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

Die Charakterisierung der antifibrotischen Wirkung von blauem Licht (λ=453 nm) und die Rolle des *Extrazelluläre- Domäne A*-Fibronektins (EDA- FN) und seiner fibroblastulären Rezeptoren in der Pathogenese des Morbus Dupuytren

Dissertation

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

> vorgelegt von Nathalie Gaßmann 2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Suschek Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka



Zusammenfassung

Zu den an den häufigsten vererbten Krankheiten des Bindegewebes zählt der Morbus Dupuytren (MD), eine fibroproliferative Krankheit der Palmaraponeurose. Es sind vor allem Männer im mittleren Alter betroffen und man nimmt an, dass neben einer genetischen Prädisposition auch andere Einflussfaktoren, wie beispielsweise wiederholte Traumata, Alkohol- oder Nikotinabusus eine Rolle spielen. Ausgehend von Veränderungen in der Dermis und Palmarfaszie kann der Morbus Dupuytren eine permanente und irreversible Kontraktur der Finger verursachen. Die dafür wesentlich verantwortliche Zellpopulation sind differenzierte Fibroblasten, sogenannte Myofibroblasten, welche im erkrankten Gewebe vermehrt exprimiert werden. Diese sind durch kontraktile Eigenschaften sowie einer vermehrten Proteinexpression von alpha-smooth-muscle-actin (α-SMA) gekennzeichnet. Ein Faktor, welcher die Myofibrogenese im Wesentlichen beeinflusst ist der Wachstumsfaktor TGF-β. Die veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM) sowie ihrer Komponenten spielt eine weitere Kernfunktion in der Pathogenese. Fibronektin (FN) ist einer der Hauptbestandteile dieser und beinhaltet eine durch alternatives Spleißen hervorgehende Domäne A (EDA). Dieses bindet über Transmembranrezeptoren, sogenannte Integrine, mit der EZM und setzt somit intrazelluläre Signale in Gang, welche ebenfalls mit der Fibroblastendifferenzierung assoziiert sind. Therapeutisch sind rein konservative Maßnahmen meist erfolglos. Bei starken Beschwerdesymptomatik sind daher operative Maßnahmen indiziert, jedoch ist eine Heilung meist nicht möglich und Rezidive sind nicht selten. Da Blaulicht eine proliferationshemmende Wirkung aufweist und bereits in anderen Feldern der Medizin Anwendung findet, ist ein neuer, konservativer Therapieansatz mittels Bestrahlung denkbar.

Mit Hilfe dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss blaues Licht (λ =453 nm) auf die Expression verschiedenster Proteine in der Pathogenese des MD hat. Hierbei lag der Fokus vor allem auf dem Surrogat Parameter α -SMA, dem Fibronektin-EDA sowie der Integrine β 1, β 4 und β 7. Untersucht wurde die Expression der genannten Komponenten unter verschiedenen Behandlungen, zu welchen die Zugabe eines Wachstumsfaktors, als in vitro Induktion einer Myofibrogenese, sowie die Bestrahlung mit blauem Licht zählt. Mittels Western Blot, FACS Analyse sowie Immunhistochemie konnte das Verhalten der Fibroblasten visualisiert und analysiert werden. Diese Methodik zeigte, dass einerseits sowohl die Stimulation der Fibroblasten mittels TGF- β 1 nicht nur die Proliferation, sondern auch die Differenzierung verstärkt, andererseits auch Zellbestrahlung mit Blaulicht (80 J/cm²) mit einer Wellenlänge von 453 nm im Speziellen bei TGF- β 1 stimulierten Fibroblasten in einer signifikanten Reduktion der α -SMA Proteinexpression resultiert. Betrachtet man nun die Expression des FN-EDAs ist ein simultanes Verhalten zu vernehmen.

Ergänzend hierzu stellt sich nun die Frage welche fibroblastulären Rezeptoren in der Pathophysiologie eine tragende Rolle spielen. Anlehnend untersuchten wir drei verschiedene Integrine, wobei vor allem das Integrin β1, welches eine essentielle Rolle im Rahmen der Kontraktion der Myofibroblasten sowie Bildung von Zell-Matrixkontakten spielt, von relevanter Bedeutung zu sein scheint. Dieses korreliert in seinem Verhalten mit des FN-EDAs, hinsichtlich einer progressiven Expression nach Aktivierung sowie regressiven Expression nach Bestrahlung und dies bestätigen auch unsere Ergebnisse, sodass hier eine positive Korrelation hinsichtlich der Myofibrogenese sowie der Integrin β1-Expression zu postulieren ist. Zum anderen das Integrin β4, welches als relevanter Ligand für Laminin seine Bedeutung in der Entstehung für Zelladhäsionen trägt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieses insbesondere in den Zellkulturen des MD vermehrt exprimiert wird und eine Bestrahlung v.a. in den aktivierten Zellen zu einer Reduktion der Expression führt. Im Rahmen der Untersuchungen des Integrins β7 waren keinerlei relevante Korrelationen ersichtlich,

Summa summarum kann eine positive Korrelation zwischen der Myofibrogenese, dessen Inhibition durch Blaulicht sowie dem Auftreten von FN-EDAs sowie seiner fibroblastulären Rezeptoren, insbesondere der Integrine $\beta 1$ und $\beta 4$ in der Pathogenese des MD attestiert werden und folglich diese einen neuen Therapieansatz hinsichtlich non-invasiver Therapieverfahren auch im Rahmen einer *Targeted Therapy* darstellen.

Summary

One of the most commonly inherited connective tissue diseases is Dupuytren's disease (MD), a fibroproliferative disease of the palmar aponeurosis. Middle-aged men are particularly affected, and it is assumed that in addition to a genetic predisposition, other influencing factors such as repeated trauma, alcohol or nicotine abuse also play a role. Originating from changes in the dermis and palmar fascia, Dupuytren's disease can cause permanent and irreversible contracture of the fingers. The cell population largely responsible for this are differentiated fibroblasts, so-called myofibroblasts, which are increasingly expressed in the diseased tissue. These are characterized by contractile properties and increased protein expression of alpha-smooth muscle actin (α-SMA). A factor that essentially influences myofibrogenesis is the growth factor TGF-β. The altered composition of the extracellular matrix (ECM) and its components plays another core function in the pathogenesis. Fibronectin (FN) is one of the main components of these and contains an alternative splicing domain A (EDA). This binds to the ECM via transmembrane receptors, so-called integrins, and thus initiates intracellular signals, which are also associated with fibroblast differentiation. Purely conservative measures are usually therapeutically unsuccessful. If the symptoms are severe, surgical measures are indicated, but a cure is usually not possible, and recurrences are not uncommon. Since blue light has an anti-proliferation effect and is already used in other fields of medicine, a new, conservative therapeutic approach using radiation is conceivable.

This work was intended to investigate the influence of blue light (λ =453 nm) on the expression of various proteins in the pathogenesis of MD. The focus here was primarily on the surrogate parameter α -SMA, the fibronectin-EDA and the integrins β 1, β 4 and β 7. The expression of the components mentioned was examined under various treatments, which included the addition of a growth factor, in vitro induction of myofibrogenesis, and irradiation with blue light. The behavior of the fibroblasts could be visualized and analyzed using Western blot, FACS analysis and immunohistochemistry. This methodology showed that, on the one hand, stimulation of fibroblasts using TGF-β not only increased proliferation but also differentiation, and on the other hand, cell irradiation with blue light (80 J/cm2) with a wavelength of 453 nm stimulated TGF-β1 in particular fibroblasts resulting in a significant reduction in α-SMA protein expression. If one now looks at the expression of the FN-EDA, a simultaneous behavior can be found. In addition, the question now arises as to which fibroblastular receptors play a key role in the pathophysiology. We examined three different integrins, with the integrin $\beta 1$ in particular, which plays an essential role in the contraction of myofibroblasts and the formation of cell-matrix contacts, appearing to be of relevant importance. This correlates in its behavior with FN-EDA, with regard to progressive expression after activation and regressive expression after irradiation and our results also confirm this, so that a positive correlation with regard to myofibrogenesis and integrin β1 expression can be postulated here. On the other hand, the integrin β4, which, as a relevant ligand for laminin, is important in the development of cell adhesions. In this work it was shown that this is increasingly expressed, particularly in the cell cultures of the MD, and that irradiation leads to a reduction in expression, especially in the activated cell line. No relevant correlations were apparent in the investigations of integrin β7,

All in all, a positive correlation can be attested between myofibrogenesis, its inhibition by blue light and the appearance of FN-EDAs as well as its fibroblastular receptors, in particular the integrins $\beta 1$ and $\beta 4$ in the pathogenesis of MD and consequently this represents a new therapeutic approach with regard to non-invasive therapeutic procedures also present in the context of targeted therapy.

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
$^{\circ}C$	Grad Celsius
α-SMA	alpha-Smooth Muscle Actin
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μт	Mikrometer
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ALA	Delta-Amino-Lävulinsäure
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destilata
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
<i>Ca2</i> +	Kalzium (-Ionen)
Cl	Chlorid
ст	Centimeter
Cu	Kupfer
Da	Dalton = atomare Masseneinheit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, mit Calcium und Magnesium
DPI	Diphenyleneiodonium
ED-A	Extra domain A
ED-B	Extra domain B
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extracellular-signal-regulated Kinasen
EZM	Extrazelluläre Matrix
FA	Fokale Adhäsionen
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast growth factor
FN	Fibronektin
g	Gramm
<i>GAPDH</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde

H2O Wasserstoffdioxid

Hämatoxylin-Eosin

Insulin like growth factor

IL-1 Interleukin-1

In vitro unter kontrollierten Bedingungen, hier: in Zellkulturschalen

In vivo im lebenden Organismus

IPL Intense pulsed light therapy

I-Smad Inhibitorische Smad

J Joule k Kilo-

LED Light-emitting diode
LLLT Low-level light therapy

m Meter

M Molare Masse

MAPK Mitogen-Activated Protein Kinase

MgMagnesiummgMilligrammminMinutenmlMillilitermmMillimeter

mM Milimol

NADH Nicotinamidadenindinukleotid

NADPNicotinamidadenindinukleotidphosphatNADPHNicotinamidadenindinukleotidphosphat

NF- κ Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells

ngNanogrammnmNanogrammNOXNADPH Oxidase

PAGE Polyacylamid-Gelelektrophorese

PBS Phosphate buffered saline
PBS-T Tris buffer saline with tween
PDGF Plateelet Derived growth factor

pH potentia Hydrogenii

RIPA Radio-Immunoprecipitation Assay (Lysispuffer für Western Blot)

ROSReaktive SauerstoffspeziesrpmRevolutions per minute

R-Smad Rezeptor-aktiviertes Smad SDS Sodium dodecyl sulfte

Sek. Sekunden

α-sma SMA=small body size, MAD=mother against decapentaplegic

Std. Stunden

TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
W	Watt

Inhaltsverzeichnis

1 Ei	inlei	itung	1
1.1	Z	Ziele der Arbeit	1
1.2		Morbus Dupuytren	
1.2	2.1	Definition	
1.2	2.2	Historie	
	2.3	Ätiologie	
	2.4	Epidemiologie	
	2.5	Histologische Stadien	
1.2	2.6	Klinik	
	2.7	Therapie	
1.3		Fibroblasten und Myofibrogenese	
1.3	3.1	Fibroblasten	
1.3	3.2	Myofibroblasten und ihre Rolle in der Pathogenese des Morbus Dupuytren	6
1.3	3.3	Extrazelluläre Matrix und ihre Komponenten	
1.3	3.4	Enzyme, Rezeptoren und Wachstumsfaktoren im Dupuytrengewebe	
1.4	L	icht	
1.4	4.1	Spektrum des Lichts	8
1.4	4.2	Molekulare Einflüsse des Lichtes in unserem Körper	8
1.4	4.3	UV-Strahlung und dessen Anwendung in der Medizin	
1.4	4.4	Blaues Licht	9
2 M	late	rial und Methoden	12
2.1		Material	
2.	1.1	Laborgeräte und Software	
	1.2	Chemikalien	
2.	1.3	Lösungen, Medien und Puffer	
	1.4	Antikörper	
2.2		Methoden	
	2.1	Patientenproben und Ethikvotum	
2.2	2.2	Zellkultur	
2.2	2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Western Blot Analyse	23
2.2	2.4	Durchflusszytometrie (FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting))	
2.2	2.5	Immunhistochemie für Kryoschnitte	
2.2	2.6	Statistische Auswertung	
3 E1	roek	onisse	
3.1	0	Vorarbeit: Proliferation und Differenzierung der Fibroblasten in der Pathogenese des	<u>4</u> 5
		Ourspetter	20

	3.2	Die Expression von α-SMA nach nach 3-tägiger Bestrahlung und/oder TGF-β-Aktivierun	g
		29	
	3.3	Die Expression von Fibronektin-EDA nach 3-tägiger Bestrahlung und/oder TGF-β-	
	Aktivie	erung	30
	3.4	Die Expression diverser Integrine nach nach 3-tägiger Bestrahlung und/oder TGF-β-	
	Aktivie	erung	32
	3.4.1	Das Expressionsverhalten des Integrins β1 nach 3-tägiger Bestrahlung und/oder TGF-β	}_
	Akti	vierung	32
	3.4.2	Das Expressionsverhalten des Integrins β4 nach 3-tägiger Bestrahlung und/oder TGF-β	}_
	Akti	vierung	35
	3.4.3	B Das Expressionsverhalten des Integrins β7 nach 3-tägiger Bestrahlung und/oder TGF-β	}_
	Akti	vierung	36
4	Disk	kussion und Schlussfolgerungen	38
	4.1	Die Rolle des Markerproteins α-SMA in der Pathogenese des Morbus Dupuytren	38
	4.2	Der Einfluss des Extrazelluläre- Domäne A-Fibronektins (EDA- FN) in der	
	Myofib	orogenese	40
	4.3	Rolle der fibroblastulären Rezeptoren in der Pathogenese des Morbus Dupuytren	40
	4.4	Antifibrotische Wirkung von Blaulicht der Wellenlänge λ=453 nm	42
	4.5	Etwaige Anwendung von blauem Licht in der Therapie des Morbus Dupuytren	46
5	Abb	oildungsverzeichnis	48
6	Tab	ellenverzeichnis	48
7	Lite	eraturverzeichnis	48

1 Einleitung

1.1 Ziele der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit war es die antifibrotischen Wirkung von blauem Licht (λ =453 nm) sowie die Rolle des Extrazelluläre- Domäne A-Fibronektins (EDA- FN) und seiner fibroblastulären Rezeptoren in der Pathogenese des Morbus Dupuytren zu untersuchen.

Mit Hilfe dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss blaues Licht (λ =453 nm) auf die Expression verschiedenster Proteine in der Pathogenese des MD hat. Hierbei lag der Fokus vor allem auf dem Surrogat Parameter α -SMA, dem Fibronektin-EDA sowie der Integrine β 1, β 4 sowie β 7. Untersucht wurde die Expression der genannten Komponenten unter verschiedenen Behandlungen, zu welchen die Zugabe eines Wachstumsfaktors sowie die Bestrahlung mit blauem Licht zählt. Mittels Western Blot und FACS Analyse konnte das Verhalten der Fibroblasten und die Myofibrogenese visualisiert und analysiert werden.

Im Rahmen dessen wurden folgende Hypothesen untersucht:

- Inwiefern TGFβ1 sowie eine Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge λ=453 nm in der Pathogenese des Morbus Dupuytren interferiert und diese beeinflusst. Hierbei diente das Protein α-SMA Protein als Surrogatparameter für die Fibroblastendifferenzierung/ Myofibrogenese.
- 2. Integrine stellen eine essentielle Rolle im Rahmen der intra- und interzellulären Signaltransduktion dar. Das Integrinprofil der Pathogenese des Morbus Dupuytren blieb bisher unerforscht, weshalb wir dies näher untersuchten und versuchten zu eruieren, ob speziellen Integrine eine erhöhte Signifikanz zukommen kann. Auch hier war es unser Ziel herauszufinden, ob die Bestrahlung einen Einfluss auf die Expression und somit einen inhibierenden Effekt auf die Myofibrogenese hat.

1.2 Morbus Dupuytren

1.2.1 Definition

Der Morbus Dupuytren, gekennzeichnet durch eine Streckbehinderung der Finger, ist eine Fibromatose der Palmaraponeurose. Durch Knoten- und Strangbildung in der Aponeurose kommt es zu einer Flexionskontraktur mit Einsteifung der Finger, welche die Subkutis und Haut, nicht jedoch die Sehnen der Hand beteiligt. Diese subkutanen Verdickungen der Hohlhand, welche sowohl ein- als auch beidseitig vorkommen können, betreffen vor allem die ulnaren Langfinger und führen im Verlauf zu einer Flexionskontraktur. In fortgeschrittenen Stadien berühren die Fingerkuppen die Hohlhand vollständig. Durch die daraus resultierende Extensionsunfähigkeit leiden die Patienten besonders unter einer Funktionsstörung der betroffenen Hand (1).

Stadium	Merkmale
0	Keine Krankheitszeichen
N	Knoten/ Strang der Hohlhand ohne Kontraktur
1	Summe des Streckdefizits zw. 0-45°
2	Summe des Streckdefizits zw. 45-90°
3	Summe des Streckdefizits zw. 90-135°
4	Summe des Streckdefizits >135°

Tabelle 1 Klassifikation nach Tubiana (2)

1.2.2 Historie

Die Dupuytren-Kontraktur, auch als digitopalmare Flexionskontraktur bekannt, findet man in der Medizinhistorie bereits ab dem 12. Jahrhundert. Im Laufe der Zeit wurden pathophysiologisch verschiedenste Ansätze und Hypothesen aufgestellt. 1674 vermutete Felix Platter, dass es sich um eine Luxation der Beugesehnen handeln könnte (2). Der Londoner Chirurg Henry Cline Senior etablierte 1808 erste OP-Techniken und Behandlungsmöglichkeiten (3).

Sir Astley Cooper mutmaßte 1822, dass exzessive, traumatische Handarbeit eine chronische Entzündung der Palmaraponeurose indiziert (4). Jedoch war es Guillaume Dupuytren, Pariser Anatom, Chirurg und Namensgeber der Erkrankung, welcher 1831 auf der einen Seiten den Ursprung in der Palmaraponeurose sah und auf der anderen Seite eine genetische Prädisposition sowie chronisches Trauma der betroffenen Hand implizierte. Er lehnte jedoch einen Zusammenhang anderer Erkrankungen ab. Therapeutisch habe er bereits die Fasziotomie empfohlen. So glaubte der Pariser Anatom, dass so die physiologische Stellung der Finger sowie deren ursprüngliche Beweglichkeit wieder zurückgewonnen werden könnte (5).

1.2.3 Ätiologie

Die ätiologischen Hintergründe der Dupuytren-Kontraktur sind bis heute noch nicht vollständig verstanden. Es gibt bestimmte Ko-Faktoren und Begleiterkrankungen, welche vermehrt mit dem Morbus Dupuytren auftreten und daher mit ihm assoziiert werden, jedoch ist bisher kein kausaler zwischen dieser und der Pathogenese geklärt worden.

Genetische Hintergründe im Sinne einer familiären Häufung der Erkrankung spielen eine große Rolle. Ursächlich hierfür wären Mutationen in einzelnen oder auch mehreren Genen. Ling und Burge diskutierten bereits im 20. Jahrhundert autosomal-dominante mit variabler Penetranz oder rezessive Erbgänge (6, 7). In einer schwedischen Familie wurden auf dem Chromosom 16 eine veränderte Region gefunden, in welcher die bekannten Gene AK-TIP, CHD 9, FTO, RBL 2, RPGRIP1I, IRX 5 und 6 zu finden sind. Um definitive Aussagen treffen zu können, müsste man die Modifikationen dieser Genprodukte explorieren. Außerdem wurden in einer großen Studie (2300 PatientInnen) Genloci im Dupuytren-Patienten gefunden, welche den Wnt-Signalweg beeinflussen (8).

Des Weiteren kann man eine gewisse geografische Tendenz erkennen: während in Asien oder Afrika kein hereditärer Zusammenhang beobachtet werden konnte, fand McFarlane in Nordeuropa eine familiäre Häufung. Die Inzidenz ist somit bei Familienmitgliedern vom bereits erkrankten Verwandten erhöht (6, 9).

Mittlerweile kann man den Diabetes mellitus als eine Volkskrankheit ansehen. Auch in der Pathogenese des MD vermag er eine Rolle zu spielen, da beide Krankheiten gemeinsam auftreten können und in gewisser Weise miteinander assoziiert sind (10, 11). Ursächlich hierfür sind neben erhöhten Glucose-Spiegeln, wie sie häufig bei Diabetikern zu finden sind, auch erhöhte Cholesterin- und Triglycerid-Spiegel (12). Dabei wurde kein geschlechtsspezifischer Unterschied beobachtet. Man konnte jedoch sehen, dass Patienten, welche unter einem Typ I Diabetes leiden durchschnittlich früher als das regelrechte Dupuytrenkollektiv erkrankten (13).

Es wird ebenfalls eine Assoziation mit Epilepsie beschrieben (14). Männliche Epileptiker tragen ein fünffach höheres, weiblich sogar ein elffach höheres Risiko an der Dupuytrenschen Kontraktur zu erkranken (15). In einer Studie mit 524 unter Epilepsie erkrankten PatientInnen wurden bei 21,6% das Auftreten von MD beobachten, insbesondere die Epilepsie idiopathischen Ursprungs wird vermehrt mit der Erkrankung in Verbindung gebracht (16).

Diverse Autoren diskutieren den Einfluss verschiedenster Noxen auf die Pathogenese des MD.

Erhöhter Alkoholkonsum sowie Leberzirrhose, auch ohne ethyltoxischen Ursprung stellen einen wichtigen Ko-Faktor in der Pathogenese dar (17-19). Ein Zusammenhang zwischen Inzidenz der Erkrankung und Nikotinabusus konnte ebenfalls nachgewiesen werden (5). In einer Studie wurde bei 68,2% der Patienten, welche sich einer operativen Therapie unterzogen, ein gleichzeitiger Nikotinkonsum beobachtet werden (20). Pathophysiologisch tragen hier vor allem die mikrovaskuläre

Okklusion von Gefäßen bei. Nikotinkonsum stellt einen wesentlich entscheidenden Faktor für die Entstehung einer peripheren Vaskulopathie dar.

Schon der Namensgeber des MD stellte die Hypothese auf, dass ein Zusammenhang zwischen der Inzidenz und handwerklichen Arbeiten bzw. manuellen Traumata besteht (3). Skoog vermutete, dass es bei diesen wiederholten Mikrotraumata zu Einrissen in der Palmaraponeurose und es folglich zu einer vermehrten Fibroblastenaktivierung und -migration kommt (21). Diese These unterstützen auch weitere Autoren (5, 22, 23). Es existieren auch Mutmaßungen, dass besonders Männer betroffen sind, welche handwerklich mit vibrierenden Geräten arbeiten (24-26). Jedoch gilt der MD trotz der Existenz dieser Arbeiten nicht als Berufskrankheit und eine Anerkennung als solche für spezifische Berufsgruppen ist äußerst selten.

Im klinischen Alltag konnte beobachtet werden, dass auch Patienten, welche mittels operativer Eingriffe der Hand versorgt wurden, eine erhöhte Inzidenz der Dupuytrenschen Kontraktur aufwiesen (27). Es wurde eine Volumenzunahme von bereits vorhandenen, jedoch an Größe persistierenden Knoten der Hohlhand sowie eine eindeutige Erkrankungsprogredienz erfasst. Lanzettá und Morrison erörterten drei klinischen Fälle, in denen durch chirurgisch indiziertes Trauma der Hand einen Morbus Dupuytren herbeiführte. Bei beschriebenen Patienten folgte zwischen drei Wochen und drei Monaten nach der Operation Knotenbildung in der Hohlhand. Dabei war zu beobachten, dass nur die operativ versorgte, nicht jedoch die kontralaterale, Extremität betroffen war (27).

Bower stellte Ende des 20. Jahrhunderts fest, dass die Inzidenz des MD in Patienten, welche sich mit HIV infizierten, erhöht war und stellte in Zuge dessen die Hypothese auf, dass ein modifiziertes Immunsystem bzw. eine Immunsuppression die Inzidenz der Krankheit begünstigen könnte (28). In weiteren klinischen Studien konnte man Antikörper gegen Kollagene, genauer gesagt Typ I-IV, nachweisen, was wiederum vermuten lässt, dass in der Pathogenese eine autoimmunologische Komponente eine Rolle spielen könnte (29, 30). Dass die Therapie mit Steroiden eine effektive Therapie darstellen kann, untermauert diese Theorie (31).

1.2.4 Epidemiologie

Epidemiologisch auffällig ist, dass die Dupuytrensche Kontraktur v.a. Männer (in einem Verhältnis 5:1) zwischen dem 40. Und 60. Lebensjahr sowie fast ausschließlich die weiße Bevölkerung betrifft.

Der Morbus Dupuytren ist mit weiteren Krankheitsbildern konnotiert. Darunter zählen der Induratio penis plastica als Fibromatose des Penis, der Morbus Ledderhose als Sklerose der Plantaraponeurose, sowie der Morbus Ormond als Ureterstenose, verursacht durch eine retroperitoneale Fibrose (32).

1.2.5 Histologische Stadien

Histologisch sind drei Stadien zu unterscheiden: In der primären Proliferationsphase kommt es zur Migration von Fibroblasten in das perifaszikuläre Gewebe und anschließend zur deren Differenzierung. Sekundär, in der Involutionsphase treten besonders strukturelle Veränderungen der Kollagenarchitektur auf. Die einst organisierten Fasern liegen nun ungeordnet vor.

In der tertiären Residualphase vollzieht sich nun ein Schrumpfungsprozess der betroffenen kollagenen Fasern (1).

