)	H2O (ml)
5	2,5	8,75
7,5	3,75	7,5
10	5	6,25
12	6	5,25
15	7,5	3,75

jeweils + 1,875 ml 4 x Trenngelpuffer
+ 10 µl TEMED
+ 25 µl 10% APS

jeweils + 3,75 ml 4 x Trenngelpuffer
+ 20 µl TEMED
+ 50 µl 10% APS

ACHTUNG: Der Polymerisationsprozess startet sofort nach Zugabe von APS. Daher APS erst zum Schluss zugeben und die Gelkomponenten durch schwenken vermischen.

Das Gel wird sofort zwischen die Glasplatten gegossen (mit Hilfe einer Pipette, einmal Auf- und Abpipettieren).

Das Trenngel wird sofort mit 70 % EtOH überschichtet. Nach der Polymerisation (20 min) das EtOH abgießen und durch das Sammelgel ersetzen.

Mengenangaben 1 Sammelgel

650 µl 30% Acrylamid
3 ml H2O
1,25 ml 4 x Sammelgelpuffer
10 µl TEMED
25 µl 10% APS

Mengenangaben 2 Sammelgele

1300 µl 30% Acrylamid
6 ml H2O
2,5 ml 4 x Sammelgelpuffer
20 µl TEMED
50 µl 10% APS

Jetzt den Kamm einsetzen und ca. 20 min warten bis das Gel auspolymerisiert.

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.04.2020 Western Blot Semi-Dry Blotting

Zurzeit werden nur fertige Gele verwendet!!!

Mini-Protean TGX Stain-Free Gels, 4-15%, 12%..etc....

15-well / slots, 15µl maximales Probenvolumen

Proben mit Laemmli-Puffer (1:4 zur Probe) versetzen und 5 min bei 95 °C erhitzen.

Proben sofort auf Eis und das Gel beladen, Proteinleiter nicht vergessen!!!

Bei Verwendung eines 10 er Kamm

Maximales Probenvolumen bei 0,75 mm Gelen: ~25 µl

Maximales Probenvolumen bei 1,0 mm Gelen: ~35 µl

Maximales Probenvolumen bei 1,5 mm Gelen: ~45 µl

Bei Verwendung eines 15 er Kamm

Maximales Probenvolumen bei 1,0 mm Gelen: bis 16 µl

5.3 SDS-PAGE

Kammer mit Laufpuffer auffüllen, mit **60 V** starten und sobald die Proteine durch das Sammelgel gewandert sind mit **110-130 V** fortsetzen, 20 min.

Dauer: 1-2 Stunden. Stoppen, wenn der Marker anfängt auszulaufen.

Abbildung, die den Prozess
der Proteinauftrennung
veranschaulicht, aus
Urheberrechtsgründen
entfernt

Abbildung der
zusammengesetzten Kammer,
aus Urheberrechtsgründen
entfernt

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.04.2020 Western Blot Semi-Dry Blotting

Mini-Protean TGX Stain-Free Gels werden nach dem Gellauf im ChemiDoc MP detektiert, das ist notwendig für die Normalisierung der Proben!!!!

5.4 Transfer

Nach dem Gellauf, erfolgt die Aufnahme des Gels mit dem ChemiDoc MP

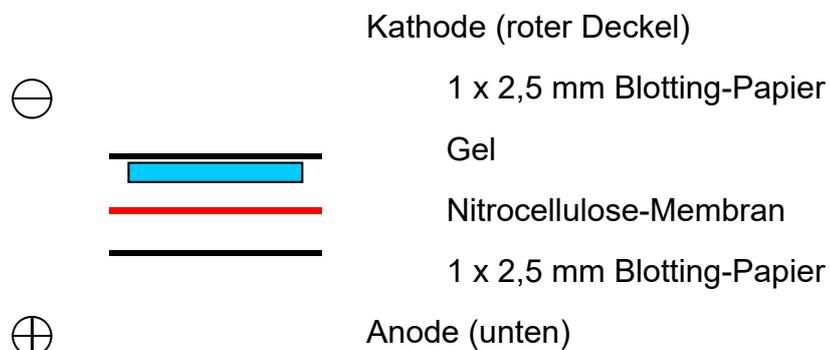
Kurz die Gele in Blotting-Puffer äquilibrieren lassen.

Aufbau des Transfers:



- Blotting-Papier und Membran werden vor dem Aufbau in Blotting-Puffer befeuchtet. Luftblasen entfernen!

Transfer wie aufgelistet aufbauen:



Transferzeit: hängt ab vom Wassergehalt des Gels, Bsp. 12%iges Gel

15 min, andere Gele für 10-30 min bloten!