1.2.6 Klinik

Betroffen sind v.a. Männer nach dem 40. Lebensjahr. Klinisch imponiert eine hypertrophe, schmerzlose Schrumpfung der Palmaraponeurose sowie eine fixierte Flexionsstellung der Finger. Im Verlauf kommt es zu palpabler Strangbildung und damit einhergehend zunehmender Funktionsbehinderung. Das Äquivalent der Erkrankung am Fuß heißt Morbus Ledderhose, am Penis Induratio penis plastica (33). Die Patienten können die geschrumpfte Palmarfaszie ist als derbe, harte Knoten bzw. Stränge tasten. Die Diagnosestellung erfolgt weithingehend klinisch, wobei differentialdiagnostisch an die Kamptodaktylie, als kongenitale Flexionskontraktur des kleinen Fingers gedacht werden muss. Des

Weiteren müssen Kontrakturen der Fingergelenke anderer Ätiologie wie beispielsweise inflammatorisch, traumatisch oder neurologisch berücksichtigt und ausgeschlossen werden (1).

1.2.7 Therapie

Konservativ:

Im Laufe der Zeit wurden verschiedenste konservative Ansätze und Methoden entwickelt, jedoch zeigte keine vielversprechenden Ergebnisse. Verschiedenste Behandlungsversuche mittels Vitamin E, γ -Interferon, DMSO blieben effektlos (34).

Unter der Annahme, dass der MD eventuell eine autoimmune Komponente aufweisen könnte, wurden lokale Steroidinjektion als konservative Therapieansatz untersucht. Diese hatten zur Folge, dass sich die vorhandenen Knoten verkleinerten und weicher wurden. Außerdem konnte man beobachten, dass es nach Injektion zu einer langsameren Progredienz kam (31, 35). Jedoch hat diese Methoden auch Nebenwirkungen. Hier wurden vor allem Hautatrophie sowie Sehnenrupturen beobachtet (34).

Eine durchgeführte Radiostrahlentherapie verhindert Progression der Erkrankung in frühen Stadien. Außerdem werden die Bedingungen für eine eventuell im Verlauf notwendige chirurgische Intervention nicht verschlechtert (36).

Die zurzeit an der vielversprechendsten konservativen Methode stellt die Injektion mikrobieller

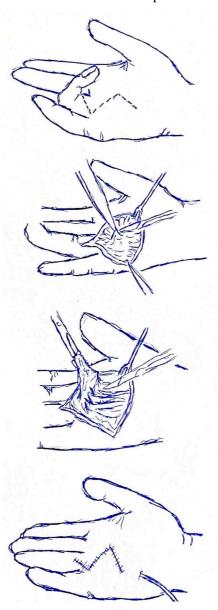


Abbildung 1 Schematische Darstellung einer Aponeurektomie

Kollagenase dar. Erstversuche hierfür wurden bereits in den 1970er Jahren durchgeführt (37). Eine randomisierte, Placebo-kontrollierte, doppelblinde Multicenterstudie von 2009 mit 308 Patienten, welche Kontrakturen von 20° und mehr aufwiesen, zeigte, dass nach drei Injektionen die Bewegungsfreiheit der betroffenen Finger signifikant erhöht war. Aber auch diese Methode zeigte Hämatome, Hautverletzungen. Schwellungen sowie diffuse Schmerzen als unerwünschte Nebenwirkung. In zwei Fällen wurde obendrein eine Sehnenruptur berichtet (38). Operativ/ chirurgisch: Operationstechnik der 1. Wahl stellt die Aponeurektomie dar. Alternativ dazu existieren noch weitere Verfahren, wie z.B. die Fasziotomie, die Dermatofasziektomie. die perkutane Nadelaponeurotomie (PNF) oder die Injektionstherapie mittels mikrobieller Kollagenase.

Der operative Zugang ist eine Y-förmige Inszision in Hohlhandmitte (nach Millesi), je nachdem wie viele Finger betroffen sind, muss man ggf. Y-förmige Zusatzinzisionen über den jeweils betroffenen Fingergrund- und Fingermittelgelenken tätigen. Dabei sollte man Schnitte vermeiden, welche Gelenkfalten oder Hautlinien senkrecht kreuzen, da es sonst Beugekontrakturen kommen kann. Eine individuelle Schnittführung ist dementsprechend äußerst wichtig. Im nächsten Schritt muss man die Palmaraponeurose der betroffenen Finger darstellen, öffnen und nun Schritt für Schritt freilegen. Im Rahmen dessen sollten Beugesehnengefäße und -nerven geschohnt werden. Ist das Operationsgebiet vollständig präpariert, kann die Palmaraponeurose bis intermetacarpal und -digital exzidiert werden. Eine sorgfältige Präparation spielt eine große Rolle, um so auch derbe Ausläufer vollständig zu

entfernen, um die postoperative Rezidivrate zu minimieren. Nach der Fasziektomie sollten die betroffenen Finger im Operationsgebiet wie ein anatomisches Präparat imponieren. Zum Schluss erfolgt, nach Drainageneinlage, eine atraumatische Hautnaht sowie postoperativ die Anlage einer dorsalen Gipsschiene, welche bis zu den Fingerspitzen reichen sollte (s. Abbildung 1) (39).

Eine OP-Indikation sollte mit Bedacht gestellt werden. Liegen zunächst bloß Verhärtung mit keiner oder nur leicht ausgeprägter Kontraktur vor, ist ein abwartendes Verfahren zu bevorzugen, da eine Progression nicht zwingend nötig ist. Findet man jedoch zunehmende Kontrakturen bis 45° Flexion in Metacarpophalangealgelenken und proximalen Interphalangealgelenken oder ist der Patient subjektiv in seinem Alltag eingeschränkt und leidet unter den Krankheitssymptomen, ist eine radikale Extipartion der Palmarfaszie anzustreben. Wird diese jedoch inkompletter exzidiert, sind Rezidive nicht selten. Erfolgt die Operation erst in einem Spätstadium der Erkrankung sind Nekrosen der Haut durch Verletzung der Gefäße und Läsionen sensibler Fingernerven eine weitere Komplikation, sodass die operative Sanierung gründlich und zum richtigen Zeitpunkt erfolgen sollte. Das Ultima Ratio der chirurgischen Therapie stellt die Amputation dar (1).

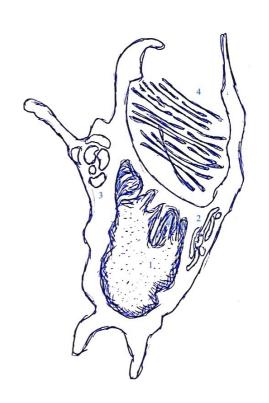
Nach einer radikalen Faszienresektion spielt insbesondere eine konsequente Nachbehandlung mittels Schienenbehandlung in Extensionsstellung sowie postoperative Physiotherapie eine große Rolle, um frühen Rezidiven vorzubeugen (33).

1.3 Fibroblasten und Myofibrogenese

1.3.1 Fibroblasten

Das Bindegewebe umfasst keine geschlossenen Zellverbände, sondern vielmehr Zellen, welche durch eine extrazelluläre Matrix getrennt sind. Diese Bindegewebsmatrix ist, je Bindegewebstyp, unterschiedlich zusammengesetzt und abhängig von dieser Zusammensetzung ist die Eigenschaft sowie die Funktion des Gewebes. Die extrazelluläre Matrix (EZM) umhüllt die Bindegewebszellen und besteht aus diversen Makromolekülen, wie beispielsweise Kollagenfasern, Elastin sowie Fibronektin. Durch dort ortsansässigen Bindegewebszellen, insbesonders durch die Fibroblasten, wird sie produziert und enthält verschiedenste Fasertypen, z.B. Kollagenfasern oder elastische Fasern. Das Bindegewebe erfüllt unter anderem eine Art Gerüstfunktion und die enthaltenen Proteoglykane Wasser und erzeigen binden somit wie Diffusionsräume. Die freien Zellen, Makrophagen, Mastzellen oder Lymphozyten erfüllen verschiedenste Funktionen.

Embryologisch ist das mesenchymale Gewebe, Abbildung 2 Schematische Illustration eines Fibroblasten; 1 welches besonders mesodermalen Ursprungs ist, zart, matrix- und zellreich und kaum differenziert.



Zellkern, 2 Golgi-Apparat, 3 raues ER, 4 Kollagenfasern

Mesenchymzellen sind multipotente Stammzellen. Sie sind reich an Fortsätzen, dynamisch, sehr teilungsfreudig und differenzieren sich mit Hilfe diverser Signalstoffen weiter in verschiedenste Zellformen, u.a. Adipozyten, glatte Muskelzelllen, Osteoblasten und -zyten, Chondrozyten sowie Fibroblasten.

Eine der Hauptaufgaben der ortsansässigen Fibroblasten besteht in der Bildung der EZM sowie die Kontrolle der Zusammensetzung und Menge dieser. Primär aktive Zellen werden als Fibroblasten

bezeichnet, die Zellen in Ruhe nennt man Fibrozyt. Das Erscheinungsbild ist divers und u.a. abhängig von der Beschaffenheit der EZM sowie der speziell organspezifischen Funktion des jeweiligen Gewebes. Häufig findet man sie als spindelförmige Zellen parallel angeordnet zu Kollagenfasern mit langen, feinen Fortsätzen. Ihr Zellkern ist oval und im elektronenmikroskopischen Bild dunkel (reich an Heterochromatin). Die Zellorganellen sind v.a. in aktiven Zellen reich entwickelt. Die Sekretion der Matrixkomponenten erfolgt über Vesikel, welche ausgehend vom Golgi-Apparat in Richtung Zelloberfläche fusionieren

Die Bestandteile des hoch differenzierten Zytoskelets, u.a. das Typ-3-Intermediärfilament Vimentin sowie Aktin, bewerkstelligen die gerichtete Fortbewegung dieser mit einer Geschwindigkeit von 1 μ m/min in drei Schritten: der Protrusion, dem Festhalten und der Traktion. Besonders die dynamischen Aktinfilamente beeinflussen die Ausrichtung der EZM-Komponenten, wie Kollagenfibrillen oder Fibronektinaggregate.

Membranständige Integrine schaffen eine Verbindungen der Fibroblasten mit Komponenten der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise dem Fibronektin, welche jedoch relativ schwach sind und so leicht wie sie geschaffen sind, sich löst sie sich auch wieder (40).

Eine pathologische Überaktivierung der Fibroblasten führt klinisch zu einer Kollagenvermehrung im Rahmen einer Fibromatose, wie sie beim Morbus Dupuytren zu finden ist.

1.3.2 Myofibroblasten und ihre Rolle in der Pathogenese des Morbus Dupuytren

Myofibroblasten fungieren als Schlüsselakteure bei der physiologischen Rekonstruktion von Bindegewebe nach Traumata und bei der Erzeugung pathologischer Gewebedeformationen, welche mit einer Fibrosierung einhergehen (41, 42).

Diese relativ neue, besondere Art von Zellen, erstmalig in der Literatur Ende 20. Jahrhunderts erwähnt, sind Fibroblasten, welche sich kontrahieren können. Ihren Namen verdanken sie dieser muskelzellähnlichen Eigenschaft, weshalb sie auch heutzutage noch als Myofibroblasten bekannt sind (42).

Zur Identifikation von Myofibroblasten helfen drei wichtige ultrastrukturelle Merkmale, welche sie von ruhenden Fibroblasten in Geweben unterscheiden: Das Vorkommen von

- Bündeln kontraktiler Mikrofilamente
- Ausgedehnten Zell-an-Matrix-Anheftungsstellen sowie
- Interzellulären Anhaftungen und Gap Junctions (43).

Intrazellulär weisen sie mehr Stressfasern, sogenannte Aktin-Mikrofilamente auf, welche, wie die Myofibrillen glatter Muskelzellen, längs zur Zelle angeordnet sind. In ihrer Gemeinschaft bilden die Myofibroblasten ein kortikales Netzwerk (44). Transmenbranöse Fibronexus verbinden diese Aktin-Mikrofilamente mit dem extrazellulär gelegenen Fibronektin Filamenten, wodurch jede einzelne Zelle Kraft auf umgebenes Gewebe übertragen kann (45, 46). Untereinander sind sie, wie ihre Vorstufen die Fibroblasten, über Gap Junctions verbunden (47).

Des Weiteren weisen beide Zellgruppen Vimentin und nicht-muskuläres Myosin auf, jedoch fehlen ihnen Laminin und Desmin, beides Proteine glatter Muskelzellen (44, 45)

Jedoch sind in diesen Definitionen auch Limitationen zu finden, da eine Unterscheidung zwischen Myofibroblasten und anderen kontraktilen Zelltypen, wie beispielsweise SMC (*Smooth Muscle Cells*) allein anhand dieser drei Merkmale nicht möglich ist. So benötigt man zur genauen Identifikation spezifische molekulare Marker.

Der am häufigsten verwendete Myofibroblastenmarker ist Alpha-smooth-muscle-actin-2 (α-SMA/ACTA 2). Dieses ist ein Mikrofilament und Protein, welches in kontraktilen Zellen, so auch SMC, für dessen Zellstruktur, -motilität und -kontraktilität verantwortlich ist und somit ebenfalls nicht zwischen Myofibroblasten und SMC in Situationen mit Mischpopulationen unterscheiden kann. Da es jedoch bei Anwesenheit von Myofibroblasten vermehrt exprimiert wird, kann man es zum Nachweis dieser nutzen und somit fungiert es als Surrogat Parameter/ Markerprotein (45).

1.3.3 Extrazelluläre Matrix und ihre Komponenten

Von besonderer Bedeutung für das Gewebe-Remodellierung ist neben der Erzeugung von Spannungskräften, auch die verstärkte ECM *(Extrazelluläre Matrix)* -Synthese- und -Aktivität. Myofibroblasten produzieren mehrere Komponenten der ECM, unter anderem die Kollagene der Typen I, III, IV und V (48), welche jedoch auch von einer Vielzahl von anderer Zellen produziert werden.

Ein zuverlässiger Marker der Myofibroblasten-ECM ist die Fibronektin-Splice-Variante ED-A (49). Neben Myofibroblasten produzieren auch fibroblastische Zellen in Kultur (50) und vaskuläre SMC in vivo und in vitro (51) in geringen Mengen ED-A FN.

Durch die Präsentation bestimmter Epitope von Proteinen der ECM unter Stress, kann der mechanische Zustand der ECM die Myofibrogenese direkt beeinflussen. Es kommt zu einer stressabhängigen Konformation der ECM-Proteine, während welcher traktile Kräfte sowie Wachstumsfaktoren interagieren können und den Prozess mitbeeinflussen.

So exprimiert auch zelluläres Fibronektin (FN) unter Zelltraktion spezielle Domänen (52), wie beispielsweise die *Extra-Domain-A* (EDA). Diese wird mittels alternativen Spleißens, z.B. im Rahmen der Gewebereparatur, an das FN-Molekül gebunden und dient als Voraussetzung für die TGF-β₁-induzierte Myofibroblasten-Differenzierung (49). Es bleibt weiterhin zu zeigen, ob zellerzeugte mechanische Kräfte die Verfügbarkeit dieser Domäne für spezifische Integrine verändern können, um Myofibroblasten-fördernde intrazelluläre Signale zu induzieren.

1.3.4 Enzyme, Rezeptoren und Wachstumsfaktoren im Dupuytrengewebe

Zellphysiologisch erfolgt die Expression von α-SMA, als Myofibroblasten-Surrogat-Parameter, in fibroblastischen Zellen mittels Smad-Signalübertragung über TGF-β₁. Hierbei bindet aktives TGF-β₁ an den TGFb-Rezeptor Typ II, was zu einer Phosphorylierung sowie Rekrutierung von TGFb-Rezeptor Typ I in einen heteromeren Rezeptorkomplex führt. Smad2 und Smad3 werden durch die Serin/Threonin-Kinase-Aktivität des aktivierten Komplexes phosphoryliert, binden jeweils an das Smad4 und translozieren in den Kern, um die Gentranskription durch Zusammenarbeit mit DNA-Transkriptionsfaktoren zu verbessern (53). Alternativ kann TGF-β₁ die Fibroblasten-Genexpression unabhängig von der Smad-Signalgebung regulieren (54). Ein Weg der Smad-unabhängigen TGF-β₁-Induktion des Myofibroblasten-Phänotyps wurde in Smad3-Knockout-Fibroblasten aufgedeckt und scheint über die Aktivierung von Phosphatidylinositol-3-Kinase sowie die Aktivierung des nachgeschalteten Effektors p21 (55). Über das TGFβ₁-Kontrollelement wird die Smad-unabhängige Transkription von α-SMA in Fibroblasten reguliert (56). Es wurden nur wenige Faktoren identifiziert, die möglicherweise unabhängig von $TGF\beta_1$ die Differenzierung von Myofibroblasten induzieren. Es wurde vermutet, dass IL-6 ein solcher Faktor ist, da IL-6-Null-Mäuse eine beeinträchtigte Wundheilung der Haut und eine reduzierte Differenzierung von Myofibroblasten bei unveränderten TGFβ₁-Spiegeln aufweisen. Darüber hinaus erhöht rekombinantes IL-6 die α-SMA-Transkription in Fibroblastenkulturen von IL-6-Null-Mäusen in Abwesenheit von exogenem TGFβ₁ (57). Da jedoch die Myofibroblasten-Differenzierung als Antwort auf IL-6 nicht bei gleichzeitiger Hemmung der TGFβ₁-Signalgebung getestet wurde, kann der Einfluss von autokrinem TGFβ1 nicht ausgeschlossen werden (45).

Neben den proinflammatorischen Zytokinen induzieren auch Agonisten der Myofibroblastenkontraktion, wie Angiotensin-II (58), Endothelin-1 (59) und Thrombin (60) eine Expression von α -SMA-Expression in vitro. Allerdings ist auch hier unklar, ob endogenes TGF- β_1 diesem Effekt unterstützt.

Es wird weiterhin vermutet, dass diese Kontraktionsagonisten den intrazellulären Stress erhöhen und somit die α-SMA- Expression ankurbeln (61). Zur Wahrnehmung mechanischer Signale von der ECM verwenden Fibroblasten Integrin-basierte Matrixadhäsionen, d. h. dieselben Transmembranorganellen, die zur Verankerung von Stressfasern im Substrat dienen (62). Als transmembranäre Proteine übernehmen die Integrine bei Zell- Zell- als auch bei Zell-Matrixkontakten eine essentielle Schlüsselfunktion und einer ihrer wichtigen Liganden stellt das Fibronektin dar. Sie sind besonders bei den Prozessen Zellproliferation, -differenzierung, -migration, -morphologie und Apoptose relevant. Die

Transmembranproteine sind Dimere, die sich jeweils aus einer α und einer β Untereinheit, von welchen 18 α- und 8 β-Untereinheiten bekannt sind, zusammensetzen (63). Experimentell konnten mittels ultrastruktureller Analyse von Myofibroblasten in fibrotischem Gewebe und Wundgranulationsgewebe ausgedehnte Zell-Matrix-Kontakte, sogenannte Fibronexus, nachgewiesen werden, die in normalen Bindegewebsfibroblasten nicht vorkommen (43). Analog hierzu konnten in kultivierten Myofibroblasten spezielle fokale Adhäsionen (FAs) nachgewiesen werden, welche aufgrund ihrer Länge von 8-30μm als "überreife (supermature) FAs" bezeichnet werden (64). α -SMA negative Fibroblasten hingegen exprimieren "klassischen FAs", die eine Länge von ca. 2–6 μm aufweisen (65). Die überreifen FAs weisen eine spezifische molekulare Zusammensetzung auf, da sie neben großen Mengen Paxillin, Tensin sowie Vinculin auch die Integrine avβ3 und a5b1 co-exprimieren (64, 66). Im Gegensatz hierzu exprimieren die klassischen FS, weder Tensin noch a5b1-Integrin (65).

1.4 Licht

1.4.1 Spektrum des Lichts

Der menschliche Sehsinn setzt sich auf der einen Seite aus dem Auge mit seiner Hornhaut, Linse, Glaskörper und Netzhaut sowie auf der anderen Seite aus dem der Sehnerv und der sich im Großhirn befindliche visuelle Kortex zusammen. Unsere farbenfrohe, räumliche Welt wird durch die Netzhaut in flächenhafte Bilder umgewandelt und dies erlaubt uns Informationen über die Umwelt wahrzunehmen. Licht ist aber auch neben dem Ausdruck einer der menschlichen Sinne ein physikalisches Phänomen und das physikalische Licht existiert länger als das menschliche Auge.

Elektromagnetische Wellen unterscheiden sich in ihrer Frequenz und in ihren Wellenlängen. Mit Hilfe unserer Augen nehmen wir elektromagnetische Wellen einer Wellenlänge eines halben Mikrometers wahr. Die Farben des Regenbogens stellen die Farbeindrücke dar.

Der für das menschliche Auge sichtbarer Spektralbereich reicht von 400 nm (violett) bis 700 nm (rot) und ist, bezogen auf das gesamte Spektrum des physikalischen Lichtes, sehr schmal. Das kurzwellige Ultraviolett wird vor Eintritt in die Erdatmosphäre vom Ozon der hohen Atmosphäre abgefangen, Wasserdampf filtert Teile des langwelligen Infrarots heraus. Das was wir als "Licht" bezeichnen, ist nur der für uns wahrnehmbare, sichtbare Spektralbereich. Ein Beispiel für kurzwellige Strahlung sind Röntgenstrahlen, für langwellige Wellen Langwellen im Radiobereich (67).

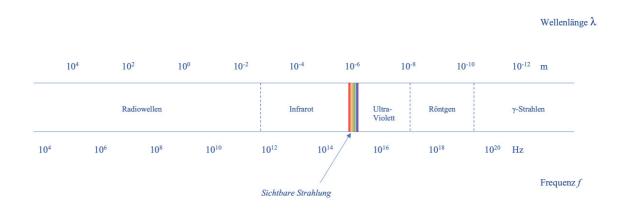


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Spektrums elektromagnetischer Wellen (68)

1.4.2 Molekulare Einflüsse des Lichtes in unserem Körper

Die Strahlung des Lichtes wird durch zelluläre Moleküle der Haut absorbiert und die Energie des Photons wird auf ein Chromophor transferriert. Es kommt zur Versetzung des Chromophores (lat. Farbträger) in einen erregten Zustand und konsekutiven Entstehung chemischer Veränderungen (68). Dabei bestimmen die Position und das Absorptionsspektrum des jeweiligen Chromophores die Eindringtiefe der jeweiligen Strahlung. Einige Beispiele für endogene Chromophore sind Melanin,

Wasser, Riboflavin, Hämoglobin oder Bilirubin. Nukleinsäuren, NADH/NADPH, Flavine oder Porphyrine sind Beispiele für Chromophore in der Epidermis (68, 69).

Sogenannte Sensibilisatoren absorbieren Strahlung, werden angeregt und verändern die Verteilung der Elektronen in den Chromophoren bzw. Photosensitizern, welche folglich in einen erregten Singlet-Zustand übergehen, in welchem sie Fluoreszenz emittieren, Wärmeenergie abgeben oder photochemische Reaktionen durchlaufen und somit zur Bildung von Photoprodukten beitragen oder in einen Triplet-Zustand konvertieren (69).

Die Bildung von ROS (reaktiven Sauerstoffspezies) ist ein Beispiel für eine photochemische Reaktion. Aufgrund ihrer hohen Spezifität können sie durch Interaktion mit zellulären Makromolekülen, wie Proteinen, Fettsäuren oder der DNA oxidative Schäden herbeiführen. Diese Reaktion ist in gewissen Rahmen physiologisch, wird jedoch die Kapazität zellulärer, antioxidativer Abwehrmechanismen überschritten, kommt es zum oxidativen Stress (68).

1.4.3 UV-Strahlung und dessen Anwendung in der Medizin

Die Ultraviolettstrahlung (kurz: UV) fällt in das Spektrum des sichtbaren Lichtes. Es werden je nach Wellenlänge drei Bereiche unterschieden: UV-A (315-380 nm) für Melaninproduktion & Stimulation der Pigmentgranula der Haut; UV-B (280-315 nm) & UV-C (100-280 nm) mit sterilisierender Wirkung auf menschliches Gewebe (Auge, Haut) (70).

Die Lichtstrahlen werden von unserer Haut zum Teil reflektiert, aber auch zu einem bestimmten Teil absorbiert. Die Absorption des Lichtes erfolgt durch spezielle Bestandteile der Zellen, wie beispielsweise Melanin (s. oben, Melanin als endogenes Chromophor), und führt, je nach Zellart, zu positiven oder auch negativen photochemischen Reaktionen. Die UV-Strahlung, besonders die UV-B-Strahlung, in gewisser Dosis auch UV-A-Strahlung, ist biologisch besonders aktiv. Das Spektrum, welches Reaktionen der Haut auslösen kann, nennt man Aktionsspektrum. Physiologisch erwünschte Wirkungen umfassen neben der Vitamin-D-Synthese auch die bereits erwähnte antimikrobielle Wirkung, die Erwärmung des Körpers, (dosisabhängig) die Immunstimulation sowie der positiv psychologische Einfluss.

Da unsere Haut für physikalische Behandlungsmöglichkeiten besonders gut zugänglich ist, ist die Phototherapie in der Dermatologie bereits fester Bestandteil in der Behandlung einiger Erkrankungen. Breitspektrum-Phototherapie findet besonders Anwendung bei der Therapie von chronischentzündlichen Dermatosen. Hierbei therapiert man mittels UV-B-Strahlung v.a. Psoriasis vulgaris, Pruritus, atopische Ekzeme oder Vitiligo; mittels UV-A-Strahlung besonders bei atopischen Ekzemen, zirkumskripter Sklerodermie, Lichen sclerosis oder auch GvH-Reaktionen (71).

1.4.4 Blaues Licht

Auch das blaue Licht kann man in verschiedene Spektren unterteilen: Violett (390-425 nm), Indigo (425-450 nm), Royal Blue (450-475 nm) sowie blau-Grün (475-500 nm) (72).

Um photophysikalische bzw. -chemische Reaktionen zu initiieren, wird das blaue Licht über vier verschiedene Photorezeptoren absorbiert. Hierunter zählen neben Flavinen und Porphyrinen auch nitrosatierte Proteine und Opsine. Diese bilden ROS, setzen NO frei und aktivieren diverse Signale mittels G-Protein-gekoppelter Proteine (73, 74).

Die Licht-sensitiven G-Protein-gekoppelten Proteine, auch Opsine genannt, absorbieren besonders Wellenlängen zwischen 380 und 496 nm. Beispiele für Opsine sind Enzephalopsin (OPN3), Melanopsin (OPN4) oder dem Neuropsin (OPN5) (73, 75).

Porphyrine sind heterozyklische, aromatische Stoffe, welche aus vier Pyol-Untereinheiten bestehen, die durch Methan-Brücken verbunden werden. Sie absorbieren v.a. blaues Licht mit Wellenlängen zwischen 410 und 440 nm (73). Zu finden sind sie u.a. im Hämoglobin oder der Cytochrom-C-Oxidase der Atmungskette (75, 76).

Flavoproteine, auch Cryptochrome genannt, sind besonders bei Pflanzen, aber auch beim Menschen und Tier zu finden und besitzen ein Maximum der Absorption bei ca. 450 nm (72, 75, 77). Eines der

Grundelemente von FMN (*flavin mononucleotide*) und FAD (*flavin adenin dinucleotide*) in einer Mehrzahl der Flavoproteinen ist Riboflavin. Als Ko-Faktor ist es Teil diverser Redox-Reaktionen (73). Diese Photorezeptoren bzw. Flavin-haltigen Oxidasen findet man v.a. in Peroxisomen, Mitochondrien sowie im Cytosol (73, 76, 78).

1.4.4.1 Interaktionen mit Flavin-haltigen und redoxrelevanten Enzymen

Während man den molekularbiologischen Mechanismus der Entstehung von ROS bei UV- oder rotem Licht bereits erfolgreich erforscht hat, ist er bei blauem Licht noch nicht vollkommen enthüllt. Zentrum der Absorption des blauen Lichtes scheinen die Mitochondrien zu sein. Durch Interaktion mit der Atmungskette wird der Energiehaushalt erschöpft. Somit bleibt der Zelle keine Energie mehr für weitere Proliferation oder gar Differenzierung (73, 79).

1.4.4.2 Einfluss von blauem Licht auf unterschiedliche Zelllinien

Wie bereits erwähnt werden die Flavine aufgrund der absorbierten Strahlung in einen erregten Zustand überführt, in welchem sie photochemische Reaktionen durchlaufen und ROS bilden können (73). Durch Bestrahlung mit blauem Licht längerer Wellenlängen (λ >440 nm) soll der schädliche Einfluss auf die Zellviabilität verringert werden (80).

Grundsätzlich gilt blaues Licht der Wellenlänge 453 nm bis zu Dosen von 500 J/cm² als nicht toxisch (75, 76). Experimentell konnte man an Hautproben keinerlei Indizien für Apoptose nach Exposition gegenüber Blaulicht mit Dosen bis zu 200 J/cm² aufzeigen (81).

Hamblin konnte nachweisen, dass es an Fettstammzellen nach der Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge λ =415 nm neben einer Dosis-abhängigen Erhöhung von ROS auch zur Reduktion der ATP-Konzentration und des mitochondrialen Membranpotentials kam, was letzten Endes zu einer Hemmung der Proliferation führte (72).

Liebemann untersuchte die Wirkung einer Bestrahlung mit blauem Licht unterschiedlicher Wellenlängen auf Keratinozyten. Hier konnte beobachtet werden, dass es ebenfalls zu einer Reduktion der Proliferation kam. Da in Keratinozyten jedoch keine vermehrte Apoptose nachgewiesen werden konnte, postulierte man hier eine Initiation der Keratinozytendifferenzierung als mögliche Ursache (76). Derartige Proliferationsverminderung waren dosisabhängig in Endothelzellen und Fibroblasten ersichtlich. Über welchen Photorezeptor diese Reaktion abläuft, ist bis heute jedoch nicht ganz geklärt, genauso wenig wie die Hypothese, dass sich proliferierende Fibroblasten eventuell empfänglicher für blaues Licht seien (73, 80, 82).

So konnten auch Magni et al. eine Dosis-abhängige Reduktion der Fibroblastenproliferation aus keloidalem Gewebe nach Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge λ =410-430 nm beobachten. Ursächlich hierfür sei eine Beeinflussung der Cytochrom C Oxidase (Komplex IV) (83). Eine Elevation der Aktivität des Komplexes IV sowie die der Aktivität des Metabolismus konnte ebenfalls durch Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge λ =442 nm beobachtet werden (75).

In gesunden Keratinozyten ist nach Exposition mit blauem Licht die Aktivität des Komplexes II der Atmungskette (Succinat Dehydrogenase (SDH)) leicht erhöht, in oralen Tumorzellen konnte interessanterweise eine Reduktion nachgewiesen werden. In beiden Zelllinien ist nichtsdestotrotz eine vermehrte Produktion von ROS nachgewiesen wurden (77).

Neben den zuvor aufgeführten Reaktionen soll die Bestrahlung mit blauem Licht zu einer Reduktion der Entzündung in oberflächlichem Gewebe führen, Wundheilung fördern und bakterielles Wachstum hemmen (75). Weitere Untersuchungen zeigten, dass es im Rahmen der Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge λ =453 nm zur Bildung von Stickoxid (NO) komm (76, 81). Die NO-vermittelte, anti-inflammatorische Wirkung resultiert in der verminderten Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-8, IL-1 β , IL-2, IFN-gamma oder TNF-alpha (73).

Aufgrund der bereits erforschten anti-proliferativen Wirkung des blauen Lichtes untersuchten Taflinski et al. den Effekt dessen auf die Differenzierung und Proliferation von humanen, dermalen Fibroblasten.

Es wurde ersichtlich, dass es durch mehrfache Bestrahlung mit nicht-toxischen Dosen zu einer Reduktion der TGF- β_1 induzierten Myofibrogenese kommt (74). Auch in weiteren Experimenten konnte eine Reduktion der Produktion von Markerproteinen in humanen Fibroblasten nach Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge λ =453 nm und vorheriger Aktivierung mit TGF- β_1 nachgewiesen werden (79, 80).

So konnten solch verminderte Expression des Markerproteins α-SMA ebenfalls bei Fibroblasten des Morbus Dupuytren gesichtet werden (79). Des Weiteren bilden die Fibroblasten im Morbus Dupuytren verhältnismäßig mehr ROS, nach Behandlung beider Fibroblasten-Gruppen, in Form von Bestrahlung, kommt es jedoch in beiden Zellreihen zur vermehrten Produktion von ROS. Reguliert wird dieser Prozess weniger durch eine induzierte Apoptose, sondern vielmehr über die Generierung von ROS (Singlet Sauerstoff oder Hydrogen Peroxid) (79, 80).

Einen ähnlichen Einfluss, wie der der Bestrahlung, konnte beobachtet werden, indem man die Zellen durch Zugabe von Hydrogen-Peroxid behandelt hat. Nach solcher Behandlung konnten verminderte Werte des Markerproteins α-SMA nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass es zur Inhibierung der Differenzierung kam. Ebenfalls reduziert war die Expression der Katalase sowie die der FAD-Konzentration und des NADP⁺/NADPH⁺-Verhältnisses (80).

Summa summarum lässt sich feststellen, dass der Einfluss von blauem Licht von Zelltyp zu Zelltyp verschieden ist. In Abhängigkeit von der jeweilig verwendeten Wellenlänge und der damit emittierten Energie konnten verschiedenste Effekte erzeugt und nachgewiesen werden.

1.4.4.3 Anwendung des blauen Lichtes in der Medizin

Die Anfänge der medizinischen Phototherapie liegen in den 1960er Jahren. Der ungarische Physiker Endre Mester etablierte die Low-Level Laser Therapie zur Photobiostimulation (PBM). Seither finden kohärente sowie nicht kohärente Lichtquellen in Form von Lasern bzw. LEDs (light emitting diodes) Anwendung in der kurativen Medizin. Besonders die Dermatologen greifen auf LED-Phototherapie zurück, da diese effektiv ist, ohne exogene Wärme zu erzeugen (84).

Um einen Effekt der Lichttherapie initiieren zu können, müssen die Photonen durch den Photoakzeptor, beispielsweise ein Chromophor, absorbiert werden. Dieser ist abhängig von Wellenlänge, Dosis, Intensität der Bestrahlung sowie die Bestrahlungszeit und -modus (84). So konnte nach Bestrahlung menschlicher Haut mit sichtbarem Licht eine erhöhte Generierung von ROS sowie proinflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden (85).

Bei einer Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 400-1100 nm, so wie es bei der PBM der Fall ist, konnten jedoch eine Förderung von Heilungsprozessen sowie eine Reduktion inflammatorischer Prozesse nachgewiesen (75). Traditionell wird bei der Photobiomodulationstherapie rotes bzw. nahes Infrarot-Licht verwendet, wodurch das Auftreten von Schmerzen, Entzündungen und Ödemen verringert sowie die Regeneration bereits beschädigten Sehnen-, Knochen oder Wundgewebes angeregt wird (72).

Jedoch hat auch mittlerweile blaues Licht, welches richtig angewandt anti-inflammatorisch sowie antiproliferativ wirkt, bereits in der Dermatologie oder bei anderen entzündlichen Erkrankungen
Anwendung gefunden. Einige Beispiele hierfür sind Akne, atopischer Dermatitis, Psoriasis, Rosazea,
das kutane T-Zell Lymphom, der neonatale Ikterus, prä-/kanzerösen Hautläsionen sowie zur
Wundheilung (73, 86, 87).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte und Software

Gerät	Handelsname	Hersteller
Absauganlage	Vacuboy	INTEGRA Biosciences AG,
		Zizers, Schweiz
Absaugpumpe	LABOPORT	KNF Neuberger GmbH,
		Freiburg, BRD
Abzug		Waldner
Autoklav	Laboklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel
		Schloss/Satuelle, BRD
Blotter	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories Inc.,
		Hercules, USA
Brutschrank	Thermo Electron Corporation	Thermo Fisher Scientific
	HERAcell®150	GmbH, Schwerte, DE
Eismaschine	RF 0244 A	Manitowoc Ice, Manitowoc,
		USA
Gasflamme	Fuego SCS basic	WLD-Tec, Göttingen, DE
Gefrierschrank -20°C	Premium NoFrost	LIEBHERR-International AG,
		Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C	Hera Freeze	Heraeus Holding GmbH,
	D: D 1 G 1D	Hanau, BRD
Geldokumentationsanlage	BioRad GelDoc	Bio-Rad Laboratories, Inc.,
(Western)	NC : D	Hercules, CA, USA
Gelkammer	Mini-Protean TetraCell	Bio-Rad Laboratories, Inc.,
H .: 1 1	PowerPac HC	Hercules, CA, USA
Heizbad	Lauda AL12	The same Pieles Coincidia
Heizblock	dry bath	Thermo Fisher Scientific
Vinia Einfrianaanät		GmbH, Schwerte, BRD
Kryo-Einfriergerät		Schmidt Laborgeräte und Umweltsimulationen
Kühlschrank 4°C	KUw 1740	
Kunischrank 4 C	KOW 1740	LIEBHERR-International AG, Bulle, Schweiz
Magnetviihven	620 Standard	
Magnetrührer	620 Standard	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Mikroskop	Axiovert. 40/ Axiskop40	Carl Zeiss AG, Oberkochen,
Wikioskop	Axiovett. 40/ Axiskop40	BRD
Multipipette	Multipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg,
типрене	Wattipette Fitas	BRD
Photometer	Victor3 TM V Multilabel	Perkin Elmer Inc., Waltham,
1 notometer	Counter model 1420	MA, USA
Photometer PC	Optiplex GX620	Dell Inc., Round Rock, USA
Pipette 100-1000 μl	eppendorf research plus	Eppendorf AG, Hamburg,
1 φειίο 100 1000 μι	- cpp shaori research pras	BRD
Pipette 10-100 μl	eppendorf research plus	Eppendorf AG, Hamburg,
- Pette 10 100 pt	11	BRD
		= = -2

Pipette 1-10 μl	eppendorf research plus	Eppendorf AG, Hamburg,
1 τρεπε 1-10 μι	eppendorr research plus	BRD
Pipette 5 ml		STARLAB GmbH, Hamburg, BRD
Pipette 10 ml		STARLAB GmbH, Hamburg, BRD
Pipette 25 ml		STARLAB GmbH, Hamburg, BRD
Pipettierhilfe	accu-jet ® pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, BRD
Power Supplier	Mini-Protean TetraCell PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Sicherheitsbrenner	Fuego SCS basic RF	WLD-Tec, Göttingen, BRD
Sonifizierer	DU 50 H (Cycle 0,5; Amplitude 80%)	Dr. Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, BRD
Sterilbank	HERAsafe	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, BRD
Taumelrollenmischer	RM5-V 1750 RM5-V80 1752	CAT Ingenieurbüro M. Zipperer GmbH, Staufen, BRD
Transferkammer	Trans-Blot Turbo TM	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Vortexer	IKA MS3 basic (3000 U/min)	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen, BRD
Waage	Kern ABJ Log NoA01 Electronic Balance Typ ABJ2204	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, BRD
Wärme-Bad 37°C	Aqualine AL 12	LAUDA DR. R. WOBSER GMBH & CO. KG, Lauda- Königshofen, BRD
Werkbank	Thermo Electron Corporation HERsafe®	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, BRD
Western Blot Imaging	ChemiDoc MP Imaging	Bio-Rad Laboratories Inc.,
Instrument	System	Hercules, USA
Zentrifuge klein	HERAEUS Pico 17 centrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, BRD
Zentrifuge groß	HERAEUS Megafuge 16R centrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, BRD

Software

Software		Hersteller
	Photometer Software WorkOut 2.0	DAZDAQ LTD., Brighton, UK
	Excel 2011	Microsoft Corp., Redmond, USA
	ImageLab 6.0	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
	GraphPadPrism 5.0	

Produkt	Handelsname	Hersteller
0,5 ml Reaktionsgefäße	Safe-Lock TubesTM 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
1,5 ml Reaktionsgefäße	SARSTEDT Reagiergefäß 1,5 ml EASY CAP	SARSTEDT AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
1,5 ml Reaktionsgefäße (safety lock)	Safe-Lock TubesTM 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
6-Well-Platte	CytoOne 6-Well Plate with Lid	STARLAB GmbH, Hamburg, BRD
96-Well-Platte	GREINER 96-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Abwurfbeutel	Vernichtungsbeutel 200 x 300 mm, PP, transparent, Stärke: 50 µm, autoklavierbar, ohne Druck	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, DE
Aluminiumständer zur kühlen Probenlagerung	Rotilabo-Alu.Rack 1.5	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Bechergläser	DURAN Becher niedrige Form und Ausguss	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/ Mainz, DE
Blotting Membran	Nitrocellulose Blotting- Membran (Porengröße 0,2μm)	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, DE
Blotting Papier	Blotting Filter Paper 2,5mm thick	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Deckgläschen	Assistent® Deckgläser, rund, Stärke 1, CE, #41001115	
Falcons	Cellstar Tubes (15ml / 50ml)	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, AT
Fertig Gel	Mini-PROTEAN TGX Stain- Free 4-20%	BioRad Laboratories Inc. Made in United States
Folie	Microtiter Sealing Tape	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Glaspipetten	Pasteurpipetten aus Glas	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, BRD
Handschuhe S	Micro-Touch Nitrile, Powder free	Ansell GmbH, München, BRD
Kryogefäße	Cryo.s Einfrierröhrchen 2ml TM	Greiner Bio-One GmbH
Laborflasche	DURAN Original Laborflasche	DWK Life Science GmbH, Wertheim/ Main, DE
Messbecherglas	Pyrex Beakers, low form, Griffin	SciLabware Ltd., Stoke-on- Trent, UK
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
Multipipetten-Spitzen (0,5 ml; 5 ml; 10 ml)	Combitips Plus steril/unsteril Neubauer improved	Eppendorf AG, Hamburg, BRD

Neubauer-Kammer/ Hämozytometer	Neubauer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen, BRD
Objektträger	Objektträger 76x26mm	Engelbrecht Medizin- und Labortecknik GmbH
Parafilm	Parafilm "M"	Bemis Company, Inc., Neenah, WI, USA
Petrischale	TC-Schale 100, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Pipettenspitze 10 μl	XL graduated filter tip	STARLAB GmbH, Hamburg, BRD
Pipettenspitze 100 μl	XL graduated filter tip	STARLAB GmbH, Hamburg, BRD
Pipettenspitze 1000 μl	XL graduated filter tip	STARLAB GmbH, Hamburg, BRD
Pipettenspitze 5 ml	Costar® 5 mL Shorty Stripette® Serological Pipets	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Pipettenspitze 10 ml	Costar® 10 mL Shorty Stripette® Serological Pipets	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Pipettenspitze 25 ml	Costar® 2 mL Shorty Stripette® Serological Pipets	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Zellscharber	cell scraper	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, AT
Zellsieb 70 μm	Cell Strainer	Becton Dickinson

Chemikalien

Produkt	Handelsname	Hersteller
2-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol M7154, for electrophoresis	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Aqua dest. (steril)	Demi-Wasser	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, BRD
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
BSA	Bovine Serum Albumin Fraktion V	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
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
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline w: Calciumw: Magnesium	PAN Biotech
Entwicklerlösung für Western Blot Membranen	Clarity TM Western ECL Substrate	BioRad

Ethanol (70%)	Wet Task	Kimberly-Clark Corporation, Neenah, WI, USA
Ethanol (90%)	Ensure; Ethanol for analysis	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
FCS	Fetal Bovine Serum Gold	PAA Laboratories GmbH,
		Pasching, AT
Glycerol	Rotipuran	Carl Roth GmbH + Co. KG,
diyeeroi	Rouparan	Karlsruhe, BRD
Glycin	Glycine	Sigma-Aldrich Co., St. Louis,
Giyein	Gryeme	MO, USA
H _{am} an	HEPES Buffer 1M 100 ml	
Hepes		Life Technologies Ltd.,
V - 1 - 1 - 1	sterile	Paisley, UK
Kochsalz-Lösung	NaCl 0,9 % Ecotainer	B.Braun Melsungen AG,
	N. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1.	Melsungen, BRD
Methanol	Methanol for analysis; Ensure	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
PBS	Dulbecco's PBS; without Ca &	PAA Laboratories GmbH,
	Mg; sterile	Pasching, AT
Pen/Strep	Pen Strep / Penicillin	Life Technologies Ltd.,
	Streptomycin	Paisley, UK
Ponceau S	Ponceau S, BioReagent,	Sigma-Aldrich Co., St. Louis,
	suitable for electrophoresis	USA
Protein Assay Kit	Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
		GmbH, Schwerte, DE
SDS	SDS ≥99,5%, Blotting-Grade	Carl Roth GmbH + Co. KG,
		Karlsruhe, DE
TGFβ1	rh TGF-beta 1	ImmunoTools GmbH,
		Friesoythe, Deutschland
TRIS	TRIS-HCl 1M Stock Solution	Sigma-Aldrich Co., St. Louis,
		MO, USA
Tris-Base	Merck KGaA 648310 Tris	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
	Base, Molecular Biology Grade	
	Calbiochem®	
Tris-HCl	Merck KGaA 648310648313	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
	Tris, Hydrochloride,	
	ULTROL® Grade	
W . 11	Calbiochem®	Ciama Alli 1 C Coll
Tryptanblau	Tryptan Blue Solution 0,4%	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Trypsin	Trypsin/EDTA Solution; 0,0 5	Biochrom AG, Berlin, BRD
	%/0,02 % (w/v) in PBS;	
	without Ca, without Mg	
Tween	Tween 20	Sigma-Aldrich Co., St. Louis,
		MO, USA
Western Blot Substrat	Immobilon Forte Western HRP	Millipore Corporation,
	Substrate	Billerica, USA
Western Marker Antikörper/	Roti-Mark WESTERN HRP-	Carl Roth GmbH + Co. KG,
Proteinmarker	Konjugat, anti-WESTERN	Karlsruhe, DE
	Marker Antikörper	
Western Marker Proteinleiter	(Kaninchen) Roti-Mark WESTERN Marker	Carl Roth GmbH + Co. KG,
rr estern warker i rotetittetter	Rou-wark western warker	Karlsruhe, DE
		Kalistune, DE

2.1.2 Chemikalien

Produkt	Handelsname	Hersteller	
2-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol M7154, for	Sigma-Aldrich Co., St. Louis,	
	electrophoresis	MO, USA	
Aqua dest. (steril)	Demi-Wasser	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, BRD	
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	
BSA	Bovine Serum Albumin Fraktion V	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT	
Dispase Typ II	Dispase II (neutral protease,	Roche Diagnostics GmbH,	
1 31	grade II); from Bacillus polymyxa, lyophilizate	Mannheim, DE	
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (D- MEM) (1X), liquid (High Glucose)	Life Technologies Ltd., Paisley, UK	
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline w: Calciumw: Magnesium	PAN Biotech	
Entwicklerlösung für Western	Clarity TM Western ECL	BioRad	
Blot Membranen	Substrate		
Ethanol (70%)	Wet Task	Kimberly-Clark Corporation, Neenah, WI, USA	
Ethanol (90%)	Ensure; Ethanol for analysis	Merck KGaA, Darmstadt, BRD	
FCS	Fetal Bovine Serum Gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT	
Glycerol	Rotipuran	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD	
Glycin	Glycine	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA	
Hepes	Hepes HEPES Buffer 1M 100 ml sterile		
Kochsalz-Lösung	NaCl 0,9 % Ecotainer	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD	
Methanol	Methanol for analysis; Ensure	Merck KGaA, Darmstadt, BRD	
PBS	Dulbecco's PBS; without Ca & Mg; sterile	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT	
Pen/Strep	Pen Strep / Penicillin Streptomycin	Life Technologies Ltd., Paisley, UK	
Ponceau S	Ponceau S, BioReagent, suitable for electrophoresis	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA	
Protein Assay Kit	Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE	
SDS	SDS ≥99,5%, Blotting-Grade	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	
$TGF\beta_1$	rh TGF-beta 1	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland	

TRIS	TRIS-HCl 1M Stock Solution	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA	
Tris-Base	Merck KGaA 648310 Tris Base, Molecular Biology Grade Calbiochem®	Merck KGaA, Darmstadt, BRD	
Tris-HCl	Merck KGaA 648310648313 Tris, Hydrochloride, ULTROL® Grade Calbiochem®	Merck KGaA, Darmstadt, BRD	
Tryptanblau Tryptan Blue Solution 0,4		Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA	
Trypsin	Trypsin/EDTA Solution; 0,0 5 %/0,02 % (w/v) in PBS; without Ca, without Mg	Biochrom AG, Berlin, BRD	
Tween	Tween 20	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA	
Western Blot Substrat	Immobilon Forte Western HRP Substrate	Millipore Corporation, Billerica, USA	
Western Marker Antikörper/	Roti-Mark WESTERN HRP-	Carl Roth GmbH + Co. KG,	
Proteinmarker	Konjugat, anti-WESTERN Marker Antikörper (Kaninchen)	Karlsruhe, DE	
Western Marker Proteinleiter	Roti-Mark WESTERN Marker	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	

2.1.3 Lösungen, Medien und Puffer

Zellkultur Medium

Zur Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurde folgendes Medium genutzt:

MD-/CTS-Fibroblasten Medium

500	ml	DMEM
10	%	FCS
1	%	Pen/Strep
1	%	Hepes

Name der Lösung/ des Zusammensetzung **Puffers** 40ml Transferpuffer Blotting Puffer 50ml Methanol Gelöst in Aqua dest. ad 500ml H2O PBS Dispase-II-Lösung 0,1% Dispase Typ II Gelöst in Aqua dest. 5% Hepes 0,001M CaCl 0,005M Glucose Kollagenase Puffer 0,1M HEPES 0,12M NaCl₂ 0,05M KCl

0,2% Kollagenase Typ I 1,5% BSA 2,5mM Tris-HCL (pH=6,8) 40% Glycerol Laemmli-Puffer 8% SDS Gelöst in Aqua dest. 0,1% Bromphenoblau Vor Gebrauch 20% Mercaptoethanol zusetzen. 25 mM Tris (pH 8,3 - 8,8) Laufpuffer/ Elektrophoresepuffer 192 mM Glycin Gelöst in Aqua dest. 0,1 % SDS 50 mM TRIS (pH=8)RIPA-Puffer für 150 mM NaCl Proteinanalyse nach abcam 1 % NP-40 Gelöst in Aqua dest. 0,5 % Na-Deoxycholat 0.1 % SDS Dem Puffer werden vor dem Gebrauch noch Phosphataseinhibitor und Proteininhibitor zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. 7,7mM Tris (pH 7,5) TBS(T)150mM NACl +Tween (bei TBST) Transferpuffer 25 mM Tris-Base (pH 8.0 - 10.5)

2.1.4 Antikörper

Antikörper

Primärantikörper gegen α-sma	
Primärantikörper gegen FN-EDA	
Primärantikörper gegen β1	
Primärantikörner gegen ß4	

Primärantikörper gegen β 4 Primärantikörper gegen β 7

Sekundärantikörper anti mouse

Gelöst in Aqua dest. | 192 mM Glycin

Sekundärantikörper anti rabbit

Sekundärantikörper anti goat

Polyclonal Goat Anti Mouse Immunglobulins/HRP Dako

Bezeichnung

Polyclonal Goat Anti Rabbit Immunglobulins/HRP Dako

Polyclonal Mouse??? Anti Goat Immunglobulins/HRP Dako

2.2 Methoden

Die in den folgenden Kapiteln erörterten Methoden wurden gemäß der SOPs (Standard Operating Procedure) des molekularbiologischen Labors der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie durchgeführt.