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.04.2020 Western Blot Semi-Dry Blotting

Optional (früher)

Anschließend Ponceau S-Färbung der Membran (2-3 min). Membran mit Wasser und anschließend mit TBS / 0,1 % Tween20 entfärben.

5.5 Immunmarkierung

Je nach Antikörper und Herstellerangaben sind Puffer und Inkubationszeiten unterschiedlich. Die tatsächliche Vorgehensweise kann daher von diesem Protokoll abweichen (siehe AK-data sheet)

- Blocken der Membran für 1 Std. bei RT mit TBS / 0,1 % Tween 20 (TBS/T) + 5 % Milchpulver oder 5 % BSA (oder ON bei 4°C)
- Inkubation mit dem 1. AK in TBS / 0,1 % Tween 20 (TBS/T) + BSA oder Milchpulver (1-5 %) für **2 Std. bei RT** oder ON bei 4°C
- 3 x 5 min waschen mit TBS/T (=Waschpuffer)
- Inkubation mit dem 2. AK in Waschpuffer für 1 Std. bei RT (DUNKEL)
- 3 x 5 min waschen mit Waschpuffer (DUNKEL), die Blots werden in TBS aufbewahrt.
- Detektion mit ChemiDoc MP

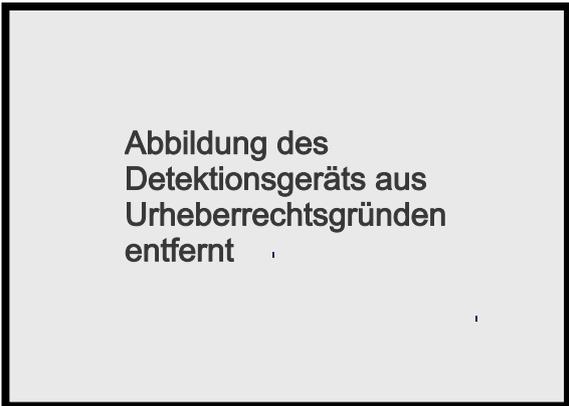
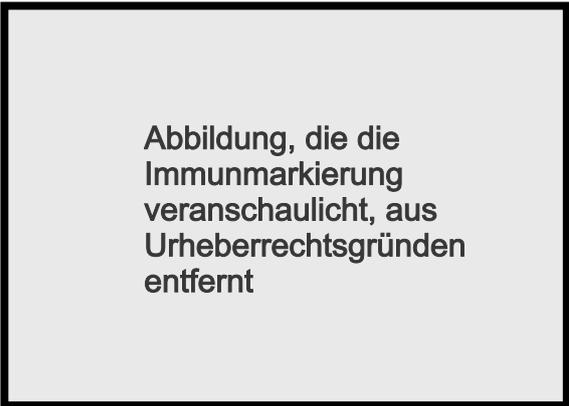


Abbildung des
Detektionsgeräts aus
Urheberrechtsgründen
entfernt



Abbildung, die die
Immunmarkierung
veranschaulicht, aus
Urheberrechtsgründen
entfernt

6. Änderungsdienst:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Professor Christoph V. Suschek für die Chance bedanken, im Rahmen einer Promotion im Forschungslabor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie in Zusammenarbeit mit Professor Joachim Windolf das systematische und methodische experimentelle Forschen zu erlernen. Danke Christoph, dass deine Tür wortwörtlich sowie sprichwörtlich immer offen gestanden hat, Feedback zu meiner Arbeit stets prompt kam und ich von dir immer konstruktive Vorschläge sowie ermutigende Worte erhalten habe. Vielen Dank auch an Herrn PD Dr. Csaba Mahotka für die Co-Betreuung meiner Arbeit.

Weiterer Dank gilt dem gesamten Team des Forschungslabors und allen, die an der Instandhaltung und Belieferung der Räumlichkeiten beteiligt sind. Danke auch an alle Gewebespendenden sowie an das Team von Ärztinnen und Ärzten der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des UKD für die Einholung der Einverständniserklärungen und Bereitstellung der Proben für die Zellkulturen. Einen besonderen Dank außerdem an Samira Seghrouchni, Jutta Schneider und Christa Wilkens für die Einarbeitung in Abläufe, Gerätebedienung und Aufgaben im Labor. Danke, dass ich mich bei praktischen Problemen und Fragestellungen jederzeit an euch wenden konnte.

Zuletzt möchte ich mich bei jenen bedanken, ohne deren Hilfe ich ein so umfangreiches Projekt nicht hätte realisieren können. Danke an meine Eltern, dass ihr mich immer ermutigt habt, weiterzumachen. Danke an Jan-Philipp Cieslik und meine Familie für das Korrekturlesen. Danke an die Liebe meines Lebens, Katerina Askeridis, für deine Liebe und bedingungslose Unterstützung in ausnahmslos jeder Lebens- und Gemütslage.