2.2.1 Patientenproben und Ethikvotum

Das verwendete Ethikvotum, welches die Studiennummer: 5882R sowie Registrierungs-ID: 2016116086 aufweist, trägt den Titel "Erstellung einer Biobank zur Erforschung des Morbus Dupuytrens".

Tag O	des hs	Behandlung	
T0		Zellaussaat	
		Kontrollzellen:	Mediumwechsel
		Vergleichszellen:	Mediumwechsel + Zugabe TGF- β
TI			
		Kontrollzellen:	Bestrahlung + Mediumwechsel
		Vergleichszellen:	Bestrahlung + Mediumwechsel + Zugabe TGF-β
		Kontrollzellen:	Mediumwechsel
		Vergleichszellen:	Mediumwechsel + Zugabe TGF-β
<i>T2</i>			
		Kontrollzellen:	Bestrahlung + Mediumwechsel
		Vergleichszellen:	Bestrahlung+ Mediumwechsel + Zugabe TGF-β
		Kontrollzellen:	Mediumwechsel
		Vergleichszellen:	Mediumwechsel + Zugabe TGF-β
<i>T3</i>			
		Kontrollzellen:	Bestrahlung + Mediumwechsel
		Vergleichszellen:	Bestrahlung + Mediumwechsel + Zugabe TGF-β
<i>T4</i>		Zellernte & Konse	ervierung in RIPA

Tabelle 2 Versuchsaufbau

Als Untersuchungskollektiv der Kontrollpatienten dienten Proben aus gesunden Palmarfaszien von Patienten mit Karpaltunnelsyndrom (CTS).

Zellkultur 2.2.2

Verwendet werden Zellen aus je neun Patienten mit Karpaltunnelsyndrom sowie Morbus Dupuytren, deren Herstellung sowie Kultivierung in Abschnitt 2.2.2.3 näher beschrieben wird. Alle Zellproben werden, wenn nicht anders beschrieben, in Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) Medium mit 4,5 g Glucose, 10 % Fetal Calf Serum (FCS) sowie 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Jegliche Zellkulturarbeit wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Isolierung der Fibroblasten

Die für die Arbeit verwendeten Fibroblasten werden aus dem Präparat isoliert. Die Patienten, oder der gesetzliche Vormund haben gemäß den Richtlinien der Ethikkommission ihr Einverständnis erklärt, dass die Präparate zu Forschungszwecken verarbeitet werden dürfen.

Während des Transports befinden sich die Präparate in einem Zellkulturmedium, welches durch zweimaliges Waschen mit sterilem PBS ohne Ca2+ und Mg2+ (PBS2-) entfernt wird. Zur Weiterverarbeitung werden die Präparate in ca. 5 mm breite Streifen geschnitten, in sterile 50 ml Falcons überführt, mit ca. 10 ml einer frisch angesetzten Dispase-II-Lösung gebettet und über Nacht bei 4 °C auf dem Taumel-Rollenmischer inkubiert. Am nächsten Tag werden die Präparate, bevor sie bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert werden, bei 37 °C im Schüttelwasserbad für 10-30 Minuten inkubiert. Der durch die Zentrifugation entstandene Überstand wird verworfen und der zweite enzymatische Verdau wird eingeleitet. Dies geschieht mit Hilfe von ca. 5-7 ml Collagenase-Puffer (mit 0,2 % Collagenase I; 1,5 % BSA) pro Falcon/Präparat. Die Präparate müssen für ca. 30 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad verbleiben. Für die Isolation der Fibroblasten wird das Gewebe in ein Zellsieb überführt. Durch Druck auf das Gewebe mittels eines Glasstempels werden die Zellen in eine Petrischale freigesetzt. Damit möglichst viele Zellen isoliert werden, wird dieser Vorgang zwei bis dreimal im Wechsel mit einer PBS²⁻ Spülung wiederholt. Die entstandene Zellsuspension wird nun in sterile 50 ml

Falcons überführt und bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des entstandenen Überstandes wird

das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert. Die sich nun in Kulturmedium befindlichen Fibroblasten werden auf sterile Petrischalen ausgesät. Damit befinden sie sich in der Passage 0 und werden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgt nach 24 Stunden, da es sich bei den Zellen um frisch isolierte Fibroblasten handelt. Dadurch sollen vorhandene Gewebsbestandteile sowie tote Zellen vollständig entfernt werden.

Ist mikroskopisch beurteilbar, dass die Fibroblasten in der Petrischale konfluieren, können sie geerntet und auf 6-Well-Platten ausgesät werden. Damit ein adäquates Überleben der Zellen gewährleistet werden kann, sollte das Medium alle zwei Tage gewechselt werden.

2.2.2.2 Kryokonservierung

In Vorbereitung auf die anstehende Krykonservierung der Fibroblasten werden zunächst die Kryoröhrchen beschriftet. Die Beschriftung unterliegt folgendem Muster:

Art der Zellen-Name/Bezeichnung-Passage-Datum

Das Einfriermedium muss steril, aus 90 % FCS sowie 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), angesetzt werden, ggf. kann eine Lagerung im Kühlschrank erfolgen. Da DMSO über 0 °C zytotoxisch wirkt, muss das Einfriermedium auf Eis gestellt werden.

Zunächst muss das Medium abgenommen werden. Um das restliche Medium zu entfernen, werden die Zellen nun mit PBS²⁻ gewaschen, welches anschließend wieder abgenommen wird. Nun erfolgt die in Abschnitt 2.2.2.4 beschriebene Trypsinierung der Zellen mit anschließender Inaktivierung mittels FCS-haltigem Medium. Die Zellsuspension wird nun in ein 50 ml Falcon überführt und ein aliquoter Teil (10 µm) wird für die Bestimmung der Zellzahl entnommen.

Pro Milliliter Einfriermedium werden $1x10^6$ Zellen gerechnet. Nachdem also die Menge an benötigtem Einfriermedium mittels der Zellzahl errechnet wurde, kann die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert werden, der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet wird im eisgekühlten Einfriermedium resuspendiert. Jeweils 1ml der Zellsuspension wird in ein Kryoröhrchen überführt und dieses wird anschließend auf Eis gelagert. Nachdem die gesamte Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt wurde, kann man diese in ein Kryoeinfriergerät stellen und unmittelbar danach für mindestens 4 Stunden in 100 % Isopropanol bei -80 °C lagern. Dabei ist es wichtig, dass die Zellen kontrolliert heruntergekühlt werden, circa 1 °C pro Minute. Zur Langzeitlagerung können sie anschließend in -80 °C kalten Stickstoff überführt werden. Dies kann man frühestens nach 24 Stunden, spätestens nach 14 Tagen durchführen.

2.2.2.3 Zellen in Kultur nehmen/ Auftauen von Zellen

Da im Einfriermedium der Zellen zu 10 % DMSO enthalten ist, muss beim Auftauen der Zellen zügig auf Eis gearbeitet werden, um mögliche Zellschäden bzw. möglichen Zelluntergang zu vermeiden. Die Kryoröhrchen werden, um Zellstress durch plötzlichen Temperaturanstieg aufgrund des warmen Mediums zu vermeiden, kurz im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, sodass noch 1/3 der Zellsuspension gefroren ist. Danach werden die Zellen zügig mit vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert und in ein bereits mit Zellkulturmedium gefülltes, vorbereitetes Falcon überführt. Nun wird die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, anschließend wird der Überstand abgesaugt, das entstandene Pellet mit einer definierten Menge an Kulturmedium resuspendiert und in die jeweiligen Kulturgefäße überführt. Anschließend können sie im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert werden.

2.2.2.4 Subkultivierung der Zellen und enzymatisches Passagieren mit Trypsin-EDTA Um adhärent wachsende Fibroblasten zu subkultivieren, wird im ersten Schritt das Medium dekantiert. Anschließend erfolgt eine Spülung mit warmen PBS²⁻, wodurch eventuell noch vorhandene

Mediumreste sowie tote Zellen entfernt werden. Nun wird das PBS²⁻ abgesaugt, die Zellen werden mit 5 ml einer Trypsin/ EDTA-Lösung (im Verhältnis 1:10, angesetzte Lösung aus 5 ml Trysin und 45 ml PBS) bedeckt und für 8 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Um das Trypsin zu inaktivieren, werden nun 13 ml FCS-haltiges Medium auf die Zellen gegeben. In der mikroskopischen Kontrolle kann man nun nach 5-10 Minuten ein Abrunden der Zellen beobachten. Unter Anwendung eines "shake-off"-Verfahrens werden die Zellen endgültig vom Boden des Gefäßes gelöst. Bei diesem Verfahren wird leicht gegen die Seiten des Kulturgefäßes geschlagen. Die restlichen, noch am Kulturgefäßboden haftenden Zellen werden mit Hilfe eines Schabers durch druckfreies Wischen gelöst. Die Zellsuspension wird nun mehrfach resuspendiert und anschießend in ein steriles 50 ml Falcon überführt. Dieses wird dann für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird dekantiert und das im Boden des Falcons verbleibende Zellpellet mit 5-10 ml, abhängig von der Anzahl der Zellen, die subkultiviert werden sollen, Kulturmedium resuspendiert. Die absolute Zellzahl kann nun mittels Neubau-Zählkammer (Hämozytometer) bestimmt werden, sodass man eine definierte Zellzahl aussäen kann. Die Zellsuspension kann, sobald dies nicht notwendig ist, in gleichen Teilen in weitere Kulturgefäße, in welche zuvor eine ausreichende Menge (10 ml) an frischem Kulturmedium gefüllt wurde, überführt werden.

2.2.2.5 Mediumwechsel

Vor Beginn des Mediumwechsels erfolgt eine mikroskopische Kontrolle der Zellkultur. Dabei wird vor allem auf die Zellgröße, die Zelldichte, die Form der Einzelzellen sowie der Anheftungsgrad (anheftend oder schwimmend) beurteilt. Danach wird das alte Medium inklusive eventuell abgelöster Gewebsstücke oder toter Zellen abgesaugt und neues, aufgewärmtes Medium einpippettiert.

2.2.2.6 Bestimmung der Zellzahl mittel Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer)

Oft benötigt man definierte Zellzahlen, so zum Beispiel während des Prozesses der Kryokonservierung oder bei der Aussaht der Zellen. Um solch eine Zellzählung von Suspensionen unter dem Mikroskop anfertigen zu können, benötigt man eine Neubau-Zählkammer (Hämozytometer), in die man dann eine definierte Menge an Zellsuspension einpipettieren kann.

Auf die Zählkammer wird zunächst ein befeuchtetes Deckgläschen platziert, sodass die Newtonringe erscheinen und ein festes Anhaften des Gläschens gewährleistet ist. Nun werden 10 μl der Zellsuspension so am Rande des Deckgläschen pipettiert, dass diese mittels Kapillarkräfte zwischen die Zählkammer und das Deckglas gelangt. Mikroskopisch unter 10-facher Vergrößerung kann nun die Zellzahl pro ml bestimmt werden. Dafür müssen alle vier Zählfelder ausgezählt, der Mittelwert bestimmt werden und dieser wird dann mit dem Kammerfaktor multipliziert. Dieser Faktor liegt bei der Neubauer-Zählkammer bei 10⁴, da eine Kammer ein Volumen von 0,1 μl fasst. Ebenfalls muss man den Verdünnungsfaktor berücksichtigen. Um die absolute Zellzahl zu bestimmen, wird der Wert mit dem Volumen der Zellsuspension multipliziert.

Gezählte Zahl * Verdünnungsfaktor * Kammerfaktor
$$= 20*5*10^4 = *10^5$$

$$\frac{haben}{soll} = \frac{9*10^5}{10^5} = 9$$

$$\frac{5}{20} = 0.25 * 8 = 2ml \ von \ der \ Zellsuspension$$

$$ad \ 8ml = 6ml \ Medium$$

2.2.2.7 Differenzierung, Zugabe von Zusätzen und Behandlung

Für den Versuchsaufbau wurden die Fibroblasten teilweise über mehrere Tage mit Zusatz von TGF- β kultiviert. Zur besseren Untersuchung des Effekts wurden parallel Kontrollzellen kultiviert, welche

keine Zusätze erhielten. Vor Beginn jedes Versuchs musste sichergestellt werden, dass genügend vitale Fibroblasten (CTS und MD) vorhanden sind. Diese wurden ausgesät und anschließend für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte der erste Mediumwechsel sowie die Zugabe von TGF-β in die entsprechenden Wells. Dieser Vorgang wurde auch an den zwei darauffolgenden Tagen wiederholt, sodass die Zellen insgesamt dreimal behandelt wurden. Am letzten Tag des jeweiligen Versuchs wurden die Zellen geerntet du für weitere Verarbeitung aufgearbeitet.

Die Fibroblasten wurden mit Hilfe einer Prototyp LED (light-emitting diode) Lampe der Firma Philips Research (Aachen) bestrahlt. Diese wurde vor Beginn der jeweiligen Bestrahlung kalibriert und hat dann blaues Licht im Bereich von 453 nm emittiert, was einer elektrischen Leistung von 68,87 W entspricht. Die zu behandelnden Zellen wurden pro Versuch an drei Tagen bestrahlt und zwischen jeder Bestrahlungseinheit für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Vor jeder Bestrahlungseinheit wurde das Medium abgesagt und jedes Well mit 1,5ml PBS (+Ca²⁺ + Mg²⁺) gefüllt. Darauffolgend wurden die Zellen unmittelbar zentral unter die LED-Lampe positioniert und mit einer Dosierung von 80 J/ cm² bestrahlt.

Unmittelbar nach der Bestrahlungseinheit wurde das PBS (+Ca²⁺ + Mg²⁺) wieder abgesaugt und auf jedes Well 1,5ml Medium (ggf. mit Zusatz 5ng/ml TGF-β) hinzugegeben. Danach wurden die Fibroblasten für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Jede Zelllinie wurde pro Experiment dreimal behandelt.

2.2.2.8 Zellernte

Das Zellpellet wird mit 500 µl PBS resuspendiert und anschließend bei 13300 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird dekantiert und anschließend werden 30 µl des Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA)-Puffers hinzugegeben. Die Proben können nun bei -20 °C eingefroren werden, bevor sie für weitere Experimente verwendet werden.

2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Western Blot Analyse

Um die Expression verschiedener Proteine in der Pathogenese des Morbus Dupuytren zu untersuchen, wurde unter anderem eine Western Blot Analyse durchgeführt. Als Kontroll-Gruppe wurden ebenfalls die Zellproben von Patienten mit Karpaltunnelsyndrom untersucht.

Dafür wurden die jeweiligen Zellen in 6-Well Platten mit einer Dichte von $5x10^4$ ausgesät und wie in Abschnitt 2.2.2.7 über den Zeitraum von drei Tagen behandelt. Damit die Zellen bis zu ihrer weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert werden können, wurden sie nach der letzten Behandlung geerntet und mit RIPA-Puffer versetzt.

2.2.3.1 Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung

Bevor sie für die Experimente eingesetzt werden, werden die Fibroblasten in keiner fest definierten Menge ausgesät. Da sie im Rahmen der Kultivierung teilweise bis zu 90 % konfluieren, ist für die Methodik des Western Blots ist die Proteinbestimmung obligat.

Das Protein Assay ist eine kolorimetrische Methode und dient zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration. Diese Reaktion basiert auf der Methode nach Lowry, welche sich aus zwei Schritten zusammensetzt:

Der erste Schritt beruht auf der Bildung eines blau-violetten Komplexes zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer (II)-Ionen in einer alkalischen Lösung, auch Biuret-Reaktion genannt.

Im zweiten Schritt reduziert im gelben Folin-Reagenz dieser biuretähnliche Komplex die Schwermetallionen mittels der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin. Die dadurch entstandenen reduzierten Stoffe besitzen eine charakteristische Blaufärbung mit einem Absorbtionsminimum bei 450nm sowie ein Absorbtionsmaximun bei 750 nm.

Die Zellpellets in RIPA können für längere Zeit bei -80 °C aufbewahrt werden. Für die Proteinisolation sowie für die Zelllyse werden die Zellproben zunächst auf Eis gebettet. Um die Zellen zu lysieren werden die Proben stark gevortext, anschließend werden sie sonifiziert (zweimal, jeweils 30 Sekunden).

Im Anschluss werden die Proben für 10 Minuten bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert, um mögliche Zelltrümmer zu selektieren.

Die sich in RIPA befindenden Proben werden in einem Verhältnis von 1:6 mit PBS²⁻ verdünnt. In Doppelbestimmung werden je 10 μl des Proteinstandards (siehe Tabelle 4) und der Probe in eine Mikrotiterplatte (96 Well) pipettiert, um danach mit je 200 μl des Working Reagenzes versetzt zu werden. Dieses Working Reagenz besteht aus einer Lösung A (Biocinonsäure) und Lösung B (4 % Kupfersulfat), welche in einem Verhältnis von 50:1 gemischt werden. Das Volumen des Working Reagenzes wird nach folgender Formel bestimmt:

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

Bsp. mit 10 Proben:

$$(9 + 10) \times 2 \times 200 \mu l$$
 = 7,6 ml WR

Die Platte wird dann mit einer Folie abgedeckt und für 30 Sekunden auf einen Schüttler gestellt, sodass gewährleistet wird, dass sich die Reagenzien vermischen können. Nach der Durchmischung muss die Platte für 30 Minuten bei 37 °C inkubieren. Danach kann die Absorption mit Hilfe des Photometers bei 562 nm gemessen werden.

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

Tabelle 3 Zusammensetzung des Proteinstandards

2.2.3.2 Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse wurde durchgeführt, um Schlüsselproteine der Myofibrogenese und deren Inhibition zu untersuchen.

Prinzip der Western Blot Analyse:

Die Western Blot Analyse dient dem elektrophoretischen Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran mit anschließender Detektion unter Verwendung von mono- und/ oder polyklonalen Antikörpern. Das Protein Blotting im engeren Sinn beschreibt dabei die Übertragung von Proteinen auf eine Membran. Es gibt zwei wesentliche Varianten, mit welchen solch ein Blotting durchgeführt werden kann. Beim Dot-Blot werden die durch eine Proteinbestimmung quantifizierten Proteine auf eine Membran getüpfelt. Beim sogenannten Gel-Blot, welcher in den unserer Methodik eingesetzt wurde, werden die Proteine vorweg gelelektrophoretisch getrennt und daraufhin auf eine Membran transferriert. Die gelelektrophoretische Separation beruht auf der Molmasse, der Ladung, dem isolelektrischen Punktes oder einer Kombination dieser Methoden.

Den Erfolg des Blotting Vorgangs kann man mit Hilfe einer Ponceau-Färbung visualisieren. Bevor die eigentliche Nachweisreaktion der zu untersuchende Proteine mittels des Antikörper-Overlays von

Statten geht, kann man diese unspezifische Färbung nutzen, sodass die nachzuweisenden Proteine visualisiert werden.

2.2.3.2.1 Verwendete Gele und Probenvorbereitung

Da die zu untersuchenden Proteine verschiedenste, sehr nah beieinander gelegene Größen aufwiesen, wurden bereits fertige Gele verwendet.

Die Proben werden, vor Beladung der Gele, mit Laemmli-Puffer beladen und die Proteine bei 95 °C für 5 Minuten hitzedenaturiert. In die erste Tasche jedes Gels wird zunächst eine Proteinleiter pipettiert, sodass man im Anschluss Proteingrößen besser vergleichen und die Lokalisation des gesuchten Proteins besser detektieren kann.

2.2.3.2.2 Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das verwendete Verfahren der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) ermöglicht es, die in den Proben enthaltenden Proteingemische entsprechend ihrer Molmasse zu separieren. Unter Zuhilfenahme von Hitze (95 °C) sowie Laemmli-Puffer werden die Proteine denaturiert. Das sich in den Gelen befindliche SDS kann nun an die Polypeptidketten binden. Aufgrund des enthaltenden Natriumdodecylsulfat weist das SDS eine negative Ladung auf, welche proportional zur Molmasse der Proteine ist. Dadurch wird die Eigenladung der Proteine überdeckt. Somit besitzen alle Proteine der Proben eine einheitliche negative Ladung. Das sich im Laemmli-Puffer befindliche β -Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken und führt somit zu einer Linearität der Proteine.

In diesen Experimenten wurde eine diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese verwendet, die sich aus einem Trenn- (resolving gel) sowie einem Sammelgel (stacking gel) zusammensetzt.

Das Sammelgel dient dazu die Proteinmischung bei einer niedrigen Spannung am Übergang zum Trenngel zu sammeln (stacking), Dieser Vorgang basiert auf dem Unterschied der Ionen zwischen den Gelen und in dem Elektrophoresepuffer. Man kann eine charakteristische Bande am Übergang der Gele erkennen. Sie kommt durch den Feldstärkegradienten zu Stande. Dieser beruht wiederum auf den schnellen Wanderungsgeschwindigkeiten der Cl⁻-Ionen des Sammelpuffers im Vergleich zu den Glycin-Ionen (Elektrophoresepuffer) und den Proteinen.

Die Wanne, in der sich die Gele befinden, wird nun mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Proteinleiter sowie die Proteinproben können nun in die dafür vorgesehenen Taschen pipettiert werden. Der Deckel der Wanne wird verschlossen und für 15 min. wird eine Spannung von 60 W angelegt. Für den Durchlauf der Proteine durch das Gel wird die Spannung folglich auf 130 W erhöht. Durch das im Laemmli-Puffer enthaltende Bromphenolblau werden die Proben während des gesamten Prozesses visualisiert. Wenn die Proben das gesamte Gel passiert haben, kann man die Spannung abschalten.

2.2.3.2.3 Blotting

Die Übertragung der Proteine eines Gels auf die Trägermembran beschreibt das Blotting im eigentlichen Sinn. Der Aufbau der Blot Kassette kann man Abb. 3 entnehmen. Wie ebenfalls auf Abbildung 3 zu sehen, wandern die Proteine aufgrund des Anlegens einer Spannung aus dem Gel auf die darunter liegende Membran. Hierfür wird die Trans Blot Turbo Apparatur der Firma BioRad verwendet. Während des Prozesses des Blottings wird eine Spannung von 25 V und eine Stromstärke von 2,5 A angelegt.

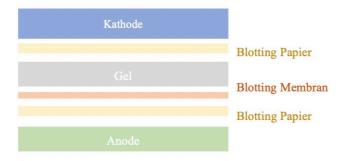


Abbildung 4 Aufbau des Western-Blot-Systems. Zunächst wird auf die Anode ein Blotting Papier transferiert, hierauf die Blotting Membran, anschließend das fertige Gel sowie ein erneutes Blotting Papier. Zum Schluss wird die Kathode aufgelegt und die Blot Kassette ist fertig zum bevorstehenden Prozess des Blottings.

2.2.3.2.4 Ponceau-S-Färbung

Diese spezielle Färbung findet ihren Nutzen in der Visualisierung und Evaluation des Blotting-Verfahrens. Die Nitrocellulosemembran wird in eine saubere Schale überführt und für ca. 2 Minuten mit der Poncaeu-S-Färbelösung beträufelt. Danach erfolgt eine Spülung der Membran mit A-dest., sodass die Proteinbanden besser visualisierbar sind. Grundlage dieser Färbung ist eine reversible, unspezifische Bindung an die positiv-geladenen Aminogruppen der Proteine.

Für die im Anschluss stattfindende Immundetektion ist es erforderlich, dass die Membran mit Hilfe von TBS-T (Tris Buffer Saline mit Tween) entfärbt wird.

2.2.3.2.5 Antikörper-Overlay und Detektion

Die Immundetektion der Zielproteine läuft in zwei wesentlichen Schritten ab.

Im ersten Schritt wird die Membran geblockt und mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation wird die Membran dreimal für je 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Dadurch werden ungebundene Antikörper ausgeschwemmt und die Bildung von sogenannten "Wölkchen" kann vermieden werden.

Im darauffolgenden zweiten Schritt wird die Membran mit einem Zweitantikörper, wessen Konzentration in allen Experimenten gleich gewählt wurde (1:100 in TBS-T), für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erfolgt die Detektion des Antikörpers in der Geldokumentationsanlage. Die HPR (Meerrettichperoxidase), welche an den Zweitantikörper gekoppelt ist, fungiert als Peroxidase und katalysiert bei der Visualisierung des Blots die Chemilumineszenzreaktion, indem sie das in der Entwicklerlösung enthaltende Luminol oxidiert. Nach zügiger Beschichtung der Blottingmembran mit der Entwicklerlösung werden diese in der Geldokumentationsanlage in Position gebracht und mit Hilfe von UV-Licht werden die zu findenden Proteinbanden identifiziert und somit für folgende densitometrische Auswertung fotografisch festgehalten.

In den Experimenten werden variierende Antikörper verwendet, deren Konzentration und benötigte Puffer wie vom Hersteller empfohlen, verwendet wurden. (siehe Tabelle 5).

Für eventuelle später Detektion, ggf. mit Nachweis neuer Antikörper, können die Blottingmembranen lichtgeschützt bei 4 °C in TBS aufbewahrt werden. Für die Qualität der Membranen ist regelmäßiger Wechsel des TBS wichtig.

Primärantikörper	Größe in kDA	Host species	Target species		Verdünnung	
					WB	IHC
Anti-alpha smooth muscle Actin antibody	42	Hase		Polyklonal	0.5 - 2 μg/ml	
Anti-Fibronectin antibody		Maus		Monoklonal	1 - 5 μg/ml.	
Anti-Integrin alpha V + beta 6 antibody	115	Maus		Monoklonal	unsuitable	
Anti-Integrin beta 1 antibody	88-130	Hase		Polyklonal	1/5000 - 1/10000	1/100 - 1/1000
Anti-Integrin beta 4 antibody	202	Hase		Polyklonal	1/500 - 1/5000	1/20 - 1/200
Anti-Integrin beta 7 antibody [72-87	Hase		Monoklonal	1/1000 - 1/10000	
Goat Anti-Mouse IgG H&L		Ziege	Maus		1/2000 - 1/20000	1/2000 - 1/20000.
Goat Anti-Rabbit IgG H&L		Ziege	Hase		1/2000 - 1/50000	1/2000 - 1/50000

Tabelle 4 Übersicht über die verwendeten Antikörper und der jeweiligen Verdünnungen

2.2.4 Durchflusszytometrie (FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting))

Die Bestimmung der Rezeptorexpression nach Bestrahlung und Aktivierung dient in diesem Versuchsansatz der Einordnung des Blaulichteffekts innerhalb der TGF-β-Signalkaskade. Mittels der Durchflusszytometrie wird untersucht, ob die Bestrahlung mit blauem Licht in TGF-β- aktivierten Zellen bereits einen Einfluss auf die Rezeptorexpression ausübt.

Für die qualitative sowie quantitative Bestimmung und Darstellung zahlreicher zellulärer Eigenschaften einer Zellpopulation, wie beispielsweise wie Zellgröße und Granularität, findet die Methodik der Durchflusszytometrie ihre Anwendung. Diese Eigenschaften werden von zwei Photodetektoren, dem FSC (forward scatter) und der SSC (side scatter), analysiert. Des Weiteren kann man durch vorangegangene mittels Fluoreszenzfarbstoffs markierte Zellstrukturen quantifizieren. Bei solchen Strukturen kann es sich unter anderem um Moleküle, Proteine oder Oberflächenantigene handeln. Die Intensität der Fluoreszenzemission der zu analysierenden Strukturen oder Zellen werden durch verschiedenste Fluoreszenzdetektoren gemessen.

Anschließend erfolgt die Bestimmung der Rezeptorexpression nach 3-tägiger Bestrahlung und/oder Aktivierung mit TGF-β. In dem vorherigen Experiment wurden die Fibroblasten über einen Zeitraum von 3 Tagen täglich zum Teil mit TGF-β aktiviert sowie zum Teil mit 80 J/cm² bestrahlt. Am vierten Tag erfolgte die Zellernte mittels Cellwash (3% FCS), die Überführung der Proben in je ein FACS-Röhrchen je Entität sowie die Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 Minuten. Der entstandene Überstand wird abgesaugt. Jede Probe wird mit 200 μl Cellwash (3% FCS) resuspendiert. Unter lichtgeschützten Bedingungen wird nun je 3 μl der entsprechenden Antikörper für die Integrine β 1 und 7 addiert. Da die Abschlussmessung und Auswertung auf die ungefärbten Zellen standardisiert wird, muss jede Probe in doppelter Ausführung vorhanden sein. Im Anschluss müssen die Proben erneut lichtgeschützt für 45 Minuten auf Eis inkubieren. Nach der Inkubation wird die überschüssige Menge an Antikörper mit 3-4ml Cellwash (3% FCS) abgewaschen. Im nächsten Schritt werden, nachdem die Proben erneut bei 1200rp für fünf Minuten zentrifugiert wurden, die Zellpellets mit 200 – 400μl Cellwash (3% FCS) resuspendiert. Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgt mittels Durchflusszytometer FACSCalibur, die Auswertung und Analyse mit Hilfe des Programms CellQuest Pro; beides von der Firma Becton Dickinson.

2.2.5 Immunhistochemie für Kryoschnitte

Die Immunhistochemie dient unter anderem zur Analyse der chemischen Zusammensetzung eines Gewebes. Die H&E Färbung, beispielsweise, hilft durch das enthaltende Hämotoxylin saure, basophile Moleküle, wie die DNA in Zellkernen, anzufärben. Das außerdem enthaltende Eosin bindet basische, eosinophile Moleküle und hilft dabei, zum Beispiel Proteine im Zytoplasma oder Kollagen der extrazellulären Matrix, anzufärben.

Des Weiteren basiert die Immunhistochemie auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion. Ziel ist es dabei mittels Antigen-spezifischer Antikörper das Antigen im Gewebe zu detektieren. Dieses kann dabei auf der Zelloberfläche gebunden, in der Zelle oder in der extrazellulären Matrix vorhanden sein. Man muss jedoch beachten, dass nicht die Antikörper-Antigen Reaktion per se detektiert wird, sondern vielmehr der verwendete Antikörper, welcher mit einem Reportermolekül konjugiert ist. Ein Beispiel für solch ein Reportermolekül ist Fluorochrom bei der Immunfluoreszenz.

Im ersten Schritt werden die Proben in Aceton bei -20 °C fixiert und anschließend lässt man diese trocknen. Die Gefrierschnitte werden in 200 ml PBS und 50 µl H₂O₂ für 10 Minuten gebadet. Durch diesen Schritt soll das Auftreten falsch positiver Signale, welche aufgrund der endogenen Peroxidase-Aktivität des Gewebes erzeugt werden können, verhindert werden. Daraufhin werden die Schnitte in PBS mit 2 % PBS A_{Albumin} oder FCS eingetaucht. Zum "Blocking" verwendet man Monoclonal Normalhorse (Common Vector S 2000 (20 ml)) in einer Verdünnung von 1:100 oder Polyclonal Normalwine (Vector S 400) ebenfalls in einer Verdünnung von 1:100. Dieser Prozess dauert 30 Minuten und anschließend wird der Überstand abgeschüttet. Nun wird der Primärantikörper in PBS A_{Albumin} angesetzt. Die Verdünnung der jeweiligen Antikörper sind in Tabelle 5 zu entnehmen. Es erfolgt eine das je fünfminütige Spülen in PBS, wobei die letzte Spülung mit einem "Schuss" PBS A_{Albumin} durchgeführt wird. Gegebenenfalls muss jeder Primärntikörper getrennt angesetzt werden. Die verwendeten Brückenantikörper bindet universell an die Primärantikörper jeglicher Spezies und können bei allen Färbungen verwendet werden. Es folgt die Zugabe des 1. Brückenantikörpers (Biotinyliertes Anti Mouse (IgG (H+L) Vector BA 2001)) in einer Verdünnung von 1:100 für 30 Minuten bzw. Swine Anti Rabbit (Dako Z 0196) in einer Verdünnugn von 1:50 für 30 Minuten sowie folgend die Spülung in PBS, auch hier wieder mit Zugabe von einem "Schuss" PBS AAlbumin in letzter Spülung. Es folgt die Zugabe des 2. Brückenantikörpers Monoclonal ABC-Kit (Vectastatin, Vector PK 4000) in einer Verdünnung von 1:50 für 30 Minuten bzw. Polyclonal PAP-Rabbit (Dako Z 113) in einer Verdünnung von 1:200 für 30 Minuten sowie anschließend eine Spülung in PBS. Nun werden zur Darstellung der Epitope mittels Farbreaktion das DAB-Chromogen (5 ml DAB (Sigma D-5637)) in 10 ml PBS aufgelöst und 3 µl 30% H₂O₂ (107209 Merck 250ml) aufgetropft und die Suspension ggf. durch einen Millipoorfilter filtriert. Bei allen Färbungen wirkt diese Farbreaktion für 10 Minuten ein. Anschließend spült man mit einmalig PBS, zweimalig mit Aqua dest. und färbt mit Hämatoxylin nach Mayer 3 Minuten gegen, umso die Zellkerne darzustellen, als Kontrast zur spezifisch-immunhistochemischen Färbung. Zuletzt erfolgt die Eindeckelung mittels xylohaltigem Eindeckmedium.

2.2.6 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden mit Hilfe von Microsoft Excel 2011 sowie dem Statistikprogramm GraphpadPrism 5.0 aufgearbeitet und ausgewertet. Für die Beurteilung der statistischen Signifikanz wurde ANNOVATwoWay sowie der T-Test verwendet. Ab einem Wert von P<0,05 wurde eine statistische Signifikanz angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Vorarbeit: Proliferation und Differenzierung der Fibroblasten in der Pathogenese des Morbus Dupuytren

Wie bereits in zahlreichen vorangegangenen Arbeiten belegt werden konnte, hat blaues Licht einen Einfluss auf die Differenzierung sowie die Proliferation von Fibroblasten. Es wurde gezeigt, dass besagte Prozesse in Abhängigkeit der Dosis inhibiert werden können. Ebenso wurde präsentiert, dass das Markerprotein α-SMA in seiner Expression inhibiert wird. Hierbei zeigte sich der stärkste Effekt bei einer täglichen Bestrahlung mit einer non-letalen Dosis von 80 J/cm². Aufgrund dessen beschlossen wir auch bei dieser Arbeit ausschließlich oben genannte Dosis zu verwenden, umso die molekularphysiologischen Einflüsse auf die Pathogenese des Morbus Dupuytren zu untersuchen.

Als Kontrollgruppe wurden Zellen von Patienten mit Karpaltunnelsyndrom verwendet.

Bei den Experimenten wurde der Einfluss von blauem Licht an nativen Zellen, sowie an Zellen, welche zuvor mittels 5 ng/ml TGF-β aktiviert worden sind, untersucht.

3.2 Die Expression von α-SMA nach nach 3-tägiger Bestrahlung und/oder TGF-β-Aktivierung

Repräsentativ zur Veranschaulichung der Differenzierung der Fibroblasten kann α-SMA als Markerprotein der Myofibrogenese herangezogen werden.

Um nun die Differenzierung zu Myofibroblasten in vitro einzuleiten, wurden Fibroblasten aus Proben von Patienten mit Karpaltunnelsyndrom sowie Morbus Dupuytren über drei Tage täglich mit 5 ng/ml TGF-β behandelt und/ oder mit einer non-letalen Dosis von 80 J/cm² bestrahlt.

Vergleicht man nun die α -SMA-Expression ist in beiden Zellkollektiven ein ähnlicher Trend ersichtlich: verglichen mit der jeweiligen Kontrollgruppe, kommt es nach Behandlung mit dem Wachstumsfaktor zum Anstieg, nach Bestrahlung der Nativ-, als auch der voraktivierten Gruppe zur Reduktion der Proteinexpression. Es ist sowohl in den Proben des Karpaltunnelsyndroms als auch in den Proben des Morbus Dupuytren eine deutlich signifikante Zunahme der nativen α -SMA-Expression nach Zugabe von TGF- β zu sehen. Nach Bestrahlung konnte bei den nativen sowie auch bei den zuvor aktivierten Zellen eine Reduktion der Expression detektiert werden, welche, verglichen mit dem Kontroll-Kollektiv, signifikant höher ausfiel. Die Zellen des MD weisen des Weiteren noch einen deutlich signifikanten Abfall der α -SMA-Expression bei gleichzeitiger Aktivierung sowie Bestrahlung auf. Vergleicht man die Ausgangswerte der Kontrollgruppen ist außerdem zu vernehmen, dass die relative α -SMA-Expression bei Patienten mit MD höher, dieser Unterschied jedoch nicht signifikant ist. In den Bildern der Immunohistochemie sind die oben beschriebenen Trends im MD ebenfalls skizziert.

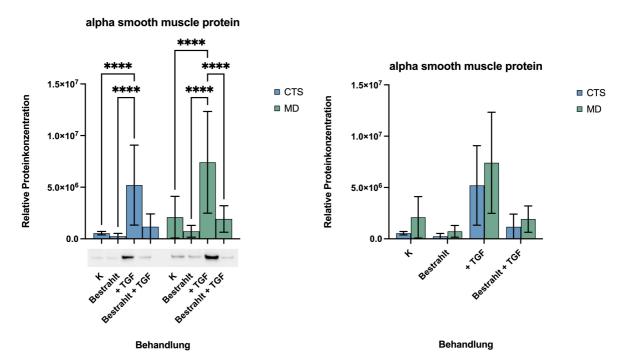


Abbildung 5 Western Blot Analyse des Proteins α -SMA nach Behandlung mittels TGF- β und/oder Bestrahlung mit blauem Licht der Dosis von 80 J/cm² Die Proben wurden täglich über drei Tage bestrahlt und mit/ohne TGF- β (5 ng/ml) aktiviert. (****= Signifikanz [p<0,0001]; n=9). Auf der linken Seite die geschachtelte Darstellung der einzelnen Behandlungen im direkten Vergleich der Proben des CTS sowie des MD sowie links unten anbei ein beispielhafter Western Blot. Rechts die gruppierte Darstellung.

3.3 Die Expression von Fibronektin-EDA nach 3-tägiger Bestrahlung und/oder TGF-β-Aktivierung

Wie bereits ausführlich in Kapitel 1.3.3 beschrieben spielt auch die ECM eine beträchtliche Rolle im Rahmen der Geweberemodellierung. Dessen Markerprotein ist die Fibronektin-Splice-Variante ED-A. Die unter Zellzug exprimierte *Extra-Domain-A* (EDA) dient als Voraussetzung für die TGFβ1-induzierte Myofibroblasten-Differenzierung.

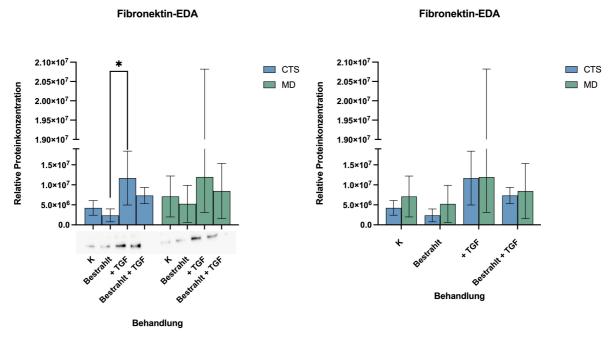


Abbildung 6 Western Blot Analyse des Proteins Fibronektin-EDA nach Behandlung mittels TGF-β und/ oder Bestrahlung mit blauem Licht der Dosis von 80 J/cm². Die Proben wurden täglich über drei Tage bestrahlt und mit/ohne TGF-β (5 ng/ml)

aktiviert. (*= Signifikanz [p<0,0101]; n=9). Auf der linken Seite die geschachtelte Darstellung der einzelnen Behandlungen im direkten Vergleich der Proben des CTS sowie des MD sowie links unten anbei ein beispielhafter Western Blot. Rechts die gruppierte Darstellung.

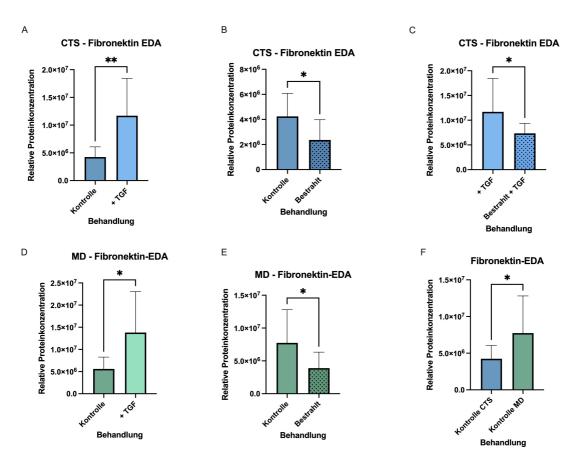


Abbildung 7 T-Test Analyse der Western Blots des Proteins Fibronektin-EDA nach Behandlung mittels TGF- β und/oder Bestrahlung mit blauem Licht der Dosis von 80 J/cm². Die Proben wurden täglich über drei Tage bestrahlt und mit/ohne TGF- β (5 ng/ml) aktiviert (*= Signifikanz; [p<0,05, **= Signifikanz [p<0,005]; n=7). A-C: Vergleich zwischen der relativen Proteinkonzentration des FN EDA im CTS zwischen den jeweiligen Behandlungen. D-E: Vergleich zwischen der relativen Proteinkonzentration des FN EDA im MD zwischen den jeweiligen Behandlungen. F: Vergleich der jeweiligen relativen Proteinexpression der Kontrollkohorte im CTS sowie MD.

Vergleicht man das Verhaltensmuster der Proteinexpression sieht man, dass sich dieses ähnliches wie das der α-SMA-Expression verhält. Beide Patientenkollektive weisen nach den einzelnen Behandlungen das gleiche Muster der Expression auf. Nach dreitägiger Behandlung mit TGF-β ist ein Anstieg, nach dreitägiger Bestrahlung ein Abfall der Kontrollwerte in beiden Gruppen zu verzeichnen. Zuvor aktivierte Zellen zeigen ebenfalls in beiden Gruppen nach Bestrahlung einen Rückgang der Fibronektin-EDA-Expression. Des Weiteren ist zu vernehmen, dass die Expression des Fibronektin EDAs im Dupuytrenschen Gewebe, verglichen mit Proben von Patienten mit CTS, erhöht ist, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant (s. Abbildung 5).

Analysiert man die jeweiligen Datensätze nun mit Hilfe der T-Test Analytik ist zu vernehmen, dass die Fibroblasten im MD signifikant mehr Fibronektin-EDA exprimieren, verglichen zu den Fibroblasten des CTS (s. Abb. 6 F). Weiterhin ist in den Zellen der jeweiligen PatientInnen mit Karpaltunnelsyndrom zum einem zu einem signifikanten Anstieg der Expression nach Zugabe des Wachstumsfaktors kommt (s. Abb. 6 A) und zum anderen zu einem signifikanten Abfall der Expression nach Bestrahlung, sowohl in den nativen Zellen (s. Abb. 6 B), als auch in den zuvor mittels TGF-β aktivierten Zellen (s. Abb. 6 C). Betrachtet man folglich die Tendenz der Expression in den Proben des Morbus Dupuytrens ist zu sehen, dass es auch hier zu einem signifikanten Anstieg der Fibronektin-EDA-Expression nach

Behandlung mittels Wachstumsfaktors kommt (s. Abb. 6 D) sowie zu einer signifikanten Expressionsreduktion nach Bestrahlung (s. Abb. 6 E) der nativen Zellen.

3.4 Die Expression diverser Integrine nach nach 3-tägiger Bestrahlung und/oder TGF-β-Aktivierung

In Anlehnung an bisherige Kenntnisse über die Signaltransduktion via Transmembranrezeptoren, sogenannte Integrine, wurde in folgenden Untersuchungen eruiert, ob im Morbus Dupuytren eine spezifische Integrinkonstellation aufzufinden ist und ob die Expression dieser durch Bestrahlung beeinflussbar ist. Das im vorherigen Kapitel erwähnte Fibronektin bindet über Integrine an Komponenten der EZM und initiiert intrazelluläre Signale.

3.4.1 Das Expressionsverhalten des Integrins β1 nach 3-tägiger Bestrahlung und/oder TGF-β-Aktivierung

Betrachtet man zunächst die Proteinexpression in den Zellen des CTS ist festzustellen, dass sich diese nach Bestrahlung sowie paradoxerweise nach Aktivierung mittels TGF-β signifikant reduziert, besonders bei erst Genanntem in deutlich signifikantem Ausmaß. Auch bei den bereits aktivierten Zellen ist nach Bestrahlung eine Reduktion der Proteinexpression zu vernehmen. Vergleicht man nun den Einfluss der Bestrahlung ist zu sehen, dass die Expressionsrate bei den nativen Zellen um ca. 55% fällt, die der voraktivierten Zellen um ca. 33%.

Ein ähnliches Verhalten weisen auch die Zellproben des MD auf. Nach Bestrahlung ist in nativen sowie voraktivierten Zellen eine Reduktion der relativen Proteinexpression zu sehen, welcher hier jedoch bei den mit TGF-β-vorbehandelten Zellen stärker ausfällt, hier ist eine Reduktion um ca. 5β% zu vernehmen. Anders als bei den Zellen des CTS steigt hier die Expression nach Behandlung mit dem Wachstumsfaktor. Des Weiteren ist zu sehen, dass in den Proben Nativkontrollen im CTS deutlich signifikant mehr Integrin β1 exprimiert wird (s. Abbildung 8).

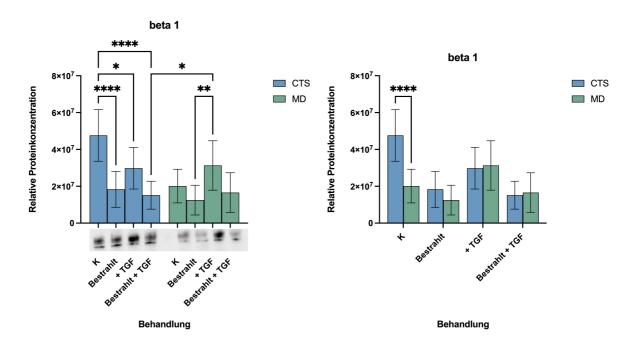


Abbildung 8 Western Blot Analyse des Integrins β 1 nach Behandlung mittels TGF- β und/ oder Bestrahlung mit blauem Licht der Dosis von 80 J/cm². (n=9). Die Proben wurden täglich über drei Tage bestrahlt und mit/ohne TGF- β (5 ng/ml) aktiviert. (*= Signifikanz [p<0,0,393], **= Signifikanz [p<0,0094], ****=Signifikanz [p<0,0001; n=9) Auf der linken Seite die geschachtelte Darstellung der einzelnen Behandlungen im direkten Vergleich der Proben des CTS sowie des MD sowie links unten anbei ein beispielhafter Western Blot. Rechts die gruppierte Darstellung.

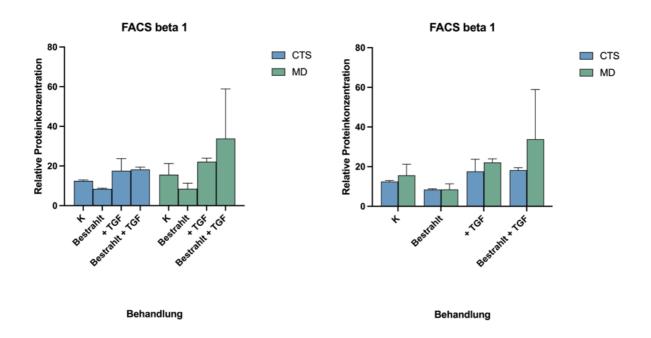
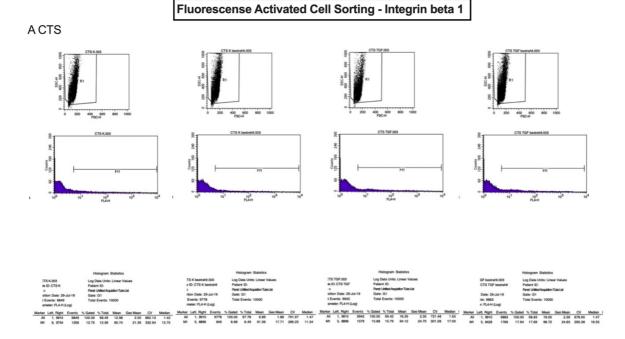


Abbildung 9 Fluorescense Activated Cell Sorting (FACS) – Analyse des Integrins β 1 nach Behandlung mittels TGF- β und/oder Bestrahlung mit blauem Licht der Dosis von 80 J/cm². Die Proben wurden täglich über drei Tage bestrahlt und mit/ohne TGF- β (5 ng/ml) aktiviert. (n=6) Rechts die gruppierte Darstellung.

Vergleicht man nun die Ergebnisse der Durchflusszytomertie (FACS, Fluorescense Activated Cell Sorting) (exemplarisch s. Abbildung 9) erkennt man, dass die Trends des Verhaltens der Proben ähnlich sind. In den Zellen des CTS ist nach Bestrahlung eine Reduktion, nach Zugabe des Wachstumsfaktors ein Anstieg der Expression zu sehen. Anders als in der Western Blot Analyse weisen bereits aktivierte und im Anschluss bestrahlte Proben minimalst erhöhte Werte auf. Korrespondierend hierzu ist in den Experimenten mit Zellen des MD in der FACS Analytik nach Bestrahlung eine reduzierte, nach Aktivierung mittels Wachstumsfaktors steigende Expression der Werte zu sehen. Aktivierte Zellen weisen nach Bestrahlung ein erhöhtes Level an Integrin β1-Expression auf. Im Unterschied zur Western Blot Analyse findet man hier jedoch keine erhöhten Werte der nativen Kontrollproben zwischen den beiden Zellkollektiven, hier ist sogar eine geringfügige, erhöhte Nativexpression des o.g. Integrins in den Fibroblasten des MD zu vernehmen (s. Abbildung 8).



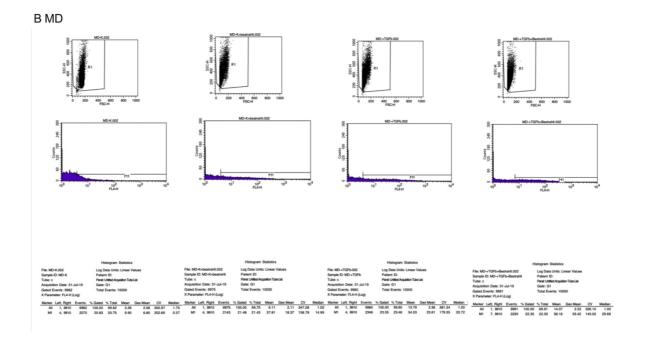


Abbildung 10 Beispielhafte FACS Analyse des Integrins β 1. A: Am Beispiel einer Patientenprobe eines Spenders mit CTS. B: Am Beispiel einer Patientenprobe eines Spenders mit MD. Jeweils von links nach rechts mit der jeweiligen Behandlung_Kontrolle – Bestrahlung – Zugabe des Wachstumsfaktors (+ TGF) - +TGF und Bestrahlung.

3.4.2 Das Expressionsverhalten des Integrins β4 nach 3-tägiger Bestrahlung und/oder TGF-β-Aktivierung

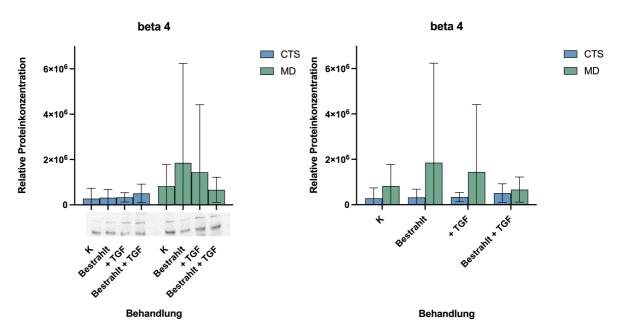


Abbildung 11 Western Blot Analyse des Integrins β 4 nach Behandlung mittels TGF- β und/oder Bestrahlung mit blauem Licht der Dosis von 80 J/cm². Die Proben wurden täglich über drei Tage bestrahlt und mit/ohne TGF- β (5 ng/ml) aktiviert. (*= Signifikanz [p<0,0101]; n=9) Auf der linken Seite die geschachtelte Darstellung der einzelnen Behandlungen im direkten Vergleich der Proben des CTS sowie des MD sowie links unten anbei ein beispielhafter Western Blot. Rechts die gruppierte Darstellung.

Auf den ersten Blick ist bereits ersichtlich, dass das Integrin $\beta 4$ im Kontrollzellkollektiv des MD in höherer Expressionsrate vorhanden ist, verglichen mit den Zellen des CTS, jedoch nicht im signifikanten Ausmaß.

Betrachtet man nun den Einfluss der einzelnen Behandlungen, sieht man, dass sich die relative Proteinexpression im CTS-Kollektiv kaum beeinflussen lässt. Es ist ein minimaler Anstieg nach Bestrahlung sowie Aktivierung mittels Wachstumsfaktors zu sehen. Bei den voraktivierten, bestrahlten Zellen ist ebenfalls ein Anstieg der Expression zu verzeichnen.

Betrachtet man nun das Expressionsverhalten in den Fibroblasten des MD, ist festzustellen, dass hier insbesondere behandelte Zellen eine große Standardvarianz aufweisen. Auch hier ist nach Bestrahlung paradoxerweise ein Anstieg der Integrinexpression zu sehen, ebenso nach Voraktivierung, jedoch in geringerem Ausmaß. Betrachtet man nun die mittels Wachstumsfaktors behandelten Zellen, ist zu sehen, dass es hier nach Bestrahlung mit Blaulicht zu einer Reduktion der Expression kommt. Bereits voraktivierte Zellen, welche folglich noch bestrahlt wurden, weisen des Weiteren die geringste Rate auf, verglichen mit der bestrahlten sowie nativen Kontrolle (s. Abbildung 10).

3.4.3 Das Expressionsverhalten des Integrins β7 nach 3-tägiger Bestrahlung und/oder TGF-β-Aktivierung

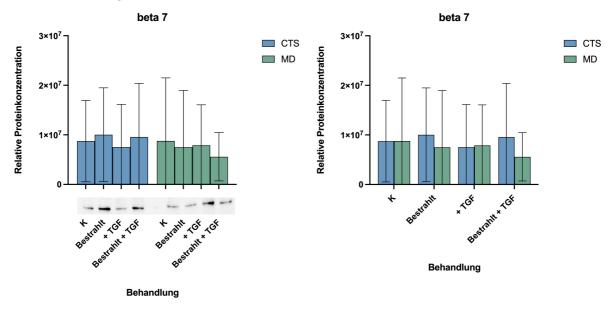


Abbildung 12 Western Blot – Analyse des Integrins β 7 nach Behandlung mittels TGF- β und/ oder Bestrahlung mit blauem Licht der Dosis von 80 J/cm². Die Proben wurden täglich über drei Tage bestrahlt und mit/ohne TGF- β (5 ng/ml) aktiviert. (n=9) Auf der linken Seite die geschachtelte Darstellung der einzelnen Behandlungen im direkten Vergleich der Proben des CTS sowie des MD sowie links unten anbei ein beispielhafter Western Blot. Rechts die gruppierte Darstellung.

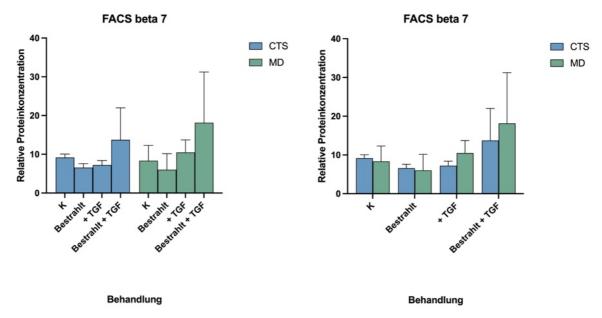


Abbildung 13 Fluorescense Activated Cell Sorting (FACS) – Analyse des Integrins β 7 nach Behandlung mittels TGF- β und/oder Bestrahlung mit blauem Licht der Dosis von 80 J/cm². Die Proben wurden täglich über drei Tage bestrahlt und mit/ohne TGF- β (5 ng/ml) aktiviert. (n=3) Auf der linken Seite die geschachtelte Darstellung der einzelnen Behandlungen im direkten Vergleich der Proben des CTS sowie des MD sowie links unten anbei ein beispielhafter Western Blot. Rechts die gruppierte Darstellung.

Bei der Expression dieses Integrins sieht man, dass sich die Werte der Kontrollkollektive des CTS und des MD kaum unterscheiden.

Die Zellen des CTS weisen nach Bestrahlung eine gering erhöhte und nach Voraktivierung eine gering verringerte Expressionsrate auf. Bei bereits aktivierten Zellen, welche im Anschluss noch bestrahlt wurden, fand man einen Anstieg der Expression.

Im MD sinkt nach Bestrahlung die relative Proteinexpression, ebenso, jedoch in minimalem Maße, nach Aktivierung mit dem Wachstumsfaktor. Bei bereits aktivierten Zellen sinkt die Expressionsrate nach Bestrahlung. Auch bei dem hier untersuchten Transmembranrezeptor fällt ein deutliches Streuungsmaß der einzelnen Proben auf (s. Abbildung 12).

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Durchflusszytometrie (exemplarisch s. Abbildung 14) wird deutlich, dass diese leicht von denen der Western Blot Analyse abweichen. Hier ist im CTS-Kollektiv nach Bestrahlung sowie nach Aktivierung eine Reduktion zu vernehmen, welcher nach erst genannter Behandlung stärker ausfällt. Mit Wachstumsfaktor aktivierte Zellen weisen nach Bestrahlung eine höhere Expressionsrate auf, verglichen mit der bestrahlten Nativgruppe sowie der aktivierten Kontrollgruppe. Die Zellen des MD weisen die Zellen der nativen Kontrollen verminderte Raten nach Bestrahlung auf. Nach Behandlung mittels Wachstumsfaktors sowie nach Bestrahlung der behandelten Zellen ist je ein Anstieg der Expressionsrate zu vernehmen (s. Abbildung 13).

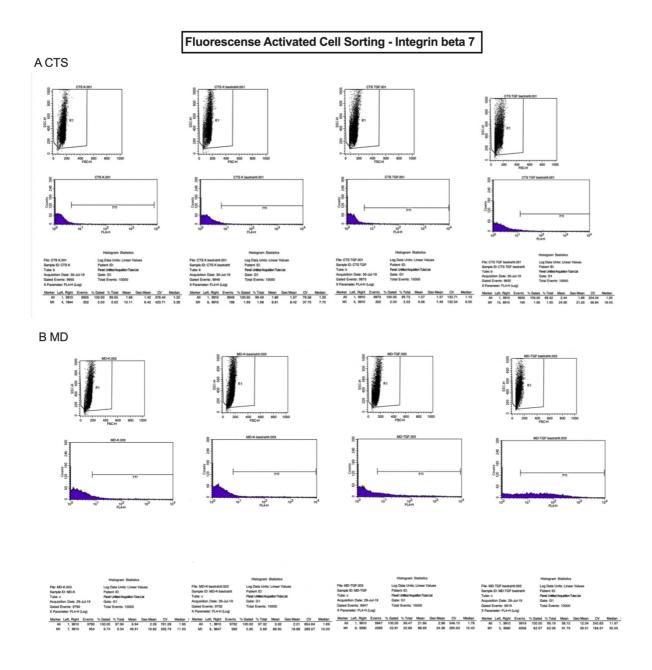


Abbildung 12 Beispielhafte FACS Analyse des Integrins β 7. A: Am Beispiel einer Patientenprobe eines Spenders mit CTS.

B: Am Beispiel einer Patientenprobe eines Spenders mit MD. Jeweils von links nach rechts mit der jeweiligen Behandlung_
Kontrolle – Bestrahlung – Zugabe des Wachstumsfaktors (+ TGF) - +TGF und Bestrahlung.

4 Diskussion und Schlussfolgerungen

4.1 Die Rolle des Markerproteins α-SMA in der Pathogenese des Morbus Dupuytren

Als Markerprotein der Myofibrolbaten sowie indirekt der Myofibrogenese stellt das Protein Alphasmooth-muscle-actin-2 (α-SMA) einen essentiellen Bestandteil bezüglich der Zellstruktur, -motilität und -kontraktilität dar.

Alternativ wurde Anfang des 21. Jahrhunderts die 4Ig-Isoform des Stressfaserproteins Palladin als neuer Marker für die Differenzierung von Myofibroblasten vorgeschlagen (88), allerdings konnte durch Western-Blot-Analyse mit Panpalladin-Antikörpern auch eine Expression der Isoform in SMC nachgewiesen werden (89). Aktuell erlaubt noch kein Zytoskelett-Protein zuverlässig eine definitive Unterscheidung zwischen Myofibroblasten und SMC. Fortschritte in der Proteomik und der Gen-Array-Analyse können jedoch zur Identifizierung eines solchen einzigartigen Markers des Myofibroblasten führen, sofern er existiert (90, 91)

Auch in Gewebeproben von Patienten mit Morbus Dupuytren konnte eine signifikant erhöhte Konzentration an Myofibroblasten nachgewiesen werden (92, 93), sodass man davon ausgehen kann, dass diese die Hauptakteure der Pathogenese der Palmarfibromatose spielen und somit mittels Messung der α-SMA -Expression dargestellt werden können.

In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass durch TGF-β eine Schlüsselrolle in der *in vivo* und *in vitro* Differenzierung des Myofibroblasten-Phänotyps (Vaughan *et al.* 2000) spielt und somit in den hier verwendeten Ansätzen zur in vitro Induktion der Myofibrogenese verwendet wurde.

So konnten wir eindeutig mit Hilfe der Western Blot Analyse (s. Abb. Xxx) verdeutlichen, dass nach Zugabe des Wachstumsfaktors TGF-β1 die α-SMA-Expression deutlich signifikant ansteigt. Bildmorphologisch ist dies auch in der immunhistologischen Darstellung zu vernehmen. (s. Abb. Xxx) Der Hauptsignalweg, durch welchen TGF-β1 den Differenzierungsprozess und somit die Expression von α-SMA reguliert, verläuft über Smads (Hinz 2007). Hierbei handelt es sich um intrazellulär gelegene Proteine. Durch die Bindung des Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor kommt es zur Phosphorylierung dessen und somit zur Rezeptoraktivierung. Dieser wiederum kann nun die Smad binden und phosphorylieren. Anschließend kommt es zur Bildung eines Komplexes, welcher in den Zellkern wandert, dort an die DNA dockt und letztendlich die Genexpression verstärkt.

Neben der Induktion der Myofibroblastendifferenzierung über Smads, leitet TGF-β1 auch Smadunabhängig den Differenzierungsprozess ein. So aktiviert es den phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K)-Akt Signalweg, welcher die Differenzierung zu Myofibroblasten induziert (Vittal et al. 2005).

Des Weiteren ist die Entwicklung von Myofibroblasten wird stark von der mechanischen Mikroumgebung beeinflusst, insbesondere von der Organisation und Steifheit der ECM (94). In experimentellen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der α-SMA-Expression in kultivierten, differenzierten Myofibroblasten mit zunehmender Matrixsteifigkeit steigt. Dies wurde anhand von Kollagen- und Polyacrylamidgelsubstraten unterschiedlicher Steifigkeit gezeigt (66). Durch Schienung der Ränder von experimentellen Wunden und somit erzeugter mechanischer Verhinderung des Wundverschlusses könnte eine schnellere Expression von α-SMA im Vergleich zu normal heilenden Wunden nachgewiesen werden; der Stressabbau durch Entfernen der Schiene führt zu reduzierter α-SMA-Expression (95).

Fibroblasten, welche sich in intakten Geweben befinden, werden durch die extrazelluläre Matrix vom "Stress abgeschirmt" (96). Wenn diese schützende Matrixstruktur durch Verletzung verloren geht, erfahren Fibroblasten eine veränderte mechanische Mikroumgebung und bemühen sich, die Spannung der ECM wiederherzustellen, indem sie die Umbau- und Syntheseaktivität erhöhen (97). In mechanisch gespannten Gelen nimmt die Spannung allmählich zu und induziert zunächst die Bildung von α-SMAnegativen Stressfasern (98, 99); welche dem De-novo-Erscheinen von Protomyofibroblasten ähneln

(95). Die Progression zum differenzierten Myofibroblasten erfordert eine signifikant höhere Steifheit, welche sich aufgrund des Remodelings durch Protomyofibroblasten zu entwickeln beginnt (100).

Hierbei wird α-SMA selbst als mechanosensitives Protein betrachtet, welches sich unter mechanischer Belastung an Stressfasern anlagert und somit die kontraktilen Funktion der Myofibroblasten unterstützt und kontrolliert (100, 101).

Eine Reduktion der Stressfaserspannung mittels Verringerung der Substratsteifigkeit und durch Hemmung der Myosinkontraktion führt zur Dissoziation von α-SMA aus Stressfasern, die als β-Zytoplasma-Aktin-Filamentbündel bestehen bleiben. Das aus Stressfasern stammende α-SMA reichert sich in zytosolischen Aggregaten an, die kurzen Stäbchen ähneln (101). Ähnliche stäbchenförmige Aggregate von α-SMA konnten während der physiologischen Ausbreitung suspendierter Myofibroblasten nachgewiesen werden (102), welche durch die allmählich zunehmende intrazelluläre Spannung und de-novo-Bildung von Stressfasern gekennzeichnet ist (66). Aufgrund dieser Studien wurde prostuliert, dass die Konstruktion von α-SMA-positiven Stressfasern die Prä-Formierung bzytoplasmatischer Aktinbündeln erfordert; das Fehlen dieser scheint zu einer zytosolischen Akkumulation von α-SMA zu führen. Es ist denkbar, dass die α-SMA-spezifische N-terminale Sequenz AcEEED eine beträchtliche Rolle für die Mechanosensitivität spielt, da die zytoplasmatische Zugabe dieser Sequenz als Peptid die Bildung von α-SMA-Stäbchen induziert (102) und α-SMA selektiv aus Stressfasern entfernt (103, 104).

In den vergangenen Jahren haben bereits mehrere Arbeiten eine verstärkte Differenzierung mittels TGFβ1- (92) sowie auch TGF-β2-Stimulation (100) erläutert, was wir mit unseren Ergebnissen nur bestätigen können. Insbesondere durch Zugabe von TGF-β1 konnte eine signifikant erhöhte Myofibrogenese erzielt werden.

Somit kann des Weiteren postuliert werden, dass durch direkte Aktivierung von TGF β 1 und die einhergehende erhöhte Spannung innerhalb der ECM und/oder Zelltraktionskräfte die Expression von α -SMA zusätzlich initiieren. Sowohl Fibroblasten als auch Myofibroblasten sezernieren TGF β 1 als Bestandteil eines Komplexes, welcher sich aus dem Latenz-assoziierten Protein (LAP) und dem latenten TGF β 1-bindenden Protein (LTBP-1) zusammensetzt (105, 106).

LTBP-1, als Mitglied der Fibrillin-Familie, fungiert hierbei als Bindungsstelle für den Komplex an die ECM. TGFß1 wird mittels proteolytischer Spaltung aus dem Komplex gelöst und unter Einfluss von Thrombospondin-1 aktiviert (107).

Die Entwicklung von Myofibroblasten wird stark von der mechanischen Mikroumgebung beeinflusst, insbesondere von der Organisation und Steifheit der ECM (94). In experimentellen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der α -SMA-Expression in kultivierten differenzierten Myofibroblasten mit zunehmender Matrixsteifigkeit steigt. Dies wurde anhand von Kollagen- und Polyacrylamidgelsubstraten unterschiedlicher Steifigkeit gezeigt (66). Durch Schienung der Ränder von experimentellen Wunden und somit erzeugter mechanischer Verhinderung des Wundverschlusses könnte eine schnellere Expression von α -SMA im Vergleich zu normal heilenden Wunden nachgewiesen werden; der Stressabbau durch Entfernen der Schiene führt zu reduzierter α -SMA-Expression (95).

Fibroblasten, welche sich in intakten, gesundem Geweben befinden, werden durch die extrazelluläre Matrix vom "Stress abgeschirmt" (96). Wenn diese schützende Matrixstruktur durch Verletzung verloren geht, erfahren Fibroblasten eine veränderte mechanische Mikroumgebung und bemühen sich, die Spannung der ECM wiederherzustellen, indem sie die Umbau- und Syntheseaktivität erhöhen (97). In mechanisch gespannten Gelen nimmt die Spannung allmählich zu und induziert zunächst die Bildung von α-SMA-negativen Stressfasern (98, 99); welche dem De-novo-Erscheinen von Protomyofibroblasten ähneln (95). Die Progression zum differenzierten Myofibroblasten erfordert eine signifikant höhere Steifheit, welche sich aufgrund des Remodelings durch Protomyofibroblasten zu entwickeln beginnt (100).

Hierbei wird α-SMA selbst als mechanosensitives Protein betrachtet, welches sich unter mechanischer Belastung an Stressfasern anlagert und somit die kontraktilen Funktion der Myofibroblasten unterstützt und kontrolliert (100, 101).

4.2 Der Einfluss des Extrazelluläre- Domäne A-Fibronektins (EDA- FN) in der Myofibrogenese

Dass die Fibronektin-Splice-Variante ED-A als zuverlässiger Marker der Myofibroblasten-ECM fungiert, konnte bereits Ende der 1990-er konnte gezeigt werden.

Währen der Entwicklung von Granulationsgewebe in vivo sowie nach TGF- β 1 Stimulation in vitro geht die FN-EDA- der α -SM-Aktin-Expression voraus. Beweisend hierfür ist die Tatsache, dass durch Inkubation von Fibroblastenkollektiven mit dem monoklonalen Anti-ED-A-Antikörper IST-9 die TGF- β 1-getriggerte Expressionszunahme von α -SM-Aktin und Kollagen Typ I Expression gehemmt wird. Als Promotor der Myofibroblasten-Differenzierung, spielt der Transforming Growth Factor- β 1 (TGF β 1) eine wichtige Rolle in der α -SMA-Induktion, der Expressionsmodelierung von Adhäsionsrezeptoren sowie Verstärkung der Synthese von Molekülen der extrazellulären Matrix (ECM), einschließlich FN-EDA (49).

Die Extra-Domain-A (EDA), welche mittels alternativen Spleißens an das FN-Molekül gebunden wird, dient als Voraussetzung für die TGF-β1-induzierte Myofibroblasten-Differenzierung (49).

Auf molekularer Ebene konnte bereits gezeigt werden, dass das Fibronektin-EDA die Fibroblasten-Differenzierung durch die Bindung der EDGIHEL- Sequenz, welche im EDA-Segment enthaltend ist, an den α4β7-Integrinrezeptor fördert. (Kohan, et al. 2010). Durch diese Bindung werden FAK- und MAP-Kinase Erk1 / 2 aktiviert und indizieren den Myofibroblasten Phänotyp. Als Kontrollreaktion diente die Blockierung der MAPK Erk1 / 2 Kinase durch biochemische Inhibitoren, wobei gezeigt werden konnte, dass es nach solch einer Blockierung zur Aufhebung der durch EDA-FN induzierte α-SMA-Expression kommt. Somit ist davon auszugehen, dass mittels Aktivierung der MAPK Erk1 / 2 die Differenzierung von Fibroblasten wesentlich beeinflusst & durch das EDA-Segment von FN vermittelt wird. Jedoch sei hierbei zu erwähnen, dass oben beschriebener Versuch an Lungenfibroblasten durchgeführt wurde und die molekularbiologischen Ergebnisse abweichen könnten. (Muro, et al. 2007) Durch diese Arbeit konnte dennoch, anlehnend an bereits vorhandene Literatur, gezeigt und bestätigt werden, dass es durch die Zugabe des Wachstumsfaktors und somit Aktivierung der Fibroblasten bzw. in vitro Stimulation einer Myofibrogenese, zu einem deutlichen Anstieg der FN-EDA-Expression kommt. Summa summarum kann eine positive Korrelation zwischen der Bildung des Myofibroblasten-Phänotyps, der einhergehenden Zellproliferation und dem Auftreten von FN-EDAs in der Pathogenese des Morbus Dupuytren attestiert werden.

4.3 Rolle der fibroblastulären Rezeptoren in der Pathogenese des Morbus Dupuytren

Es verbleibt nun noch die Frage, wie Myofibroblasten die allmählich zunehmende Veränderung der Matrixsteifigkeit wahrnehmen, welche mit einem Gewebeumbau einhergeht. Diesbezüglich wären drei Hauptmechanismen der Mechanosensorik hierbei denkbar:

- (1) Mechano-sensitive Ionenkanäle in der Plasmamembran (108),
- (2) Integrin-vermittelte Stresswahrnehmung (109) sowie
- (3) Geometrische Veränderungen, die bestimmte Signaldomänen in Proteinen der ECM enthüllen (52).

Sich in Kultur befindende Fibroblasten regulieren das Niveau der α-SMA-Expression nach lokaler Dehnung der Plasmamembran unter Verwendung von sich drehenden Magnetitperlen. Es wird angenommen, dass die Reaktion auf diese schnellen Reiz zumindest zum Teil von der Öffnung mechanosensitiver Ionenkanäle und dem Einstrom von Ca² über die Plasmamembran abhängt (110).

Jedoch zieht sich die Myofibrogenese in vivo, als Reaktion auf Matrixveränderungen, teilweise über Tage und Monate, was wiederum einen "langsamen" Mechanosensor erfordert. Darüber hinaus kann die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten durch subtile Kräfte induziert werden, wie sie im Rahmen von Entzündungen und Geweberegeneration zu finden sind (111). Solch physiologische Mechano-Stimuli schließen die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein von Membrankanälen als einzigen Kraftdetektionsmechanismus für die Myofibrogenese weithingehend aus.

Vogel et. al beschrieben das sogenannte Tissue Engineering als ein dynamisches Zusammenspiel zwischen den jeweiligen Zellen und deren biologischen Matrizen über multiple Zyklen von Mechanosensorik, -transduktion und Zellreaktion/ -response sowie Matrixumbau, sodass eine Umwandlung biochemischer Signale in einer Reaktion der gesamten Zelle resultieren kann. Während der Mechanosensorik wird eine Veränderung der Kraft/ Geometrie als lokale molekulare Veränderung der Proteinkonformation (Faltung/ Entfaltung von Proteinen) wahrgenommen. Solche Mechanismen, welche mittels Krafteinwirkung beeinflussbar sind, sind beispielsweise das Öffnen von Ionenkanälen, die Entfaltung von zytoplasmatischen oder Matrixproteinen, die Veränderungen der Enzymkinetik oder die Bildung von Catch-Bonds. Im Rahmen der Transduktion erfolgt die Umwandlung dessen in biochemische Signale sowie Aktivierung von intrazellulären Signalwegen. Schließlich erfolgt die zelluläre Response/ Reaktion via veränderter, zellulärer Funktionen, welche kurzfristig über bewegliche Systeme, langfristig durch Veränderung der molekularen Zusammensetzung erfolgt. (77)

Bereits Anfang des 21. Jahrhunderts fand man heraus, dass infolge extrazellulär ausgeübter, mechanischer Kräfte die intrinsische Mechanosensitivität partiell mittels Integrin-vermittelter Adhäsionen eine Untergruppe von zellulären Reaktionen initiiert.

Aufgrund der erhöhten Spannung innerhalb fokaler Adhäsionen kommt es zu einer verstärkten Integrin-Clusterbildung sowie FAK-Phosphorylierung. Jedoch muss man bedenken, dass es auch zelltypspezifische Reaktionen auf extern einwirkende Kräfte gibt, so beispielsweise neuronale Reaktionen auf Berührung oder Schall sowie Wachstum bzw. Genexpression in glatten Muskelzellen (76).

In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass eine zellerzeugte Traktion in Epithelzellen über Integrine erfolgt und folglich zu einer Aktivierung des TGFβ1 aus seinem Komplex heraus zur Folge hat. Sowohl LAP als auch LTBP-1 enthalten die RGD-Sequenz, eine spezielle Aminosäuresequenz aus Arginin, Glycin sowie Asparaginsäure, für die Bindung von Integrinen (112). Insbesondere die Integrine avb5 und avb3 (113) sowie a8b1 binden und interagieren stark mit LAP-TGFβ1 (114). Im Rahmen von Herz- (115), Lungen- und Leberfibrose (116) konnte bereits eine vermehrte Expression dieser nachgewiesen werden.

Die in der Pathogenese des MD bereits bekannten Veränderungen der ECM, insbesondere in Hinblick auf die einerseits vermehrte Fibronektinexpression aber auch anderseits das veränderte Adhäsionsverhalten, könnten auf den Fakt hindeuten, dass auch das Integrinprofil der Dupuytrenzellen different sein könnte.

Vorangegangene Arbeiten untersuchten bereits Veränderungen im Integrinprofil. So könnten Magro et al. (1995, 1997) bereits Ende des 20. Jahrhundert mittels immunohistologischer Färbung die Upregulation des $\alpha5\beta1$ -Integrins in zellreichen, jedoch nicht in zellarmen Knoten nachweisen. Quaglino et al. (1997) postulierten, dass es im Dupuytren'schen Gewebe, insbesondere aus Präparaten der Stränge, zu einer erhöhten Expression des Integrins $\alpha5$ sowie erniedrigten Expression des Integrins $\alpha2$ kommt, was sie mittels FACS bewiesen. Vaerst et al. untersuchten das Integrin-Expressionsverhalten in Zellen von Spendern ohne extrinsische Risikofaktoren, Spendern, welche an einem Rezidiv erkrankt waren sowie gesunden Spendern mit einer als Kontrolle. Hierbei war eine Upregulation der Genexpression in Dupuytrenzellen im Vergleich zu Aponeurosezellen in Bezug auf die Integrine $\alpha2$, $\beta3$ und $\beta5$ zu sehen. Hinsichtlich der Integrine $\alpha1$, $\alpha3$, $\alpha4$, $\alpha5$, αV , $\alpha11$ und $\beta1$ konnte kein Unterschied nachgewiesen werden.

Wir konnten in der Western Blot Analyse eine deutlich signifikant reduzierte Expression des Integrins β1 im Dupuytrenschen Gewebe, verglichen mit Gewebeproben des Karpaltunnelsyndroms nachweisen. Während es nun nach Zugabe von TGFβ in den Proben des CTS zur signifikant erniedrigten Expression kommt, findet man im MD eine Zunahme dessen. Das Integrin β1 führt zu einer stärkeren Kontraktion der Myofibroblasten (117) und korreliert in seiner Expression mit der Konzentration von Fibronektin, das wiederum im Gewebe dessen wichtigster Ligand ist (118-120). Des Weiteren ist das Fibronektin verantwortlich für die Aktivierung des Integrin β1 und somit die Bildung von Zell- Matrixkontakten sowie die Bildung von Stressfasern induziert (42, 121, 122). Wie schon ausführlich in Kapitel 4.2 erläutert, ist in den aktivierten Zellproben des Morbus Dupuytren eine erhöhte Konzentration an FN-EDA vorhanden, sodass diese Korrelation auch in direktem Zusammenhang mit der erhöhten Integrin-Expression zu stehen scheint. Dies erklärt auch die Abnahme der Konzentration nach Bestrahlung, sodass wir bestätigen können, dass dieses Integrin mit seinem identischen Verhaltensmuster nach den jeweiligen Anwendungen in direktem Zusammenhang mit dem des Fibronektin EDAs zu stehen und auch hier eine essentielle Rolle in der Pathogenese des Morbus Dupuytren zu spielen scheint.

Hinsichtlich des Integrins β4 ist zu vermerken, dass dieses in den Gewebeproben des MD vermehrt exprimiert wird, jedoch nicht in signifikantem Ausmaß. Nach Zugabe von TGF-β1 eine eine Zunahme der Expressionsrate zu verzeichnen, was darauf schließen lässt, dass dieses Integrin, welches eine besondere Rolle als Transmembranprotein insbesonders im Rahmen der Ausbildung von Zelladhäsionen spielt, in Myofibroblasten vermehrt exprimiert und somit für die Dupuytrensche Pathogenese eine relevante Rolle spielen könnte. Es dient vor allem als Ligand für Laminin und ist insbesondere auf Epithelzellen, unreifen Thrombozyten und endothelzellen mittelgroßer Blutgefäße zu finden. Jedoch wird dieses auch auf Zellen mesenchymalen Ursprungs wie beispielsweise Fibroblasten, Myoblasten und Myotuben exprimiert und mit dem aggressiven metastatischen Phänotyp menschlicher und muriner Karzinome assoziiert. So konnte gezeigt werden, dass es in Mausfibroblasten durch Behandlung mittels TGF β zur Modulation der Expression, Stimulation der Zellinvasion und des Metastasierungspotenzial kommt und dies mit der Reorganisation des Zytoskeletts korreliert (123).

Das Vorkommen des Integrins β7 ist bereits im Rahmen inflammatorisch-hepatischer Erkrankungen sowie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen vorbeschrieben. Hierbei wird es insbesondere von B- und T-Lymphozyten, natürlichen Killer Zellen sowie Monozyten exprimiert und dient bereits als Ansatz für Targeted Therapy (124) (125). Des Weiteren spielt die aktivierte Form des Integrins eine essentielle Rolle als spezifisches Ziel für die CAR-T-Zelltherapie bezüglich der Behandlung des multiplen Myeloms (126). Im Rahmen diverser Fibromatosen wurde es bisher noch nicht erforscht. In der hiesigen Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in Gewebeproben des CTS sowie MD exprimiert wird, in gleichem Maße. Die Zugabe des Wachstumsfaktors beeinflusst die Integrinexpression im Dupuytrenschen Gewebe kaum, sodass davon auszugehen ist, dass die es auch im Rahmen der Myofibrogenese keine signifikant höhere Proteinexpression zu finden und dieses somit keine tragende Rolle in der Pathogenese des Morbus Dupuytren spielt.

So bleibt dennoch weiterhin zu eruieren, ob zellerzeugte mechanische Kräfte die Verfügbarkeit der Extrazellulären Domäne A des Fibronektins für spezifische Integrine modifizieren können, um so folglich myofibroblastenfördernde intrazelluläre Signale zu induzieren.

4.4 Antifibrotische Wirkung von Blaulicht der Wellenlänge λ =453 nm

Zur genaueren Analyse der antifibrotischen Wirkung von blauem Licht in der Pathogenese des Morbus Dupuytren wurden die Fibroblasten zunächst mittels TGF-β1 über einen Zeitraum von drei Tagen behandelt, umso die Myofibrogenese in vivo zu stimulieren. Folglich wurden diese Zellen über einen dreitägigen Zeitraum mit einer Wellenlängen von 453 nm sowie einer Dosis von 80 J/cm² bestrahlt. Da die Bestrahlung mit dieser Dosis den stärksten Effekt auf den Prozess der Myofibrogenese aufwies (127) sowie inhibierend auf Fibroblasten wirkt (74), wurde diese so gewählt.

Aufgrund dessen, dass das Protein α-SMA, wie ausführlich bereits in Kapitel 1.3.2 beschrieben, als verlässlichster Indikator der Myofibroblasten anzusehen ist (42), wurden, zur besseren Visualisierung der Ergebnisse, die Proben immunohistologisch angefärbt (s. Abbildung 15). Bildmorphologisch ist hier bereits ein deutlicher Anstieg der Konzentration nach Behandlung mittels Wachstumsfaktors sowie ein eindeutiger Abfall der Konzentration nach Bestrahlung zu vernehmen. Somit konnten wir durch diese zusätzliche Methodik die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse (s. Abbildung 5) in beiden Zellkollektiven bestätigen. Insbesondere an dem visuellen Beispiel der Zellen des Dupuytren'schen Gewebes ist in den Kontroll-Proben sowie auch in den aktivierten Proben eine deutliche Abnahme der Expression zu vermerken. Primär sollte hierbei ein Blick auf die aktivierten (Myo-) Fibroblasten geworfen werden, da hier die Regredienz der α-SMA-Expression deutlich signifikant ist. Da durch die zu vorige Aktivierung mittels Wachstumsfaktors eine in vitro Myofibrogenese initiiert wurde, ließe sich konsekutiv hier ein klinisch relevanter Ansatz schließen. So könne man davon ausgehen, dass die Myofibroblasten im Morbus Dupuytren stärker auf eine antifibrotische Lichttherapie ansprechen würden als gesunde Fibroblasten.

alpha-smooth-muscle-Protein

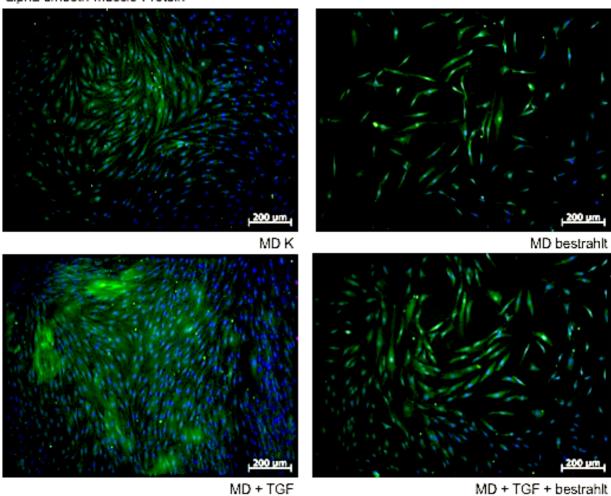


Abbildung 13 Beispielhafte Darstellung der a-SMA-Expression im Morbus Dupuytren in der Immunohistochemie. Im Bild ersichtlich sind neben den grün angefärbten α-SMA Fibrillen auch die blau angefärbten Zellkerne zur Illustration der relativen Zellzahl.

Fibronektin EDA

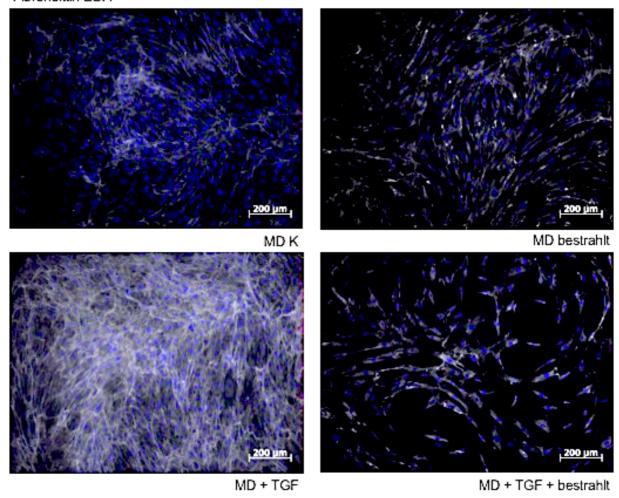


Abbildung 14 Beispielhafte Darstellung der FN EDA-Expression im Morbus Dupuytren in der Immunohistochemie. Im Bild ersichtlich sind neben den weiß angefärbten Fibronektin EDA Fibrillen auch die blau angefärbten Zellkerne zur Illustration der relativen Zellzahl.

Dieses Thema stellte bereits in multiplen Vorarbeiten der letzten Dekaden eine signifikante Rolle. Im Rahmen dieser wurde bewiesen, dass diverse Moleküle und Signalstoffe im Differenzierungsprozess involviert sind, sodass dieser an Komplexität gewonnen hat.

Die durch die Radiatio bedingt erniedrigte Expression von α-SMA könnte auf zellphysiologischer Ebene ebenfalls mit einer erhöhten TNF-α (tumor necrosis factor-α) Expression co-variieren, welcher insbesondere in der inflammatorischen Phase der Wundheilung exprimiert wird. Dieser Nekrosefaktor inhibiert die Synthese der extrazellulären Matrix und aktiviert Matrix Metalloproteinasen (MMPs) (128). In vorangegangenen Arbeiten zeigte sich, dass in einer dreidimensionalen Matrix kultivierte Fibroblasten unter Zugabe des Zytokins TNF-α mit einer erniedrigten α-SMA Expression reagieren. Des Weiteren inhibiert TNF-α über den durch Stress aktivierten JNK Signalweg die durch TGF-β1 induzierte Expression von Kollagen 1A und Fibronektin. Hierbei konnte Ende des 20. Jahrhunderts durch Avalos-Diaz et al. (1999) demonstriert werden, dass UV-A Strahlung bei humanen dermalen Fibroblasten und Keratinozyten die Transkription von TNF-α induziert (129). Ob ein simultaner Effekt auf die TNF-α Expression durch die Bestrahlung mit blauem Licht initiierbar ist, wäre ein möglicher Ansatzpunkt in weiteren Untersuchungen.

Auf zellphysiologischer Ebene spielen Flavine als Photosensibilasatoren bzw. Chromophoren des blauen Lichtes mit einem Absorptionsmaximum bei 370 nm und 450 nm eine essentielle Rolle in der Absorption von Blaulicht. Charakterisiert sind Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) durch den Rest an der Ribityl Seitenkette des heterozyklischen isoallozin

Ringsystems. So scheint das Mitochondrium die Organelle der Zelle zu sein, welche blaues Licht absorbiert, dieses somit mit der Atmungskette interagiert und es so folglich zur Ausschöpfung der Energiereserven der Zelle kommt, sodass konsekutiv keine Energie mehr für bspw. Zellproliferation oder -differenzierung zur Verfügung steht (73) (79).

Eine Komponente des Komplexes I (NADH-Dehydrogenase) der Atmungskette ist FMN und wandelt in Rahmen dessen als Redoxenzym Sauerstoff (O₂) in Superoxid (O₂-) um. Die hierfür benötigte Aktivierungsenergie soll mittels Bestrahlung mit blauem Licht geliefert werden. Durch solch eine Lichtexposition kommt es folglich zur Erhöhung der Mengen an ROS sowie intrazellulärem oxidativem Stress (75) (82). Ein weiteres durch blaues Licht beeinflussbares Flavin-haltiges Cytochrom ist im Komplex II der Atmungskette (Succinatdehydrogenase) zu finden, FADH₂ (75).

Die Absorption des blauen Lichtes führt zur Veränderung elektronischer Eigenschaften des Isoalloxazin-Rings des Flavins, was wiederum in lokal chemischen Veränderungen resultiert (73).

Bereits Ende des 20. Jahrhunderts wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Photoreduktion der Flavine mittels blauen Lichtes zur Produktion von H_2O_2 führt. Hierbei wurde postuliert, dass Blaulicht Flavinhaltige Oxidasen aktiviert und somit die H_2O_2 -Produktion in Peroxisomen und Mitochondrien stimuliert, was eine erhöhte Konzentration von H_2O_2 und seiner Metabolite, z.B. Hydroxylradikale, zu Folge hat (78). Später fand man heraus, dass durch das Zusammenspiel von Blaulicht mit Porphyrin-haltigen Enzymen sowie Flavoproteinen ROS in Form von Singlet-Sauerstoff und Hydrogen-Peroxid entstehen. Hierbei konnte eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Hydrogen-Peroxid, insbesondere bei Bestrahlung mit der Wellenlänge λ =453nm nachgewiesen werden (82). Mittels Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge λ =453nm konnte man eine verminderte Absorption initiieren, was folglich in einer Reduktion der Flavine resultiert (73, 80).

Durch die Bestrahlung kommt es zur Anregung eines Triplett-Zustands sowie Reduktion von Flavinen (FAD und FMN) und Flavoproteinen, was schließlich die verstärkte Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zur Folge hat. Dabei läuft die Reduktion des molekularen Sauerstoffes ohne Oxidation bzw. Verbrauch des Substrates, wie beispielsweise NADPH ab. Somit ist das Enzym vollständig entkoppelt und die reguläre Enzymreaktion gehemmt. Das ist bei flavinhaltigen Enzymen der Atmungskette (z.B. Komplex 1, NADPH Dehydrogenase) in gleicher bzw. ähnlicher Art beobachtet (80). Krassovka et. al untersuchten weiterhin, inwieweit die zuvor beschriebene ROS-Generierung nach Bestrahlung als Koeffizient in der Differenzierungshemmung geachtet werden kann. Es wurde beobachtet, dass es durch Inkubation mit Reaktiven Sauerstoffspezies in Form von H₂O₂ nicht nur in den nativen, sondern auch in den zuvor mittels TGF- β aktivierten Zellen zu einer signifikanten Reduktion der α-SMA-Konzentration kam. Somit postulierten sie bereits einen möglichen Dedifferationsmechanismus, welcher jedoch bisher noch nicht im Rahmen der Pathogenese des Morbus Dupuytren untersucht wurde (127). Es gibt jedoch bereits multiple Faktoren und Stoffe, welchen eine dedifferenzierende Wirkung zugesprochen wird, wie beispielsweise dem MyoD (130), dem Prostaglandin E2 (PGE2) (131) oder auch dem fibroblast growth factor (FGF) (132).

Somit scheint die intrazelluläre Konzentration sowohl an α -SMA als auch an EDA-FN und die konsekutive Bildung von Myofibroblasten durch die Bestrahlung mit Blaulicht der Wellenlänge λ =453 nm wesentlich durch die intrazellulären Konzentrationen wichtiger Schlüsselmediatoren, wie ERK 1/2, SMAD 2/3 und p38 reguliert zu sein. Summa summarum interferiert das blaue Licht (453 nm) wesentlich mittels Photoreduktion und ist somit in der Lage die für die Myofibrogenese verantwortlichen Signalwege, wie beispielsweise den TGF- β 1-Signalweg, zu dezimieren.

Betrachtet man nun den molekularpathologischen Signalweg, in welchem das Blaulicht mit der Expression diverser Integrine im Rahmen der Pathophysiologie des Morbus Dupuytrens interferiert, fällt auf, dass dies bisher noch nicht erforscht ist. Bezüglich der Frage, welche fibroblastulären Rezeptoren eine tragende Rolle spielen könnten untersuchten wir drei verschiedene Integrine. Das Integrin $\beta 1$, welches eine tragende Rolle im Rahmen der Myofibroblastenkontraktion sowie Bildung von Zell-Matrixkontakten zu spielen scheint, korreliert in seiner Expression mit der des Fibronektins, hinsichtlich einer Zunahme der Expressionsrate nach Aktivierung sowie Abnahme der Expressionsrate nach

Bestrahlung mittels blauen Lichts der Wellenlänge λ =453, welches wiederum zur Aktivierung dessen führt und dies bestätigen auch unsere Ergebnisse. Zum anderen das Integrin β 4, welches seine Bedeutung in der Entstehung für Zelladhäsionen trägt als als wichtiger Ligand für Laminin und auch im den untersuchten Zellkulturen vermehrt exprimiert wird. Eine Bestrahlung dieses Integrins resultiert ebenfalls, in der aktivierten Zellreihe, in einer reduzierten Expression.

So untersuchten Toh et al. unter anderem den Einfluss von Blaulicht auf menschliche Hornhautendothelzellen und postulierten, dass Zelloberflächenproteine, insbesondere die Integrine, leichter oxidiert werden als andere Proteingruppen. Insbesondere das durch Bestrahlung oxidierte Integrin β1wies eine Inaktivität bei der Ausbildung von Zelladhäsionen sowie Proliferation auf, welches die Autoren auf einer durch Bestrahlung initiierten Zellfunktionsstörung zu Grunde führten (133).

Auch im Rahmen der onkologischen Forschung gewinnen die Integrine immer mehr an Bedeutung. Der Signalweg des Integrins β1, welchem eine tragende Rolle hinsichtlich Progression sowie Metastasierung diverser Tumorentitäten, so auch dem Brustkrebs zukommt, steht aktuell im Mittelpunkt diverser Arbeiten, u.a. zur Entwicklung des sogenannten *Integrin Targeting* in der Strahlentherapie, mit welchen die spezifischen Signalwege mittels ionisierender Strahlung inhibiert werden sollen (134). Neben den bereits aufgeführten Merkmalen der Beteiligung an Prozessen wie beispielsweise Zelldifferenzierung oder -migration spielen Integrine auch bei diversen tumorassoziierten Attributen wie Invasion, Metastasierung und Resistenzentwicklung gegenüber Radio-/ und Chemotherapie eine Rolle, sodass die Intigrine auch im Rahmen der Erforschung der Tumormikroumgebung zur Entwicklung spezifischer Therapien immer mehr an Bedeutung gewinnen (135).

4.5 Etwaige Anwendung von blauem Licht in der Therapie des Morbus Dupuytren

Wie bereits in Abschnitt 1.2.7 ausführlich diskutiert, sind die Therapiemöglichkeiten eines Morbus Dupuytren begrenzt. Insbesondere die Ergebnisse der konservativen Möglichkeiten sind nicht zufriedenstellend und versprechen keine endgültige Heilungsoption. Jedoch weist auch die operative Therapie ihr Schwächen auf, sodass sich nun postulieren lässt, ob eine Bestrahlung alleine oder optional simultan beziehungsweise additiv zu anderen Therapieoptionen eine neuere Alternative darstellen könnte.

Prinzipiell wäre eine Anwendung im Rahmen einer Sekundär- bzw. Tertiärprävention vorstellbar. Eine Primärphrophylaxe könnte insbesondere bei Patienten/-innen mit signifikanter familiärer Prädisposition erwogen werden. Sekundärprophylaktisch bestände die Möglichkeit die Bestrahlung neoadjuvant oder adjuvant zu einem operativen Eingriff durchzuführen; noch davor zur Größenreduktion, postoperativ vor allem zur Rezidivprophylaxe. Ziel der Therapie sollten hierbei zum einem die Wiederherstellung der Fingerbeweglichkeit sowie zum anderen die Größenregredienz der bereits formierten Knötchen und Stränge sein. Da die Myofibrogenese insbesondere während der Proliferationsphase von statten geht, würde eine Bestrahlung in histologisch frühen Stadien erfolgsversprechend sein. Jedoch ist die Krankheitsaktivität bei Betroffenen vor allem in den frühen Phasen klinisch schwer zu differenzieren sowie in Frühstadien schwer zu diagnostizieren und so besteht meist eine gewisse Diskordanz zwischen klinischer und histologischer Einteilung. Ob eine Bestrahlung auch in späten klinischen Stadien oder gar bei bereits langjährig bestehenden Flexionskontrakturen einsetzbar sein und Erfolg versprechend sein kann, ist bis heute nicht bekannt und kann nur spekuliert werden.

Da nun insbesondere direkt postoperativ die individuellen, endogenen IL-6 sowie TGFβ-Spiegel erhöht sind, wäre hier auch ein tertiärer Einsatz einer Radiatio denkbar.

Jedoch muss auch hier beachtet werden, dass in Patienten, welche unter Morbus Dupuytren leiden, eine hohe Rezidivrate zu verzeichnen ist, sodass aufgrund dessen an eine lebenslange Bestrahlung in Betrachtung gezogen werden müsste, wobei hierunter womöglich eine reduzierte subjektive Lebensqualität der Betroffenen resultieren könnte.

Summa summarum wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit isolierte, sich in Zellkultur befindliche Fibroblasten über einen Zeitraum von 72 Stunden behandelt und bestrahlt. Die bei diesem in vivo Versuch vorliegenden Bedingungen und die daraus resultierenden Ergebnisse sind nicht zwingendermaßen auf ein in vitro Versuch zu übertragen. Dabei ist der Einfluss von Blaulicht auf sich unter Cutis, Subcutis und subkutanem Fett befindliche Fibroblasten noch nicht bekannt. Jedoch ist hierbei auch zu beachten, dass sich die Pathogenese des MD auch unmittelbar unter der Haut, sprich subkutan, vollzieht, sodass dies einen deutlichen Vorteil darstellen könnte.

5 Abbildur	ngsverzeichnis	
Abbildung 1	Schematische Darstellung einer Aponeurektomie	4
Abbildung 2	Schematische Illustration eines Fibroblasten	5
Abbildung 3	Schematische Darstellung des Spektrums elektromagnetischer Wellen	8
Abbildung 4	Aufbau des Western Blot Systems2	26
Abbildung 5	Western Blot Analyse des Proteins α-SMA nach Behandlung mittels TGF-β	
	und/oder Bestrahlung mit blauem Licht der Dosis von 80 J/cm ²	0
Abbildung 6	Western Blot Analyse des Proteins Fibronektin-EDA nach Behandlung mittels TGF-ß	}
	und/oder Bestrahlung mit blauem Licht der Dosis von 80 J/cm ² 3	0
Abbildung 7	T-Test Analyse der Western Blots des Proteins Fibronektin-EDA nach Behandlung	
	mittels TGF-β und/ oder Bestrahlung mit blauem Licht der Dosis von 80 J/cm²3	1
Abbildung 8	Western Blot Analyse des Integrins β 1 nach Behandlung mittels TGF- β und/oder	
	Bestrahlung mit blauem Licht der Dosis von 80 J/cm ² 3	2
Abbildung 9	Fluorescense Activated Cell Sorting (FACS) – Analyse des Integrins β1 nach	
	Behandlung mittels TGF-β und/ oder Bestrahlung mit blauem Licht der Dosis von 80	
	<i>J/cm</i> ² 3	3
Abbildung 10	Beispielhafte FACS Analyse des Integrins β 13	4
Abbildung 11	Western Blot Analyse des Integrins β 4 nach Behandlung mittels TGF- β und/oder	
	Bestrahlung mit blauem Licht der Dosis von 80 J/cm ² 3	5
Abbildung 12	Western Blot – Analyse des Integrins β 7 nach Behandlung mittels TGF- β und/oder	
	Bestrahlung mit blauem Licht der Dosis von 80 J/cm ² 3	6
Abbildung 13	Fluorescense Activated Cell Sorting (FACS) – Analyse des Integrins β7 nach	
	Behandlung mittels TGF-β und/ oder Bestrahlung mit blauem Licht der Dosis von 80	
	J/cm^2 3	6
Abbildung 14	Beispielhafte FACS Analyse des Integrins β 73	7
Abbildung 15	Beispielhafte Darstellung der α-SMA-Expression im Morbus Dupuytren in der	
	Immunohistochemie4	3
Abbildung 16	Beispielhafte Darstellung der FN EDA-Expression im Morbus Dupuytren in der	
	Immunohistochemie4	4
	verzeichnis	
	ifikation nach Tubiana (2)	
Tabelle 2 Versu	chsaufbau2	0
Tabelle 3 Zusan	nmensetzung des Proteinstandards	?4
Tabelle 4 Übers	icht über die verwendeten Antikörper und der jeweiligen Verdünnungen2	?7
7 Literatur	verzeichnis	

- 1. Rüther W, Lohmann CH. Orthopädie und Unfallchirurgie. 20 ed. München: Elsevier 2014.
- 2. Verheyden CN. The history of Dupuytren's contracture. Clin Plast Surg. 1983;10:619-625.
- 3. Greve CS. Biochemische Untersuchungen extrazellulärer Matrixkomponenten beim Morbus Dupuytren. Lübeck. 2002.
- 4. Grabowski P. Morbus Dupuytren. Münster. 2004.
- 5. Brenner P, Krause-Bergmann A, Van VH. Dupuytren contracture in North Germany. Epidemiological study of 500 cases. Unfallchirurg. 2001;104:303-311.
- 6. Ling RS. THE GENETIC FACTOR IN DUPUYTREN'S DISEASE J Bone Joint Surg Br. 1963;45:709-718.
- 7. Burge P. Genetics of Dupuytren's disease. Hand Clin. 1999;15:63-71.
- 8. Dolmans G, Werker P, Hennies H, Furniss D, EA F, Franke L, et al. Wnt signaling and Dupuytren's disease. New England Journal of Medicine. 2011;365(4):307-317.

- 9. Millesi H. On the pathogenesis and therapy of Dupuytren's contracture. (A study based on more than 500 cases). Ergeb Chir Orthop. 1965;47:51-101.
- 10. Paeslack V. Dupuytrensche Kontraktur und Diabetes mellitus. Schweiz Med Wschr. 1962;92:349-350.
- 11. Rhomberg P. Dupuytrensche Kontraktur und interne Erkrankungen. Wien klin Wschr. 1967;79:792.
- 12. Sanderson PL, Morris MA, Stanley JK, Fahmy NR. Lipids and Dupuytren's disease. J Bone Joint Surg Br. 1992;74(6):923-927.
- 13. Arkkila P, Kantola I, Viikari J. Dupuytren's disease: association with chronic diabetic complications. J Rheumatol. 1997;24(1):153-159.
- 14. Pojer J, Radivojevic M, Williams TF. Dupuytren's disease. Its association with abnormal liver function in alcoholism and epilepsy. Arch Intern Med. 1972;129:561-566.
- 15. Early PF. Population studies in Dupuytren's contracture. J Bone Joint Surg Br. 1962;44:602-613.
- 16. Stuhler T, Stankovic P, Ritter G, Schmulder E. Epilepsy and Dupuytren's contracture a syntropy of 2 diseases? Handchirurgie. 1977;9:219-223.
- 17. Becker K, Tinschert S, Lienert A, Bleuler PE, Staub F, Meinel A, Rößler J, Wach W, Hoffmann R, Kühnel F, Damert HG, Nick HE, Spicher, R, Lenze, W, Langer, M, Nürnberg P, Hennies, HC. The importance of genetic susceptibility in Dupuytren's disease. Clin Genet. 2014.
- 18. Burge P, Hoy G, Regan P, Milne R. Smoking, alcohol and the risk of Dupuytren's contracture. J Bone Joint Surg Br. 1997;79(2):206-210.
- 19. Noble J, Arafa M, Royle SG, McGeorge, G, Crank S. The association between alcohol, hepatic pathology and Dupuytren's disease. J Hand Surg Edinb Scotl. 1992;17(1):71-74.
- 20. An HS, Southworth SR, Jackson WT, Russ B. Cigarette smoking and Dupuytren's contracture of the hand. J Hand Surg. 1988;13:872–874.
- 21. Skoog T. Dupuytren's contracture. Postgrad Med. 1957;21:91–99.
- 22. Mikkelsen OA. Dupuytren's disease-the influence of occupation and previous hand injuries. The Hand. 1978;10:1-8.
- 23. Bovenzi M. Hand-arm vibration syndrome and dose-response relation for vibration induced white finger among quarry drillers and stonecarvers. Italian Study Group on Physical Hazards in the Stone Industry. Occup Environ Med. 1994;51:603–611.
- 24. Descatha A, Bodin J, Ha C, Goubault P, Lebreton, M.; Chastang, J.F.; Imbernon, E.; Leclerc, A.; Goldberg, M.; Roquelaure, Y. Heavy manual work, exposure to vibration and Dupuytren's disease? Results of a surveillance program for musculoskeletal disorders. Occup Environ Med. 2012;69:296–299.
- 25. Liss GM, Stock SR. Can Dupuytren's contracture be workrelated?: review of the evidence. American Journal of Ind Medicine. 1996;29(5):521–532.
- 26. Thomas PR, Clarke D. Vibration white finger and Dupuytren's contracture: are they related? Occup Med Oxf Engl. 1992;42:155–158.
- 27. Lanzettá M, Morrison WA. Dupuytren's disease occurring after a surgical injury to the hand. J Hand Surg Edinb Scotl. 1996;21:481–483.
- 28. Bower M, Nelson M, Gazzard BG. Dupuytren's contractures in patients infected with HIV. BMJ. 1990;300(6718):164–165.
- 29. Menzel EJ, Piza H, Zielinski C, Endler AT, Steffen C, Millesi, H. Collagen types and anticollagen-antibodies in Dupuytren's disease. Hand. 1979;11(3):243–248.
- 30. Neumüller J, Menzek J, Millesi, H. Prevalence of HLA-DR3 and autoantibodies to connective tissue components in Dupuytren's contracture. Clinical Immunol Immunopathol. 1994;71(2):142–148.
- 31. Ketchum LD, Donahue TK. The injection of nodules of Dupuytren's disease with triamcinolone acetonide. J Hand Surg. 2000;25(6):1157–1162.
- 32. Berchthold R. Chirurgie. München: Elsevier; 2008.

- 33. Niethard FU, Biberthaler P, Pfeil J. Duale Reihe: Orthopädie und Unfallchirurgie. 8 ed. Stuttgart: Thieme; 2017.
- 34. Ryan GM. Nonoperative treatment of Dupuytren's disease. J Hand Surg Am. 2008;33(7):1208-1210.
- 35. Meek RM, McLellan S, Reilly J, Crossan JF. The effect of steroids on Dupuytren's disease: role of programmed cell death. J Hand Surg Br. 2002;27(3):270-273.
- 36. Betz N, Ott OJ, Adamietz B, Sauer R, Fietkau R, Keilholz L. Radiotherapy in early-stage Dupuytren's contracture. Long-term results after 13 years. Strahlenther Onkol 2010;186(2):82-90.
- 37. Hueston JT. Enzymic fasciotomy. Hand. 1971;3(1):38-40.
- 38. Hurst LC, Badalamente MA, Hentz VR, Hotchkiss RN, Kaplan FT, Meals RA, Rodzvilla J. Injectable collagenase clostridium histolyticum for Dupuytren's contracture. N Engl J Med. 2009;361(10):968-979.
- 39. Schumpelick V, Kasperk R, Stumpf M. Operationsatlas Chirurgie Stuttgart: Thieme; 2021.
- 40. Welsch U, Kummer W, Deller, Thomas. Histologie Das Lehrbuch. München: Elsevier; 2018.
- 41. Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. Wound Repair Regen. 2005;13:7–12.
- 42. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. J Pathol. 2003:200:500–503.
- 43. Eyden B. The myofibroblast: a study of normal, reactive and neoplastic tissues, with an emphasis on ultrastructure. Part 1 normal and reactive cells. J Submicrosc Cytol Pathol. 2005;37:109–204.
- 44. Tomasek JJ, Schultz RJ, Haaksma CJ. Extracellular matrix-cytoskeletal connections at the surface of the specialized contractile fibroblast (myofibroblast) in Dupuytren disease. J Bone Joint Surg Am. 1987;69(9):1400-1407.
- 45. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. Am J Pathol. 2007;170(6):1807-1816.
- 46. Singer II. The fibronexus: a transmembrane association of fibronectin-containing fibers and bundles of 5 nm microfilaments in hamster and human fibroblasts. Cell. 1979;16(3):675-685.
- 47. Sandbo N, Lau A, Kach J, Dulin NO. Delayed stress fiber formation mediates pulmonary myofibroblast differentiation in response to TGF-β. Am J Physiol Lung Cell Mol. 2011;301(5):656-666.
- 48. Schurch W, Seemayer TA, Hinz B, Gabbiani G. The myofibroblast. Histology for pathologists (Mills SE, ed), Philadelphia, USA: Lippincott-Williams & Wilkins Pub (in press). 2006.
- 49. Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. J Cell Biol. 1998;142(8):73-81.
- 50. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. Mol Biol Cell. 2001;12(27):30-41.
- 51. Glukhova MA, Frid MG, Shekhonin BV, Vasilevskaya TD, Grunwald J, Saginati M. Expression of extra domain A fibronectin sequence in vascular smooth muscle cells is phenotype dependent. J Cell Biol. 1989;109(3):57-66.
- 52. Vogel V, Sheetz M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7(2):65–75.
- 53. Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in TGF signaling through Smads. Annu Rev Cell Dev Biol. 2005;21(6):59–93.
- 54. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- beta family signalling. Nature. 2003;42(5):77-84.
- 55. Wilkes MC, Mitchell H, Penheiter SG, Dore JJ, Suzuki K, Edens M. Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. Cancer Res. 2005;65(104):31–40.

- 56. Tomasek JJ, McRae J, Owens GK, Haaksma CJ. Regulation of alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts is dependent on the intronic CArG element and the transforming growth factor- beta1 control element. Am J Pathol. 2005;166(13):43–51.
- 57. Gallucci RM, Lee EG, Tomasek JJ. IL-6 modulates alpha-smooth muscle actin expression in dermal fibroblasts from IL-6- deficient mice. J Invest Dermatol. 2006;126(56):1-8.
- 58. Swaney JS, Roth DM, Olson ER, Naugle JE, Meszaros JG, Insel PA. Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenylyl cyclase. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(4):37–42.
- 59. Shi-Wen X, Chen Y, Denton CP, Eastwood M, Renzoni EA, Bou-Gharios G. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/ phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. Mol Biol Cell. 2004;15(270):7–19.
- 60. Bogatkevich GS, Tourkina E, Abrams CS, Harley RA, Silver RM, Ludwicka-Bradley A. Contractile activity and smooth muscle-a actin organization in thrombin-induced human lung myofibroblasts. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003;285(3):34-43.
- 61. Shephard P, Hinz B, Smola-Hess S, Meister JJ, Krieg T, Smola H. Dissecting the roles of endothelin, TGF-beta and GM-CSF on myofibroblast differentiation by keratinocytes. Thromb Haemost. 2004;92(2):62-74.
- 62. Chen CS, Tan J, Tien J. Mechanotransduction at cell–matrix and cell–cell contacts. Annu Rev Biomed Eng. 2004;6:275–302.
- 63. Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. J Cell Mol Med. 2007(11 (1)):21-38.
- 64. Dugina V, Fontao L, Chaponnier C, Vasiliev J, Gabbiani G. Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. J Cell Sci. 2001;114(32):85–96.
- 65. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix cytoskeleton crosstalk. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001;2:793–805.
- 66. Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. Mol Biol Cell. 2003;14(250):8–19.
- 67. Harten U. Physik für Mediziner. Berlin: Springer; 2020.
- 68. Svobodova A, Walterova D, Vostalova J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2006;150 (1):25–38.
- 69. Mahmoud BH, Hexsel CL, Hamzavi IH, Lim HW. Effects of Visible Light on the Skin. Photochem Photobiol. 2008;84 (2):450–462.
- 70. Haas U. Physik Für Pharmazeuten, Mediziner und Studierende mit Physik als Nebenfach. 7 ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2011.
- 71. Rassner G. Dermatologie Lehrbuch und Atlas. München: Elsevier; 2006 9.
- 72. Hamblin MR. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. Photochem Photobiol. 2018;94:199 –212.
- 73. Garza ZCF, Born M, Hilbers PJ, van Riel NW, Liebmann J. Visible Blue Light Therapy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. Curr Med Chem. 2018;25:5564–5577.
- 74. Taflinski L, Demir E, Kauczok J, Fuchs PC, Born M, Suschek CV, et al. Blue light inhibits transforming growth factor- 1-induced myofibroblast differentiation of human dermal fibroblasts. Exp Derm. 2014;23:240–246.
- 75. Serrage H, Heiskanen V, Palin WM, Cooper PR, Milward MR, Hadis M, et al. Under the spotlight: mechanisms of photobiomodulation concentrating on blue and green light. Photochem Photobiol Sci. 2019;18:1877–1909.
- 76. Liebmann J, Born M, Kolb-Bachofen V. Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. J Invest Dermatol. 2010;130:259–269.

- 77. Lewis JB, Wataha JC, Messer RLW, Caughman GB, Yamamoto T, Hsu SD. Blue light differentially alters cellular redox properties. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2005;72:223–229.
- 78. Hockberger PE, Skimina TA, Centonze VE, Lavin C, Chu S, Dadras S, et al. Activation of flavin-containing oxidases underlies light- induced production of H2O2 in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci. 1999;96:6255–6260.
- 79. Krassovka J, Borgschulze A, Sahlender B, Lögters T, Windolf J, Grotheer V. Blue light irradiation and its beneficial effect on Dupuytren's fibroblasts. PLOS ONE 14. 2019.
- 80. Krassovka JM, Suschek CV, Prost M, Grotheer V, Schiefer JL, Demir E, et al. The impact of non-toxic blue light (453nm) on cellular antioxidative capacity, TGF- 1 signaling, and myofibrogenesis of human skin fibroblasts. J Photochem Photobiol. 2020;B209,111952.
- 81. Opländer C, Deck A, Volkmar CM, Kirsch M, Liebmann J, Born M, et al. Mechanism and biological relevance of blue-light (420-453 nm)-induced nonenzymatic nitric oxide generation from photolabile nitric oxide derivates in human skin in vitro and in vivo. Free Radic Biol Med. 2013;65:1363–1377.
- 82. Opländer C, Hidding S, Werners FB, Born M, Pallua N, Suschek CV. Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts. J Photochem Photobiol. 2011;B103:118–125.
- 83. Magni G, Banchelli M, Cherchi F, Coppi E, Fraccalvieri M, Rossi M, et al. Experimental Study on Blue Light Interaction with Human Keloid-Derived Fibroblasts. Biomedicines 2020;8.
- 84. Barolet D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. Semin Cutan Med Surg. 2008;27:227–238.
- 85. Liebel F, Kaur S, Ruvolo E, Kollias N, Southall MD. Irradiation of Skin with Visible Light Induces Reactive Oxygen Species and Matrix-Degrading Enzymes. J Invest Derm. 2012;132:1901–1907.
- 86. Cohen L, Brodsky MA, Zubair R, Kohli I, Hamzavi IH, Sadeghpour M. Cutaneous Interaction with Visible Light: What Do We Know. J Am Acad Dermatol. 2020.
- 87. Vandersee S, Beyer M, Lademann J, Darvin ME. Blue-violet light irradiation dose dependently decreases carotenoids in human skin, which indicates the generation of free radicals. Oxid Med Cell Longev. 2015;579675.
- 88. Rönty M, Leivonen S-K, Hinz B, Rachlin A, Otey C, Kähäri V-M. Isoform-specific regulation of the actin-organizing protein paladin during TGF-beta1-induced myofibroblast differentiation. J Invest Dermatol. 2006;126(23):87–96.
- 89. Mykkanen OM, Gronholm M, Ronty M, Lalowski M, Salmikangas P, Suila H. Characterization of human palladin, a microfilament-associated protein. Mol Biol Cell. 2001;12:60-73.
- 90. Chambers RC, Leoni P, Kaminski N, Laurent GJ, Heller RA. Global expression profiling of fibroblast responses to transforming growth factor-beta1 reveals the induction of inhibitor of differentiation-1 and provides evidence of smooth muscle cell phenotypic switching. Am J Pathol. 2003;162(5):33–46.
- 91. Malmstrom J, Lindberg H, Lindberg C, Bratt C, Wieslander E, Delander EL. Transforming growth factor-beta 1 specifically induce proteins involved in the myofibroblast contractile apparatus. Mol Cell Proteomics. 2004;3(4):66-77.
- 92. Bisson MA, McGrouther DA, Mudera V, Grobbelaar AO. The different characteristics of Dupuytren's disease fibroblasts derived from either nodule or cord: expression of alpha-smooth muscle actin and the response to stimulation by TGF-beta1. J Hand Surg Edinb Scotl. 2003;28:351-356.
- 93. Hindman HB, Marty-Roix R, Tang JB, Jupiter JB, Simmons BP, Spector M. Regulation of expression of alpha-smooth muscle actin in cells of Dupuytren's contracture. J Bone Joint Surg Br. 2003;85:448-455.
- 94. Hinz B, Gabbiani G. Cell–matrix and cell–cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. Thromb Haemost. 2003;90:993–1002.

- 95. Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. Am J Pathol. 2001;159(100):9–20.
- 96. Tomasek J, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;3:349-363.
- 97. Eckes B, Krieg T. Regulation of connective tissue homeostasis in the skin by mechanical forces. Clin Exp Rheumatol. 2004;22(7):3–6.
- 98. Tamariz E, Grinnell F. Modulation of fibroblast morphology and adhesion during collagen matrix remodeling. Mol Biol Cell. 2002;13(39):15–29.
- 99. Marenzana M, Wilson-Jones N, Mudera V, Brown RA. The origins and regulation of tissue tension: identification of collagen tension-fixation process in vitro. Exp Cell Res. 2006;312(4):23–33.
- 100. Hinz B. Masters and servants of the force: the role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. Eur J Cell Biol. 2006;85(1):75–81.
- 101. Goffin JM, Pittet P, Csucs G, Lussi JW, Meister JJ, Hinz B. Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers. J Cell Biol. 2006;172(2):59–68.
- 102. Clement S, Hinz B, Dugina V, Gabbiani G, Chaponnier C. The N-terminal Ac-EEED sequence plays a role in a-smooth-muscle actin incorporation into stress fibers. J Cell Sci. 2005;118(1):395–404.
- 103. Hinz B, Gabbiani G, Chaponnier C. The NH2-terminal peptide of alpha-smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo. J Cell Biol. 2002;157(6):57–63.
- 104. Chaponnier C, Goethals M, Janmey PA, Gabbiani F, Gabbiani G, Vandekerckhove J. The specific NH2-terminal sequence Ac-EEED of alpha-smooth muscle actin plays a role in polymerization in vitro and in vivo. J Cell Biol. 1995;130(8):87–95.
- 105. Mangasser-Stephan K, Gartung C, Lahme B, Gressner AM. Expression of isoforms and splice variants of the latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) in cultured human liver myofibroblasts. Liver. 2001;21(10):5-13.
- 106. Koli K, Hyytiainen M, Ryynanen MJ, Keski-Oja J. Sequential deposition of latent TGF-beta binding proteins (LTBPs) during formation of the extracellular matrix in human lung fibroblasts. Exp Cell Res. 2005;310(3):70–82.
- 107. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. J Cell Sci. 2003;116(2):17–24.
- 108. Martinac B. Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction. J Cell Sci. 2004;117(24):49–60.
- 109. Katsumi A, Orr AW, Tzima E, Schwartz MA. Integrins in mechanotransduction. J Biol Chem. 2004;279(1200):1–4.
- 110. Ko KS, Arora PD, McCulloch CA. Cadherins mediate intercellular mechanical signaling in fibroblasts by activation of stretch-sensitive calcium-permeable channels. J Biol Chem. 2001;276(359):67–77.
- 111. Ng CP, Hinz B, Swartz MA. Interstitial fluid flow induces myofibroblast differentiation and collagen alignment in vitro. J Cell Sci. 2005;118(473):1-9.
- 112. Keski-Oja J, Koli K, von Melchner H. TGF- beta activation by traction? Trends Cell Biol. 2004;14(65):7–9.
- 113. Ludbrook SB, Barry ST, Delves CJ, Horgan CM. The integrin alphavbeta3 is a receptor for the latency-associated peptides of transforming growth factors beta1 and beta3. Biochem J. 2003;369(31):1–8.
- 114. Lu M, Munger JS, Steadele M, Busald C, Tellier M, Schnapp LM. Integrin alpha8beta1 mediates adhesion to LAP-TGFbeta1. J Cell Sci. 2002;115(464):1–8.
- 115. Bouzeghrane F, Mercure C, Reudelhuber TL, Thibault G. Alpha8beta1 integrin is upregulated in myofibroblasts of fibrotic and scarring myocardium. J Mol Cell Cardiol. 2004;36(3):43–53.

- 116. Levine D, Rockey DC, Milner TA, Breuss JM, Fallon JT, Schnapp LM. Expression of the integrin alpha8beta1 during pulmonary and hepatic fibrosis. Am J Pathol. 2000;156(19):27–35.
- 117. Norman JT, Fine LG. Progressive renal disease: fibroblasts, extracellular matrix, and integrins. Exp Nephrol. 1999;7(2):167-177.
- 118. Magro G, Lanzafame S, Micali G. Co-ordinate expression of alpha 5 beta 1 integrin and fibronectin in Dupuytren's disease. Acta Histochem. 1995;97(3):229-233.
- 119. AbiEzzi SS, Foulk RA, Harwood FL, Akeson WH, Amiel D. Decrease in fibronectin occurs coincident with the increased expression of its integrin receptor alpha5beta1 in stress-deprived ligaments. Iowa Orthop J. 1997;17:102-109.
- 120. Manabe R, Ohe N, Maeda T, Fukuda T, Sekiguchi K. Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment. J Cell Biol. 1997;139(1):295-307.
- 121. Chi-Rosso G, Gotwals PJ, Yang J, Ling L, Jiang K, Chao B. Fibronectin type III repeats mediate RGD-independent adhesion and signaling through activated beta1 integrins. J Biol Chem. 1997;272(50):31447-31452.
- 122. Hocking DC, Sottile J, McKeown-Longo PJ. Activation of distinct alpha5beta1-mediated signaling pathways by fibronectin's cell adhesion and matrix assembly domains. J Cell Biol. 1998;141(1):241-253.
- 123. Scardigli R, Soddu S, Falcioni R, Crescenzi M, Cimino L, Sacchi A. The beta 4 integrin subunit is expressed in mouse fibroblasts and modulated by transforming growth factor-beta 1. Exp Cell Res. 1996;15(Sep):223.
- 124. Farstad IN, Halstensen TS, Lien B, Kilshaw PJ, Lazarovits AI, Brandtzaeg P. Distribution of beta 7 integrins in human intestinal mucosa and organized gut-associated lymphoid tissue. Immunology. 1996;89 (2)(Oct):227-237.
- 125. Patsenker E, Stickel F. Role of integrins in fibrosing liver diseases. Am J Physio-Gastroint Liver Physiol. 2011;301(3):G425-G34.
- 126. Hosen N, Matsunga Y, Hasegawa K, Matsuno H, Nakamura Y. The activated conformation of integrin β7 is a novel multiple myeloma-specific target for CAR T cell therapy. Nat Med. 2017;23(12):1436-1443.
- 127. Krassovka J. Molekulare Grundlagen der durch blaues Licht induzierten Differenzierungshemmung humaner Fibroblasten zu Myofibroblasten. 2017.
- 128. Goldberg MT, Han YP, Yan C, Shaw MC, Garner WL. TNF-alpha suppresses alpha-smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. J Invest Dermatol. 2007(11):2645–2655.
- 129. Avalos-Diaz E, Alvarado-Flores E, Herrera-Esparza R. UV-A irradiation induces transcription of IL-6 and TNF alpha genes in human keratinocytes and dermal fibroblasts. Rev Rhum Engl Ed. 1999;66(1):13-19.
- 130. Hecker L, Jagirdar R, Jin T, Thannickal VJ. Reversible Differentiation of Myofibroblasts by Myod. Exp Cell Res. 2011;317(13):1914-1921.
- 131. Garrison G, Huang SK, Okunishi K, Scott JP, Kumar Penke LR, Scruggs AM, et al. Reversal of Myofibroblast Differentiation by Prostaglundin E(2). Am J Respir Cell Mol Biol. 2013;48(5):550-558.
- 132. Ramos C, Becerril C, Montaño M, García-De-Alba C, Ramírez R, Checa M, et al. Fgf-1 Reverts Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Tgf-B1 through Mapk/Erk Kinase Pathway. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2010;299(2):L222-L31.
- 133. Toh K, Nishio K, Nakagawa R, Egoshi S, Abo M, Perron A, et al. Chemoproteomic Identification of Blue-Light-Damaged Proteins. J Am Chem Soc. 2022;144(44):20171-20176.
- 134. Nam JM, Chung Y, Hsu HC, Park CC. beta1 integrin targeting to enhance radiation therapy. Int J Radiat Biol. 2009;85(11):923-928.
- 135. Vehlow A, Storch K, Matzke D, Cordes N. Molecular Targeting of Integrins and Integrin-Associated Signaling Networks in Radiation Oncology. Recent Results Cancer Res. 2016;198:89-106.

Danksagung

Von tiefstem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder für die unendliche Unterstützung bedanken. Ich kann meine Dankbarkeit nicht in Worte fassen. Ihr wart immer für mich da, zu jeder Tages- und Nachtzeit, habt meine Launen ertragen und es immer geschafft mir ein Lächeln auf die Lippen zu zaubern. Danke!

Ein riesengroßes Dankeschön gebührt außerdem meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Suschek. Egal wann, du hattest immer ein offenes Ohr für meine Fragen und danke, und hast mir immer freundlich und geduldig zur Seite gestanden und hattest immer einen guten Rat parat, auch bei den noch so trivialsten Fragen. Danke dafür!

Ich möchte mich auch bei dem ganzen Team des Forschungslabors der Unfall- und Handchirurgie bedanken. Danke für die tolle Einarbeitung und Zusammenarbeit, die gemeinsamen Frühstücke und eure tatkräftige Unterstützung. Tausend Dank liebe Samira Seghrouchni, liebe Jutta Wilkens und liebe Jutta Schneider für die vielen hilfreichen Tipps und Tricks im Labor, die kleinen Hilfen zwischendurch und tausend Dank dafür, dass ihr immer ein offenes Ohr hattet und mir bei jeder auch noch so kleinen Kleinigkeit immer geholfen und mit Rat und Tat zur Seite gestanden habt.

Und danke liebe Kathrin für die gemeinsame Zeit im Labor, die aufmunternden Worte und vor allem danke für deine Freundschaft und Unterstützung.